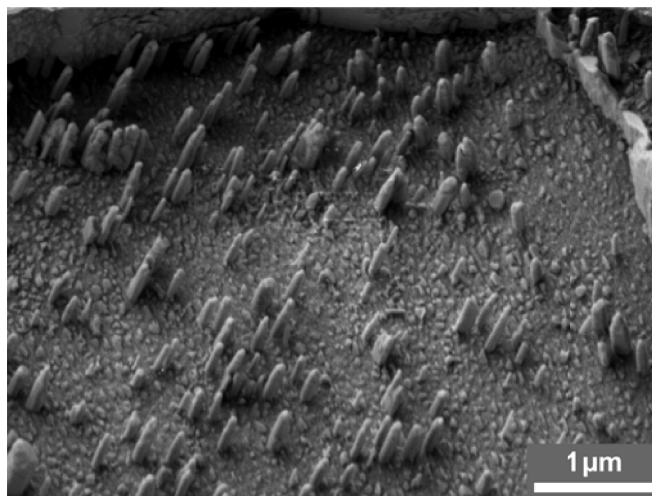

Direkte Beobachtung des Wachstums von
Calciumcarbonatkristallen auf den Oberflächen
von frisch gewachsenen „flat pearls“ und auf
frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen

Klaudia Rückmann



**Direkte Beobachtung des Wachstums von
Calciumcarbonatkristallen auf den Oberflächen
von frisch gewachsenen „flat pearls“ und auf
frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen**

Im

Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik (FB1)
der Universität Bremen

von

M. Sc. Klaudia Rückmann

im November 2022

eingereichte Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Erstgutachterin: Prof. Dr. Monika Fritz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan Bornholdt

Eingereicht am: 02.11.2022

Tag des Promotionskolloquiums: 04.07.2023

Abstract

Nacre is a biogenic polymer-mineral composite material containing mineral layers made of confluent aragonite platelets (about 98 wt.%) and organic material (2 wt.%). The 500 nm thick polygonal-shaped aragonite platelets have diameters in the μm range. Edges of the mineral platelets are surrounded by the so-called intertabular organic matrix (ITM). The interlamellar organic matrix (ILM) – an organic layer with a thickness of about 40 nm – separates the different confluent mineral layers. Own AFM investigations of the interlamellar matrix carried out in liquid environment (deionised water) have shown that the ILM consists of a network-like structure of randomly oriented and intertwined chitin filaments with holes up to 200 nm. Different protein molecules are bound to these chitin filaments affecting the biomineralization process [1, 2].

Two different types of samples obtained from natural nacre of the gastropod *Haliotis tuberculata* – (1) **freshly grown flat pearl nacre** and (2) **freshly cleaved nacre surfaces** – were used to study the artificially induced nucleation and growth of calcium carbonate (CaCO_3) crystals directly by AFM-observations. To prepare freshly grown flat pearl nacre, cover glass discs were inserted into the extrapallial space between the mantle epithelium and the shell of living seawater snails [3, 4]. Freshly cleaved nacre surfaces were prepared from the shells of seawater snails [4].

The surface structures of both kinds of samples were characterized by AFM. Therefore, native samples were imaged with the AFM in liquid environment (0,9 mM or 1 mM CaCO_3 solution). On the freshly cleaved nacre surface the polygonal-shaped aragonite platelets could be observed very well. Growth fronts of freshly grown flat pearl nacre consist of small stacked aragonite platelets with upstairs decreasing lateral dimensions forming the so-called „stacks of coins“. Here, the organic layers covering the single aragonite platelets are clearly visible [4, 5].

To observe artificial biomineralization several AFM-sequences were recorded. To initiate crystal growth on both sample types defined volumes of the initial CaCO_3 solution (0,9 mM or 1 mM) were replaced several times by supersaturated solutions (2 mM, 4 mM or 5 mM). These solution exchanges were carried out carefully during AFM imaging to observe nucleation processes directly. On both surfaces, freshly grown flat pearl nacre and freshly cleaved nacre surfaces, artificially induced nucleation and the growth of preferably needle-shaped crystals were observed for the first time with the AFM. Stronger and faster crystal-growing processes were observed at the boundaries and at the central region of aragonite platelets as might be expected from the distribution of e.g. carboxyl groups and proteins within the chitin filament network of the thin organic layer (ILM) [5, 6].

In addition, REM investigations were carried out on both types of samples where crystal growth were initiated and observed successfully within the AFM-experiment. Here, structures, distances and densities of artificial grown crystallites were studied in detail.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
2	Perlmutter - Grundlagen und Stand der Forschung	4
2.1	Die kristallinen Modifikationen des Calciumcarbonats	4
2.2	Kristallisationsprozesse	8
2.3	Aufbau des Perlmutter	11
2.3.1	Die interlamellare organische Matrix (ILM)	13
2.3.2	Zusammensetzung der interlamellaren und intertabularen organischen Matrix (ILM und ITM)	18
2.3.3	Die lösliche organische Matrix	20
2.3.4	Proteine in der organischen Matrix	23
2.4	Natürliches Aragonitwachstum in den Schneckenschalen und Wachstumsmodelle	26
2.5	Farberscheinungen an Perlmutter und „flat pearls“	32
3	Experimentelle Grundlagen zu AFM und REM	35
3.1	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	35
3.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	40
3.2.1	Sekundärelektronen	42
3.2.2	Rückstreuielektronen	45
4	Präparations- und Untersuchungsmethoden	47
4.1	Präparation der CaCO ₃ -Lösungen	47
4.2	Probenpräparation	51
4.2.1	Herstellung der „flat pearls“	51
4.2.2	Präparation der Wachstumsfronten aus „flat pearls“	55
4.2.3	Erzeugung der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen	56
4.2.4	Präparation der Wachstumsfronten und Perlmutterpaltflächen für AFM-Untersuchungen	58
4.3	Proteinpräparation und Bestimmung der Proteinkonzentration	61
4.4	AFM-Versuchsaufbau und Vorbereitungen für AFM-Untersuchungen	63
4.4.1	Reinigungsprozeduren	64
4.4.2	Sondenhalter für AFM-Untersuchungen	65
4.4.3	AFM-Versuchsaufbau für Strukturuntersuchungen in Flüssigkeit und für Wachstumsexperimente	67

4.4.4	Kalibrierung der AFM-Sonden	69
4.4.5	Austausch der CaCO ₃ -Lösungen während der AFM-Wachstumsexperimente	71
4.5	Erarbeitung einer Präparationsmethode für ergänzende REM-Untersuchungen	75
5	Ergebnisse und Diskussionen	82
5.1	Charakterisierung der Wachstumsfronten von „flat pearls“ mittels AFM . .	82
5.1.1	Charakterisierung der Oberflächenstruktur	82
5.1.2	Bestimmung der Filamentdurchmesser der organischen Matrix . . .	95
5.1.3	Vergleichsuntersuchung zur Eignung der beiden AFM-Sondenarten .	99
5.2	Direkte Beobachtung des induzierten Wachstums auf „flat pearl“-Oberflächen	102
5.2.1	Erstes Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche . . .	103
5.2.1.1	Aufnahme der AFM-Bildsequenz	103
5.2.1.2	Ergänzende Charakterisierung der Wachstumsfront nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM	112
5.2.1.3	Bestimmung der lateralen Ausdehnungen einzelner Aragonitplättchen	116
5.2.2	Zweites Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche . . .	118
5.2.2.1	Aufnahme der AFM-Bildsequenz	118
5.2.2.2	Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder . . .	126
5.2.2.3	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten	130
5.2.2.4	Ergänzende Charakterisierung der Wachstumsfront nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM	135
5.3	Charakterisierung der Perlmutterpaltflächen mittels AFM	141
5.3.1	Charakterisierung der Oberflächenstruktur	141
5.4	Direkte Beobachtung des induzierten Wachstums auf Perlmutterpaltflächen	156
5.4.1	Erstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche	158
5.4.1.1	Voruntersuchung: AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur	158
5.4.1.2	Aufnahme der AFM-Bildsequenz	162
5.4.1.3	Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder . . .	169
5.4.1.4	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten	171
5.4.1.5	Ergänzende Charakterisierung der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM	174
5.4.2	Zweites Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche	180
5.4.2.1	Aufnahme der AFM-Bildsequenz	180
5.4.2.2	Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder . . .	185

5.4.2.3	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten	187
5.4.2.4	Ergänzende Charakterisierung der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM	190
5.4.3	Drittes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche	201
5.4.3.1	Aufnahme der AFM-Bildsequenz	201
5.4.3.2	Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder	206
5.4.3.3	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten	207
5.4.3.4	Ergänzende Charakterisierung der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM	209
5.4.4	Weitere Wachstumsexperimente auf Perlmutterpaltflächen	213
6	Zusammenfassung und Ausblick	230
7	Danksagung	236
8	Literaturverzeichnis	237
9	Publikationen und Vorträge	255
10	Anhang	257
10.1	Spezifikationen der verwendeten AFM-Sonden	257
10.2	Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.1	258
10.3	Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.2	264
10.4	Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.3	267
10.5	Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.4	268
10.6	Materialliste	284
10.7	Geräteliste	292
10.8	Softwareliste	293
10.9	Abkürzungsverzeichnis	293
10.10	Einheitenverzeichnis	294
10.11	Formelverzeichnis	295
10.12	Chemisches Formelverzeichnis	295
	Abbildungsverzeichnis	297
	Tabellenverzeichnis	303

1 Einleitung und Motivation

Durch die Kombination verschiedener Materialien sowie deren geometrische Anordnung zueinander entstehen Verbundmaterialien – auch Komposite genannt –, deren mechanische Eigenschaften, wie z.B. Härte, Elastizität, Stabilität und Biegefestigkeit gezielt verändert und positiv beeinflusst werden können [2, 4]. Als Biominerale bezeichnet man die in der Natur vorkommenden Verbundmaterialien, die sehr oft aus in eine organische Matrix eingelagerten und/oder eingewachsenen, ursprünglich recht spröden Mineralkristallen aus Modifikationen des Calciumcarbonats oder des Calciumphosphats bestehen [2]. Dazu gehören z. B. die aus Hydroxylapatit-Mineralplättchen und Kollagenfasern bestehenden Knochen und Zähne von Wirbeltieren, aber auch Kieselalgen, Weizengrannen und Schachtelhalme, bei denen in die organische Matrix Siliziumdioxid eingelagert ist [4, 7]. Dabei können Biominerale in einem Organismus auch bestimmte Aufgaben erfüllen, so sind z. B. in den Skeletten von Schlangensterne aus Calcitkristallen bestehende, optische Mikrolinsen eingebaut und die sogenannten magnetotaktischen Bakterien können sich durch die Einbettung von Eisenoxid-Nanoteilchen im Erdmagnetfeld orientieren [2, 4]. Die zuerst durch Selbstassoziation entstehende organische Matrix dient dabei als Grundgerüst, das Form, Anordnung und Geometrie der später gebildeten Mineralkristalle festlegt [4].

Das die innere Schalenschicht von Meeresschnecken und Muscheln bildende und aufgrund optischer Mehrfachinterferenzen bunt schimmernde Perlmutter ist ein biogener Verbundwerkstoff. Dieser besteht aus vielen einzelnen polygonal geformten Aragonitplättchen mit lateralen Ausdehnungen im Bereich einiger Mikrometer, die in den Zwischenräumen der durch Selbstassoziation entstandenen und entsprechend vorgeformten organischen Schichten, die eine organische Matrix bilden, gewachsen sind [4, 5]. Dabei bilden die Aragonitplättchen in horizontaler Richtung ausgedehnte und konfluente (durchgehende) Schichten mit Höhen von etwa 500 nm, die der mittleren Wellenlänge des sichtbaren Lichts entsprechen [1, 4]. Die benachbarten Plättchen in diesen horizontalen Schichten sind durch jeweils dünne organische Schichten der sogenannten intertabularen Matrix (ITM) voneinander getrennt. Im Perlmutter sind nun viele dieser horizontalen, konfluenten Schichten, die jeweils durch die interlamellare organische Matrix (ILM) getrennt sind, versetzt übereinander gewachsen, sodass eine stabile und elastische „Mauersteinanordnung“ aller Aragonitplättchen vorliegt [5]. Wie bereits in eigenen Untersuchungen [1, 2, 4] gezeigt werden konnte, besteht die unlösliche organische Matrix größtenteils aus mehr oder weniger geradlinig verlaufenden, netzwerkartig verflochtenen Chitinfilamenten, an die zahlreiche verschiedene Proteinmoleküle gebunden sind, die als Nukleationskeime während des Aragonitwachstums dienen können und so die Biomineralisation beeinflussen. Aufgrund der

hohen biologischen Verträglichkeit kann Perlmutter z. B. als Zahn- und Knochenersatzwerkstoff eingesetzt werden [2]. Neben der biologischen Verträglichkeit erwartet man durch die organische Matrix – zusätzlich zu der durch das Calciumcarbonat bedingten Festigkeit – vor allem Elastizität und Biegefestigkeit [4, 8]. Darüber hinaus ist es durchaus denkbar, dass bei Überlastung, Bruch oder Überdehnung eventuell eine Selbstheilung des Materials möglich ist [2].

Deshalb ist eine künstliche Herstellung von Perlmutter von großem Interesse. Dazu muss jedoch zuerst der natürliche und danach erst ein induzierter Wachstumsprozess der Aragonitkristalle in der organischen Matrix untersucht und besser verstanden werden. Diese Untersuchungen sind Ziel der vorliegenden Arbeit. Bisher konnte die Nukleation und das Wachstum von Aragonitkristallen, die in den lateralen Zwischenräumen der vorher ausgebildeten organischen Schichten entstehen, noch nicht direkt beobachtet werden. Allgemein wird angenommen, dass die Aragonitkristalle zunächst verstärkt entlang der \vec{c} -Achse in die [001]-Richtung bis zu einer Höhe von etwa 500 nm wachsen [5]. Die Anwesenheit der vorgeformten organischen Schicht hemmt nun das weitere Wachstum in [001]-Richtung, sodass das Wachstum nun stärker lateral in die [100]- und [010]-Richtung erfolgt und sich schließlich Kristallite verbinden und so flache, etwa 500 nm dicke Aragonitplättchen entstehen [3, 5]. In der Literatur werden für die Entstehung der typischen Plättchenform des Aragonits bei der Perlmutterbildung verschiedene Wachstumsmodelle, wie z. B. das heteroepitaktische Wachstum, das ionotrope Modell oder das Mineralbrückenmodell diskutiert [4, 5].

In der vorliegenden Arbeit erfolgt nun erstmals mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM) die direkte Beobachtung der Nukleation und des Wachstums von Calciumcarbonatkristallen über jeweils längere Zeiträume auf zwei Arten von Probenoberflächen. Das sind *erstens* die aus sogenannten „flat pearls“ gewonnenen Wachstumsfronten und *zweitens* die frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen, auch Perlmutterspaltflächen genannt.

Für die Herstellung der „flat pearls“ werden abiotische Substrate (z. B. Deckgläser) im extrapallialen Raum zwischen dem Mantelepithel des Schneckenkörpers und der inneren Schalenseite lebender Meeresschnecken inkubiert [4, 9]. Das auf dem inkubierten Substrat aufgewachsene Schalenmaterial wird dann als „flat pearl“ bezeichnet [3, 9]. Hier bieten die aus den sogenannten „stacks of coins“ (Stapel unterschiedlich großer übereinanderliegender Aragonitplättchen) bestehenden weißlich erscheinenden Wachstumsfronten einen guten Zugang zu den einzelnen Aragonitplättchen und zu der organischen Matrix, die diese Aragonitplättchen bedeckt sowie zu der organischen Matrix zwischen den verschiedenen „stacks of coins“ [4]. Zusätzlich ist aufgrund der definierten Inkubationszeiträume das genaue Alter des aufgewachsenen Schalenmaterials bekannt [3, 4]. Dagegen werden die

Perlmuttspaltflächen, bei denen die einzelnen, lateral benachbarten Aragonitplättchen in den horizontal verlaufenden, konfluenten Schichten gut beobachtbar sind, aus den Schnecken- und Meeresschnecken erzeugt [4, 10]. Für die Initiierung des Kristallwachstums auf den jeweiligen Probenoberflächen während des direkten Abbildens mit dem AFM werden übersättigte CaCO_3 -Lösungen verschiedener Konzentrationen verwendet. Aus den Beobachtungen dieser Wachstumsexperimente werden Hinweise zum Aragonitwachstum im Perlmutter gewonnen. Nach Durchführung der AFM-Wachstumsexperimente erfolgt zusätzlich die Untersuchung und Charakterisierung derselben Proben mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM).

Im Kapitel 2 werden die Grundlagen und der Stand der Forschung zu den Modifikationen des Calciumcarbonats und den Kristallisationsprozessen, zum Aufbau des Perlmutts und der organischen Matrix, zu den in der organischen Matrix vorhandenen biomineralisierenden Proteinen sowie zu den bisher in der Literatur diskutierten Wachstumsmodellen behandelt. Das Kapitel 3 widmet sich den Grundlagen der beiden genutzten experimentellen Techniken Rasterelektronen- und Rasterkraftmikroskopie. Im Kapitel 4 erfolgt sowohl die Beschreibung der Reinigungsprozeduren und Vorbereitungen für die AFM-Untersuchungen als auch die Beschreibung der recht aufwendigen Herstellungs- und Präparationsprozeduren der Wachstumsfronten aus „flat pearls“ und der Perlmuttspaltflächen für die AFM- und REM-Untersuchungen. Im Kapitel 5 werden die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen beider Probenarten – Wachstumsfronten und Perlmuttspaltflächen – und die Ergebnisse der Wachstumsexperimente auf diesen Probenoberflächen detailliert beschrieben und diskutiert. Im Kapitel 6 folgt schließlich die Zusammenfassung und ein Ausblick.

2 Perlmutt - Grundlagen und Stand der Forschung

Perlmutter ist ein natürlich gewachsenes und daher ein biologisch sehr gut verträgliches, starkes und zähes Polymer-Mineral Verbundmaterial, das zu etwa 98 wt.% aus polygonalen, jeweils etwa 500 nm dicken Aragonitplättchen besteht, die sowohl nebeneinander als auch versetzt übereinander innerhalb einer organischen Matrix angeordnet sind [4, 5]. Das durch Biomineralisation entstandene Aragonit ist eine Kristallisationsform des Calciumcarbonats und wird in Abschnitt 2.1 näher eingeordnet und beschrieben [2, 4]. In Abschnitt 2.2 finden sich Anmerkungen zum Keimbildungs- und Kristallisationsprozess des Calciumcarbonats. Darüber hinaus erfolgt die Beschreibung des detaillierten Aufbaus der inneren, aus Perlmutter bestehenden Schalenschicht von Meeresschnecken in Abschnitt 2.3 und der verschiedenen für die Entstehung der Perlmuttertschicht diskutierten Wachstumsmodelle in Abschnitt 2.4 sowie die Erklärung der Farberscheinungen an den unterschiedlichen Probenarten – Wachstumsfronten und Perlmutterpaltflächen – in Abschnitt 2.5.

Generell ist Calciumcarbonat eines der häufigsten, wenn nicht sogar das wichtigste Biomineral. Diese Biomineralisation, die u. a. von Meeresschnecken und Muscheln sowie von Zähnen und Knochen der Säugetiere her bekannt ist, ist eine sehr wichtige CO₂-Senke neben anderen CO₂- bzw. kohlenstoffbindenden Prozessen, wie z. B. Kalkabscheidungen im Meer (Sedimentschichten, Fossilien), der Bildung von Kalkstein und Dolomit sowie der Photosynthese [11, 12]. Die durch Biomineralisation im Einzelnen entstehende Größe, Struktur und Morphologie des Calciumcarbonats wird in der Natur offenbar über den Wassergehalt, den pH-Wert, die Temperatur, den Kristallisationsweg und über räumliche Beschränkungen beim Wachstumsprozess sowie über Additive, wie z. B. saure Proteine oder Mg²⁺-Ionen, beeinflusst oder sogar darüber gesteuert [13].

2.1 Die kristallinen Modifikationen des Calciumcarbonats

Man unterscheidet fünf kristalline Modifikationen und eine amorphe Form (ACC¹) des Calciumcarbonats, das ein Calciumsalz der Kohlensäure ist [14, 15]. Die drei kristallinen wasserfreien, in der Natur vorkommenden Polymorphe sind Calcit, Aragonit und Vaterit [2, 4]. Die Eigenschaft in diesen drei Formen aufzutreten, heißt Trimorphie des Calciumcarbonats [4, 16]. Das Calciumcarbonat ist ein Ionenkristall und besteht aus zweifach positiv geladenen Calciumionen (Ca²⁺-Ionen) und zweifach negativ geladenen Carbonationen (CO₃²⁻-Ionen) [4, 17]. Bei den drei Modifikationen sind die Ionen im Kristallgitter entsprechend unterschiedlich angeordnet [14, 16]. Neben diesen drei wasserfreien Modifikationen existieren noch zwei hydratisierte Formen des Calciumcarbonats, das Monohy-

¹amorphes Calciumcarbonat, englisch: amorphous calcium carbonate

drocalcit² und das Ikaït³ [14, 19]. In diesem Abschnitt werden nur die drei wasserfreien Modifikationen - Calcit, Aragonit und Vaterit - näher betrachtet.

Carbonate bestehen immer aus Carbonationen (CO_3^{2-} -Ionen), aber verschiedenen zweiwertigen Kationen, wie z. B. Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Zn^{2+} -, Sr^{2+} -, Pb^{2+} - oder Ba^{2+} -Ionen⁴ [4, 16]. Der Ionenradius r_{Ion} der zugehörigen Kationen ist entscheidend für die Ausbildung der Kristallstruktur. So bildet sich eine trigonale Kristallstruktur stets dann aus, wenn der Ionenradius $r_{\text{Ion}} < 1,08 \text{ \AA}$ ist und eine orthorhombische Kristallstruktur entsteht bei Ionenradien $r_{\text{Ion}} > 1,08 \text{ \AA}$ [14, 16]. Die Ionenradien betragen z. B. $0,72 \text{ \AA}$ bei Mg^{2+} -Ionen, $0,69 \text{ \AA}$ bei Fe^{2+} -Ionen⁵, $0,83 \text{ \AA}$ bei Zn^{2+} -Ionen und $0,75 \text{ \AA}$ bei Mn^{2+} -Ionen⁶ [16, 26]. So kristallisieren Magnesit (MgCO_3), Siderit (FeCO_3), Rhodochrosit (MnCO_3) und Smithsonit (ZnCO_3) in der trigonalen Calcit-Struktur, aber Strontianit (SrCO_3), Cerussit (PbCO_3) und Witherit (BaCO_3) bilden eine orthorhombische Kristallstruktur⁷ aus [16]. Ca^{2+} -Ionen weisen einen mittleren Radius von $1,08 \text{ \AA}$ auf und können somit sowohl in der trigonalen Calcit-Struktur als auch in der orthorhombischen Aragonit-Struktur kristallisieren [4, 16]. Sogar die hexagonale Vaterit-Struktur kann von Calciumcarbonat gebildet werden [4, 14]. Darüber hinaus treten auch Carbonatgesteine mit verschiedenen zweiwertigen Kationen auf [2]. So enthält z. B. Dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) neben Ca^{2+} -Ionen auch Mg^{2+} -Ionen [16].

Calcit

Calcit – auch Kalkspat genannt – kommt in großer Formenvielfalt vor, tritt jedoch besonders häufig in rhomboedrischer, skalenödrischer, tafeliger (Pinakoid) oder prismatischer Ausbildung auf [4, 16]. Es kristallisiert im trigonalen Kristallsystem und weist die folgenden Gitterparameter auf: $a = b = 4,98 \text{ \AA}$ und $c = 17,02 \text{ \AA}$ [2, 28]. Bekannt sind auch häufige Zwillingsbildungen, so treten z. B. Kontaktzwillinge, polysynthetische Zwillinge und durch tektonische Verformung hervorgerufene Druckzwillinge auf [29, 30]. Je nach Grad der Verunreinigung variiert die Farbe und Dichte der Calcitkristalle, wobei die Dichte im Bereich

²Calciumcarbonat-Monohydrat mit $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [18, 19]

³Calciumcarbonat-Hexahydrat mit $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [18, 19].

Ikaït, das zuerst am Grund des Ikka-Fjords in Grönland entdeckt wurde [20, 21], bildet sich in der Natur nur bei Temperaturen im Bereich von -2°C bis 7°C [22] und kommt z. B. in Antarktischem Schelfeis [23, 24] und in Salzseen [25] vor. In wässrigen Lösungen ist Ikaït bei allen Temperaturen und niedrigen Drücken thermodynamisch weniger stabil als Calcit [22]. Oberhalb von 7°C oder bei Veränderung der geologischen Umgebungsbedingungen findet meist die Umwandlung von natürlich gebildetem Ikaït in Calcit oder Vaterit statt [18, 19].

⁴Magnesiumionen (Mg^{2+} -Ionen), Zinkionen (Zn^{2+} -Ionen), Strontiumionen (Sr^{2+} -Ionen), Blei(II)-Ionen (Pb^{2+} -Ionen) und Bariumionen (Ba^{2+} -Ionen)

⁵Eisen(II)-Ionen

⁶Mangan(II)-Ionen

⁷Die Ionenradien betragen $1,35 \text{ \AA}$ bei Sr^{2+} -Ionen, $1,41 \text{ \AA}$ bei Pb^{2+} -Ionen und $1,55 \text{ \AA}$ bei Ba^{2+} -Ionen [16, 27].

zwischen $2,6 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ und $2,8 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ liegen kann⁸ [14, 31]. Calcit hat eine Mohshärte von 3 und weist eine sehr gute Spaltbarkeit entlang bevorzugter Spaltflächen⁹ auf [4, 31]. So erhält man bei Spaltung eines Calcitkristalls stets einen rhomboedrischen Spaltungskörper [32]. Calcit tritt von den wasserfreien Calciumcarbonatmodifikationen geologisch am häufigsten auf, so z. B. als Hauptbestandteil von Kalkstein und Mergeln sowie von metamorph gebildetem Marmor [29, 31]. Auch Stalaktiten und Stalagmiten, die nicht nur in Höhlen, sondern auch z. B. unter Betonbrücken zu bewundern sind, bestehen größtenteils aus Calcit [4, 29]. Weiterhin kommt es in Kalksintern, Erzgängen und Karbonatiten¹⁰ vor [31]. Als Biomineral findet man es recht häufig, so z. B. in Schalen von Vogeleiern [34], in der äußeren Schalenschicht von Mollusken [35], in den Zellwänden von Kalkalgen [36], in den Schalen von marinen Foraminiferen (marinen Einzellern) [35], im Exoskelett von Crustaceen (Krebstieren) [37], als optische Mikrolinsen in den Skeletten von Schlangensterne [7, 38] und in den Augenlinsen von fossilen Trilobiten¹¹ [37] sowie in nanokristalliner Form als Bestandteil der Schwerkraftrezeptoren¹² im Innenohr von Säugetieren [4, 14].

Aragonit

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zum Kristallwachstum ist das Aragonit von besonderer Bedeutung. Aragonit ist unter Normalbedingungen thermodynamisch weniger stabil als die Calcit-Modifikation¹³ [4, 16]. Es bildet eine orthorhombische Kristallstruktur aus, deren Einheitszelle durch die Gitterparameter $a = 4,95 \text{ \AA}$, $b = 7,96 \text{ \AA}$ und $c = 5,74 \text{ \AA}$ charakterisiert wird [5, 15]. In [001]-Richtung entlang der \vec{c} -Achse, welche der Wachstumsrichtung entspricht, wechseln sich Doppelschichten aus Carbonationen und Schichten aus Calciumionen ab (siehe Abb. 1) [4, 17]. Aragonit, das im Gegensatz zum Calcit keine bevorzugten Spaltflächen besitzt, weist eine höhere Dichte von $2,95 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ und eine etwas höhere Mohshärte von 3,5 bis 4 auf [4, 16]. Perlmutt, das z. B. die innere Schalenschicht von Mollusken (Weichtieren) bildet, besteht aus vielen in eine organische Matrix eingebetteten, flachen und polygonalen Aragonitplättchen, die vorwiegend in [100]- und [010]-Richtung entlang der \vec{a} -Achse bzw. \vec{b} -Achse wachsen [4, 5]. Da das Wachstum des Aragonits entlang der \vec{c} -Achse in [001]-Richtung durch die Anwesenheit

⁸Reiner Calcit hat eine Dichte von $2,7 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ [31].

⁹(211)-Ebenen in Miller Indizes [14]

¹⁰Karbonatite sind magmatische Gesteine, bei denen der Anteil der Karbonatminerale mehr als 50 % beträgt [33].

¹¹meeresbewohnende Arthropoden (Gliederfüßer) [39]

¹²Die Otolithen (Ohrsteinchen, Gehörsteinchen) sind fassförmige Calcitkristalle mit einer Größe im Mikrometerbereich [40].

¹³Aragonit ist für eine gegebene Temperatur bei höheren Drücken thermodynamisch stabiler als Calcit [41].

von organischen Komponenten gehemmt wird, entsteht die typische Plättchenform [2, 5]. Auch bei der sogenannten Biorock-Technologie zur Herstellung von Wellenbrechern an Stränden lagern sich an Metallkonstruktionen, die im Meer installiert wurden und an die eine geringe Spannung¹⁴ angelegt ist, vorwiegend Aragonitkristalle ab, die dann insgesamt eine Stabilität von Leichtbeton erreichen [42, 43].

Das in der Natur seltener als Calcit vorkommende Aragonit wird dort hauptsächlich durch hydrothermale Prozesse gebildet [4, 44]. Dabei entstehen kristalline Strukturen durchaus in großer Formenvielfalt, wie z. B. dendritische und nadelartige sowie säulen- und kugelförmige Strukturen [4, 45]. So kommt es z. B. in Hohlräumen in vulkanischen Gesteinen und in Sinterkrusten oder Sprudelsteinen vor, die als Ausfällungen in thermalen Quellen entstehen [4, 16]. Als Biomineral ist es Bestandteil der Schalen von Schildkröteneiern [46, 47] und der Exoskelette von Steinkorallen [48] sowie des Perlmutter in den Schalen von Mollusken [4, 35]. Zusätzlich tritt es als Otolithen (Gehörsteinchen) von Fischen auf [49].

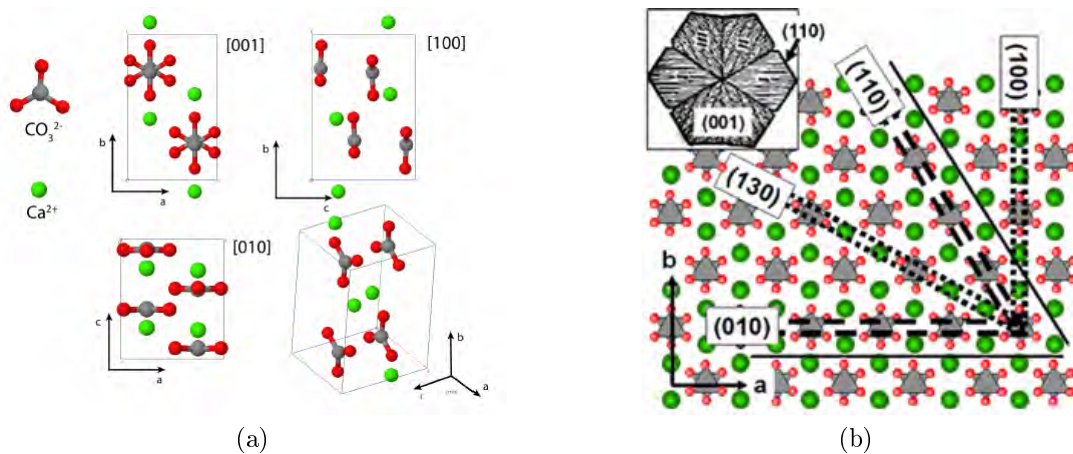


Abbildung 1: (a) Aragonit-Kristallstruktur: Anordnung der Calciumionen (Ca^{2+} -Ionen) und Carbonationen (CO_3^{2-} -Ionen) in den drei Kristallrichtungen und orthorhombische Einheitszelle (Abb. aus [17]). Entlang der \vec{c} -Achse in [001]-Richtung sind Schichten von Ca^{2+} -Ionen und Doppelschichten von CO_3^{2-} -Ionen in alternierender Reihenfolge angeordnet [2, 17]. (b) Geologischer Aragonitkristall (links oben) und (001)-Ebene des Aragonits mit CO_3^{2-} -Ionen als graue Dreiecke und Ca^{2+} -Ionen als grüne Kreise (Abb. aus [50]).

Die Untersuchungen an z. B. Perlmutter legen nahe, dass die räumliche Beschränkung durch die organische Matrix für die Aragonitbildung mitentscheidend ist, da ohne die organische Matrix rein thermodynamisch Calcit die stabilere Modifikation wäre. Dass eine vorgegebene räumliche Einschränkung oder die Vorgabe bzw. Existenz einer porösen Matrix im Nano- oder Mikrometerbereich vorzugsweise zur Ausbildung von thermodynamisch

¹⁴Bei höherer Spannung lagert sich hauptsächlich Brucit ab [42, 43].

weniger stabileren Kristallmodifikationen und -formen führt, wurde z. B. bestätigt durch Beobachtung der Calciumcarbonatkristallisation auf selbstorganisierenden Monoschichten abgeschiedener Tropfen mit 4 μm bis 10 μm Durchmesser [51] bzw. auf biomimetischen Templates aus DMAP (4-(Dimethylamino)pyridin¹⁵) und aus mit DMAP bedeckten kolloidalen Goldnanopartikeln in wässriger Lösung [52]. Die räumliche Einschränkung stabilisiert die amorphe-Phase (ACC¹⁶) und schränkt die Beweglichkeit der Ionen weg von ihrer Oberfläche ein, sodass deren Auflösung sowie die Keimbildung und Kristallisation verlangsamt werden. Damit können sich auch Kristalle in einer metastabileren Form bilden und in dieser Kristallmodifikation weiterwachsen [13, 53]. So wurde in [54] gezeigt, dass sich räumlich, in spurgeätzten Nanoporen eingeschränktes amorphes Calciumcarbonat in Aragonit-Nanodrähte mit definierten Durchmessern umwandelt. Bei der Mikrostrukturierung handelt es sich um eine Imitation der in der Natur vorherrschenden Gestaltungsprinzipien. Die Art der räumlichen Einschränkung gestattet offenbar eine Kontrolle über die Morphologie der Kristalle [13].

Vaterit

Vaterit, das eine hexagonale Kristallstruktur ausbildet, besitzt eine Einheitszelle mit den Gitterparametern $a = b = 4,13 \text{ \AA}$ und $c = 8,49 \text{ \AA}$ und ist von den drei wasserfreien Modifikationen thermodynamisch am instabilsten [4, 55]. Daher ist Vaterit recht selten anzutreffen, so z. B. als spontane Präzipitate in stagnierenden, natürlichen Gewässern [56, 57]. In biologischen Materialien ist es meistens nur in einem geringen Anteil vorhanden [4, 14]. Als Biomineral findet man Vaterit z. B. in den Schalen von Gastropoden [35] und in den Stacheln von Seescheiden [14, 58] sowie als Bestandteil der Otolithen (Gehörsteinchen) von Fischen [59, 60] und als Bestandteil von Gallensteinen [4, 61].

2.2 Kristallisationsprozesse

Das Kristallwachstum erfolgt nicht einfach spontan aus einer übersättigten Lösung. Zuerst muss sich ein Kristallisationskeim, auch Nukleationskeim genannt, bilden oder bereits vorhanden sein. Bei einer industriellen Kristallzucht wird ein großer Einkristall desselben Materials eingebracht, der die Wachstumsrichtung sowie die bevorzugte Kristallisationsform festlegt und dann unter geeigneten Bedingungen weiterwächst. Bei der Biomineralisation müssen sich die Kristallisationskeime selbstständig aus der übersättigten Lösung entwickeln. Hierbei kann als Kristallisationskeim auch ein Protein fungieren, das durch

¹⁵englisch: 4-dimethylamino-pyridine

¹⁶amorphes Calciumcarbonat

elektrostatische oder strukturelle Wechselwirkungen die Oberflächenenergien beeinflusst [2, 4].

Ein bereits entstandener Nukleationskeim kann nur weiterwachsen, wenn er einen Mindestradius¹⁷ erreicht hat und so die freie Keimbildungsenthalpie abnimmt [4, 14]. Die freie Keimbildungsenthalpie ΔG_K setzt sich zusammen aus der freien Enthalpie ΔG_V (Volumenanteil¹⁸), die bei der Bildung des Keims, also beim Übergang von der übersättigten Lösung in die kristalline Phase, frei wird, und aus der freien Enthalpie ΔG_O (Oberflächenanteil¹⁹), die zur Bildung der Grenzfläche zwischen Nukleationskeim und übersättigter Lösung aufgebracht werden muss [14, 62]. Somit ergibt sich die freie Keimbildungsenthalpie ΔG_K zu:

$$\Delta G_K = \Delta G_V + \Delta G_O = V \cdot \frac{\Delta g}{v} + A \cdot \sigma \quad , \quad (1)$$

wobei v das Molvolumen der kristallinen Phase, Δg die Differenz der molaren freien Enthalpie der beiden Phasen und σ die spezifische freie Grenzflächenenergie²⁰ sowie V das Volumen und A die Oberfläche des Kristallisationskeims ist [62].

Bei der Entstehung und dem weiteren Wachstum der Kristallisationskeime spielt also deren Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis eine entscheidende Rolle. Die Grenzfläche, die sich zwischen dem Nukleationskeim und der übersättigten Lösung ausbildet, verbraucht durch ihre Oberflächenspannung freie Enthalpie [2]. Betrachtet man einen kugelförmigen Keim, dessen Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis proportional zu $1/r$ ist, nimmt der relative Anteil der Oberfläche mit kleiner werdendem Radius r zu und somit wird mehr freie Enthalpie verbraucht [2, 4]. Das System wird also bestrebt sein, zu kleine Nukleationskeime zugunsten größerer Nukleationskeime schnell wieder aufzulösen oder kleinere Nukleationskeime zu größeren zusammenzufassen. Ein ähnliches Verhalten ist aus dem gleichen physikalischen Grund von sich berührenden Seifenblasen her bekannt, bei denen die kleinere die größere aufbläst. Somit ist anschaulich klar, dass der Nukleationskeim nur weiterwachsen kann, wenn er die Mindestgröße überschritten hat [2]. Dieses Verhalten wird als Ostwald-Reifung bzw. Ostwald-Ripening bezeichnet und ist auch aus der Kolloidchemie bekannt [4, 63]. Für das Kristallwachstum sind daher Kristallisationskeime, die weiterwachsen notwendig.

¹⁷Betrachtet man die freie Keimbildungsenthalpie ΔG_K in Abhängigkeit des Keimradius, so liegt der Mindestradius bzw. kritische Radius beim Maximum von ΔG_K [14, 62].

¹⁸Dabei gilt immer: $\Delta G_V < 0$. Die freie Enthalpie ΔG_V ist proportional zum Volumen des Nukleationskeims [62].

¹⁹Dabei gilt immer: $\Delta G_O > 0$. Die freie Enthalpie ΔG_O ist proportional zur Oberfläche des Nukleationskeims [62].

²⁰Die spezifische freie Grenzflächenenergie entspricht hier der Oberflächenspannung [62].

Von der Biomineralisation des Calciumcarbonats ist bekannt, dass das Kristallwachstum oft durch Festkörperumwandlung aus der amorphen Phase (ACC) erfolgt, da diese amorphe Phase die thermodynamisch günstigste Variante ist, die zuerst aus der CaCO_3 -Lösung entsteht, vorausgesetzt, dass die Lösung für die ACC-Bildung ausreichend übersättigt ist. Bei diesem Prozess werden Wassermoleküle unterschiedlich ins amorphe Calciumcarbonat eingebaut. Das amorphe Calciumcarbonat besteht aus einer nanoporösen Ca-reichen Matrix mit Kanalnetzwerk, das mit Wasser und mit CO_3^{2-} -Ionen gefüllt ist [64]. Dabei sind hier zwei Arten von Wasser zu unterscheiden: *erstens* das wenig bewegliche (rigide) Wasser, das sind direkt an Ca-Atome gebundene Wassermoleküle und *zweitens* sehr mobile Wassermoleküle, die über Wasserstoffbrücken an den Sauerstoff der CO_3^{2-} -Ionen binden. Diese Bindung ist energetisch günstiger als die Brückenbindung zwischen Wassermolekülen. Das Verhältnis von rigidem zu mobilem Wasser entscheidet über die Stabilität der sogenannten ACC-Cluster [13]. Überschreiten die ACC-Cluster eine Größe von etwa 45 nm, so wird z. B. die Calcitbildung gegenüber der ACC-Bildung wieder thermodynamisch günstiger [65, 66].

Aus dieser ACC-Phase treten Festkörperumwandlungen auf, wenn erste Kristallite durch Verbrauchen (Auflösen) der ACC-Matrix entstehen. Bei höherer Temperatur bildet sich vorzugsweise Calcit, bei höherem Druck auch Vaterit. Befindet sich das amorphe Calciumcarbonat in viel mobilem Wasser, so führt das zur schnelleren Auflösung der ACC-Cluster und konsequenterweise zur Keimbildung für die kristalline Phase, da die Lösung in einen Konzentrationsbereich kommt, der für die Kristallbildung noch übersättigt, aber für die ACC-Bildung bereits untersättigt ist. Dabei haben Auflösung und Keimbildung unterschiedliche Geschwindigkeiten [67, 68]. Auch hier spielt das Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis eine entscheidende Rolle: kleinere Partikel lösen sich schneller wieder auf. Die Geschwindigkeit der Auflösung und die der Keimbildung entscheiden mit über die Morphologie der entstehenden Kristalle.

Eine wichtige Rolle beim Kristallisationsprozess spielen die Additive, wie z. B. saure Proteine mit Carboxyl- und/oder Sulfatgruppen, Mg^{2+} -Ionen, Aminosäuren (Asparaginsäure, Glycin, Phosphoserin) und andere carboxylhaltige Moleküle (Citrate, Polyacrylsäure). Viele Additive erhöhen die Stabilität der ACC-Partikel, verzögern damit deren Auflösung und so den Kristallisationsprozess und begünstigen damit aber die Entstehung metastabiler Kristallmodifikationen [13]. Beispielsweise beeinflussen carboxylhaltige Moleküle die Größe, Struktur und Morphologie der wachsenden Kristalle, Mg^{2+} -Ionen stabilisieren die ACC-Partikel durch ihre höhere Ladungsdichte im Vergleich zu Ca^{2+} -Ionen und der dadurch verstärkten Wechselwirkung mit Wasser, eine hohe Konzentration von Citraten in der Lösung unterdrückt die Bildung von Vaterit zugunsten einer Calcitkristal-

lisation [69, 70]. Hochmolekulare Additive verzögern die Bildung von ACC-Partikeln und induzieren so die Bildung von flüssigen CaCO_3 -Phasen (sogenannte polymer-induced liquid precursor²¹) zugunsten einer klassischen Keimbildung für Kristalle [13]. So führt beispielsweise die Zugabe von mehr Polyasparaginsäure (PAsp) zu kleineren Calcitkristallen und zur Bevorzugung von Vaterit [13] sowie die Anwesenheit von Polyacrylsäure (PAA) bzw. Polystyrolsulfonat (PSS) in einer Lösung, die Ca^{2+} -Ionen enthält, zur Bildung von Ca-PAA-Polymernetzwerken bzw. Ca-PSS-Kügelchen, welche die Bildung von ACC-Partikeln verzögern [71, 72]. Solche hochmolekularen Additive beeinflussen somit auch die Struktur, Größe und Morphologie der entstehenden Calciumcarbonatkristalle [13].

2.3 Aufbau des Perlmutts

Das bei Betrachtung im natürlichen Licht bunt schimmernde biogene Polymer-Mineral Verbundmaterial Perlmutter besteht zu 98 wt.% aus vielen durchgehend erscheinenden und übereinanderliegenden etwa 500 nm hohen Aragonitschichten, die aus einzelnen polygonal geformten Aragonitplättchen gebildet werden [4, 5]. Die einzelnen Plättchen, deren laterale Ausdehnungen im Bereich von etwa 5 μm bis 10 μm liegen, sind jeweils von organischer Matrix umgeben, deren Trockenmasse insgesamt nur 2 wt.% beträgt [1, 4]. Die **Abbildung 2** zeigt eine Perlmutterbruchfläche, bei der die lateral aneinandergrenzenden, polygonalen Aragonitplättchen, die in horizontaler Richtung ausgedehnte Aragonitschichten bilden, deutlich sichtbar sind [4, 5]. Diese Aragonitschichten verlaufen wiederum über und unter anderen Schichten, wobei die einzelnen Aragonitplättchen in den übereinanderliegenden Schichten lateral versetzt angeordnet sind [2, 4]. Die Aufnahme dieser Bruchfläche, die aus der Perlmuttertschicht der Schale einer Meeresschnecke (Art *Haliotis tuberculata*) gewonnen wurde, erfolgte im unbeschichteten Zustand mit einem Rasterelektronenmikroskop²² [4]. Dadurch ist die organische Matrix, welche die einzelnen Plättchen in lateraler Richtung und die verschiedenen Aragonitschichten in vertikaler Richtung voneinander trennt, nicht sichtbar [2, 4].

Die **Abbildung 3** zeigt schematisch den Aufbau des Perlmutts aus einzelnen, jeweils in die organische Matrix eingebetteten Aragonitplättchen, deren Höhen etwa der mittleren Wellenlänge des sichtbaren Lichts entsprechen [2, 4]. Die organische Matrix (blau hervorgehoben in der Abb. 3) wird (1) in interlamellare Matrix (ILM) und intertabulare Matrix (ITM) sowie (2) in lösliche und unlösliche Matrix eingeteilt [1, 4]. Die horizontal zwischen übereinanderliegenden Aragonitplättchen befindliche und etwa 30 nm bis zu

²¹PILP

²²Der Begriff Rasterelektronenmikroskop wird im Folgenden auch mit REM abgekürzt.
englisch: scanning electron microscope (SEM)

50 nm dicke interlamellare Matrix besteht aus einem Netzwerk von Chitinfilamenten, an denen verschiedene Proteinmoleküle angelagert sind [1, 2]. Die durch diese netzwerkartige Anordnung der Chitinfilamente entstehenden Löcher bzw. Poren weisen Durchmesser im Bereich von einigen zehn Nanometern bis zu 200 nm auf [1, 4]. Die genauere Beschreibung und Charakterisierung der Oberflächenstruktur der interlamellaren Matrix erfolgt in Abschnitt 2.3.1. Die lateral aneinandergrenzenden Aragonitplättchen werden in horizontaler Richtung durch die wesentlich dünnere und damit auch weniger Material enthaltende intertabulare Matrix voneinander getrennt [4, 5]. Die ITM besteht vermutlich vorzugsweise aus dem Protein Kollagen [5, 73]. Innerhalb der Aragonitplättchen treten sogenannte Nanoporen (NP) auf, die organisches Material aus der ILM und/oder ITM enthalten, die beim Wachstum entstanden sind und vermutlich als Nukleationskeime wirkten [4, 14]. Die Begriffe lösliche und unlösliche Matrix werden in Abschnitt 2.3.3 erklärt.

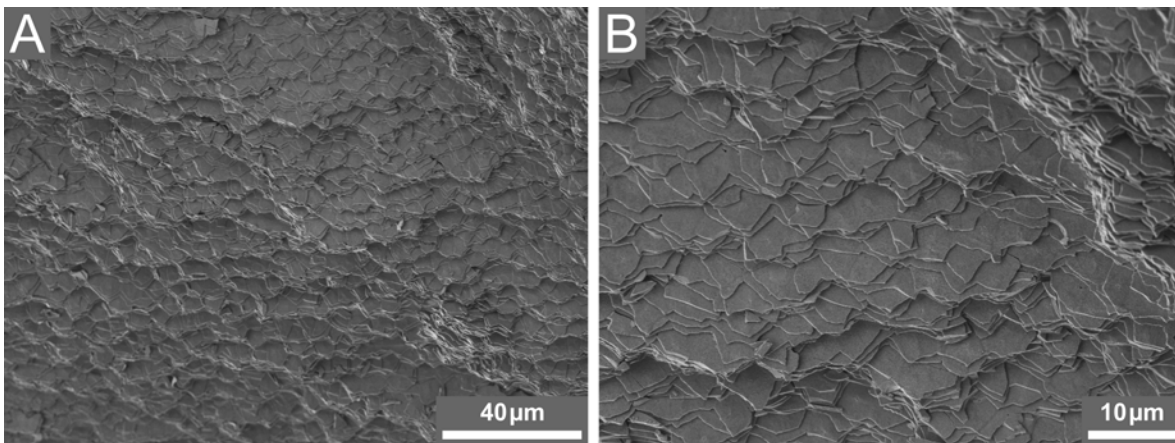


Abbildung 2: REM-Aufnahmen einer Perlmutterbruchfläche, in der die einzelnen, polygonalen Aragonitplättchen und die aus diesen Plättchen bestehenden lateral ausgedehnten Aragonitschichten gut erkennbar sind (Abb. aus [4]). Sehr viele dieser etwa 500 nm hohen Aragonitschichten sind übereinander angeordnet [4, 5]. Die Perlmutterbruchfläche wurde aus der Schale einer Meeresschnecke der Art *Haliotis tuberculata* erzeugt [4].

In den Löchern bzw. Poren der interlamellaren Matrix können sich Mineralbrücken (MB), also vertikale kristalline Verbindungen, zwischen den übereinanderliegenden Aragonitplättchen ausbilden, die einen Durchmesser von etwa 30 nm aufweisen und die Weitergabe der Kristallorientierung an das in der nächsten Schicht neu entstehende, darüber angeordnete Plättchen ermöglichen [4, 14]. Die Höhe der Mineralbrücken entspricht in etwa der Schichtdicke der interlamellaren Matrix zwischen den Aragonitplättchen [1, 18]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die kristallographische Orientierung jeweils innerhalb dieser vertikalen kristallinen Verbindungen konstant bleibt [14, 18]. Die organischen Bestandteile, insbesondere Proteinmoleküle, und die anorganischen Ionen (Calcium- und

Carbonationen) für das Aragonitwachstum können durch die Poren bzw. Löcher in der interlamellaren Matrix zu den entsprechenden Nukleationsstellen diffundieren [1, 2]. Die Sekretion von Protein- und Chitinmolekülen erfolgt durch bestimmte Epithelzellen des Mantels [74]. Die auf den großen, horizontalen Oberflächen ((001)-Flächen) der Aragonitplättchen vorhandenen „nanoasperities“ und die Poren bzw. Löcher in der interlamellaren Matrix erhöhen die Haftreibung zwischen den Aragonitplättchen untereinander sowie zwischen organischer Matrix und Aragonitplättchen [4, 8]. Dadurch nimmt die Widerstandsfähigkeit des Perlmutter gegenüber Scherkräften zu [8, 75]. Diese „nanoasperities“ sind kristallisationsbedingte Unebenheiten mit Höhen von wenigen Nanometern [76, 77]. Die vertikalen Mineralbrücken, die sich zwischen übereinanderliegenden Plättchen ausbilden, und die interlamellare Matrix zwischen den Plättchen tragen ebenfalls zur Elastizität, Bruchfestigkeit und Stabilität der Perlmutter Schicht der Schneckenschalen bei [4, 75]. Die elastischen Chitinfilamente, aus denen die interlamellare Matrix aufgebaut ist, können sich bei Scher- und Zugbelastungen verbiegen und sind dehnbar und stauchbar [2, 4]. Somit können auftretende Kräfte über diese Chitinfilamente an benachbarte Aragonitplättchen übertragen werden [4]. Selbst die durch extreme Krafteinwirkung eventuell zerrissenen Fasern können sich im Netzwerk neu ordnen bzw. neu verbinden und so zu einer Selbstheilung des Verbundmaterials führen [2]. Auch durch die „nanoasperities“, die Mineralbrücken und die interlamellare Matrix ist das Verbundmaterial Perlmutter wesentlich stabiler als reines Aragonit [4, 78].

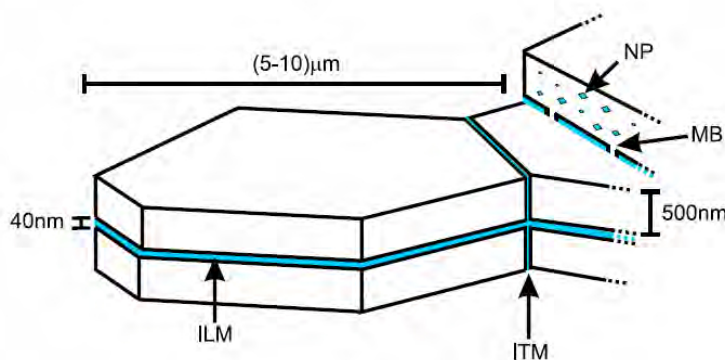


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Perlmutter aus einzelnen polygonalen Aragonitplättchen und organischer Matrix, welche die Plättchen sowohl in vertikaler als auch lateraler Richtung umgibt (Abb. aus [14]). Weitere Erklärungen finden sich im Text.

2.3.1 Die interlamellare organische Matrix (ILM)

Eigene AFM-Untersuchungen in [1, 2] lieferten detaillierte Beiträge zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur der sogenannten unlöslichen organischen Matrix, die aus dem Perlmutter von Schalen der Meeresschnecken der Art *Haliothis laevigata* stammt. Dabei wurde die unlösliche Matrix im nativen, vollständig hydrierten Zustand untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die unlösliche organische Matrix aus einem Netzwerk von miteinander

verwobenen Filamenten besteht, an denen zahlreiche globuläre Strukturen angelagert sind [1, 4]. Bei diesen runden Strukturen handelt es sich um verschiedene an die Filamente gebundene Proteinmoleküle [1].

Für diese umfassenden, eigenen Untersuchungen zur Charakterisierung der unlöslichen organischen Matrix musste zuerst die auf der Außenseite der Schneckenschale vorhandene Calcitschicht mit einem Schlammstrahler²³, der Aluminiumoxidpartikel mit Durchmessern von 0,12 mm bis zu 0,25 mm als Strahlmittel verwendet, entfernt werden [2, 4]. Mehrere aus der verbliebenen Perlmuttertschicht ausgebohrte etwa ein Zentimeter große Perlmuttertscheiben wurden danach zwei Wochen gegen 100 mM Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Lösungen dialysiert, um die Aragonitplättchen, also den mineralischen Anteil, herauszulösen. Um eine möglichst vollständige Entmineralisierung der Perlmutterproben zu ermöglichen, erfolgte der Austausch der EDTA-Lösungen dabei in regelmäßigen Zeitabständen von zwei bis drei Tagen [1]. Da EDTA mit den zweifach positiv geladenen Calciumionen sehr stabile Chelatkomplexe bildet²⁴, wurden die nach vollständiger Entmineralisierung erhaltenen Probestücke der unlöslichen organischen Matrix zusätzlich zwei weitere Wochen gegen 2 mM Calciumchlorid(CaCl₂)-Lösungen dialysiert [2]. Dabei erfolgte der Austausch der CaCl₂-Lösungen ebenfalls alle zwei bis drei Tage [1, 2].

Die **Abbildung 4** zeigt nun eigene, ausgewählte mit dem AFM aufgenommene Oberflächenbereiche der unlöslichen organischen Matrix aus dem Perlmutter von *Haliotis laevigata* in verschiedenen Vergrößerungen [1, 2]. Zahlreiche wabenförmige Abdrücke (Vertiefungen mit erhöhten Rändern) in der unlöslichen Matrix, die offensichtlich durch das Herauslösen der Aragonitplättchen mittels Dialyse entstanden sind und sichtbar die polygonale Form der dort ursprünglich vorhandenen Aragonitplättchen aufweisen, waren bereits in den AFM-Übersichtsaufnahmen mit Scanflächen von 108 µm · 108 µm und 30 µm · 30 µm (Bilder (A) und (B)) gut erkennbar [4]. Zur besseren Sichtbarkeit wurden zwei dieser wabenförmigen Abdrücke im Bild (A) mit weißen Pfeilen markiert. Bei einer Scanfläche von 10 µm · 10 µm (Bild (C1) bzw. (C2)) konnte besonders deutlich der wabenförmige, fast hexagonale Abdruck eines einzelnen Aragonitplättchens beobachtet werden [2]. Die erhöhten Ränder der Vertiefungen entstehen durch die intertabulare organische Matrix, die sich unterhalb der obersten Schicht der interlamellaren organischen Matrix befindet [2]. Darüber hinaus waren auch Reste der ITM, die die einzelnen Aragonitplättchen in der ursprünglich darüber angeordneten Aragonitschicht in vertikaler Richtung umgab, auf der obersten Schicht der ILM und deren versetzte Anordnung zu der ITM in der darunterliegenden Schicht erkennbar [1, 2]. Das demonstriert deutlich die mauersteinartige,

²³Typ WA 70; Sigg Strahltechnik; Jestetten, Deutschland

²⁴EDTA wirkt als Calciumchelator [2, 4].

versetzte Anordnung der Aragonitplättchen in den übereinanderliegenden Schichten [5]. Die ILM besteht sichtbar aus vielen netzwerkartig angeordneten, über- und untereinander verlaufenden Filamenten (Bilder (D) bis (F)) [1, 4].

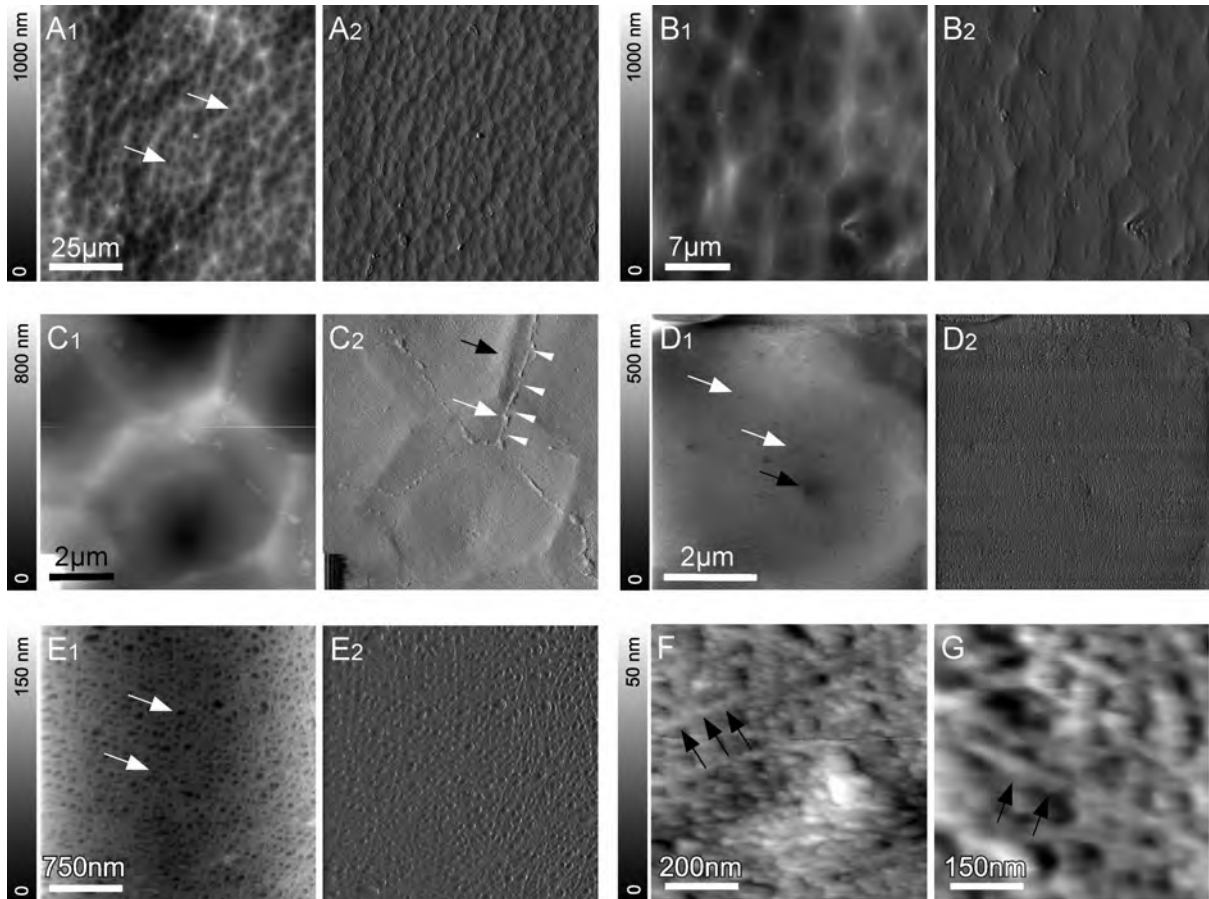


Abbildung 4: Eigene AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur der unlöslichen organischen Matrix, die durch Herauslösen des mineralischen Anteils aus dem Perlmutter von Meeresschnecken (Art *Haliotis laevigata*) mittels Dialyse gegen 100 mM EDTA-Lösungen gewonnen wurde (Abb. aus [1]). Die Strukturuntersuchung der unlöslichen Matrix erfolgte im nativen, vollständig hydrierten Zustand. Links (Bilder mit Index 1) ist jeweils das Höhengensignal und rechts (Bilder mit Index 2) das entsprechende Fehlersignal dargestellt. Die unlösliche organische Matrix besteht aus vielen netzwerkartig angeordneten, miteinander verwobenen Filamenten und aus Poren bzw. Löchern mit Größen im Bereich von einigen 10 nm bis zu etwa 200 nm zwischen den Filamenten [1, 2].

Die in den Bildern (E) und (F) bei kleineren Scanflächen von $3,0\ \mu\text{m} \cdot 3,0\ \mu\text{m}$ und $830\ \text{nm} \cdot 830\ \text{nm}$ deutlich erkennbaren mehr oder weniger geradlinig angeordneten Filamente verlaufen nahezu parallel sowie in mehreren Schichten über- und untereinander und erzeugen dadurch Poren bzw. Löcher mit Größen von einigen 10 nm bis zu etwa 200 nm [1, 2]. Etwa in der Mitte einzelner wabenförmigen Vertiefungen wurden jedoch auch größere Lö-

cher bzw. Poren, von denen eine beispielhaft im Bild (D1) mit weißem Pfeil hervorgehoben ist, beobachtet [1]. In diesem Loch befand sich vermutlich eine Mineralbrücke, die sich in vertikaler Richtung zwischen den nun herausgelösten, zuvor übereinanderliegenden Aragonitplättchen beim Wachstum des Aragonits ausgebildet hatte [4, 18]. In den Bildern (E) und (F) sind die an den Filamenten angelagerten globulären Strukturen verschiedener Größen, die wahrscheinlich auch als Nukleationskeime dienten, deutlich sichtbar [2]. Die Diffusion von organischen Bestandteilen sowie von Calcium- und Carbonationen für das Aragonitwachstum findet durch die Poren zwischen den Filamenten statt [1, 2].

Weitere Proben der unlöslichen organischen Matrix wurden mit einem Protease-Puffer²⁵ behandelt, um die an den Chitinfilamenten angelagerten globulären Strukturen – vermutlich verschiedene Proteinmoleküle – abzulösen [1, 4]. Das Abbilden der Oberfläche eines Probestücks erfolgte während des durch die Protease-Behandlung bewirkten Abbaus von Proteinen direkt mit dem AFM. Der dafür verwendete Protease-Puffer enthielt Proteinase K mit einer Konzentration von $0,02 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und Trypsin mit einer Konzentration von $2,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ [2]. In der **Abbildung 5** sind ausgewählte Bilder aus der mit dem AFM aufgenommenen Bildsequenz dargestellt, welche die Probenoberfläche insgesamt über einen Zeitraum von vier Stunden zeigen. Zu Beginn (Bilder (A)) erfolgte das Abbilden der Probenoberfläche in einem 20 mM Tris/HCl-Puffer, der einen pH-Wert von 8,5 aufwies und zusätzlich nur 3 mM Calciumchlorid enthielt [2]. Zwischen den Aufnahmen der Bilder (A) und (B) wurden nun die Proteasen mit den oben erwähnten Konzentrationen in den Tris/HCl-Puffer hinzugefügt. Die Aufnahme der Bilder (B) bis (H) erfolgte nur über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten [1, 2]. Wie bei Betrachtung der Bilder deutlich erkennbar ist, führte die Behandlung der unlöslichen organischen Matrix mit Proteasen (1) zum Abbau der intertabularen Matrix auf der Oberfläche der interlamellaren Matrix (weiße Pfeile) und (2) zum Abbau der intertabularen Matrix in der darunterliegenden Schicht (schwarze Pfeile) sowie (3) zum Ablösen von Proteinen, die an den Chitinfilamenten der interlamellaren Matrix gebunden waren [1].

Diese Untersuchungen zeigten, dass sowohl die interlamellare Matrix als auch die intertabulare Matrix eine Vielzahl von unterschiedlich stark gebundenen Proteinen enthalten [1, 2]. Weiterhin konnte von uns in [1] gezeigt werden, dass die Proteine Perlucin, Perlwapin, AP8 und Perlustrin in den präparierten Probestücken der unlöslichen organischen Matrix stark an die Chitinfilamente gebunden sind.

²⁵Zusammensetzung: 20 mM Tris/HCl-Puffer mit dem pH-Wert von 8,5, 3 mM Calciumchlorid (CaCl_2), $0,02 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Proteinase K und $2,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Trypsin [1, 2]

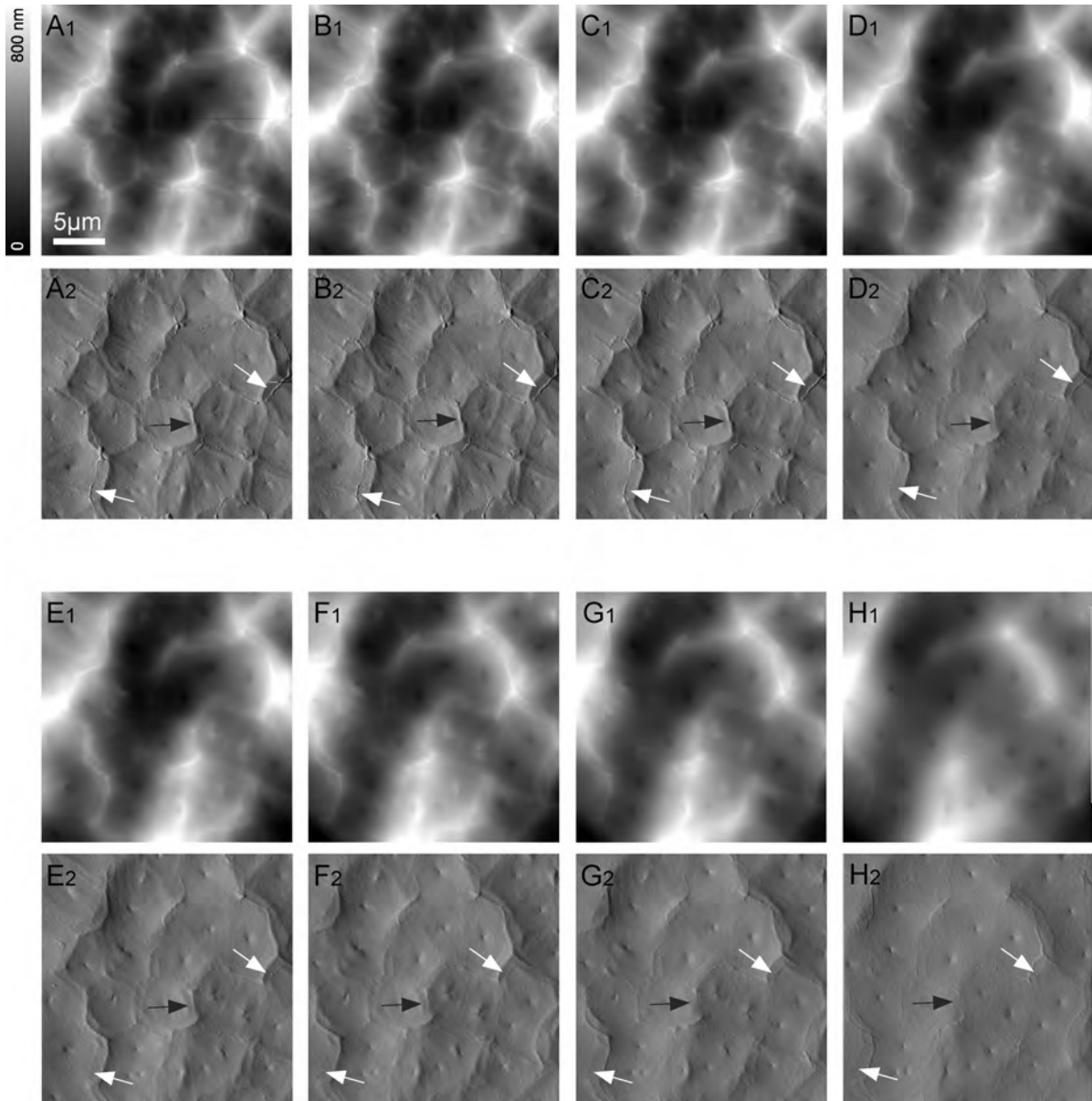


Abbildung 5: Eigene, ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz der Probenoberfläche der unlöslichen organischen Matrix während des durch Proteasen (Proteinase K und Trypsin) hervorgerufenen Abbaus von gebundenen Proteinen (Abb. aus [1]). Jeweils oben (Bilder mit Index 1) sind die Hörsignale und jeweils unten (Bilder mit Index 2) die entsprechenden Fehlersignale dargestellt. Der Einsatz der Proteasen bewirkte den Abbau der ITM auf der Oberfläche der ILM (weiße Pfeile) und in der darunterliegenden Schicht (schwarze Pfeile) sowie das Ablösen von Proteinen der ILM [1, 2].

Von Weiss et al. in [73] und von Bezares et al. in [6] konnte gezeigt werden, dass die interlamellare Matrix der Meeresschnecke *Haliotis rufescens* größtenteils aus dem Polysaccharid Chitin besteht. Bezares et al. gelangen zusätzlich der Nachweis, dass Chitin auch Bestandteil der intertabularen Matrix ist [6]. Anhand der beschriebenen Ergebnisse

wurde von uns ein Modell der offenbar hochorganisierten aus Chitinfilamenten bestehenden interlamellaren organischen Matrix entworfen, das in der **Abbildung 6** gezeigt ist. Dabei besitzen die an den einzelnen Filamenten gebundenen Proteinmoleküle unterschiedliche Größen [1, 2]. Die von Falini et al. in [79] durchgeführten Röntgenbeugungsuntersuchungen der unlöslichen Matrix, die aus dem Gladius²⁶ des Kalmars *Loligo sanpaulensis* gewonnen wurde, und die von Weiner et al. in [80, 81] mittels Elektronen- und Röntgenbeugung erfolgten Untersuchungen der unlöslichen Matrizen, die aus dem Perlmutter verschiedener Molluskenschalen²⁷ stammen, lassen vermuten, dass die unlösliche Matrix aus der Perlmuttertschicht von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevigata* ebenfalls aus β -Chitin besteht [14]. Über die detaillierte Oberflächenstruktur der intertabularen organischen Matrix, von der angenommen wird, dass diese vorzugsweise aus Kollagen besteht, ist bisher nichts Genaueres bekannt [1, 5].

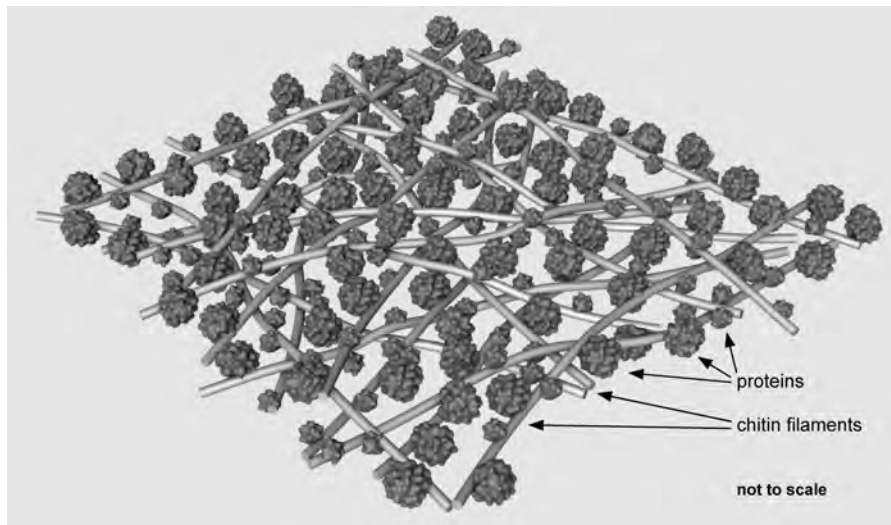


Abbildung 6: Modell der aus mehr oder weniger geradlinig verlaufenden, netzwerkartig angeordneten Chitinfilamenten und Poren unterschiedlicher Größen bestehenden interlamellaren organischen Matrix (ILM) (Abb. aus [1]). Die zuvor in den AFM-Aufnahmen beobachteten globulären Strukturen an den Chitinfilamenten sind verschiedene Proteinmoleküle [1, 2].

2.3.2 Zusammensetzung der interlamellaren und intertabularen organischen Matrix (ILM und ITM)

Bezares et al. in [6] und Nudelman et al. in [82] führten Untersuchungen zur Zusammensetzung der unlöslichen organischen Matrix durch, die nach Entmineralisierung der Perl-

²⁶englisch: pen

²⁷Dabei wurden z. B. die unlösliche Matrix des Cephalopoden *Nautilus repertus* und die unlösliche Matrix der Bivalve *Pinctada margaritifera* untersucht [80, 81].

muttschicht von Molluskenschalen erhalten wurde. Dabei erfolgte der Nachweis von verschiedenen Makromolekülen, wie z. B. aragonitnukleierenden Proteinen, und spezifischen chemischen Gruppen, wie z. B. Carboxyl- und Sulfatgruppen, in den unlöslichen Matrizen von drei verschiedenen Klassen von Mollusken: Schnecken (Gastropoda), Kopffüßern (Cephalopoda) und Muscheln (Bivalvia) [5, 6]. Die genaue Verteilung der Makromoleküle auf den Oberflächen der ILM und ITM wurde mittels enzymatischem Abbau mit Proteasen²⁸ und durch die Verwendung von verschiedenen Färbemethoden erhalten [5, 6]. Dabei erfolgte unter anderem die Nutzung der kolloidalen Eisenfärbung²⁹, der Färbung mit „calcofluor white“³⁰ und mit Aminoacridon³¹ sowie der immunhistochemischen Färbung mit polyklonalen Antikörpern³² [6, 82].

Bezares et al. konnten für die unlösliche Matrix, die aus dem Perlmutter der Schalen von Meeresschnecken (Art *Haliotis rufescens*) gewonnen wurde, zeigen, dass bestimmte Makromoleküle und chemische Gruppen an verschiedenen Stellen auftraten [5, 6]. Jeweils in der Mitte der wabenförmigen Vertiefungen bzw. Abdrücke in der interlamellaren Matrix, die durch das Herauslösen der polygonalen Aragonitplättchen mittels Dialyse³³ entstanden sind, existierte ein zentraler Bereich mit vielen Carboxylgruppen und aragonitnukleierenden Proteinen. Dieser zentrale Bereich war wiederum von einem ringförmigen Bereich, der viele Sulfatgruppen enthielt, umgeben [5, 14]. Zusätzlich gelangen Bezares et al. der Nachweis, dass die interlamellare Matrix zum größten Teil aus dem Polysaccharid Chitin bestand und in der intertabularen Matrix ebenfalls viele Carboxyl- und Sulfatgruppen und aragonitnukleierende Proteine sowie Chitin vorkamen [6]. Die **Abbildung 7** zeigt die von Bezares et al. gefundene Zusammensetzung der ILM und ITM. Auch Nudelman et al. gelangen der Nachweis einer vergleichbaren Verteilung der Makromoleküle in der unlöslichen Matrix des Cephalopoden *Nautilus pompilius* und der Bivalve *Atrina rigida*, die beide ebenfalls wie die Meeresschnecken zum Stamm der Weichtiere (Mollusca) zählen [82]. Allerdings konnte zwischen dem mittleren Bereich der wabenförmigen Ab-

²⁸Dabei wurden z. B. Trypsin, Proteinase K und Kollagenase verwendet [6].

²⁹Damit wurden hier die Sulfatgruppen angefärbt. Im Allgemeinen erfolgt mit der kolloidalen Eisenfärbung der Nachweis von geladenen sauren Gruppen, wie z. B. Sulfat- und Carboxylgruppen [6]. Bei Verwendung eines niedrigen pH-Werts ($\text{pH} < 2$) findet die Bindung der kolloidalen Eisenionen nur an die Sulfatgruppen statt, da die Carboxylgruppen unter diesen Bedingungen protoniert sind [6, 82].

³⁰Mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff „calcofluor white“ wurde hier das Vorkommen von Chitin nachgewiesen [6, 83]. Die Bindung des Farbstoffs erfolgt spezifisch an β -(1,3)- und β -(1,4)-verknüpfte Polysaccharide, wie z. B. Chitin oder Cellulose [6].

³¹Damit wurden die Carboxylgruppen markiert [6, 82].

³²Der Nachweis der aragonitnukleierende Proteine gelang durch Anfärbung mit polyklonalen Antikörpern (Antikörper gegen die aragonitnukleierende Fraktion der sauren Proteine in der löslichen organischen Matrix der Bivalve *Atrina rigida*) [6, 82].

³³Die Entmineralisierung erfolgte mit Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Lösungen oder „cation-exchange resin“ [6].

drücke in der ILM und der ITM eine geringe Konzentration (1) an aragonitnukleierenden Proteinen bei *Atrina rigida* und (2) an Carboxylgruppen bei *Nautilus pompilius* nachgewiesen werden [5, 82].

Da die in dieser Arbeit zur Erzeugung der Perlmutterpaltflächen verwendeten Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis tuberculata* stammen, ist vermutlich eine ähnliche Verteilung der Makromoleküle und chemischen Gruppen in der ILM und ITM zu erwarten [5]. Allerdings müssen dazu noch detaillierte Untersuchungen erfolgen.

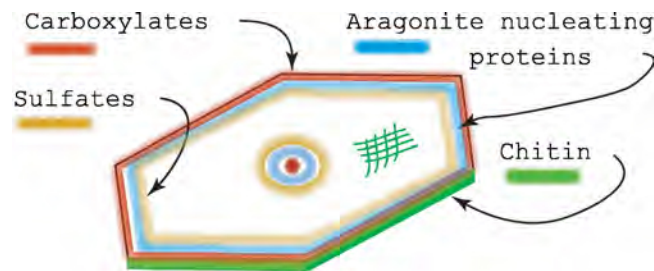


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Verteilung von Carboxyl- und Sulfatgruppen, aragonitnukleierenden Proteinen sowie Chitinmolekülen in der ILM und ITM (Abb. aus [6]). Sowohl in der Mitte der durch die Entmineralisierung entstandenen wabenförmigen Abdrücke der ILM als auch in der ITM existieren Carboxyl- und Sulfatgruppen sowie aragonitnukleierende Proteine [5, 6]. Chitin bildet den Hauptbestandteil der ILM, kommt aber auch in der ITM vor [6].

Wie der Name bereits vermuten lässt, fördern aragonitnukleierende Proteine die Nukleation und das Wachstum des Polymorphs Aragonit [5, 14]. Bei verschiedenen Wachstumsmodellen, welche die Entstehung des Aragonits bei der Perlmutterbildung beschreiben, wird auch angenommen, dass Carboxyl- und Sulfatgruppen die Nukleation und das Wachstum des Aragonits begünstigen [5, 14]. Die einzelnen Wachstumsmodelle werden in Abschnitt 2.4 genauer erklärt. Entsprechend der oben beschriebenen Verteilung der verschiedenen Makromoleküle sollte die Nukleation des Calciumcarbonats und das weitere Wachstum der neuen Calciumcarbonat- bzw. Aragonitkristalle bevorzugt sowohl jeweils in der Mitte der Aragonitplättchen als auch im Bereich der intertabularen Matrix, also auch am Rand der Aragonitplättchen, zu erwarten sein [6, 82].

2.3.3 Die lösliche organische Matrix

Die nach der Entmineralisierung der Perlmuttertschicht, also nach dem Herauslösen der Aragonitplättchen, in der Lösung vorhandenen organischen Bestandteile bilden die lösliche organische Matrix [5, 14]. In dieser löslichen Matrix kommen unterschiedliche Proteine vor,

von denen mehrere eine biomineralisierende Funktion besitzen [1, 5]. Der Großteil der Bestandteile der löslichen Matrix wurde (1) von den oben beschriebenen Chitinfilamenten und (2) ein kleiner Teil aus dem während des Wachstums in den Aragonitplättchen eingebauten organischen Material herausgelöst [2, 4]. Die Proteine Perlucin, Perlwapin, Perlustrin und Perlinhibin sowie die Aragonitproteine AP8 sind Bestandteile der löslichen Matrix, die aus der Perlmuttertschicht der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliothis laevigata* durch die Entmineralisierung mit 6%igen bis 12%igen Essigsäurelösungen gewonnen wurde [1, 2]. Proteinmoleküle, die fester an die Chitinfasern gebunden sind, können nicht durch die Verwendung von niedrig konzentrierten Essigsäurelösungen³⁴ oder 100 mM EDTA-Lösungen abgelöst werden und so verbleiben auch einige der als „löslich“ bezeichneten Proteine in der unlöslichen Matrix [1, 5]. Die unlösliche Matrix besteht somit aus einzelnen, miteinander verwobenen Chitinfilamenten, an die einige Proteinmoleküle sehr fest gebunden sind [1, 2]. So sind die Proteine Perlucin, Perlwapin, Perlustrin und AP8 nach einer Entmineralisierung mit 100 mM EDTA-Lösungen weiterhin in der unlöslichen Matrix vorhanden [1, 5]. Die Bezeichnung „löslich“ bzw. „unlöslich“ bezieht sich jeweils auf die Bedingungen, unter denen das Herauslösen des mineralischen Anteils stattgefunden hat [1, 2].

Die **Abbildung 8** zeigt zwei mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erhaltenen Gele, welche die in der löslichen bzw. unlöslichen Matrix vorkommenden Proteine zeigen [1, 2]. Dort sind die Proteine, die mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 angefärbt wurden, jeweils als blaue Banden auf den farblosen Gelen erkennbar [2, 84]. Zusätzlich zu den Proteinen der löslichen Matrix (Spalte gekennzeichnet mit „S“ im Bild (A)) und den Proteinen der unlöslichen Matrix (Spalte markiert mit „IS“ im Bild (B)) sind jeweils die Banden der Markerproteine (Spalten gekennzeichnet mit „M“ jeweils auf der linken Seite), die ein bekanntes Molekulargewicht besitzen, sichtbar [1, 2]. Bei dem Gel auf der linken Seite sind eindeutig mehrere stärker gefärbte blaue Banden zu erkennen, denen die Proteine Perlucin (plc), Perlwapin (pwa), Perlustrin (plu), AP8 und Perlinhibin (pin) zugeordnet werden können [1, 84]. Diese Proteine weisen verschiedenste Molekulargewichte auf, so sind Perlwapin mit 14,5 kDa [5], Perlustrin mit 9,4 kDa [5], Perlinhibin mit 4,8 kDa [85] sowie AP8 α und AP8 β mit 8,7 kDa bzw. 7,8 kDa in der löslichen Matrix vorhanden [14, 86]. Es treten zwei unterschiedlich schwere Perlucinvarianten mit den Molekulargewichten von 18 kD und 21 kDa auf, wobei in der löslichen Matrix die 18 kDa schwere Variante dominiert [5, 84]. Das Gel im Bild (B) zeigt die Proteine aus der unlöslichen Matrix. Dort kommen ebenfalls Perlucin (plc), Perlwapin (pwa), Perlustrin (plu) und AP8 vor [1, 2]. Im Gegensatz zur löslichen Matrix

³⁴6%ige bis 12%ige Essigsäurelösungen [1, 2]

tritt die 21 kDa schwere Perlucinvariante in der unlöslichen Matrix mit einer höheren Konzentration auf [1, 84]. Den schwächer gefärbten Banden auf den Gelen konnten noch keine Proteine zugeordnet werden [1, 2].

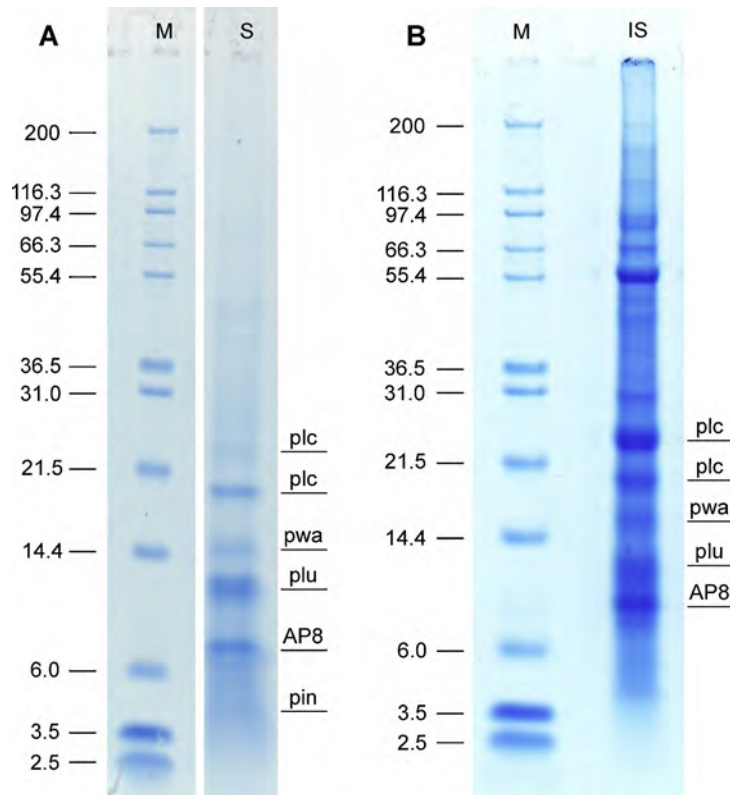


Abbildung 8: Mit der SDS-PAGE erhaltene Gele mit den Proteinen der (A) löslichen und (B) unlöslichen organischen Matrix (Abb. aus [1]). Die lösliche bzw. unlösliche Matrix wurde aus der Perlmutschicht der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevigata* gewonnen. Die Spalten „M“ zeigen jeweils die Banden der Markerproteine, die ein bekanntes Molekulargewicht aufweisen. (A) Die Proteine Perlucin (plc), Perlwapin (pwa), Perlustrin (plu), Perlinhibin (pin) und AP8 sind in der löslichen Matrix vorhanden [1, 2]. Dort treten zwei Perlucinvarianten mit verschiedenen Molekulargewichten von 21 kDa und 18 kDa auf, wobei die 18 kDa schwere Variante dominiert [5, 84]. Die blau gefärbten Banden der Proteine Perlwapin bei 14 kDa, Perlustrin bei 10 kDa, Perlinhibin bei 4 kDa und AP8 bei 8 kDa sind ebenfalls deutlich beobachtbar [1, 2]. (B) Die Proteine Perlucin, Perlwapin, Perlustrin und AP8 kommen auch in der unlöslichen Matrix vor [1].

Von Heinemann et al. in [87, 88] wurden Untersuchungen (1) zur Wirkung der löslichen Matrix auf die Präzipitation von Calciumcarbonat und (2) zum Einfluss der unlöslichen Matrix auf die Kristallisation von Calciumcarbonat durchgeführt. Die lösliche Matrix und auch die unlösliche Matrix stammen aus dem Perlmutter der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevigata* [14, 88]. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe einer Prote-

inkonzentration von $0,02 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ der löslichen Matrix zu einer übersättigten Calciumcarbonatlösung den Anstieg der Präzipitationsrate um den Faktor 1,4 im Vergleich zu einer reinen übersättigten Calciumcarbonatlösung bewirkte [4, 87]. Zudem gelang der Nachweis, dass bei Anwesenheit einer Konzentration von $1,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ der Proteine der löslichen Matrix in einer übersättigten Calciumcarbonatlösung keine Präzipitation von Calciumcarbonat stattfand [5, 87]. In [88] konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die unlösliche Matrix als Ausgangspunkt für das Wachstum von flachen, polygonalen Calciumcarbonatkristallen diene [2]. Weitere von Gries et al. in [89] durchgeführte Untersuchungen zum Einfluss der löslichen Matrix, die ebenfalls aus Schneckenschalen von *Haliotis laevigata* gewonnen wurde, auf das Wachstum von Calciumcarbonat zeigten, dass die Verwendung einer Proteinkonzentration von $1,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ hemmend auf das Kristallwachstum wirkte und so die Entstehung von Kristallen auf der unlöslichen Matrix größtenteils verhinderte, aber die Zugabe einer Konzentration von $0,02 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ der „löslichen“ Proteine das Kristallwachstum auf der unlöslichen Matrix verstärkte [4]. In [90] wurde nachgewiesen, dass eine spezifische Bindung des Proteins Perlucin nur an Aragonit stattfindet und nicht an Calcit [2].

2.3.4 Proteine in der organischen Matrix

Hier werden kurz die wichtigsten in der organischen Matrix vorhandenen Proteine vorgestellt, die an die Chitinfasern gebunden sind und offenbar Einfluss auf das Wachstum der Aragonitplättchen haben [1, 5]. Die Idee liegt nahe diese Proteine beim künstlichen Wachstum, das in dieser Arbeit untersucht werden soll, einzusetzen.

Perlucin

Perlucin, das ein Molekulargewicht von 18 kDa^{35} besitzt, wurde erstmals nach einer Entmineralisierung mit 10%iger Essigsäurelösung aus der Perlmuttertschicht der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevigata* gewonnen [91]. Perlucin hat von den in dieser Perlmuttertschicht vorkommenden Proteinen sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen organischen Matrix die höchste Konzentration [5, 84]. Abhängig von den Bedingungen unter denen die Entmineralisierung stattgefunden hat, unterscheidet sich die Konzentration an Perlucin in der löslichen Matrix [14, 84]. Neben dieser etwa 18 kDa schweren Variante treten noch Perlucinvarianten unterschiedlicher Molekulargewichte auf, so konnte in der Perlmuttertschicht der Meeresschnecke *Haliotis laevigata* eine 21 kDa schwere Variante nachgewiesen werden [1, 84]. Das aus 155 Aminosäuren bestehende Protein weist eine einzelne C-Typ Lektin-Domäne auf, welche die ersten 130 Aminosäuren umfasst

³⁵Einheit Dalton (Da); $1 \text{ Da} = 1 \text{ u} = 1,661 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ [4]

[92, 93]. Proteine mit solchen Lektin-Domänen zeigen eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von Kohlenhydraten [14, 94]. Neben dem in Hühnereierschalen vorzufindenden Ovocleidin-17 [95] und dem im Sekret der Bauchspeicheldrüse vorhandenen Protein Lithostatine [96] ist Perlucin ein weiteres Protein aus einem calciumcarbonathaltigen Biomineral, das eine C-Typ Lektin-Domäne enthält [14, 91].

Untersuchungen zum Einfluss des Proteins zeigten, dass Perlucin die Präzipitation von Calciumcarbonat aus einer gesättigten Lösung erhöht [91]. Weiterhin wurde von Blank et al. in [97] die Kristallisation von Calciumcarbonat auf frisch gespaltenen ($4\bar{4}\bar{1}$)-Flächen geologischen Calcits direkt mit dem AFM untersucht. Dabei bewirkte die Zugabe von Perlucin zu einer gesättigten Calciumcarbonatlösung das beschleunigte Wachstum [5, 14].

Perlustrin

Das 9,4kDa schwere Protein Perlustrin besteht aus 84 Aminosäuren und wurde ebenfalls erstmals nach einer Entmineralisierung mit 10%iger Essigsäurelösung aus dem Perlmutter der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevis* isoliert [91, 98]. Die Aminosäuresequenz enthält vor allem die Aminosäuren Cystein (14,3 mol%), Prolin (9,5 mol%) und Leucin (8,3 mol%) [5]. Die Sequenz der ersten 33 Aminosäuren zeigt eine gewisse Ähnlichkeit zu dem aus 1428 Aminosäuren bestehenden Protein Lustrin A, das ein deutlich größeres Molekulargewicht von 116 kDa aufweist und aus dem Perlmutter von Meeresschnecken der Art *Haliotis rufescens* gewonnen wurde [14, 91]. Aufgrund einer etwa 40%igen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von Perlustrin zu der N-terminalen Domäne der von Säugetieren stammenden insulinähnlichen Wachstumsfaktorbindungsproteine (IGFBPs) 1 bis 5, wird angenommen, dass Perlustrin eine ähnliche Funktion bei der Perlmutterbildung hat wie die IGFBPs, die z. B. im Biomineral Knochen vorkommen [14, 98]. Dort beeinflussen die IGFBPs den Stoffwechsel [5, 98]. Vermutlich hat Perlustrin Einfluss auf die Proliferation der Mantelepithelzellen [5, 84]. Untersuchungen des Kristallwachstums in Anwesenheit von Perlustrin zeigten, dass dieses Protein das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen weder beschleunigt noch inhibiert [5].

Perlwapin

Das aus 134 Aminosäuren bestehende Protein Perlwapin mit einem Molekulargewicht von etwa 14,5 kDa enthält drei aufeinanderfolgende etwa 42 Aminosäuren umfassende Sequenzwiederholungen, die eine 30%ige bis 50%ige Übereinstimmung zu den sogenannten „whey acidic protein“(WAP)-Domänen anderer Proteine zeigen [5, 99]. Im Perlwapin kommen insbesondere die Aminosäuren Cystein mit 18,7 mol%, Prolin mit 15,7 mol% und Glycin

mit 11,9 mol% vor [5]. Die typischen WAP-Domänen, die auch als „four-disulfide core“-Domänen bezeichnet werden, enthalten vier Disulfidbrücken, die sich zwischen den acht vorhandenen Cysteinresten ausbilden [14, 99]. In der dritten WAP-Domäne von Perlwapin treten allerdings neun Cysteinresten auf [98, 99]. Das Protein Lustrin A, das im Perlmutter der Meeresschnecke *Haliotis rufescens* vorkommt, enthält auch eine WAP-Domäne, die am C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz auftritt und zehn Cysteinreste aufweist sowie eine 61,4%ige Übereinstimmung mit der dritten WAP-Domäne von Perlwapin zeigt [99, 100].

Die direkte AFM-Beobachtung des Kristallwachstums auf frisch gespaltenen ($4\bar{4}\bar{1}$)-Flächen geologischen Calcits in Anwesenheit einer gesättigten Calciumcarbonatlösung mit der Konzentration von $0,02 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ des Proteins Perlwapin zeigte, dass Perlwapin sich spezifisch an einzelne Calcitstufen anlagert und so das Wachstum neuer Kristallschichten hemmt [5, 99]. Beim Aragonitwachstum während der Perlmutterentstehung verhindert Perlwapin so möglicherweise das Wachstum von Flächen mit einer bestimmten Kristallorientierung [14, 99].

Perlinhibin

Wie bereits vom Namen abzuleiten ist, hat das Protein Perlinhibin eine inhibierende, also hemmende, Wirkung auf das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen [5, 85]. Die Gewinnung dieses nur 4,8 kDa schweren Proteins erfolgte auch aus dem Perlmutter der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevigata* [85]. In der 41 Aminosäuren umfassenden Sequenz kommen vor allem die Aminosäuren Cystein (19,5 mol%), Histidin (17,1 mol%) und Arginin (14,6 mol%) vor [5, 85]. In [85] konnte mittels AFM-Untersuchungen gezeigt werden, dass Perlinhibin spezifisch an Calcitstufen bindet und die Zugabe einer Konzentration von $0,02 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Perlinhibin zu einer gesättigten Calciumcarbonatlösung das weitere Wachstum verhindert [5].

AP8 α und AP8 β

Die sauren Aragonitproteine³⁶ AP8 weisen ein Molekulargewicht von etwa 8 kDa auf, wobei zwei verschiedene Varianten AP8 α mit 8,7 kDa und AP8 β mit 7,8 kDa unterschieden werden [5, 14]. Die Gewinnung dieser Proteine erfolgte aus der löslichen Matrix, die durch Entmineralisierung der Perlmuttertschicht der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis rufescens* erhalten wurde [5, 86]. Die Zusammensetzung beider Proteinvarianten, die größtenteils aus polaren und/oder geladenen Aminosäuren bestehen, ist sehr ähnlich [5]. So

³⁶englisch: aragonite proteins [4, 14]

kommen in der Aminosäuresequenz beider Proteine hohe Anteile von (1) der Aminosäure Glycin (etwa 40 mol%) und (2) den Aminosäuren Asparagin und/oder Asparaginsäure (etwa 35 mol%) vor [5, 14]. Da die Aminosäure Asparaginsäure zwei Carboxylgruppen besitzt, an welche die zweifach positiv geladenen Calciumionen binden können³⁷, wird angenommen, dass die Proteine AP8 α und AP8 β eine hohe Kapazität für die Bindung von Ca²⁺-Ionen aufweisen und so das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen beschleunigen können [14, 86]. In [101] konnte unter anderem mittels AFM- und REM-Untersuchungen nachgewiesen werden, dass beide Proteine die Wachstumsgeschwindigkeiten neu entstehender Calcitschichten erhöhen und auch die Morphologie der Calcitstufen ändern [5].

Weitere Proteine

Zusätzlich konnten die Aragonitproteine AP7³⁸ und AP24³⁹ mit den Molekulargewichten von 7 kDa und 24 kDa, die inhibierend auf das Kristallwachstum auf einer Calcitoberfläche wirkten, sowie das Protein Lustrin A⁴⁰ aus dem Perlmutter von Meeresschnecken der Art *Haliotis rufescens* isoliert werden [5, 102]. Da die aus 45 Aminosäuren bestehende C-terminale Domäne des Proteins Lustrin A eine sehr hohe Ähnlichkeit zu Proteinen zeigt, die als Proteaseinhibitoren wirken, weist Lustrin A vermutlich die Fähigkeit auf, Proteasen oder Proteine mit Protease-ähnlichen Strukturen zu binden [14, 100]. So wirkt Lustrin A vermutlich als Proteaseinhibitor und verhindert den Abbau von Proteinen, die von den Epithelzellen des Mantels sezerniert werden [100].

Aus der Perlmuttertschicht der Auster *Pinctada fucata* konnten zudem das spezifisch an Aragonit bindende Proteine Pif⁴¹ und das auf das Kristallwachstum von Calciumcarbonat hemmend wirkende Protein Nacrein, das ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa besitzt, gewonnen werden [103, 104, 105].

2.4 Natürliches Aragonitwachstum in den Schneckenschalen und Wachstumsmodelle

Lebende Meeresschnecken bzw. die natürlichen Schneckenschalen von gestorbenen Meeresschnecken der Art *Haliotis tuberculata* (Grünes Seeohr) wurden für die Erzeugung der „flat pearls“ und der Perlmutterpaltflächen genutzt [4, 10]. Bei einigen AFM-Experimenten zum

³⁷Die Bindung der Ca²⁺-Ionen kann erfolgen, wenn die Carboxylgruppen deprotoniert sind.

³⁸Das Aragonitprotein AP7 besteht aus 66 Aminosäuren [5, 14].

³⁹Die Sequenz des Aragonitproteins AP24 besteht aus 171 Aminosäuren [5, 14].

⁴⁰Wie zuvor bereits erwähnt, weist das Protein Lustrin A ein deutlich größeres Molekulargewicht von 116 kDa auf [14, 91].

⁴¹Es existieren verschiedene Pif-Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten. So treten z. B. Pif80 und Pif97 mit Molekulargewichten von 80 kDa bzw. von 97 kDa auf [103].

Kristallwachstum fanden zudem Proteine der löslichen organischen Matrix⁴² Verwendung, die hier aus natürlichen Schneckenschalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevigata* (Glattes Seeohr) präpariert wurden [2, 4]. Die **Abbildung 9** zeigt jeweils die Außenseite der Schneckenschalen beider Arten, die zur Gattung der Seeohren (*Haliotis*) gehören [4]. Die Gattung der Seeohren gehört zur Familie der Haliotidae, die wiederum zur Klasse der Schnecken (Gastropoda) zählt [2]. Die oftmals auch als Abalonen bezeichneten Meeresschnecken gehören zum Stamm der Weichtiere (Mollusca) [4]. In der oft spiralförmig aussehenden Schneckenschale, deren äußere Schalenschicht aus Calcit und deren innere Schalenschicht aus Perlmutter besteht, befinden sich wenige Öffnungen, die zum Austausch von Atemwasser dienen und für tentakelartige Mantelfortsätze, die als Sinnesorgane fungieren, zur Verfügung stehen [4, 14]. Zwischen dem Mantelepithel⁴³ des Schneckenkörpers, der innerhalb der Schale liegt und nur an einer Stelle über den Schalenmuskel (Columellarmuskel) mit der Schneckenschale verbunden ist, und der inneren Schalenseite befindet sich der nach außen durch ein Sekretband verschlossene extrapalliale Raum, der die sogenannte extrapalliale Flüssigkeit enthält [4, 84]. Diese extrapalliale Flüssigkeit enthält alle für das Wachstum der Schale benötigten organischen und anorganischen Bestandteile [4, 14]. Die Zusammensetzung der anorganischen Ionen (z. B. Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen⁴⁴) ähnelt dabei der Zusammensetzung des Meerwassers [4, 106].



Abbildung 9: Die aus Calcit bestehende Außenseite der Schneckenschalen von Meeresschnecken der zwei verschiedenen Arten (A) *Haliotis tuberculata* (Grünes Seeohr) und (B) *Haliotis laevigata* (Glattes Seeohr) (Bild (B) aus [4]).

Die Entstehung der neuen Schalenschichten erfolgt im Bereich der Wachstumsfront, also dem äußeren, weißlich erscheinenden Rand auf der Schaleninnenseite [4, 84]. Die Wachstumsfront ist im Bild (A) der **Abbildung 10** sehr gut erkennbar und besteht aus vielen

⁴²siehe Abschnitt 2.3.3

⁴³detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 4.2.1

⁴⁴Natriumionen (Na^+), Kaliumionen (K^+), Magnesiumionen (Mg^{2+} -Ionen) und Calciumionen (Ca^{2+})

der typischen „stacks of coins“, also aus tannenbaumartigen und Münzstapel-ähnlichen Anordnungen von wenigen übereinanderliegenden Aragonitplättchen [2, 4]. Die einzelnen Aragonitplättchen eines „stack of coins“ (siehe REM-Aufnahme im Bild (B) der Abb. 10) weisen dabei laterale Ausdehnungen von wenigen Mikrometern⁴⁵ auf, wobei das obere Aragonitplättchen stets eine größere laterale Ausdehnung als die darunterliegenden Plättchen besitzt [4, 5]. Die verschiedenen „stacks of coins“ sind jeweils im Abstand von wenigen bis einigen zehn Mikrometern angeordnet [4]. Die Wachstumsfront mit den „stacks of coins“ erscheint bei natürlicher Beleuchtung aufgrund der nahezu wellenlängenunabhängigen Mie-Streuung weißlich, da die charakteristischen Größen d der Strukturen (sowohl Abstände der „stacks of coins“ als auch Plättchendurchmesser) im Bereich weniger Mikrometer liegen und damit für diese Strukturen $d \geq \lambda$ gilt, wobei λ die Lichtwellenlänge ist [4, 5].

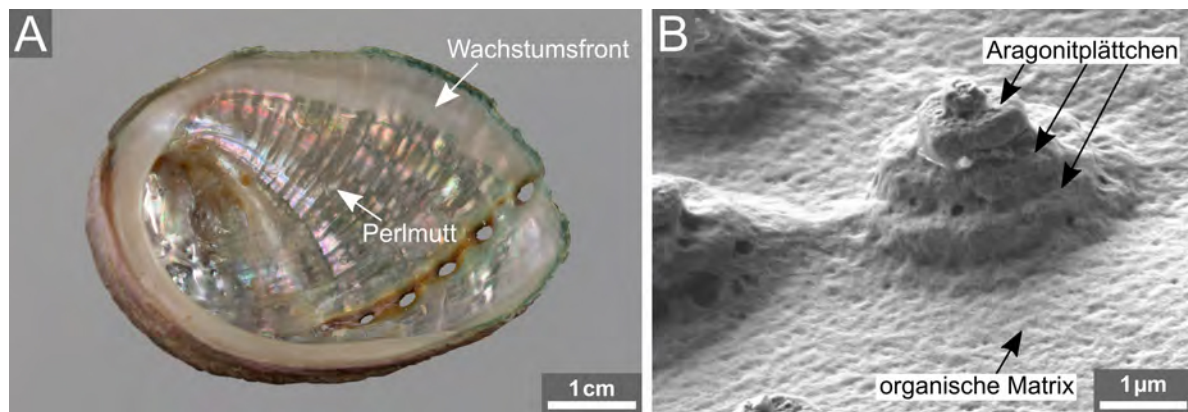


Abbildung 10: (A) Weißlich erscheinende Wachstumsfront am äußeren Rand und bunt schimmerndes Perlmutter im inneren Teil der Schaleninnenseite (Art *Haliotis tuberculata*) (Abb. aus [4]). (B) REM-Aufnahme eines „stack of coins“ aus der Wachstumsfront (Abb. aus [4]). Die lateralen Ausdehnungen der übereinanderliegenden Aragonitplättchen, die einen „stack of coins“ (tannenbaumartige bzw. Münzstapel-ähnliche Anordnung) bilden, nehmen von oben nach unten zu [4, 5].

In der **Abbildung 11** ist nun schematisch die Entstehung der tannenbaumartigen „stacks of coins“ gezeigt [4]. Bevor die ersten Aragonitkristalle entstehen, erfolgt die Ausbildung der organischen Schichten [4, 5]. In den Zwischenräumen dieser vorgeformten organischen Schichten entstehen dann die neuen Aragonitkristalle, die zunächst entlang der \vec{c} -Achse in [001]-Richtung bis zu einer Höhe von etwa 500 nm wachsen und anschließend verstärkt lateral in die [100]- und [010]-Richtung entlang der \vec{a} - bzw. \vec{b} -Achse weiterwachsen [4, 9]. Das Aragonitwachstum in [001]-Richtung wird dabei durch die Anwesenheit der organischen Komponenten, also der vorgeformten organischen Schichten, gehemmt [4]. Das

⁴⁵Die Vermessung der lateralen Ausdehnungen einzelner Aragonitplättchen wird beispielhaft in Abschnitt 5.2.1.3 gezeigt.

laterale Wachstum eines Aragonitplättchens erfolgt solange, bis dieses in lateraler Richtung mit anderen gleichzeitig gewachsenen Aragonitplättchen weiterer „stacks of coins“ zusammenstößt [3, 4]. So entsteht die polygonale Form der Aragonitplättchen mit einer Höhe von etwa 500 nm und lateralen Ausdehnungen im Bereich weniger Mikrometer⁴⁶ [4, 5]. Das Wachstum des nächsten, in der darüberliegenden Aragonitschicht neu entstehenden Plättchens beginnt schon bevor das darunterliegende Aragonitplättchen seine vollständige laterale Ausdehnung erreicht hat [3, 4]. Da stets mehrere Aragonitplättchen übereinander wachsen, bilden sich diese Münzstapel-ähnlichen Anordnungen von wenigen Aragonitplättchen mit unterschiedlichen lateralen Ausdehnungen [5, 9]. Die lateralen Ausdehnungen der Plättchen nehmen dabei stets von unten nach oben ab [4].

Die in der Literatur diskutierten Wachstumsmodelle (heteroepitaktisches Wachstum, ionotropes Wachstum, Wachstum über Mineralbrücken und Hypothese des amorphen „precursor“) werden im Folgenden kurz vorgestellt [4, 14].

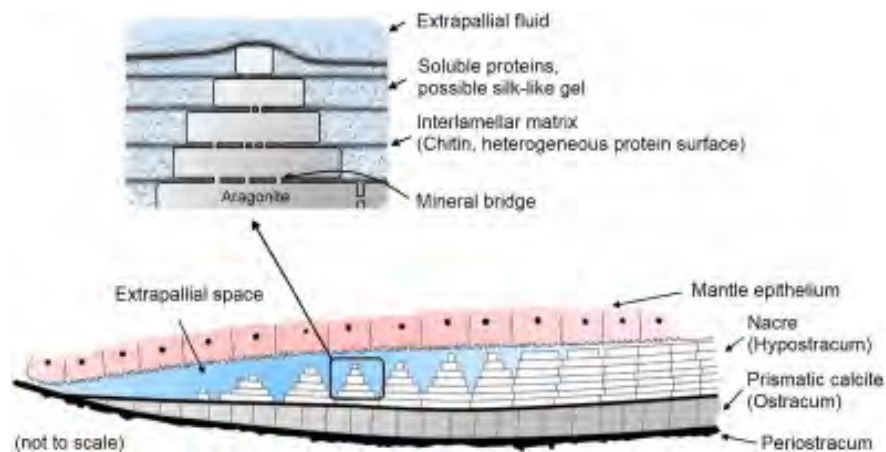


Abbildung 11: Schematische Darstellung zur Entstehung der „stacks of coins“, d. h. der Münzstapel-ähnlichen Anordnungen von übereinanderliegenden Aragonitplättchen, im Bereich der Wachstumsfront auf der Schaleninnenseite (Abb. aus [5]).

Heteroepitaktisches Wachstum

Dieses Wachstumsmodell geht auf die in [107] von Erben und Watabe durchgeführten Untersuchungen zur Perlmutterentstehung bei verschiedenen Arten von Bivalven (Muscheln)⁴⁷ zurück [4]. Dort gelang die Beobachtung, dass das Wachstum des Minerals auf der Oberfläche des organischen Substrats erfolgt [4, 5]. Das Bild (A) der **Abbildung 12** zeigt schematisch das Wachstum des Aragonits im heteroepitaktischen Wachstumsmodell. Dabei nimmt man an, dass das Aragonit schichtweise auf der interlamellaren organischen

⁴⁶Bei *Haliotis tuberculata* sind die Aragonitplättchen etwa 4 µm bis 10 µm groß [4].

⁴⁷z. B. *Pteria colymbus*, *Isognomon alatus* und *Brachidontes exustu* [107]

Matrix (ILM) wächst und das Wachstum gitterangepasst erfolgt [4, 5]. Gitterangepasst bedeutet hier, dass der Gitterabstand der Ionen im entstehenden Mineral (Aragonit) genau dem Abstand der funktionellen Gruppen der organischen Matrix entspricht, an denen die Bindung der entsprechenden Ionen erfolgt [4, 108]. Hier erwartet man allerdings die Ausbildung einer homogenen Aragonitschicht auf der ILM [4]. Mit diesem Modell lässt sich somit nicht erklären, warum sich die Aragonitplättchen an bestimmten räumlich begrenzten Stellen auf der ILM bilden und die tannenbaumartigen „stacks of coins“ entstehen [4, 14].

Weiner und Hood führten in [109, 110] Untersuchungen der löslichen organischen Matrizen durch, die von verschiedenen Mollusken stammten, und konnten zeigen, dass dort Proteine mit einem hohen Anteil an Asparaginsäure (Asp) vorkommen und die Asparaginsäure in einer sich wiederholenden Sequenz der Form Asp-Y-Asp auftritt [4, 14]. Bei den zwischen der Asparaginsäure auftretenden Aminosäuren (Y) handelt es sich vorwiegend um Glycin oder Serin [4, 109]. Die Asparaginsäure besitzt Carboxylgruppen, an denen die Bindung von Calciumionen (Ca^{2+} -Ionen) erfolgen kann [14]. Anhand dieser Untersuchungen nahmen Weiner und Hood nun an, dass die positiv geladenen Calciumionen an die negativ geladenen Carboxylgruppen der Asparaginsäure binden und der Abstand der Ca^{2+} -Ionen im kristallinen Gitter von Aragonit somit genau dem Abstand der Carboxylgruppen in der organischen Matrix entspricht [4, 110]. Demnach werden zunächst die Ca^{2+} -Ionen von der negativ geladenen Asparaginsäure angezogen und anschließend ziehen die gebundenen Ca^{2+} -Ionen dann negativ geladene Carbonationen (CO_3^{2-} -Ionen) aus der extrapallialen Flüssigkeit an [4, 14]. Bei Anlagerung von weiteren Ionen (sowohl Ca^{2+} -Ionen als auch CO_3^{2-} -Ionen) entsteht somit eine homogene Aragonitschicht mit definierter Dicke [4].

Wachstum über Mineralbrücken

Nach dem Mineralbrückenmodell (siehe schematische Zeichnung im Bild (B) der Abb. 12) entstehen kristalline Verbindungen mit einem Durchmesser von etwa 30 nm und einer Höhe von etwa 40 nm – die sogenannten Mineralbrücken – in vertikaler Richtung jeweils zwischen zwei direkt übereinanderliegenden, in verschiedenen Schichten angeordneten Aragonitplättchen [14, 111]. Die Höhe der Mineralbrücken entspricht dabei der Schichtdicke der zwischen den übereinander angeordneten Aragonitschichten vorhandenen interlamellaren Matrix [5, 18]. Diese interlamellare Matrix (siehe Abschnitt 2.3.1) weist Poren bzw. Löcher unterschiedlichen Durchmessers (einige Nanometer bis zu 200 nm) auf, welche durch die netzwerkartige Anordnung der Chitinfilamente bedingt sind [1, 2]. Beim Aragonitwachstum über Mineralbrücken wird angenommen, dass neue Aragonitkristalle zunächst auf

dem unteren Aragonitplättchen entstehen und diese anschließend durch die Poren bzw. Löcher in der interlamellaren Matrix nach oben in die nächste Schicht weiterwachsen und dort zur Bildung des neuen Aragonitplättchens führen [4, 14]. Über die Mineralbrücken erfolgt die Weitergabe der kristallographischen Orientierung des unteren Aragonitplättchens an das neu entstehende, darüberliegende Plättchen in der nächsten Schicht [4, 18]. Mittels Elektronentomographie-Messungen konnte von Gries et al. in [14, 18] *erstens* die Existenz solcher kristallinen Verbindungen mit Durchmesser von etwa 30 nm und *zweitens* die Konstanz der kristallographischen Orientierung innerhalb der Mineralbrücken nachgewiesen werden [4].

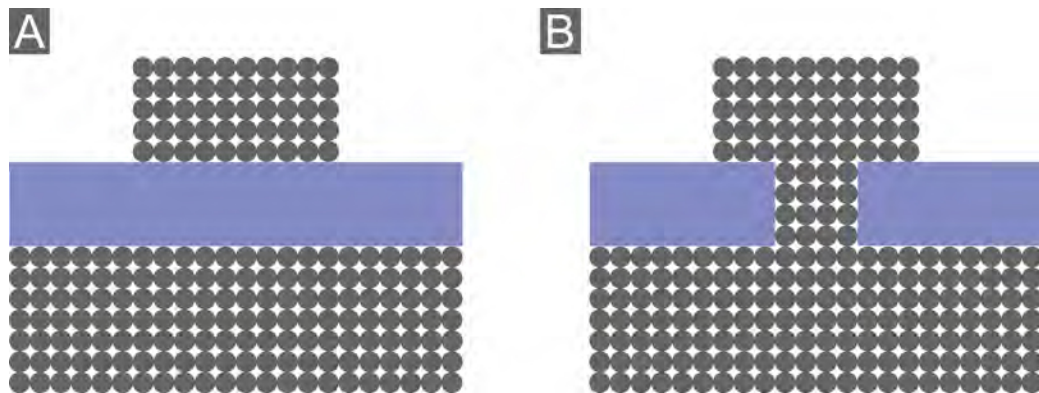


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Entstehung der etwa 500 nm dicken Aragonitplättchen (A) im heteroepitaktischen Wachstumsmodell und (B) im Mineralbrückenmodell. Die interlamellare organische Matrix, die sich zwischen den übereinander angeordneten Aragonitplättchen (grau) befindet, ist blau gekennzeichnet (Abb. aus [4], adaptiert nach [111]).

Ionotropes Wachstum

Bei dem von Greenfield et al. in [112] vorgeschlagenen ionotropen Effekt führt eine lokal auftretende hohe Konzentration der „precursor“-Ionen, die für das Aragonitwachstum benötigt werden, zur Kristallisation des Calciumcarbonats [4, 112]. Dabei wird angenommen, dass die Bindung der Ca^{2+} -Ionen zunächst an auf der interlamellaren organischen Matrix vorgegebenen Bindungsorten erfolgt und die gebundenen Ca^{2+} -Ionen dann negativ geladene Carbonationen (CO_3^{2-} -Ionen) aus der extrapallialen Flüssigkeit anziehen, die dann wiederum weitere Ca^{2+} -Ionen anziehen [4, 14]. Dieser Prozess führt zu einer lokalen Erhöhung der Konzentration an Ca^{2+} - und CO_3^{2-} -Ionen und somit zur Übersättigung und zur Calciumcarbonatkristallisation [4, 112]. Die Bindungsorte für die Ca^{2+} -Ionen auf der interlamellaren Matrix sind z. B. sulfatierte Chitinmoleküle oder sulfatierte Seitenketten von Proteinen [4, 5]. Bei diesem Modell muss der Abstand der Ca^{2+} -Ionen, die an der ILM

gebunden sind, nicht dem Gitterabstand der Ca^{2+} -Ionen im kristallinen Aragonitgitter entsprechen und somit kann sich hier zunächst auch eine amorphe Phase ausbilden, die sich erst nach einiger Zeit in kristallines Material umwandelt [4, 14].

Hypothese des amorphen „precursor“

Hierbei nimmt man an, dass zunächst die Bildung einer amorphen Übergangsphase erfolgt und nach einiger Zeit die Umwandlung dieser amorphen Phase in kristallines Material stattfindet [4, 14]. Die Umwandlung erfolgt vermutlich aus thermodynamischen Gründen [4, 5]. So gelang der Nachweis von amorphem Calciumcarbonat (ACC) z. B. in den Schalen von Bivalven- und Gastropodenlarven⁴⁸ und in den Zähnen von Polyplacophora (Käferschnecken) [4, 14]. Das amorphe Calciumcarbonat in den Schalen der Bivalven- und Gastropodenlarven wandelt sich später in das thermodynamisch stabilere Aragonit um [5]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Bildung der aus Calcit-Einkristallen bestehenden Stacheln bei Seeigellarven (Arten *Strongylocentrotus purpuratus* und *Paracentrotus lividus*) über amorphes Calciumcarbonat erfolgt [113].

2.5 Farberscheinungen an Perlmutter und „flat pearls“

Die schillernden Farben des Perlmutter werden durch Interferenz an dünnen Schichten erzeugt [114]. Die dünne Schicht ist hier die etwa 500 nm dicke und lateral aus vielen nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen bestehende oberste Aragonitschicht, deren Dicke der mittleren Wellenlänge des sichtbaren Lichts entspricht [4, 5]. Für eine gegebene Schichtdicke erfüllen nur bestimmte Wellenlängen die Bedingungen für eine konstruktive oder destruktive Interferenz, d. h. bei einer bestimmten Dicke der Aragonitplättchen und z. B. senkrechtem Einfall des Lichts werden ein bis zwei Farben verstärkt und andere löschen sich aus. Da die effektive Schichtdicke vom Einfallswinkel des Lichts abhängt, ändern sich die durch konstruktive Interferenz sichtbaren Farben, wenn man unter verschiedenen Winkeln das Perlmutter betrachtet. Dieser Effekt ist von buntschillernden Seifenblasen her bekannt, deren Lamellendicke im Bereich von 200 nm bis zu 1000 nm liegt. Bei der Seifenblase treten durch Dickenfluktuationen der Seifenhaut aufgrund von z. B. Gravitation und Bewegung zusätzliche Effekte, wie Farbänderungen bei gleichem Betrachtungswinkel auf [114, 115]. Das Prinzip der Mehrfachreflexionen und Interferenz an einer dünnen Schicht ist in der **Abbildung 13** gezeigt.

⁴⁸Die Untersuchung erfolgte z. B. bei den Arten *Biomphalaria glabrata* (Gastropode), *Mercenaria mercenaria* (Bivalve) und *Crassostrea gigas* (Bivalve) [5, 113].

Für senkrechten Lichteinfall ergibt sich die Bedingung für konstruktive Interferenz sofort wie folgt:

$$m \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot n_\gamma + \frac{\lambda}{2} \quad , \quad (2)$$

wobei m eine ganze Zahl, λ die Wellenlänge, d die Dicke des Aragonitplättchens und n_γ der Brechungsindex von Aragonit in Lichteinfallrichtung, die mit der schnellen Wachstumsrichtung entlang der \vec{c} -Achse übereinstimmt, sind. Der Phasensprung von π bzw. $\frac{\lambda}{2}$ entsteht bei der Reflexion an der Grenzschicht zum dichteren Medium [115]. Aragonit ist ein zweiachsiger, also doppelbrechender Kristall, mit den Brechungsindizes⁴⁹ $n_\alpha = 1,68$, $n_\beta = 1,68$ und $n_\gamma = 1,53$ [117, 118]. Der Zwischenraum der übereinander angeordneten Aragonitplättchen ist mit organischer Matrix gefüllt, die im Wesentlichen⁵⁰ aus netzwerkartig verwobenen Chitinfilamenten und Poren bzw. Löchern zwischen diesen Filamenten besteht [1, 2]. Nimmt man an, dass diese organische Matrix zu $\frac{3}{4}$ aus Chitin und $\frac{1}{4}$ aus Wasser oder zu $\frac{4}{5}$ aus Chitin und $\frac{1}{5}$ aus Wasser besteht, so ergibt sich ein Brechungsindex $n_{organisch}$ von 1,32 bis zu 1,34. Der Brechungsindex von β -Chitin beträgt $n_{Chitin} = 1,43$ [118]. Somit tritt der Phasensprung nur am im Bild oberen Übergang (Luft-Aragonit) auf [115].

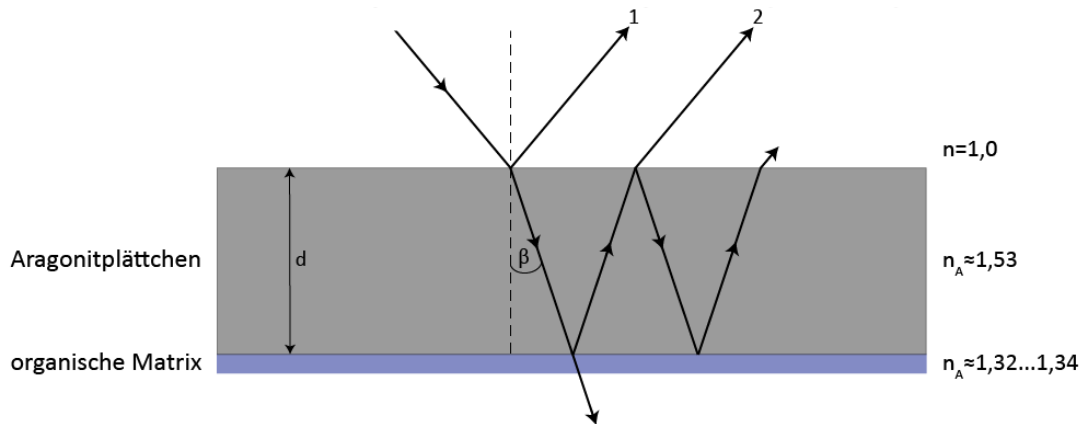


Abbildung 13: Interferenz an der etwa 500 nm dicken Aragonitschicht. Die Überlagerung von Strahl 1 und Strahl 2 führt zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz in Abhängigkeit von Wellenlänge und Gangunterschied (doppelte effektive Schichtdicke plus Phasensprung).

Die die oberste Aragonitschicht bedeckende organische Matrix ist mit ihrer Höhe von etwa 30 nm bis 50 nm zu dünn, um Interferenzeffekte zu bewirken. Die organische Matrix zwischen dem oberen und dem darunterliegenden Aragonitplättchen wirkt optisch wie ein Luftspalt zwischen Glasscheiben und bewirkt Lichtreflexion, die den Strahl 2 generiert.

⁴⁹Die Brechungsindizes wurden jeweils bei einer Wellenlänge von 589 nm ermittelt [116].

⁵⁰An den Chitinfilamenten sind noch verschiedene Proteinmoleküle gebunden [1, 2].

Weitere Vielfachreflexionen spielen aufgrund ihrer geringen Intensität keine Rolle. Bei schrägem Lichteinfall (siehe Abb. 13) ändert sich die effektive Schichtdicke von $d \cdot n_\gamma$ zu $\frac{d}{\cos\beta} \cdot n_A$, wobei β der Brechungswinkel im Medium und n_A der resultierende Brechungsindex in der Richtung des Lichts im Aragonit ist. Betrachtet man Perlmutter aus einer Blickrichtung, so sieht man entsprechend Formel (2) zwei Farben, die sich dann mit dem Blickwinkel verändern bzw. im Spektrum verschieben [114, 115].

Im Gegensatz dazu erscheinen die Wachstumsfronten der „flat pearls“ und die am äußeren Rand der Schaleninnenseite im Tageslicht weiß, da sowohl die Größe der „stacks of coins“ als auch deren Abstände untereinander im Bereich weniger Mikrometer liegen ($d \gg \lambda$). An diesen Strukturen findet Mie-Streuung statt, die nahezu wellenlängenunabhängig ist [4]. Etwa vergleichbar ist die Lichtstreuung an Wassertröpfchen in Wolken, die ebenfalls weiß erscheinen. Dadurch sind die Wachstumsfronten auf den „flat pearls“ und Perlmutter an Spaltflächen sehr gut erkennbar und unterscheidbar [4, 5].

3 Experimentelle Grundlagen zu AFM und REM

In diesem Abschnitt wird allgemein der Aufbau und die Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops (AFM) beschrieben, mit dessen Hilfe die Oberflächenstruktur von „flat pearls“ und Perlmutterpaltflächen untersucht wurde und die direkte Beobachtung des Kristallwachstums auf diesen Probenoberflächen erfolgte. Zudem wird der Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops (REM) vorgestellt und die zur Bildentstehung führenden Wechselwirkungen zwischen Probenatomen und Elektronenstrahl erklärt.

3.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

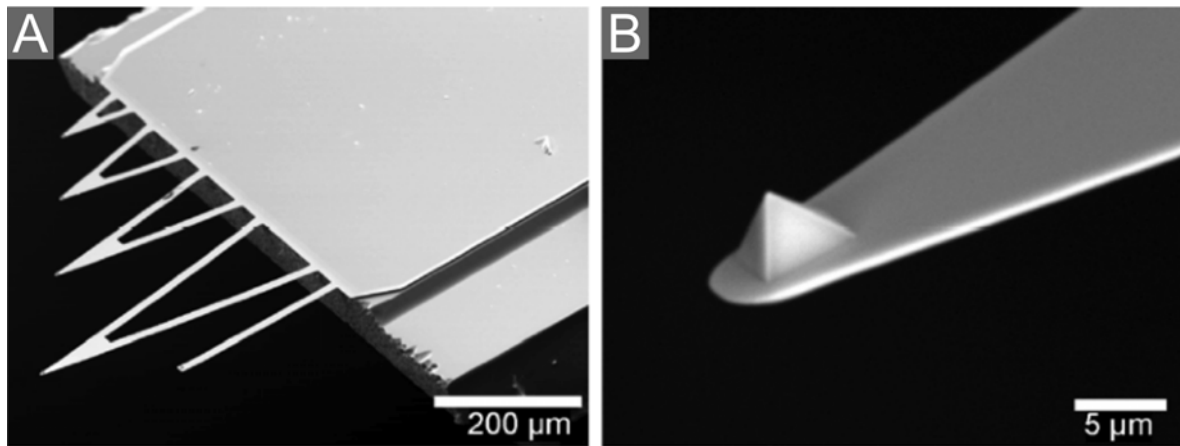


Abbildung 14: REM-Bilder (A) von mehreren AFM-Cantilevern (Federbalken) verschiedener Geometrien (Länge, Breite und Form) und (B) von einer pyramidenförmigen Spitze an der Unterseite eines Cantilevers (Bilder aus [119]).

Beim Rasterkraftmikroskop⁵¹, dessen erster Prototyp von Binnig, Quate und Gerber 1986 entwickelt wurde, erfolgt die Untersuchung der Oberfläche einer nichtleitenden Probe mit Hilfe einer feinen Spitze, die an der Unterseite eines Cantilevers angebracht und über der Probe angeordnet ist [4, 120]. Dabei kann die Oberflächenstruktur mit Auflösungen bis hin in den atomaren Bereich abgebildet werden [2, 4]. Der Cantilever, also ein Federbalken mit bestimmter Federkonstante, ist an einem z. B. aus Silizium bestehenden Trägerchip angebracht, der wiederum in dem AFM-Sondenhalter⁵² fixiert ist [4]. Die Federkonstante wird durch die Geometrie, also Länge, Dicke, Breite und Form, des Federbalkens und dessen Material beeinflusst [121]. Die Spitze-Cantilever Systeme bestehen oft aus Siliziumnitrid(Si_3N_4) [122, 123]. Im Bild (A) der **Abbildung 14** sind mehrere an

⁵¹englisch: atomic force microscope [4]

⁵²Dieser Sondenhalter wird später in den AFM-Kopf eingebaut (Details siehe Abschnitt 4.4) [2, 4].

einem Trägerchip befestigte und aus Siliziumnitrid bestehende Federbalken unterschiedlicher Geometrien gezeigt [2, 119]. Oftmals finden pyramidenförmige Spitzen (siehe Bild (B) in der Abb. 14) Verwendung, jedoch können Spitzen verschiedenster Geometrien und Radien hergestellt werden [4, 119]. Die Spitze, deren Höhe typischerweise wenige Mikrometer beträgt, weist oft einen Radius von nur wenigen Nanometern auf [2, 4].

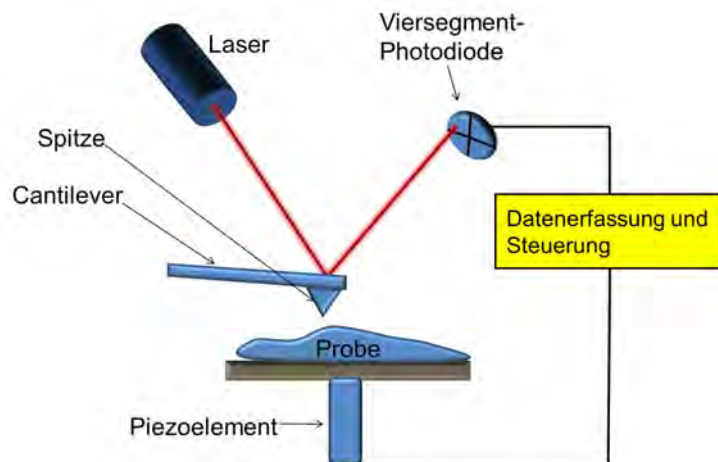


Abbildung 15: Schematische Darstellung des beim AFM verwendeten Rückkopplungsmechanismus bestehend aus Halbleiterlaser, Cantilever und Photodiode zur Regelung des Abstands zwischen Spitze und Probenoberfläche (Abb. aus [2]).

Im AFM werden mehrere Piezosteller verwendet: (1) zur Regelung des Spitze-Probe Abstands oder der Andruckkraft bei direktem mechanischen Kontakt zwischen Spitze und Probenoberfläche und (2) zur lateralen Verschiebung der Probe in x- und y-Richtung [2, 4]. Der Abstand zwischen Spitze und Probe wird mittels Rückkopplungsmechanismus über die Anhebung oder Absenkung der Probe kontrolliert [2]. Dazu wird ein Halbleiterlaser genutzt, dessen Strahl schräg auf die z.B. mit Gold oder Aluminium beschichtete Oberseite des Cantilevers fällt und von dieser reflektiert wird und schließlich auf ein Photodiodearray oder eine Zwei- bzw. Vier-Quadrantenphotodiode trifft [4, 124]. Die zwischen Probenoberfläche und Spitze wirkenden Kräfte (z. B. kurzreichweitige chemische Bindungskräfte und Van-der-Waals Kräfte) führen zu einer Auslenkung des Cantilevers und somit zu einer Verschiebung des Laserspots auf der Photodiode, die dann erfasst wird [2, 4]. Die **Abbildung 15** zeigt schematisch diesen beim AFM verwendeten Rückkopplungsmechanismus.

Die Untersuchung der Oberflächenstruktur von Proben mittels AFM kann in verschiedenen Betriebsmodi erfolgen: (1) Kontakt-Modus, (2) Nicht-Kontakt-Modus, (3) Intermittierend-Kontakt-Modus und (4) PeakForce-Tapping-Modus [125, 126]. Der PeakForce Tapping-Modus ist ein spezieller von der Firma Bruker⁵³ entwickelter Modus, der bei den in dieser Arbeit durchgeführten AFM-Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop Bio-

⁵³Billerica, MA, USA

Scope ResolveTM Verwendung fand [126, 127]. Die unterschiedlichen Betriebsmodi sowie deren Vorteile und Einschränkungen werden im Folgenden kurz beschrieben.

- Der Kontakt-Modus⁵⁴, bei dem die Spitze in direktem mechanischen Kontakt mit der Probenoberfläche ist und somit abstoßende (repulsive) Kräfte zwischen Spitzenatomen und Oberflächenatomen vorherrschen, gestattet es, insbesondere biologische Proben in Flüssigkeiten (z. B. in deionisiertem Wasser oder in CaCO₃-Lösungen) zu untersuchen und hohe Auflösungen der Oberflächenstruktur zu erreichen [4, 128]. Dabei sind zwei Modi möglich: (1) der „constant height“-Modus, bei dem die Andruckkraft variiert wird, sodass die Höhenposition der Spitze konstant bleibt und (2) der „constant force“-Modus, bei dem über eine Höhenänderung der Spitze bzw. des Cantilevers die Andruckkraft der Spitze auf die Probenoberfläche konstant gehalten wird [4]. Der direkte mechanische Kontakt führt jedoch zur schnellen Abnutzung der Spitze sowie eventuell zur Beschädigung oder Deformation der Probenoberfläche [2, 4]. Das Abbilden der Oberflächentopografie von sehr weichen Proben mittels Kontakt-Modus ist oftmals schwierig [129].
- Der Nicht-Kontakt-Modus⁵⁵, bei dem das aus Spitze und Cantilever bestehende System in konstanter Höhe von etwa 50 nm bis 150 nm über der Probenoberfläche geführt wird und die Spitze die Probenoberfläche nicht berührt, eignet sich besonders zur Untersuchung weicher Proben [4, 130]. Das Spitze-Cantilever System schwingt dabei jedoch, wobei die Anregungsfrequenz nahe der Resonanzfrequenz des Spitze-Cantilever Systems liegt [4, 131]. Typischerweise betragen die Resonanzfrequenzen zwischen 50 kHz und 400 kHz [2, 4]. In diesem Modus dominieren anziehende (attraktive) Kräfte zwischen Probenatomen und Spitzenatomen, welche eine Änderung der effektiven Federkonstante des Cantilevers bewirken und so die Resonanzfrequenz des Spitze-Cantilever Systems verschieben [4, 130]. Die Verschiebung der Resonanzfrequenz wiederum führt zu einer Änderung der Schwingungsamplitude, die mittels Rückkopplungsmechanismus erfasst wird und aus der man das Höhenprofil der Probe erhält [4, 131]. Da hier zwischen Probenatomen und Spitzenatomen kleinere Kräfte als im Kontakt-Modus wirken, ergeben sich ungenauere Abbildungen der Oberflächenstruktur [2, 4].
- Beim Intermittend-Kontakt-Modus⁵⁶ wird das Spitze-Cantilever System ebenfalls mit Frequenzen nahe seiner Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt [2, 4]. Wäh-

⁵⁴englisch: contact mode

⁵⁵englisch: non contact mode

⁵⁶englisch: tapping mode

rend des Schwingungszyklus ist die Spitze jedoch nur im Kontakt mit der Probenoberfläche bei maximaler Auslenkung des Cantilevers, also bei maximaler Schwingungsamplitude [4]. Da sich der Abstand zwischen Probenoberfläche und Spitze ändert, wirken in diesem Modus je nach Abstand sowohl anziehende (attraktive) als auch abstoßende (repulsive) Kräfte [4, 131]. Hier werden vor allem die im Kontakt-Modus auftretenden lateralen Scherkräfte, die zu einer Beschädigung oder Deformation der Probe führen können, vermieden [4, 132]. Dieser Modus erlaubt genauere Abbildungen der Probenoberfläche als der Nicht-Kontakt-Modus aufgrund der stärkeren Kräfte zwischen Probenatomen und Spitzenatomen [2, 4].

- Beim PeakForce-Tapping-Modus wird das Spitze-Cantilever System ebenfalls zum Schwingen gebracht, allerdings wird hier ein sinusförmiges Anregungssignal mit Frequenzen im Bereich von etwa 100 Hz bis 2 kHz verwendet [133]. Die Anregungsfrequenz liegt dabei weit unterhalb der Resonanzfrequenz des Spitze-Cantilever Systems [133, 134]. Als Regelsignal, aus dem sich das Höhenprofil der Probe ergibt, dient die mittels Rückkopplungsmechanismus aus der Auslenkung des Cantilevers erhaltene maximal wirkende Wechselwirkungskraft zwischen Probenatomen und Spitzenatomen – die sogenannte „peak force“ [135]. Diese „peak force“ wird während des Abbildens der Probenoberfläche konstant gehalten [133, 136]. Im Vergleich zu den anderen oben erwähnten Betriebsmodi sind hier sehr kleine abbildende Kräfte möglich (minimale „peak force“ von 100 pN) [133]. Dieser Modus erlaubt auch das Abbilden der Oberflächenstruktur von weichen Proben, wie z. B. der organischen Matrix, in Flüssigkeit⁵⁷ mit sehr hoher Auflösung⁵⁸ [137]. Hier werden auch die im Kontakt-Modus auftretenden lateralen Scherkräfte, die zu einer Beschädigung oder Deformation der Probe führen können, vermieden [138].

Zum besseren Verständnis zeigt die **Abbildung 16** schematisch *erstens* das Spitze-Cantilever System während eines Schwingungszyklus, also dem Annähern der Spitze an die Probenoberfläche und dem anschließenden Wegfahren der Spitze von der Probenoberfläche, und *zweitens* die dabei aufgenommenen Kraftkurven [134]. Befindet sich die Spitze in weiter Entfernung von der Probenoberfläche (Position 1) wirken keine oder nur sehr geringe Kräfte zwischen Probenatomen und Spitzenatomen, sodass der Cantilever keine Auslenkung erfährt [135, 139]. Bei Annäherung der Spitze an die Probenoberfläche (Position 1 bis 2) wirken zunehmend langreichweitige attraktive Kräfte, welche die Spitze an die Probenoberfläche ziehen und zu einer Auslen-

⁵⁷Im Allgemeinen kann das Abbilden der Probenoberfläche mittels PeakForce-Tapping-Modus sowohl an Luft als auch in Flüssigkeit erfolgen [137]. Die Untersuchungen der „flat pearls“ und Perlmutter-spaltflächen wurden stets in Flüssigkeit (CaCO₃-Lösungen) durchgeführt.

⁵⁸Die erreichbare Auflösung hängt auch von dem verwendeten Spitze-Cantilever System ab [122, 123].

kung des Cantilevers führen [135]. Übersteigt der attraktive Kraftgradient die Größe der Federkonstante k des Cantilevers, „springt“ die Spitze an die Probenoberfläche (Position 2) und bleibt in Kontakt mit dieser [135, 140]. Die bei Kontakt zwischen Spitze und Probe dominierenden repulsiven Kräfte nehmen bei weiterer Annäherung zu, bis die maximale Wechselwirkungskraft („peak force“) erreicht ist (Position 3), deren Wert (Setpoint) beim Abbilden vom Benutzer festgelegt wird [139, 141]. Dabei verbiegt sich der Cantilever in entgegengesetzter Richtung zur Probenoberfläche [139]. Wird die Spitze anschließend von der Probenoberfläche weggefahren, nehmen die zwischen Spitze und Probe wirkenden Kräfte wieder ab, jedoch bleibt die Spitze aufgrund von Adhäsionskräften über den Kontaktpunkt an der Probenoberfläche haften (Position 4 und 5) [135, 139]. Danach löst sich die Spitze von der Probenoberfläche und kehrt in den ursprünglichen Zustand zurück, in der keine bzw. nur sehr geringe Kräfte zwischen Spitzen- und Probenatomen wirken [139, 140]. Aus den aufgenommenen Kraftkurven können Informationen über die mechanische Beschaffenheit der Probenoberfläche, wie z. B. Adhäsionskraft, Energieverlust während eines Schwingungszyklus (Dissipation) und maximale Deformation der Probe, gewonnen werden [134, 141]. Bei sogenannten Kraftkarten („force maps“) erfolgt die Aufnahme von Kraftkurven bei jedem Pixel⁵⁹ des untersuchten Probenbereichs [135].

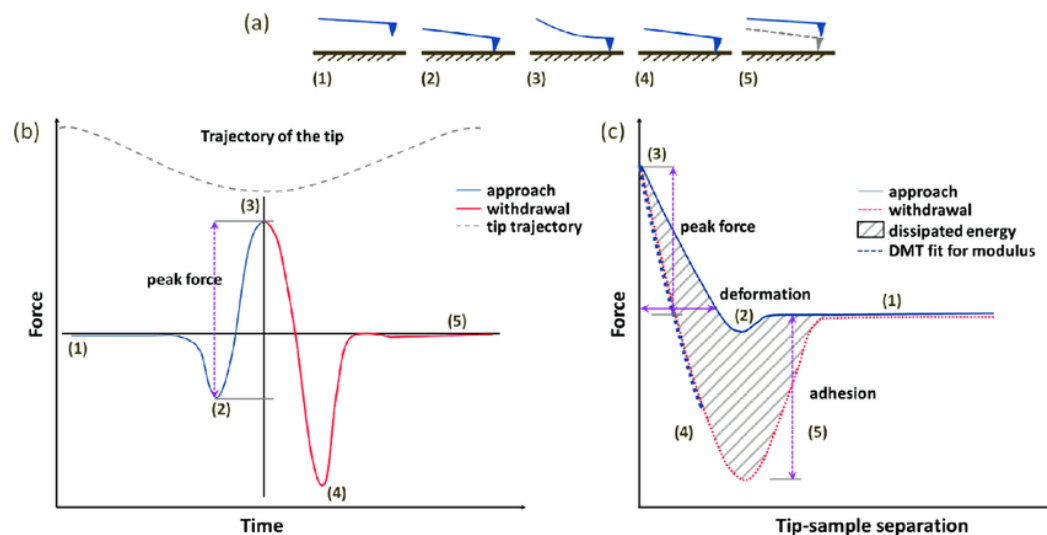


Abbildung 16: Schematische Zeichnung des Spitze-Cantilever-Systems über der Probe und der Kraftkurven während eines Schwingungszyklus im PeakForce-Tapping-Modus. (A) Position des Spitze-Cantilever-Systems bei Annäherung an die Probenoberfläche und bei anschließendem Wegfahren von der Probenoberfläche, (B) Kraft als Funktion der Zeit und (C) Kraft in Abhängigkeit des Abstands zwischen Spitze und Probe (Abb. aus [134]).

⁵⁹Die gewünschte Auflösung (z. B. 64x64 Pixel) wird vorher festgelegt.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mit einem Lichtmikroskop kann höchsten eine 1000-fache Vergrößerung und nur eine Auflösung von etwa 200 nm, die durch die Größe der Lichtwellenlänge des sichtbaren Lichts bedingt ist, erreicht werden [4, 142]. Im Vergleich dazu sind mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM⁶⁰), bei dem mittels Elektronenstrahl die Oberfläche zeilenweise abgetastet wird, Auflösungen von wenigen Nanometern möglich [2, 142]. Die erreichbare Auflösung wird hauptsächlich durch den Strahldurchmesser des Elektronenstrahls auf der Probenoberfläche, der je nach Fokussierung etwa zwischen 1 nm und 1 μ m betragen kann, bestimmt und ist somit stark von der Elektronenerzeugungsmethode abhängig [4, 143]. Bei Proben, die nicht elektrisch leitfähig sind, müssen die Probenoberflächen für die REM-Untersuchung meistens mit einer dünnen Schicht, z. B. aus Gold oder Kohlenstoff, bedampft oder besputtert werden [2, 4]. So wird eine starke Aufladung der Probenoberfläche bei der REM-Untersuchung vermieden [4]. Die Untersuchung der Proben erfolgt stets im Vakuum⁶¹. Daher sollten die Probestücke möglichst wasserfrei sein [2, 4].

Die Erzeugung des Elektronenstrahls kann erfolgen durch: (1) Glühemission, (2) kalte Feldemission oder (3) thermische Feldemission [142, 145]. Werden die Elektronen thermisch durch Glühemission erzeugt, besteht der Strahlkopf des REM aus einer Wolfram-Haarnadelkathode⁶² oder einem Lanthanhexaborid(LaB₆)-Einkristall, einem Wehneltzylinder und einer Anode [4, 142]. Durch die zwischen Wolfram-Glühdraht bzw. LaB₆-Einkristall⁶³ und Anode anliegende hohe positive Spannung werden die Elektronen in Richtung der Anode beschleunigt und passieren dabei den Wehneltzylinder [142, 147]. Dieser Wehneltzylinder ist eine auf leicht negativem Potential liegende zylinderförmige Steuerelektrode und wird zur Intensitätsregelung sowie zur Fokussierung des Elektronenstrahls genutzt [2, 148]. Bei Verwendung eines LaB₆-Einkristalls kann ein geringerer Strahldurchmesser und somit eine höhere Auflösung erreicht werden, allerdings ist dessen Lebensdauer kürzer als die einer Wolfram-Haarnadelkathode [142, 146]. Mit beiden Kathodenarten ist ein maximaler Strahlstrom von 1000 nA erreichbar [144].

Mit einer Feldemissionskathode kann aufgrund einer besseren Fokussierung des Elektronenstrahls eine höhere Auflösung erreicht werden [4, 146]. Dabei wird die bei der Glühemission auftretende Geschwindigkeitsverteilung der austretenden Elektronen vermieden [4]. Die Feldemissionskathode, deren Betrieb bei Raumtemperatur⁶⁴ erfolgt, besteht

⁶⁰englisch: scanning electron microscope (SEM)

⁶¹Je nach Elektronenerzeugungsmethode wird mit einem Vakuum zwischen 10^{-3} Pa und 10^{-8} Pa gearbeitet [144].

⁶²gebogener Glühdraht aus einer Wolframlegierung, Aufheizung auf etwa 2700 K [142, 146]

⁶³Aufheizung auf etwa 1900 K [144]

⁶⁴Betrieb bei etwa 300 K [144]. Diese Art der Feldemission wird als „kalte“ Feldemission bezeichnet [144].

aus einem Wolfram-Einkristall mit einer feinen Spitze, die einen Krümmungsradius von $r < 0,1 \mu\text{m}$ aufweist [149]. Dieser Einkristall ist auf einem gebogenen Wolfram-Glühdraht angebracht [145, 149]. Im Strahlkopf befinden sich neben der Feldemissionskathode noch zwei Anoden [145]. Durch die zwischen Kathode und erster Anode anliegende hohe Spannung⁶⁵ wird die Austrittsarbeit der Elektronen reduziert und so Elektronen aus der feinen, monokristallinen Spitze emittiert [145, 150]. Die zweite Anode dient wieder zur Beschleunigung der Elektronen [146, 150]. Allerdings müssen solche Feldemissionskathoden immer im Ultrahochvakuum (10^{-8} Pa) betrieben werden und der maximal erreichbare Strahlstrom ist mit nur $0,2 \text{ nA}$ sehr gering [144]. Bei den sogenannten Schottky-Feldemittern wird der Effekt der Glühemission mit dem der Feldemission kombiniert [143]. Dort ist die Spitze des Wolfram-Einkristalls, die hier jedoch nur einen Krümmungsradius von $r < 1 \mu\text{m}$ besitzt, zusätzlich mit Zirkonium(IV)-oxid (ZrO_2) bedampft [146, 149]. Die Bedampfung reduziert die Austrittsarbeit der Elektronen [145]. Durch das Aufheizen des Wolfram-Glühdrahts bzw. des Wolfram-Einkristalls mit Spitze kann so die Feldstärke, die für die Emission der Elektronen notwendig ist, im Vergleich zu den „kalten“ Feldemittern reduziert werden [144]. Die Schottky-Feldemitter erzeugen einen höheren Emissionsstrom (10 nA), der über längere Zeit konstant ist [149]. Zusätzlich reicht ein Vakuum von 10^{-6} Pa für den Betrieb aus [144].

Bei dem zur Untersuchung der Probestücke verwendeten Rasterelektronenmikroskop⁶⁶ werden Schottky-Feldemitter zur Strahlerzeugung eingesetzt [150]. Unterhalb der Kondensorlinse befindet sich eine Aperturblende, mit welcher der Durchmesser des Elektronenstrahls zusätzlich reguliert werden kann [4, 150]. Die Objektivlinse besteht aus einem Dublett aus elektromagnetischer und elektrostatischer Linse [150]. Am unteren Ende dieser Objektivlinse befinden sich zwei magnetische Spulenpaare, mit denen der Elektronenstrahl in x - und y -Richtung abgelenkt und über die Probenoberfläche gerastert werden kann [4, 150]. Die erreichbare Auflösung ist neben dem Strahldurchmesser des Primärelektronenstrahls⁶⁷ auf der Probenoberfläche auch von der verwendeten Beschleunigungsspannung, der Rastergeschwindigkeit, dem Arbeitsabstand⁶⁸, dem Neigungswinkel zwischen Detektor und Probenoberfläche sowie Linsenfehlern abhängig [4, 142]. Linsenfehler sind z. B. chromatische Aberration, sphärische Aberration und Astigmatismus [4]. Die Auflösung nimmt mit zunehmender Beschleunigungsspannung, also zunehmender Geschwindigkeit der Primärelektronen, und abnehmenden Strahldurchmesser zu [4, 14]. Beim verwendeten Rasterelektronenmikroskop können Beschleunigungsspannungen im Bereich von 100 V bis

⁶⁵Dabei liegt ein elektrisches Feld mit einer Feldstärke von mindestens einigen $10^7 \frac{\text{V}}{\text{cm}}$ an [144].

⁶⁶Auriga[®] series, Gemini[®]; Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH; Oberkochen, Deutschland

⁶⁷Die auf die Probenoberfläche auftreffenden Elektronen werden als Primärelektronen bezeichnet [2, 4].

⁶⁸Abstand zwischen dem Polschuh der Objektivlinse und dem fokussierten Probenbereich [4, 146]

30 kV verwendet werden [148]. Dort ist eine maximale Auflösung von 1 nm bei Verwendung einer Beschleunigungsspannung von 30 kV erreichbar [150].

Die sogenannten Primärelektronen (PE) treffen auf die Probenoberfläche, dringen in das Probenmaterial ein und wechselwirken dort mit den Probenatomen und erzeugen so Sekundärelektronen (SE), Rückstreuerelektronen (BSE), charakteristische Röntgenstrahlung, Röntgenbremsstrahlung, Kathodolumineszenz und Augerelektronen (AE) [2, 4]. Die Abbildung 17 zeigt das durch Wechselwirkung zwischen Primärelektronenstrahl und Probenatomen entstehende birnenförmige Wechselwirkungsvolumen, dessen Größe mit steigender Beschleunigungsspannung und kleiner werdender Kernladungszahl⁶⁹ Z des untersuchten Probenmaterials zunimmt [4, 151].

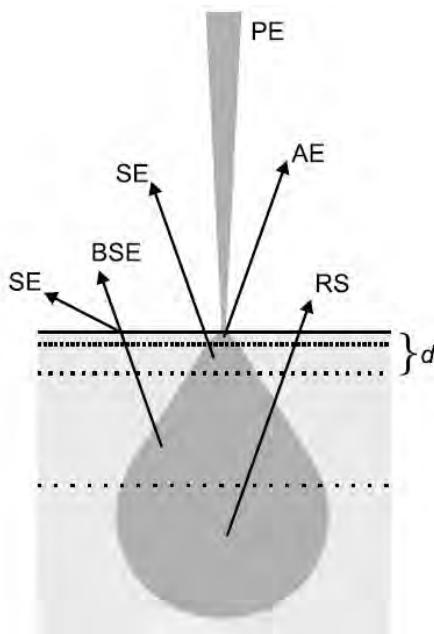


Abbildung 17: Schematische Zeichnung des birnenförmigen Wechselwirkungsvolumens (Anregungskeule), das durch die Wechselwirkung zwischen Primärelektronenstrahl (PE) und Probenatomen entsteht (Abb. aus [14]). Die auf die Probenoberfläche auftreffenden Primärelektronen (PE) dringen unterschiedlich tief in das Probenmaterial ein und erzeugen dort Sekundärelektronen (SE), Rückstreuerelektronen (BSE), Augerelektronen (AE) und Röntgenstrahlung (RS) [4]. Die Emission der Sekundärelektronen erfolgt dabei nur aus oberflächennahen Schichten mit der Dicke d [14].

3.2.1 Sekundärelektronen

Niederenergetische Elektronen mit maximaler kinetischer Energie⁷⁰ von 50 eV, die durch inelastische Streuprozesse zwischen den Primärelektronen und den in den äußeren Elektronenschalen der Probenatome vorhandenen Valenzelektronen entstehen und anschließend aus der Probenoberfläche austreten, werden als Sekundärelektronen (SE)⁷¹ bezeichnet [4, 153]. Die kinetische Energie der emittierten Sekundärelektronen hängt von der Austrittsarbeit des Probenmaterials ab und liegt größtenteils nur im Bereich von 1 eV bis 5 eV [4, 154]. Diese in der Probe erzeugten Sekundärelektronen werden in Abhängig-

⁶⁹Die Kernladungszahl entspricht der Ordnungszahl [4].

⁷⁰kinetische Energie der Sekundärelektronen: $0 \leq E \leq 50$ eV [147, 152]

⁷¹englisch: secondary electrons

keit des Entstehungsprozesses und -ortes in Sekundärelektronen vom Typ 1 und Typ 2 eingeteilt [147, 155]. Die nur aus oberflächennahen Bereichen mit Tiefen bis zu maximal 10 nm stammenden Sekundärelektronen, die als SE₁-Elektronen (Sekundärelektronen vom Typ 1) bezeichnet werden, entstehen vorzugsweise lateral nur im Bereich des Auftreffpunkts des Primärelektronenstrahls auf der Probenoberfläche [4, 147]. Dadurch ist mit den SE₁-Elektronen eine hohe laterale Auflösung von etwa 1 nm bis 5 nm erreichbar [155]. Die Detektion der SE₁-Elektronen ermöglicht somit eine hochaufgelöste Untersuchung und Abbildung der Oberflächenstruktur der Probe [4]. Die SE₂-Elektronen entstehen hingegen durch inelastische Streuprozesse der bereits zuvor im Probenmaterial ein- oder mehrfach elastisch gestreuten Primärelektronen, also durch inelastische Streuprozesse der Rückstreuelektronen⁷², und liefern somit neben Informationen zur Oberflächenstruktur auch indirekt Informationen über die Materialzusammensetzung [4, 156]. Jedoch kann mit den SE₂-Elektronen nur eine laterale Auflösung erreicht werden, die in der Größenordnung der mittels Rückstreuelektronen erreichbaren Auflösung von etwa 0,01 µm bis 1 µm liegt [155, 157]. Die Austrittstiefe der SE₂-Elektronen liegt im Bereich von 0,1 µm bis 1 µm und hängt von der Kernladungszahl Z des Probenmaterials und der verwendeten Beschleunigungsspannung ab [155].

Zudem können Rückstreuelektronen, welche die Probenoberfläche mit hoher kinetischer Energie verlassen, an den Wänden der Probenkammer oder an der Endlinse der elektronenoptischen Säule weitere Sekundärelektronen erzeugen, die als SE₃-Elektronen⁷³ bezeichnet werden [155]. SE₄-Elektronen⁷⁴ entstehen durch Wechselwirkung zwischen den Primärelektronen und dem Inneren der elektronenoptischen Säule am Ende der Objektivlinse [146, 155]. Die SE₃- und SE₄-Elektronen liefern somit keine Informationen über die Probenbeschaffenheit und tragen nur zum Hintergrundsignal bei [146, 158].

Der Emissionskoeffizient δ der Sekundärelektronen – auch Sekundärelektronenausbeute genannt – beschreibt das Verhältnis der Anzahl der emittierten⁷⁵ Sekundärelektronen zur Anzahl der auf die Probe auftreffenden Primärelektronen und hängt von der verwendeten Beschleunigungsspannung, der Austrittsarbeit des Probenmaterials, dem Einfallswinkel des Primärelektronenstrahls zur Probenoberfläche und der lokalen Oberflächenkrümmung der Probe ab [146, 154].

Beim verwendeten Rasterelektronenmikroskop⁷⁶ stehen zwei verschiedene Sekundärelektronendetektoren zur Verfügung: (1) der Inlens-Detektor und (2) der SE₂-Detektor,

⁷²siehe Abschnitt 3.2.2

⁷³Sekundärelektronen vom Typ 3

⁷⁴Sekundärelektronen vom Typ 4

⁷⁵Dabei werden nur die SE₁- und SE₂-Elektronen berücksichtigt [146].

⁷⁶Auriga[®] series, Gemini[®]; Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH; Oberkochen, Deutschland

auch Everhart-Thornley-Detektor genannt.

Der SE_2 -Detektor, der an der Wand der Probenkammer montiert und somit seitlich im schrägen Winkel zur Probenoberfläche angeordnet ist, besteht aus Kollektorgitter, Szintillator und Photomultiplier [4, 150]. Dieser Detektor weist vorwiegend die SE_2 -Elektronen nach, detektiert aber auch eine geringe Anzahl an Rückstreuelektronen, die aus der Probenoberfläche austreten und in Richtung des Detektors abgelenkt werden [150, 157]. Durch Anlegen einer leicht positiven Spannung⁷⁷ am Kollektorgitter von z. B. 300 V werden die sich langsam bewegenden, niederenergetischen Sekundärelektronen angezogen und zum Szintillator hin beschleunigt [4, 159]. Ein sogenanntes Pseudo-Rückstreubild⁷⁸ entsteht, indem am Kollektorgitter eine negative Spannung angelegt wird und so die Sekundärelektronen abgewiesen werden und nur der Nachweis der hochenergetischen, sich in Richtung des Detektors bewegenden Rückstreuelektronen erfolgt [150, 159]. Die auf den Szintillator auftreffenden Elektronen erzeugen Photonen, die dann zum Photomultiplier weitergeleitet werden und dort Elektronen aus der Photokathode über den photoelektrischen Effekt herauslösen [2, 4]. Diese herausgelösten Elektronen werden über Dynoden, also Anoden mit jeweils höherer Spannung, beschleunigt [2]. Der Photomultiplier erzeugt somit eine Spannung, die proportional zur Anzahl der Photonen und damit zur Anzahl der auf das Szintillatormaterial auftreffenden Elektronen ist [2, 4]. Zur Erhöhung der Plastizität der untersuchten Probenoberfläche tragen der Flächenneigungskontrast und der Kanteneffekt bei [4, 160]. Durch den Neigungswinkel zwischen SE_2 -Detektor und Probenoberfläche erscheinen abgewandte Flächen dunkler als dem Detektor zugewandte Strukturen [2, 4]. Die Emission von Sekundärelektronen ist aus Kanten aufgrund der größeren Oberfläche im Vergleich zu glatten Strukturen stärker [4, 160]. Der SE_2 -Detektor wird daher insbesondere zur Abbildung der Probentopografie genutzt [161]. Die Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Probestücke der Wachstumsfronten und der Perlmutterspaltflächen sowie der bei den AFM-Wachstumsexperimenten auf diesen Probestücken induziert gewachsenen Calciumcarbonatkristalle erfolgte stets mit dem SE_2 -Detektor.

Der Inlens-Detektor, der im Inneren der elektronenoptischen Säule oberhalb der Objektivlinse angebracht und somit direkt oberhalb der Probe angeordnet ist, weist hauptsächlich die lateral nur um den Auftreffpunkt des Primärelektronenstrahls entstehenden SE_1 -Elektronen nach, aber auch in geringer Anzahl die SE_2 -Elektronen [150, 162]. Daher wird dieser Detektor zur hochaufgelösten Untersuchung und Abbildung der Oberflächenstruktur genutzt [163]. Er besteht ebenfalls aus einem Szintillator und einem Photomultiplier,

⁷⁷Dabei kann eine Kollektorspannung im Bereich von -250 V bis 400 V verwendet werden [150].

⁷⁸Im Gegensatz zu den mittels Rückstreuelektronendetektoren (z. B. EsB[®]-Detektor, siehe Abschnitt 3.2.2) aufgenommenen Bildern enthält das Pseudo-Rückstreubild kaum Informationen über die Materialzusammensetzung [159].

wobei das Szintillatormaterial ringförmig um den Primärelektronenstrahl angeordnet ist [163, 164].

3.2.2 Rückstreuelektronen

Primärelektronen, die auf die Probenoberfläche auftreffen und in tiefere Probenschichten eindringen, können an den Atomkernen des Probenmaterials ein- bis mehrfach elastisch gestreut werden und die Probe anschließend wieder über deren Oberfläche verlassen [2, 165]. Bei diesen aus der Probenoberfläche austretenden Elektronen, die im Gegensatz zu den Sekundärelektronen größtenteils hohe kinetische Energien besitzen, spricht man von Rückstreuelektronen (BSE⁷⁹) [4]. Die kinetische Energie der Rückstreuelektronen kann im Bereich zwischen 50 eV und der Primärelektronenenergie E_0 liegen⁸⁰ [147, 152]. Die Rückstreuelektronen können bis zu einer maximalen Tiefe von etwa 2 μm aus dem gesamten birnenförmigen Wechselwirkungsbereich, dessen Größe durch die Eindringtiefe des Primärelektronenstrahls in die Probe festgelegt wird, stammen [4, 166]. Die Austrittstiefe der Rückstreuelektronen entspricht dabei in etwa der Hälfte der Eindringtiefe der Primärelektronen, die wiederum von der angelegten Beschleunigungsspannung und der Kernladungszahl Z des Probenmaterials abhängt [166, 167]. Mit steigender Beschleunigungsspannung, also zunehmender Primärelektronenenergie, und mit abnehmender Kernladungszahl nimmt die Eindringtiefe der Primärelektronen zu und somit auch die Größe des Entstehungsbereichs der Rückstreuelektronen [155, 164]. Mittels Rückstreuelektronen lassen sich verschiedene Materialien im Wechselwirkungsbereich unterscheiden, da diese unterschiedliche Rückstreukoeffizienten aufweisen [4]. Der Quotient aus der Anzahl der emittierten Rückstreuelektronen und der Anzahl der auf die Probe auftreffenden Primärelektronen wird als Rückstreukoeffizient η bezeichnet [4, 147]. Der Rückstreukoeffizient ist elementspezifisch, also von der Kernladungszahl Z des zu untersuchenden Probenmaterials abhängig, und nimmt mit steigender Kernladungszahl der streuenden Atome zu [2, 168]. So dringen Primärelektronen in Materialien mit hoher Kernladungszahl weniger tief ein und werden dort stärker elastisch gestreut. Diese Materialien erscheinen dann in den REM-Aufnahmen heller als Materialien mit kleineren Kernladungszahlen [168]. Der Rückstreukoeffizient ist auch vom Einfallswinkel der Primärelektronen und in geringem Maße von deren Energie abhängig [147, 168].

Der Nachweis der Rückstreuelektronen erfolgt mit einem oberhalb der Probe angeordneten ringförmigen Detektor, der sich entweder direkt im Inneren der elektronenoptischen Säule oder unterhalb der Objektivlinse am Ende der elektronenoptischen Säule befindet

⁷⁹englisch: backscattered electrons

⁸⁰kinetische Energie der Rückstreuelektronen: $50 \text{ eV} < E \leq E_0$ (E_0 - Primärelektronenenergie) [147, 152]

[4, 148]. Meistens finden dafür aus mehreren Segmenten bestehende Halbleiterdetektoren oder auf YAG (Yttrium-Aluminium-Granat) basierende Einkristall-Szintillatoren Verwendung⁸¹. Um die Sekundärelektronen, die nur geringe kinetische Energien bis zu maximal 50 eV besitzen, abzuweisen, liegt der Rückstreuelektronendetektor auf einem negativen Potential [4, 148]. Die Nachweiseffizienz von Rückstreuelektronendetektoren wird hauptsächlich durch die angelegte Beschleunigungsspannung, den Arbeitsabstand zwischen dem Polschuh der Objektivlinse und dem fokussierten Probenbereich sowie durch die Orientierung zwischen Probenoberfläche und Detektor bestimmt [4, 146].

⁸¹Bei dem in dieser Arbeit zur Untersuchung der Probestücke verwendeten Rasterelektronenmikroskop (Auriga[®] series, Gemini[®]; Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH; Oberkochen, Deutschland) können zwei verschiedene Rückstreuelektronendetektoren verwendet werden: (1) der EsB[®]-Detektor (energie-selektiver (energy-selective) BSE-Detektor) und (2) der AsB[®]-Detektor (winkelselektiver (angle-selective) BSE-Detektor) [164, 169]. Der EsB[®]-Detektor befindet sich im Inneren der elektronenoptischen Säule des REM oberhalb der Objektivlinse und detektiert Rückstreuelektronen, die aus der Probenoberfläche unter einem maximalen Winkel von 15° zum Primärelektronenstrahl austreten [164, 170]. Das vor dem Detektor angebrachte Gitternetz, an dem eine Spannung U_{Gitter} im Bereich zwischen 0 V und -1500 V angelegt werden kann, dient (1) zur Abweisung der niederenergetischen Sekundärelektronen und (2) zur Selektion der Rückstreuelektronen in Abhängigkeit ihrer kinetischen Energie [148]. Liegt am Gitternetz eine Spannung von $U_{\text{Gitter}} < -800$ V an, werden nur Rückstreuelektronen detektiert. Bei Spannungen von $U_{\text{Gitter}} > -800$ V werden sowohl Sekundärelektronen als auch Rückstreuelektronen erfasst [150]. Der AsB[®]-Detektor ist ein fester, aus mehreren, meistens vier Segmenten bestehender und unterhalb der Objektivlinse angebrachter Halbleiterdetektor, der die Rückstreuelektronen detektiert, die aus der Probenoberfläche unter einem größeren Winkel zum Primärelektronenstrahl austreten [164, 170].

4 Präparations- und Untersuchungsmethoden

Bei den bereits in [10] gezeigten AFM-Untersuchungen an frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen sowie bei eigenen durchgeführten AFM-Experimenten auf den Oberflächen von frisch gewachsenen „flat pearls“ und auf frisch erzeugten Perlmutterspaltflächen wurde zunächst Reinstwasser⁸² (1) jeweils für die Benetzung der Probenoberfläche während der Präparationsprozedur und (2) als Flüssigkeit, in der das Abbilden der Probenoberfläche zu Beginn jeder AFM-Untersuchung erfolgte, verwendet [4]. Besonders bei den AFM-Experimenten an Perlmutterspaltflächen zeigte sich jedoch, dass Reinstwasser zum Abbau des Calciumcarbonats, insbesondere an den Kanten der Aragonitplättchen, führt und so die bereits ursprünglich zwischen den Plättchen vorhandenen Löcher und Spalten schnell deutlich größer wurden [4, 10]. Da die Probestücke während der gesamten Vorbereitungsprozedur allerdings stets mit Flüssigkeit benetzt sein mussten, um ein Austrocknen der Probenoberflächen zu verhindern, fanden bei allen weiteren AFM-Untersuchungen immer CaCO_3 -Lösungen sowohl bei der Probenpräparation als auch beim anfänglichen Abbilden mittels AFM Verwendung [4]. Um dabei möglichst noch kein oder nur wenig Kristallwachstum auf den jeweiligen später zu untersuchenden Probenoberflächen zu initiieren, wurden nur gesättigte 0,9 mM oder gering übersättigte 1 mM CaCO_3 -Lösungen genutzt [4, 10]. Bei den später durchgeführten AFM-Wachstumsexperimenten kamen auch höher konzentrierte CaCO_3 -Lösungen (2 mM, 4 mM und 5 mM) zum Einsatz, um gezielt Wachstum von Kristallen zu initiieren und deren Wachstumsprozesse direkt mit dem AFM zu beobachten. Somit erfolgte bei jeder AFM-Untersuchung als Erstes immer das Ansetzen der CaCO_3 -Lösungen.

Im Folgenden wird daher zuerst die Präparation der CaCO_3 -Lösungen beschrieben und anschließend sowohl die Erzeugung der Wachstumsfronten und der Perlmutterspaltflächen als auch die Präparation der Probestücke für die AFM-Untersuchungen vorgestellt. Darüber hinaus wird die Präparation der löslichen organischen Matrix, deren Proteine als Additive bei den AFM-Wachstumsexperimenten Verwendung fanden, und die Ermittlung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay beschrieben.

4.1 Präparation der CaCO_3 -Lösungen

Die Beschreibung der Herstellung der gesättigten CaCO_3 -Lösung (0,9 mM) und der übersättigten CaCO_3 -Lösungen (1 mM, 2 mM, 4 mM und 5 mM) erfolgte von mir bereits ausführlich in [4]. Dort findet sich auch ein detailliertes Protokoll der Präparationsprozedur, die im Folgenden kurz zusammengefasst ist.

⁸²deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand von $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ [4]

Das Ansetzen der CaCO_3 -Lösungen erfolgte hier jeweils durch Mischen einer Calciumchlorid(CaCl_2)- und einer Natriumhydrogencarbonat(NaHCO_3)-Stammlösung, welche gleiche Konzentrationen aufwiesen, im Verhältnis von 1:1 [4, 17]. Um jedoch eine CaCO_3 -Lösung mit der Konzentration von z. B. 1 mM herzustellen, müssen beide Stammlösungen jeweils eine Konzentration von 2 mM aufweisen, da sich deren Konzentrationen beim Mischen halbieren [4]. Die **Abbildung 18** zeigt den Sättigungsgrad und den pH-Wert der präparierten CaCO_3 -Lösung⁸³ in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Calciumchlorid- und Natriumhydrogencarbonat-Stammlösungen [4, 10].

Da mit sehr kleinen Sättigungskonzentrationen gearbeitet wurde, erfolgte vor jeder Präparation zunächst die sorgfältige Reinigung der drei 250 ml-Messzylinder, in denen *erstens* das Ansetzen der jeweiligen Stammlösungen und *zweitens* das Mischen beider Stammlösungen stattfand, und der drei mit Schraubverschluss verschließbaren Duran[®]-Laborglasflaschen⁸⁴ mit Volumina von 500 ml bzw. 1000 ml⁸⁵, in denen *erstens* das zur Herstellung verwendete Reinstwasser und *zweitens* die präparierten CaCO_3 -Lösungen aufbewahrt wurden [4]. Zum Säubern wurden diese Gefäße zunächst 12 Stunden mit 0,1 M Salzsäure⁸⁶ (HCl) inkubiert und nach Entfernung der Salzsäure jeweils dreimal mit Reinstwasser gespült. Nach erneuter Befüllung mit Reinstwasser und Verschließen erfolgte die Lagerung der Gefäße bis zur erneuten Verwendung. Die Messzylinder wurden zusätzlich mit Aluminiumfolie abgedeckt [4, 10].

Zur Vermeidung des Auftretens von Luftblasen bei den später in CaCO_3 -Lösungen durchgeführten AFM-Untersuchungen wurde das für die Herstellung der Stammlösungen verwendete Reinstwasser in die 1000 ml-Laborglasflasche gefüllt und vor Ansetzen der Stammlösungen 10 Minuten entgast [4]. Um nun eine Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung definierter Konzentration herzustellen, erfolgte zunächst die Berechnung der dafür notwendigen Masse des in gepulverter Form vorliegenden Natriumhydrogencarbonats⁸⁷ (NaHCO_3), das eine molare Masse von $84,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ aufwies, entsprechend der folgenden Gleichung

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{V \cdot M} \quad ,$$

wobei n die Stoffmenge, M die molare Masse und c die gewünschte Konzentration der

⁸³berechnet von Malte Launspach, AG Fritz, Institut für Biophysik; Fachbereich 1 der Universität Bremen; Bremen, Deutschland

⁸⁴DWK Life Sciences GmbH; Mainz, Deutschland

⁸⁵Dabei wurden zwei Laborglasflaschen mit Volumina von 500 ml und eine Laborglasflaschen mit Volumen von 1000 ml verwendet [4].

⁸⁶VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; Fontenay-sous-Bois, Frankreich

⁸⁷AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland

Stammlösung ist [4, 17]. Als Volumen V der Stammlösung wurde stets 250 ml verwendet. Das Abwiegen des Natriumhydrogencarbonats erfolgte anschließend mittels Wägepapier⁸⁸ auf einer Feinwaage⁸⁹. Nach Hinzufügen des abgewogenen Natriumhydrogencarbonats in den bereits mit etwa 100 ml entgastem Reinstwasser gefüllten Messzylinder wurde dieser mit weiterem Reinstwasser sorgfältig auf das Volumen von 250 ml aufgefüllt. Danach erfolgte die zweiminütige Durchmischung der Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung bei 150 UPM⁹⁰ mit Hilfe des im Messzylinder befindlichen Rührfischs und eines Magnetrührers. Für das Ansetzen der Calciumchlorid(CaCl₂)-Stammlösung, deren Präparation analog zur Herstellung der ersten Stammlösung verlief, wurde Calciumchlorid⁹¹ (CaCl₂) mit einer molaren Masse von $110,99 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, das ebenfalls in gepulverter Form vorlag, verwendet [4]. Hier fanden Stammlösungen mit den Konzentrationen von 2 mM, 4 mM, 8 mM und 10 mM Verwendung. Die Massen an Calciumchlorid und Natriumhydrogencarbonat, die für das Ansetzen der Stammlösungen benötigt wurden, sind in der Tabelle 1 aufgelistet [4, 10].

Konzentration der Stammlösungen	m_{CaCl_2} in g (für 250 ml)	m_{NaHCO_3} in g (für 250 ml)
10 mM	0,277	0,210
8 mM	0,222	0,168
4 mM	0,111	0,084
2 mM	0,055	0,042

Tabelle 1: Benötigte Massen m_{CaCl_2} an Calciumchlorid und m_{NaHCO_3} an Natriumhydrogencarbonat für die Herstellung der jeweiligen 250 ml-Stammlösungen (Tab. aus [4]).

Nach Ansetzen der zur Herstellung der höher übersättigten CaCO₃-Lösungen benötigten Stammlösungen wurde jeweils das gleiche Teilvolumen beider Stammlösungen für die Erzeugung der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO₃-Lösung mit dem zuvor bereits entgasten Reinstwasser in einem Messzylinder⁹² entsprechend verdünnt und die verdünnten Lösungen in einem weiteren Messzylinder (für Calciumcarbonat) zwei Minuten bei 150 UPM mittels Rührfisch und Magnetrührer gemischt sowie die fertig präparierte 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO₃-Lösung in eine der 500 ml-Laborglasflaschen gefüllt [4, 10]. Die Präparation der CaCO₃-Lösung erfolgte im Chemielabor bei einer nahezu konstanten Umgebungstemperatur von etwa 24 °C. Um eine Anpassung der Temperatur der hergestellten 0,9 mM

⁸⁸Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland

⁸⁹BP210D; Sartorius AG; Göttingen, Deutschland

⁹⁰Umdrehungen pro Minute

⁹¹AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland

⁹²Dabei wurde stets einer der Messzylinder für die Calciumchlorid-Stammlösung und der zweite Messzylinder für die Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung verwendet [4].

bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung an die im AFM-Raum herrschende Raumtemperatur zu gewährleisten, wurde diese nach dem Ansetzen sofort in den AFM-Raum, in dem sowohl die Probenpräparation als auch das anschließende AFM-Experiment stattfand, gestellt. Das Ansetzen der höher übersättigten CaCO_3 -Lösung erfolgte erst später, nachdem das Abbilden des zur Beobachtung des Kristallwachstums ausgewählten Probenbereichs mit dem AFM stabil über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten gelang. Dazu erfolgte das Mischen der verbliebenen gleichen Teilvolumina beider Stammlösungen und anschließend das zweiminütige Rühren bei 150 UPM. Danach wurde die höher übersättigte CaCO_3 -Lösung in die zweite 500 ml-Laborglasflasche gefüllt und ebenfalls in den AFM-Raum neben das AFM gestellt, um eine Anpassung der Temperaturen zu ermöglichen [4].

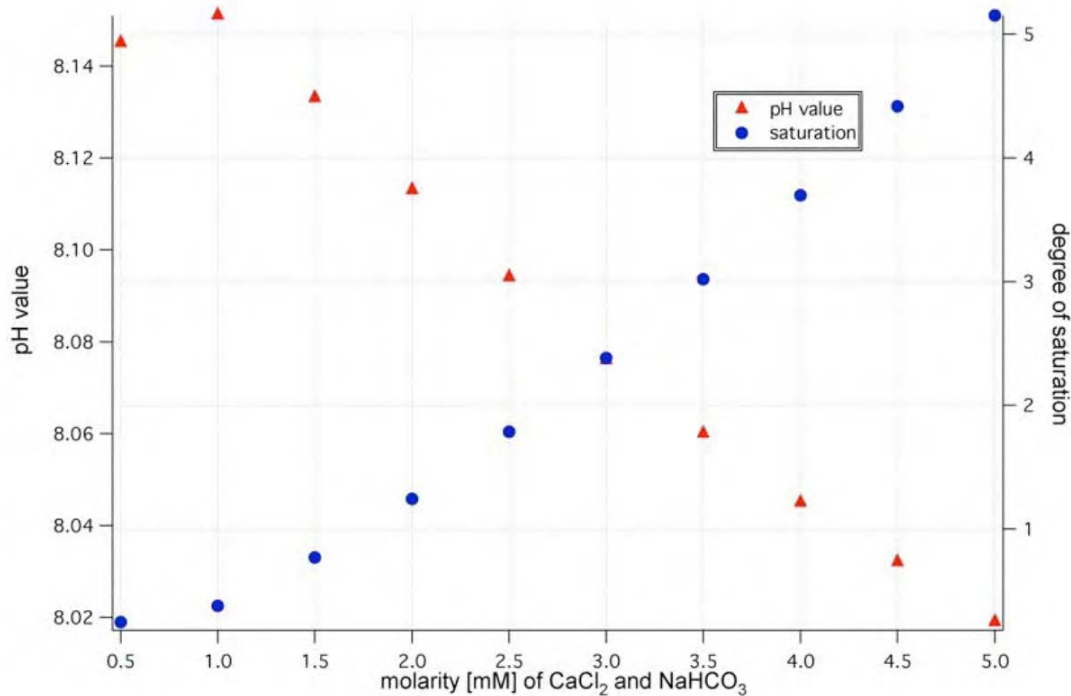
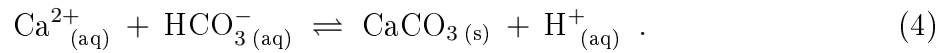


Abbildung 18: Abhängigkeit des pH-Wertes und des Sättigungsgrades der präparierten CaCO_3 -Lösung von den Konzentrationen der Calciumchlorid(CaCl_2)- und Natriumhydrogencarbonat(NaHCO_3)-Stammlösungen (Abb. von [171]). Bei Herstellung der CaCO_3 -Lösungen werden die Stammlösungen jeweils gleicher Konzentration im Verhältnis von 1:1 gemischt [4, 17].

Für den Mischungsprozess der Calciumchlorid(CaCl_2)-Stammlösung und der Natriumhydrogencarbonat(NaHCO_3)-Stammlösung gilt folgende Gleichgewichtsreaktion [4, 10]:



Die Kristallisation von Calciumcarbonat, die an Nukleationskeimen in übersättigten CaCO_3 -Lösungen erfolgt, wird durch folgende Gleichung beschrieben⁹³ [4, 87]:



Dabei werden Wasserstoffionen (H^+ -Ionen) frei, sodass der pH-Wert der übersättigten CaCO_3 -Lösungen abnimmt [87]. Die Abnahme des pH-Wertes führt wiederum zur Auflösung des Calciumcarbonats an den Probenoberflächen, also an den Aragonitplättchen der Perlmutterpalflächen und an den Aragonitplättchen der „stacks of coins“ bei den Wachstumsfronten, sowie zum Abbau bereits neu gebildeter Kristalle. Nach einiger Zeit stellt sich somit ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau des Calciumcarbonats ein [4, 10]. Um dieser Abnahme des pH-Wertes und so der Auflösung des Calciumcarbonats entgegenzuwirken, erfolgte während der AFM-Wachstumsexperimente möglichst kontinuierlich ein Austausch der höher übersättigten CaCO_3 -Lösungen [4].

4.2 Probenpräparation

In diesem Abschnitt erfolgt die detaillierte Beschreibung der Herstellung der „flat pearls“, aus denen später die Probestücke der Wachstumsfronten gewonnen wurden, und der Erzeugung der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen bzw. Perlmutterpalflächen sowie der Präparation der Wachstumsfrontprobestücke und der Perlmutterpalflächen für die AFM-Untersuchungen.

4.2.1 Herstellung der „flat pearls“

Zur Gewinnung der „flat pearls“ wurden, wie von mir in [4] beschrieben, runde Deckgläser mit drei verschiedenen Durchmessern von 2 mm, 10 mm und 12 mm in den extrapallialen Raum zwischen der Innenseite der natürlichen Schale und dem Mantelepithel des Schneckenkörpers lebender Meeresschnecken der Art *Halotis tuberculata* für verschiedene Inkubationszeiträume eingefügt [9]. Die **Abbildung 19** zeigt zur Veranschaulichung (1) die schematische Darstellung einer Meeresschnecke, bei der zwischen Mantelepithel und Schaleninnenseite ein Deckglas, auf dem bereits das Wachstum neuer Schalenschichten erfolgte, inkubiert wurde und (2) zum Vergleich eine lebende Meeresschnecke, bei der erst kurze Zeit vor der Bildaufnahme drei neue Deckgläser (rote Pfeile und blauer Pfeil) eingefügt wurden [3, 4].

⁹³Bei der Kristallisation des Calciumcarbonats bleiben die Natriumionen (Na^+ -Ionen) und die Chloridionen (Cl^- -Ionen) gelöst und werden daher im Folgenden nicht weiter betrachtet [4].

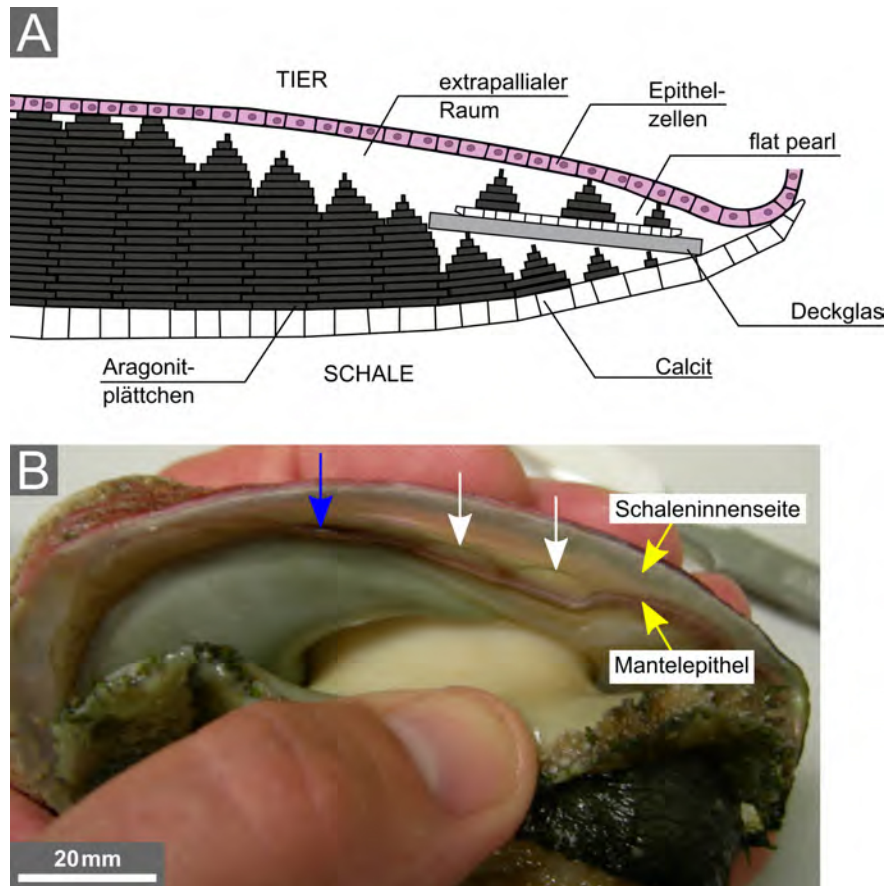


Abbildung 19: Gewinnung der „flat pearls“. (A) Schematische Darstellung eines bereits über längeren Zeitraum im extrapallialen Raum inkubierten Deckgläschens, auf dem schon neues Schalenmaterial in natürlicher Reihenfolge entstanden ist (Abb. von [172]). (B) Mehrere zwischen der Innenseite der Schale und dem Mantelepithel einer lebenden Meeresschnecke (Art *Haliotis tuberculata*) eingefügte 12 mm große Deckgläser (Abb. aus [4]). Die zwei gut erkennbaren Deckgläser sind mit roten Pfeilen und das nur schwer sichtbare dritte Deckglas mit blauem Pfeil gekennzeichnet.

Die Aufzucht der Meeresschnecken erfolgte in einer Abalonenfarm⁹⁴ in Frankreich und die von dort erhaltenen etwa 4 cm bis zu 10 cm großen Tiere wurden bei uns in einem Aquarium mit natürlichem Meerwasser gehalten, das eine Wassertemperatur von etwa 16 °C aufwies [3, 4]. Der Austausch des im Aquarium vorhandenen natürlichen Meerwassers⁹⁵, das unserem Institut⁹⁶ vom Alfred-Wegener-Institut⁹⁷ zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte in Abständen von etwa vier Wochen [4]. Das Einfügen der Deckgläser in den flüssigkeitsgefüllten und normalerweise nach außen durch ein Sekretband verschlossenen

⁹⁴Scea France Haliotis; Plouguerneau, Frankreich

⁹⁵Das natürliche Meerwasser wurde aus der Nordsee nahe Helgoland gesammelt [3, 4]

⁹⁶Institut für Biophysik, AG Fritz „Pure and Applied Biomineralisation“; Fachbereich 1 der Universität Bremen; Bremen, Deutschland

⁹⁷Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung (AWI); Bremerhaven, Deutschland

Extrapallialraum löst eine Abwehrreaktion der Meeresschnecke aus, wodurch neues Schalenmaterial auf diesen Deckgläsern abgelagert wird [9, 84]. Es wird angenommen, dass die Anordnung der neu gewachsenen Schalenschichten auf den als Substraten verwendeten Deckgläsern dem Aufbau der natürlichen Schneckenschale entspricht [4, 9]. Die Sekretion der für die Schalenbildung notwendigen organischen Makromoleküle, insbesondere unterschiedlicher Proteine, und anorganischen Ionen in die im Extrapallialraum enthaltene extrapalliale Flüssigkeit erfolgt durch bestimmte Epithelzellen des Mantels [9, 84]. Die Zusammensetzung der in dieser extrapallialen Flüssigkeit vorkommenden anorganischen Ionen, wie z. B. Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen, entspricht in etwa der Zusammensetzung des Meerwassers [4, 106].

Zunächst wurden die Deckgläser⁹⁸ mit Ethanol⁹⁹ gründlich gesäubert und mit fusselfreien Tüchern¹⁰⁰ getrocknet sowie anschließend mit Meerwasser abgespült, das zuvor mittels Einmalspritze¹⁰¹ und Spritzenvorsatzfilter¹⁰², der eine Porengröße von 0,22 μm aufwies, steril filtriert wurde [4]. Danach erfolgte das Einfügen der Deckgläser in den extrapallialen Raum. Dazu wurde das Mantelepithel mit dem Daumen behutsam heruntergedrückt und die Deckgläser vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette zwischen Mantelepithel und Schaleninnenseite geschoben, ohne (1) die Deckgläser zu zerbrechen und (2) das Mantelepithel, den Schneckenkörper oder den Schalenmuskel, über den der Schneckenkörper mit der Schale verbunden ist, zu verletzen [4, 9]. Oftmals verblieben nicht alle eingefügten Deckgläser für den gesamten geplanten Inkubationszeitraum zwischen Schaleninnenseite und Mantelepithel [4]. Um die Ausbeute an „flat pearls“ zu erhöhen, wurden daher immer mehrere – am besten zwei bis drei – Deckgläser gleichzeitig im Extrapallialraum einer Meeresschnecke inkubiert [3, 4]. Die Inkubation der Deckgläser erfolgte nun für verschiedene Zeitspannen von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen [4, 9]. Um ein zu starkes Einwachsen der Deckgläser in der Perlmutternschicht auf der inneren Schaleninnenseite zu vermeiden, wurden bei Inkubationszeiträumen von mehr als sieben Tagen die Deckgläser in einem Zeitabstand von jeweils einer Woche mittels Pinzette gelockert. Um das oftmals trotzdem leicht in der Schneckenschale eingewachsene Deckglas später wieder vollständig zu entnehmen, erfolgte zunächst das Entfernen von Schalenmaterial mittels Diamantstift um das Deckgläschen herum und anschließend wurde das Deckglas mit einer Pinzette vorsichtig nach oben ge-

⁹⁸Menzel-Gläser, rund, Durchmesser von 2 mm, 10 mm und 12 mm; Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; Braunschweig, Deutschland

⁹⁹Ethanol absolut; VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; Fontenay-sous-Bois, Frankreich

¹⁰⁰VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

¹⁰¹Injekt®-Solo, zweiteilig, Luer-Ansatz, 20 ml Volumen; B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland

¹⁰²Millex®-GV Filtereinheit, PVDF Membran; Merck Millipore Ltd.; Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Irland

drückt [4]. Jeweils in einer aus Kunststoff¹⁰³ bestehenden Petrischale¹⁰⁴ mit etwa 8 ml des steril filtrierten Meerwassers wurden die „flat pearls“ im Kühlraum bei 6 °C gelagert. Die zusätzliche Abdichtung der mit Deckel verschlossenen Petrischalen erfolgte jeweils mit einer Lage Parafilm¹⁰⁵ [3, 4].

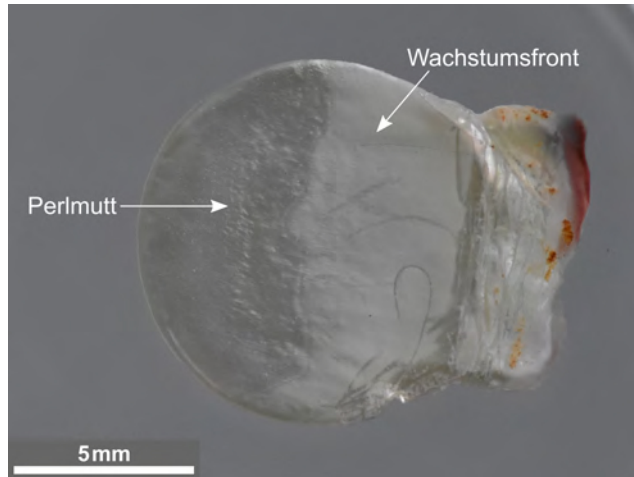


Abbildung 20: Nach sechswöchiger Inkubation entstandene „flat pearl“ mit weißlich erscheinender Wachstumsfront (rechts) und bereits fertig gewachsener Perlmutter-Schicht (links) (Abb. aus [4]).

Die **Abbildung 20** zeigt eine nach sechswöchiger Inkubation entstandene und hier mit einer dünnen Schicht Meerwasser bedeckte „flat pearl“ mit Wachstumsfront (rechts) und bereits fertig gewachsener Perlmutter-Schicht (links) [4]. Das aus vielen übereinanderliegenden und durch die interlamellare organische Matrix getrennten Aragonitschichten bestehende Perlmutter schimmert aufgrund der Interferenz an dünnen Schichten beim Betrachten in weißem Licht unter verschiedenen Winkeln in den Regenbogenfarben [4, 115]. In der fotografischen Aufnahme ist die Perlmutter-Schicht bei Betrachtung unter einem festen Winkel als gut reflektierende Oberfläche erkennbar [4]. Die im natürlichen Licht weißlich erscheinenden Wachstumsfronten, auf denen später auch das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen direkt mit dem AFM beobachtet wurde, bestehen aus sogenannten „stacks of coins“, also wenigen übereinanderliegenden, jeweils etwa 500 nm hohen und durch die organische Matrix voneinander getrennten Aragonitplättchen mit nach oben abnehmenden lateralen Ausdehnungen [3, 4]. Die untersten Aragonitplättchen der „stacks of coins“ sind oftmals fast vollständig von einer Schicht der organischen Matrix überzogen [4]. Die **Abbildung 21** zeigt beispielhaft REM-Aufnahmen mehrerer „stacks of coins“ einer Wachstumsfront, die aus einer nach 14-tägiger Inkubation entstandenen „flat pearl“ stammt. Die einzelnen Aragonitplättchen weisen laterale Ausdehnungen im Bereich von wenigen Mikrometern auf, wobei die Durchmesser der obersten Plättchen noch etwas klei-

¹⁰³Polystyrol

¹⁰⁴10 mm Höhe, 35 mm Durchmesser; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

¹⁰⁵VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

ner sind [4, 9]. Die Abstände zwischen den verschiedenen „stacks of coins“ sind recht unterschiedlich, liegen aber abgeschätzt im Bereich weniger hundert Nanometer bis zu mehreren Mikrometern [4]. Wie in Abschnitt 2.5 bereits erklärt, erscheint die Wachstumsfront mit den „stacks of coins“ bei Beleuchtung im natürlichen Licht aufgrund der Mie-Streuung weißlich [4, 5].

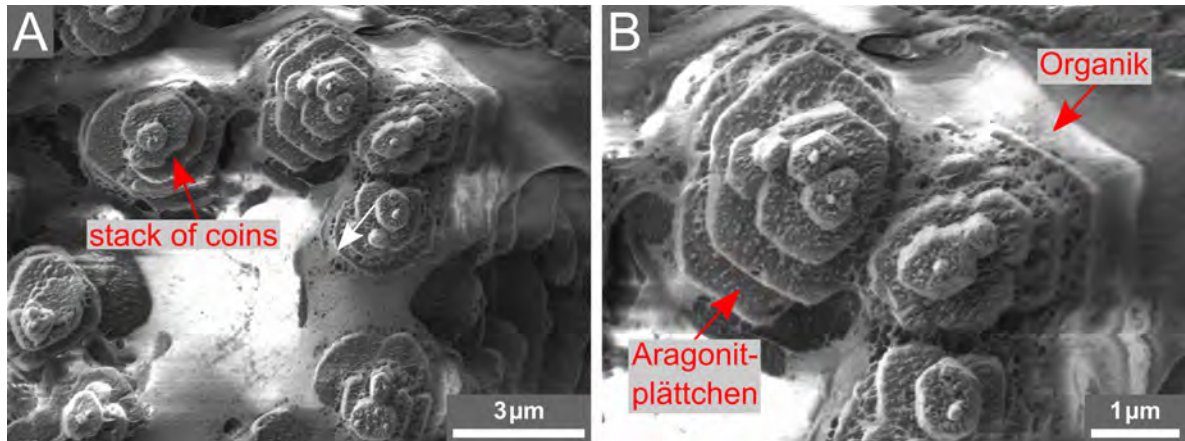


Abbildung 21: Die für Wachstumsfronten typischen, aus wenigen übereinander angeordneten Aragonitplättchen mit nach unten zunehmenden lateralen Ausdehnungen und organischer Matrix bestehenden, „stacks of coins“ [4, 9]. Die Wachstumsfront wurde hier aus einer nach 14-tägiger Inkubation entstandenen „flat pearl“ gewonnen.

4.2.2 Präparation der Wachstumsfronten aus „flat pearls“

Die „flat pearls“, deren Aufbewahrung nach Entnahme aus dem Extrapallialraum jeweils in einer mit steril filtriertem Meerwasser befüllten Petrischale erfolgte, mussten für die AFM-Untersuchungen in kleinere Probestücke zerlegt werden [4]. Dafür erfolgte jedoch die Entnahme der „flat pearls“ aus den Petrischalen. Da die „flat pearls“ und insbesondere deren Oberflächen während der Präparationsprozedur nicht austrocknen durften, mussten die Probestücke stets mit Flüssigkeit feucht gehalten werden [4, 10]. Für die Benetzung der Probenoberflächen durfte kein Reinstwasser verwendet werden und so fand dafür immer eine 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung Verwendung. Daher erfolgte als Erstes das Ansetzen der 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung [4]. Anschließend fand die Zerkleinerung der ausgewählten „flat pearl“ in mehrere Probestücke statt (siehe **Abbildung 22**). Nach Reinigung der Bearbeitungsinstrumente – Pinzetten und Körner – und eines Objektträgers¹⁰⁶ mit Ethanol¹⁰⁷ und der anschließenden Trocknung des Objektträgers mit einem fusselfreien Tuch¹⁰⁸ erfolgte dazu zunächst die Platzierung der „flat pearl“ mittels Pinzette auf dem Ob-

¹⁰⁶Menzel-Gläser; Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; Braunschweig, Deutschland

¹⁰⁷Ethanol absolut; VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; Fontenay-sous-Bois, Frankreich

¹⁰⁸VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

jektträger und anschließend die sofortige Benetzung der Probenoberfläche mit der 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung [4, 10]. Mehrere kleinere Probestücke wurden nun durch Ausüben von Druck mit Hilfe eines Körners gezielt aus der „flat pearl“ erzeugt. Das Zerlegen wurde wiederholt, bis eine geeignete Probengröße von maximal 5 mm · 5 mm erreicht war [4]. Bei der Präparation dieser kleineren Wachstumsfrontbruchstücke durfte jedoch keine Beschädigung des später mit dem AFM zu charakterisierenden Probenbereichs erfolgen [4, 10]. Das für die AFM-Untersuchung ausgewählte und nach der Zerkleinerungsprozedur zusätzlich mit der zuvor verwendeten CaCO_3 -Lösung (0,9 mM oder 1 mM) erneut befeuchtete Probestück wurde zunächst in einer Petrischale¹⁰⁹ gelagert. Die Aufbewahrung der restlichen Probestücke, an denen später auch AFM-Untersuchungen durchgeführt wurden, erfolgte in einer weiteren Petrischale im Kühlraum bei 6 °C. Dafür wurden etwa 8 ml des zuvor steril filtrierten Meerwassers in die Petrischale gefüllt, die Petrischale mit dem Deckel verschlossen und zusätzlich mit Parafilm abgedichtet [4].

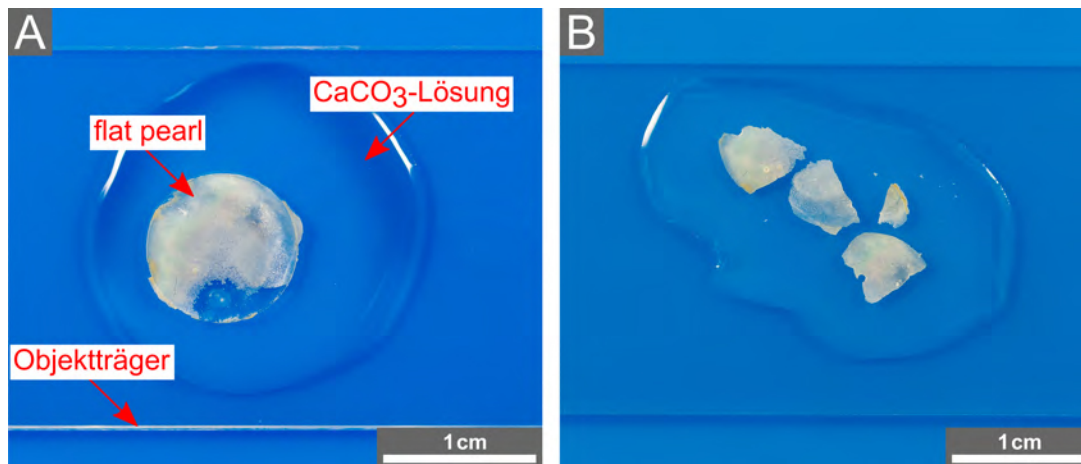


Abbildung 22: Gewinnung mehrerer Probestücke aus einer „flat pearl“. (A) Eine „flat pearl“ mit weißlich erscheinender Wachstumsfront, die auf einem Objektträger platziert und zusätzlich mit einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befeuchtet wurde, und (B) mehrere aus der in (A) gezeigten „flat pearl“ erzeugte Bruchstücke (Abb. aus [4]).

4.2.3 Erzeugung der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen

Die **Abbildung 23** zeigt zur Visualisierung des Präparationsverfahrens mehrere fotografische Aufnahmen der Schneckenschalen bzw. Probestücke, die während der Gewinnung der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen aufgenommen wurden. Vor Beginn der Probenpräparation erfolgte hier ebenfalls die Herstellung einer 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung. Nach der Reinigung zweier Pinzetten und eines Hammers mit Ethanol¹¹⁰, wurden

¹⁰⁹10 mm Höhe, 35 mm Durchmesser; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

¹¹⁰Ethanol absolut; VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; Fontenay-sous-Bois, Frankreich

die Perlmuttspaltflächen aus der Schale einer Meeresschnecke der Art *Haliotis tuberculata* durch gezielte Hammerschläge erzeugt [4]. Dazu erfolgte zunächst das kurzzeitige Auftauen einer bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Schneckenschale und das mechanische Entfernen des noch über den Schalenmuskel mit der Schale verbundenen Schneckenkörpers sowie anschließend das gründliche Spülen der Schneckenschale mit entionisiertem Wasser, bis alle noch verbliebenen organischen Reste vollständig entfernt waren, und das Einwickeln der Schale in mehrere Lagen von Tüchern¹¹¹, sodass insbesondere die später frisch erzeugten Probestücke vor Verunreinigungen geschützt waren [4, 10]. Danach wurde die eingewickelte Schneckenschale mit einem Hammer in drei bis vier größere Bruchstücke zerschlagen und eines dieser Bruchstücke mittels Hammer weiter zerkleinert, bis die daraus gewonnenen Probestücke laterale Abmessungen von maximal $4\text{ mm} \cdot 4\text{ mm}$ aufwiesen [4].

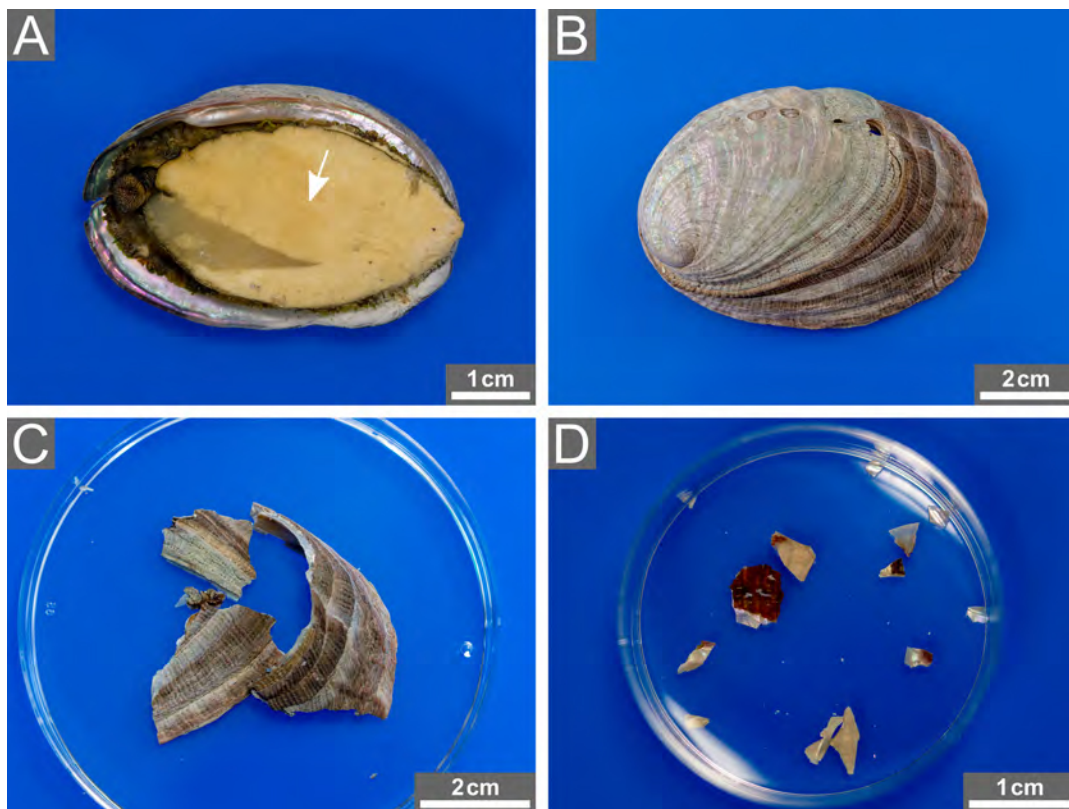


Abbildung 23: Erzeugung der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen bzw. Perlmutterspaltflächen. (A) Mit der Schale über den Schalenmuskel verbundener Schneckenkörper (weißer Pfeil) einer gestorbenen Meeresschnecke der Art *Haliotis tuberculata*, (B) Schale ohne Schneckenkörper, (C) aus der Schale mittels Hammer erzeugte größere Bruchstücke und (D) mehrere für AFM-Untersuchungen geeignete frisch gewonnene Probestücke mit maximaler Größe von $4\text{ mm} \cdot 4\text{ mm}$ benetzt mit einer $0,9\text{ mM CaCO}_3$ -Lösung (Abb. aus [4]).

¹¹¹Wischfix; Fripa; Miltenberg, Deutschland

Die restlichen nicht für die weitere Probenpräparation verwendeten größeren Bruchstücke wurden in Aluminiumfolie verpackt wieder bei -20 °C eingefroren [10]. Nach der meist mehrfach durchgeführten Zerkleinerungsprozedur wurden die für AFM-Untersuchungen geeigneten und jeweils mit einem Tropfen der $0,9\text{ mM}$ bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung befeuchteten Proben zunächst in einer Petrischale¹¹² gesammelt [4, 10].

4.2.4 Präparation der Wachstumsfronten und Perlmutterpaltflächen für AFM-Untersuchungen

Die Probestücke der Wachstumsfronten und die Perlmutterpaltflächen wurden gleichermaßen für die AFM-Untersuchungen vorbereitet. Die **Abbildung 25** zeigt zur Übersicht schematisch die einzelnen Schritte der Präparationsprozedur der Probestücke für die AFM-Untersuchungen. Sowohl die Strukturuntersuchungen als auch die Wachstumsexperimente erfolgten immer in 3 ml einer CaCO_3 -Lösung, wobei diese jedoch definierte unterschiedliche Konzentrationen aufwies. Am Anfang eines jeden AFM-Experiments wurde die Probenoberfläche in 3 ml einer $0,9\text{ mM}$ oder 1 mM CaCO_3 -Lösung¹¹³ abgebildet [4]. Während der AFM-Untersuchungen durften sich die Probestücke nicht bewegen, sodass diese vorher ausreichend fixiert werden mussten [4, 10]. Daher erfolgte das Festkleben aller Probestücke jeweils in einer Petrischale mit Durchmesser von 35 mm . Die verwendete Petrischalenart wies eine Höhe von 10 mm auf und konnte ein Volumen von maximal 10 ml fassen. So waren die Proben bei Verwendung eines Lösungsvolumens von 3 ml stets vollständig mit der CaCO_3 -Lösung bedeckt.

Nach der Gewinnung der „flat pearl“-Bruchstücke bzw. der Erzeugung der Perlmutterpaltflächen und der anschließenden Benetzung der jeweiligen Probenoberflächen mit einer $0,9\text{ mM}$ oder 1 mM CaCO_3 -Lösung erfolgte die Fixierung der Probestücke jeweils in der Mitte einer aus Polystyrol bestehenden Petrischale¹¹⁴ mittels Zweikomponentenkleber¹¹⁵, dessen Abbindezeit bei Raumtemperatur fünf Minuten betrug [4]. Dafür wurden zunächst die zwei Komponenten – Harz und Härter – im Verhältnis von $1:1$ für eine Minute mit einem Holzzahnstocher¹¹⁶ gründlich gemischt [4, 10]. Nachdem ein kleiner Klebertropfen in der Mitte der sterilen Petrischale mit einem weiteren Holzzahnstocher aufgebracht und die Unterseite des Probestücks mit einem Blatt Filterpapier¹¹⁷ getrocknet wurde, erfolgte das Aufkleben des Probestücks. Dazu wurde die Probe mittels Pinzette von oben auf den Kle-

¹¹² 10 mm Höhe, 35 mm Durchmesser; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

¹¹³Die $0,9\text{ mM}$ CaCO_3 -Lösung bzw. die 1 mM CaCO_3 -Lösung entspricht einer gesättigten Lösung bzw. einer gering übersättigten Lösung [4].

¹¹⁴ 10 mm Höhe, max. 10 ml Volumen; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

¹¹⁵Epoxykleber, max. 4 min Topfzeit; Bindulin; H.L. Schönleber GmbH; Fürth, Deutschland

¹¹⁶Vivess; REWE-Zentral AG; Köln, Deutschland

¹¹⁷Rundfilter, 110 mm Durchmesser; Schleicher & Schuell BioScience GmbH; Dassel, Deutschland

bertropfen gelegt und vorsichtig festgedrückt [3, 4]. Wie in [4] von mir beschrieben, sollte sich (1) der Kleber idealerweise nur unterhalb des Probestücks befinden und (2) durfte der Klebertropfen nur so klein dosiert werden, dass dieser beim behutsamen Festdrücken des Probestücks nicht über den Probenrand quoll. Weiterhin durfte (3) keine Beschädigung des Probenbereichs, dessen Oberflächenstruktur später charakterisiert und/oder auf dem das Kristallwachstum initiiert und direkt mit dem AFM beobachtet werden sollte, erfolgen [4, 10]. Direkt nach dem Aufbringen und Andrücken des Probestücks auf dem Klebertropfen wurde die Probenoberfläche sofort mit der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung erneut befeuchtet [4, 10]. Nach dem fünf Minuten dauernden Abbinden des Zweikomponentenklebers erfolgte das Hinzufügen von 3 ml der für die Benetzung der Probenoberfläche verwendeten CaCO_3 -Lösung in die Petrischale. Anschließend konnte die Petrischale mit dem so präparierten Probestück ins AFM eingebaut werden und die AFM-Untersuchung der Probe erfolgen.

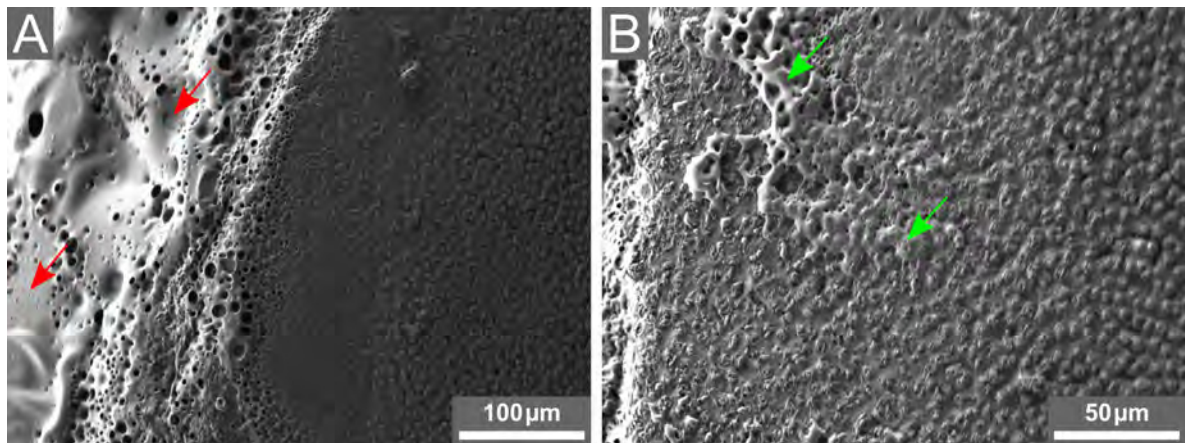


Abbildung 24: Beispielhafte REM-Aufnahmen eines „flat pearl“-Probestücks aufgeklebt in der Mitte einer 35 mm großen Petrischale. Der zu Probenfixierung verwendete Zweikomponentenkleber ist deutlich über den Probenrand gequollen (rote Pfeile in (A)) und befindet sich teilweise auf der zu untersuchenden Probenoberfläche (grüne Pfeile in (B)).

Die **Abbildung 24** zeigt REM-Aufnahmen der Probenoberfläche eines „flat pearl“-Bruchstücks, bei dem keine Untersuchungen mittels AFM erfolgten. Da dort der zur Fixierung verwendete Klebertropfen im Verhältnis zu den lateralen Abmessungen der Probe deutlich zu groß gewählt und das Probestück auf dem Klebertropfen mit der Pinzette zu fest angedrückt wurde, ist der Kleber über den Probenrand gequollen (rote Pfeile im Bild (A)) und teilweise auch auf der Probenoberfläche vorhanden (grüne Pfeile im Bild (B)). Dadurch kann es zu einer Passivierung der Probenoberfläche kommen, sodass Kristallwachstum, dessen Initiierung durch die Verwendung von höher übersättigten CaCO_3 -Lösungen erfolgen sollte, nicht mehr stattfinden kann [4]. Während des Abbindens des Zweikomp-

nenntenklebers durfte die Petrischale nicht geschlossen werden, da die dabei entstehenden Dämpfe ebenfalls zu einer Passivierung der Probenoberfläche führen können [4, 10].

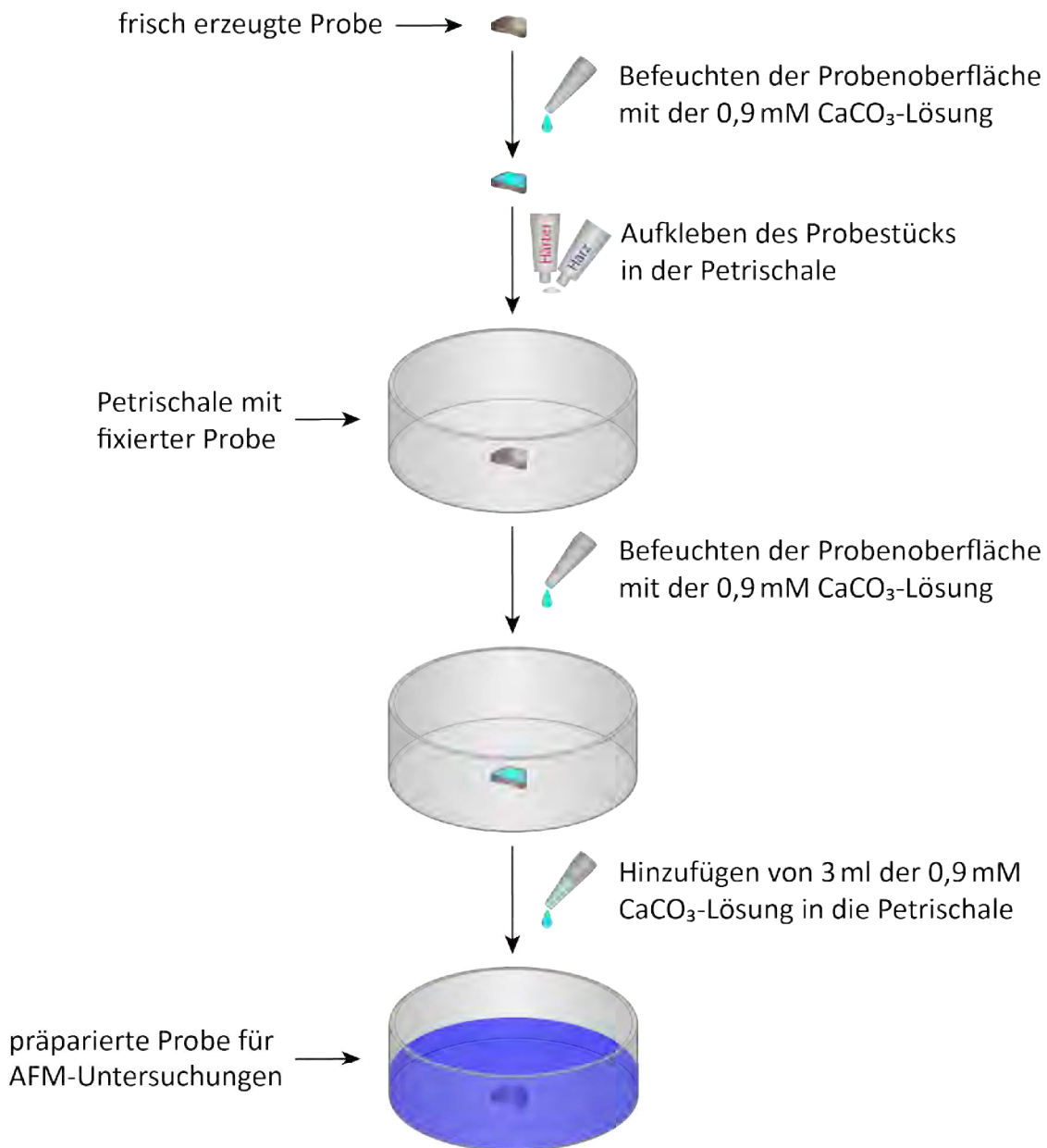


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Präparationsprozedur der Proben („flat pearls“ und Perlmutterpaltflächen) für die AFM-Untersuchungen (Strukturcharakterisierungen und Wachstumsexperimente). Nach Gewinnung der Proben erfolgte jeweils die Benetzung der Probenoberfläche mit einer 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung, die anschließende Fixierung des Probestücks mittels Zweikomponentenkleber in einer Petrischale und die erneute Befeuchtung der Probenoberfläche mit der zuvor verwendeten CaCO_3 -Lösung [4]. Nach Abbinden des Zweikomponentenklebers wurden 3 ml der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale hinzugefügt.

4.3 Proteinpräparation und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die lösliche organische Matrix, die verschiedene Proteinmoleküle enthält (siehe Abschnitt 2.3.3), wurde zusätzlich bei einigen AFM-Wachstumsexperimenten zur Förderung oder Hemmung des Kristallwachstums eingesetzt. Diese Proteine haben dabei unterschiedlichen Einfluss auf die Entstehung der Aragonit- bzw. Calciumcarbonatkristalle (siehe Abschnitt 2.3.4) [5]. Zudem konnte in [87, 89] gezeigt werden, dass die Verwendung von bestimmten Proteinkonzentrationen der löslichen Matrix das Kristallwachstum beschleunigen, aber auch inhibieren kann. Die detaillierte Beschreibung der Gewinnung der löslichen Matrix aus dem Perlmutter der Schneckenschalen und der Ermittlung der Proteinkonzentration der löslichen Matrix mittels Bradford-Assay erfolgte von mir in [2] und [4]. Die lösliche Matrix wurde dort aus der Perlmuttertschicht der Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliothis laevigata* gewonnen [2, 4]. Im Folgenden sind die Präparationsprozedur der löslichen Matrix und die Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay kurz beschrieben.

Präparation der löslichen organischen Matrix

Zunächst wurde die auf der äußeren Schalenseite vorhandene Calcitschicht mit einem Schlammstrahler¹¹⁸ entfernt und anschließend die verbliebene reine, bunt schimmernde Perlmuttertschicht mehrfach mit entionisiertem Wasser gespült¹¹⁹, mit einer 6%igen Natriumhypochloritlösung gereinigt¹²⁰ und mehrmals mit Reinstwasser sorgfältig abgespült¹²¹ [4, 173]. Nach Trocknung der Schneckenschale im Kühlraum bei einer Temperatur von 6 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden erfolgte das Zerschlagen der Perlmuttertschicht mit einem Hammer in größere Bruchstücke und anschließend die weitere Zerkleinerung dieser Bruchstücke mit einem Backenbrecher¹²² [2, 173]. Die zerkleinerten Perlmutterstücke mit einem maximalen Durchmesser von etwa 5 mm wurden danach mittels Dialyse entmineralisiert, wobei niedrig konzentrierte Essigsäurelösungen (6%ige und 12%ige Essigsäurelösungen¹²³) Verwendung fanden [173]. Die nach vollständigem Herauslösen des mineralischen Anteils, also der in die organische Matrix eingebetteten Aragonitplättchen, erhaltene Lösung mit den Proteinen der löslichen Matrix wurde zusätzlich gegen einen

¹¹⁸Typ WA 70 mit Aluminiumoxid(Al_2O_3)-Partikeln (Durchmesser von 0,12 mm bis 0,25 mm) als Strahlmittel; Sigg Strahltechnik GmbH; Lauchringen, Deutschland [2, 4]

¹¹⁹Dadurch wurden alle größeren Verschmutzungen entfernt [4, 173].

¹²⁰NaClO-Lösung; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland. Durch die Behandlung der Perlmuttertschicht mit der NaClO-Lösung erfolgte das Entfernen von organischen Verunreinigungen [2, 4].

¹²¹Damit sollten alle Rückstände der NaClO-Lösung von der Perlmuttertschicht entfernt werden [2, 4].

¹²²Pulverisette 1; Fritsch GmbH; Idar-Oberstein, Deutschland

¹²³Bei den ersten zwei Dialysesritten wurden jeweils 6%ige Essigsäurelösungen und beim dritten Dialysesritt eine 12%ige Essigsäurelösung genutzt [4, 173].

20 mM Natriumcitratpuffer¹²⁴ dialysiert [2]. Beide Dialyseverfahren erfolgten jeweils über eine Zeitspanne von sieben Tagen im Kühlraum bei 6 °C, wobei die Lösungen alle zwei bis drei Tage gewechselt wurden [2, 4]. Nach beiden Dialysen wurde jeweils die im Dialyseschlauch vorhandene Lösung, welche die Proteine der löslichen Matrix enthielt, steril filtriert. Dabei kamen nach der Dialyse gegen die Essigsäurelösung ein Filter mit der Porengröße von 0,45 µm und nach der Dialyse gegen den Natriumcitratpuffer ein Filter¹²⁵ mit der kleineren Porengröße von 0,22 µm zum Einsatz [4, 84].

Um die so präparierte lösliche Matrix später bei den AFM-Wachstumsexperimenten einsetzen zu können, wurde diese zusätzlich gegen eine 0,5 mM Natriumhydrogencarbonat(NaHCO₃)-Lösung über einen Zeitraum von etwa drei Tagen im Kühlraum bei einer Temperatur von 6 °C dialysiert [4]. Dabei erfolgte der Austausch der NaHCO₃-Lösung zweimal im Abstand von jeweils drei Stunden [4].

Konzentrationsbestimmung mit dem Bradford-Assay

Da bei den AFM-Wachstumsexperimenten auch CaCO₃-Lösungen, denen jeweils eine definierte Proteinkonzentration der löslichen Matrix hinzugefügt wurde, zur Initiierung oder Hemmung des Kristallwachstums Verwendung fanden sollten, musste die Proteinkonzentration der jeweils genutzten löslichen Matrix genau bekannt sein [4]. Die Ermittlung der Gesamte Proteinkonzentration der wie oben beschrieben präparierten löslichen organischen Matrix erfolgte photometrisch mit dem von M. M. Bradford entwickelten Bradford-Assay über die Messung der spektralen Eigenschaften des dabei verwendeten Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G-250 [4, 174]. Dieser Farbstoff bildet mit den in der Probe lösung vorhandenen Proteinen unter sauren Umgebungsbedingungen Protein-Farbstoff-Komplexe, wodurch sich das ursprünglich bei einer Wellenlänge von 465 nm liegende Absorptionsmaximum des reinen, ungebundenen Farbstoffs zu einer Wellenlänge von 595 nm verschiebt [4, 175]. Die Bindung des Farbstoffs erfolgt dabei unspezifisch an kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten der Polypeptidketten [4, 176]. Durch die Komplexbildung mit Proteinen ändert sich die rötlich braune¹²⁶ Färbung des ungebundenen Farbstoffs (Bradford-Reagenz¹²⁷) zu Blau¹²⁸ [177]. Die Stärke der Blaufärbung und somit auch die Absorptionsstärke bei der Wellenlänge von 595 nm nimmt mit steigender Proteinkonzentration, also steigender Anzahl an Protein-Farbstoff-Komplexen, zu [4, 175].

¹²⁴Natriumcitratpuffer: pH-Wert 4,8, mit 0,02 % Natriumazid [4, 173]. Natriumazid (NaN₃); Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland

¹²⁵0,45 µm (Durapore[®]-Membranfilter, Typ HVLP), 0,22 µm (Durapore[®]-Membranfilter, Typ GVWP), PVDF Membran; Merck Millipore Ltd.; Tullagreen, Carrigtwohill Co. Cork, Irland

¹²⁶Der Farbstoff liegt in seiner kationischen Form vor [174].

¹²⁷Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland

¹²⁸Der Farbstoff liegt in seiner anionischen Form vor [174].

Es muss allerdings beachtet werden, dass (1) die minimale Inkubationszeit zur Bildung der Protein-Farbstoff-Komplexe zwei Minuten beträgt und (2) die Protein-Farbstoff-Komplexe nur für eine kurze Zeit von etwa einer Stunde stabil bleiben [4, 14].

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der löslichen Matrix wurde als Erstes eine Kalibrierung mit Lysozymlösungen, die definierte bekannte Konzentrationen im Bereich von $0 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ bis $15 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ aufwiesen, durchgeführt [2, 4]. Dazu erfolgte zunächst das Ansetzen einer Stammlösung mit der Lysozymkonzentration von $15 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und die Verdünnung dieser Stammlösung entsprechend den gewünschten Konzentrationen sowie anschließend das vorsichtige Mischen von jeweils 200 μl der Bradford-Reagenz und 800 μl der jeweiligen Lysozymlösung in einer 1,5 ml Küvette¹²⁹ und das zusätzliche Verschließen der Küvetten mit Parafilm¹³⁰ [4, 84]. Da die nach Herauslösen des mineralischen Anteils mittels Dialyse erhaltene lösliche Matrix für die Verwendung während der AFM-Wachstumsexperimente zusätzlich gegen eine 0,5 mM Natriumhydrogencarbonat(NaHCO_3)-Lösung dialysiert wurde, erfolgte das Ansetzen der Stammlösung und ebenfalls die Verdünnung mit einer 0,5 mM NaHCO_3 -Lösung [4]. Die Messung der Absorptionsstärke des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G-250 bei der Wellenlänge von 595 nm erfolgte mittels Spektralphotometer¹³¹ jeweils 10 Minuten nachdem die Bradford-Reagenz und die jeweilige Lysozymlösung gemischt wurden, wobei als Referenzlösung die 0,5 mM NaHCO_3 -Lösung Verwendung fand [4, 14]. Aus den für die verschiedenen Lysozymkonzentrationen gemessenen Absorptionswerten wurde eine Kalibrierungskurve ermittelt, mit der anschließend die Berechnung der Proteinkonzentration aus den für die Proben der löslichen Matrix erhaltenen Absorptionswerten erfolgen konnte [4, 174]. Die gemessenen Absorptionswerte für die verschiedenen Lysozymkonzentrationen und für die Proben der löslichen Matrix sowie die Kalibrierungskurve und die daraus ermittelten Proteinkonzentrationen der löslichen Matrix finden sich in [4].

4.4 AFM-Versuchsaufbau und Vorbereitungen für AFM-Untersuchungen

Die Untersuchung und Charakterisierung der Oberflächenstruktur der Wachstumsfronten, die aus „flat pearls“ gewonnen wurden, und der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen, die hier auch als Spaltflächen bezeichnet werden, sowie die direkte Beobachtung der Nukleation und des Wachstums von Calciumcarbonat (CaCO_3) auf diesen Oberflächenarten erfolgte mit dem Rasterkraftmikroskop BioScope ResolveTM der Firma Bruker¹³²

¹²⁹Abmessungen: 12,5 mm · 12,5 mm · 45 mm; Brand GmbH + Co. KG; Wertheim, Deutschland

¹³⁰VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

¹³¹CE 1021; Cecil Instruments Limited; Cambridge, Großbritannien

¹³²Billerica, MA, USA

im PeakForce-Tapping-Modus. Sowohl für die Strukturuntersuchungen beider Probenarten („flat pearls“ und Perlmutterpaltflächen) als auch für die Wachstumsexperimente wurden zwei unterschiedliche AFM-Sonden verwendet: (1) PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden und (2) ScanAsyst-Air AFM-Sonden. Die PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden bestehen jeweils aus einem 36 μm langen¹³³ Siliziumnitrid(Si_3N_4)-Cantilever, der eine nominale Federkonstante von $0,35 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine nominale Resonanzfrequenz in Luft von 165 kHz aufweist, und aus einer Spitze mit einem nominalen Radius von 1 nm [122]. Eine ScanAsyst-Air AFM-Sonde besteht ebenfalls aus einem Siliziumnitrid-Cantilever, der jedoch eine nominale Federkonstante von $0,4 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine nominale Resonanzfrequenz in Luft von 70 kHz aufweist [123]. Die Spitze, die an dem 115 μm langen¹³⁴ Cantilever angebracht ist, besitzt einen nominalen Radius von 2 nm, kann jedoch entsprechend der Spezifikationen einen maximalen Radius bis 12 nm aufweisen [123]. Der Cantilever mit der Spitze ist jeweils an einem größeren Trägerchip befestigt [2, 4]. Die weiteren Spezifikationen beider AFM-Sondenarten sind im Anhang in Abschnitt 10.1 aufgelistet. Bei den AFM-Untersuchungen wurden die Bilder mit verschiedenen Auflösungen im Bereich von 64 x 64 Pixel bis 512 x 512 Pixel und unterschiedlichen Abtastraten von 0,3 Hz bis zu 1,1 Hz aufgenommen. Zusätzlich erfolgte bei einigen AFM-Experimenten die Aufnahme von Kraftkarten¹³⁵ des abgebildeten Probenbereichs, um Informationen über die Probenoberfläche, wie z. B. Bedeckung mit organischer Matrix, und das Kristallwachstum zu erhalten. Für die Bildbearbeitung und -auswertung wurden die Programme NanoScope Analysis¹³⁶ und IGOR¹³⁷ verwendet.

4.4.1 Reinigungsprozeduren

Im Folgenden findet sich die detaillierte Beschreibung der Reinigungsprozeduren sowohl für die AFM-Sonden (Cantilever mit Spitze), die jeweils an einem Trägerchip angebracht waren, als auch für die Sondenhalter, in denen später die Trägerchips fixiert wurden.

Trägerchip mit Cantilever und Spitze

Alle AFM-Sonden wurden jeweils für mehrere AFM-Untersuchungen (Strukturuntersuchungen und Wachstumsexperimente) verwendet. Daher erfolgte die Reinigung bereits genutzter AFM-Sonden direkt nach dem jeweiligen AFM-Experiment mit Wasserstoffper-

¹³³Dabei handelt es sich um die nominale Länge des Cantilevers [122].

¹³⁴Dabei handelt es sich ebenfalls um die nominale Länge des Cantilevers [123].

¹³⁵englisch: force maps; Erklärung siehe Abschnitt 3.1

¹³⁶NanoScope Analysis 1.8; Bruker; Billerica, MA, USA

¹³⁷WaveMetrics, Inc.; Portland, OR, USA

oxid¹³⁸(H₂O₂) und Reinstwasser¹³⁹. Bei Reinigung der AFM-Sonden nur mit Reinstwasser verblieben auf diesen oft organische Rückstände, vermutlich Proteine oder Chitinreste, die beim nächsten AFM-Experiment mit derselben AFM-Sonde die zu untersuchende Probenoberfläche kontaminierten. Für die Reinigungsprozedur wurden 3 ml Wasserstoffperoxid und 3 ml Reinstwasser jeweils in eine Petrischale¹⁴⁰ gefüllt. Das Säubern der AFM-Sonde erfolgte nun, indem der Trägerchip mit Cantilever und Spitze mittels Pinzette zuerst für 30 Sekunden in die 3 ml Wasserstoffperoxid und anschließend für 120 Sekunden in die 3 ml Reinstwasser eingetaucht wurde. Diese Reinigungsprozedur fand noch ein zweites Mal statt. Das Eintauchen des Trägerchips musste immer sehr vorsichtig erfolgen, damit der Cantilever und/oder die Spitze nicht abbrechen. Anschließend wurde der Trägerchip an Luft fünf Minuten getrocknet. Zusätzlich erfolgte die Reinigung des Trägerchips und der AFM-Sonde für eine Minute in einem Ar⁺-Plasma mittels Plasmacleaner¹⁴¹ [2, 4]. Bis zur jeweiligen AFM-Untersuchung wurde die so gesäuberte AFM-Sonde in einer kleinen Box, in der sich eine haftende Gelbeschichtung befand, aufbewahrt. Neue AFM-Sonden wurden jeweils nur eine Minute in dem Ar⁺-Plasma gereinigt [2, 4].

Sondenhalter

Bei den AFM-Untersuchungen fanden zwei verschiedene Sondenhalter Verwendung, deren Reinigungen jeweils nach der gleichen Prozedur erfolgten. Da der Sondenhalter, in dem später der Trägerchip befestigt wurde, beim AFM-Experiment stets in Kontakt mit der CaCO₃-Lösung in der Petrischale war, musste dieser jedes Mal ebenfalls sorgfältig gereinigt werden, um Kontaminationen der Probe und der CaCO₃-Lösung, in der sich das Probestück befand, zu vermeiden. Dazu erfolgte die gründliche Reinigung des Sondenhalters mit dem Spülmittel *Ultra Joy*¹⁴², indem dessen Oberflächen zuerst zwei Minuten mit den Fingerkuppen mechanisch abgerieben und danach mehrmals mit Reinstwasser abgespült wurden [4]. Anschließend erfolgte die vollständige Trocknung des Sondenhalters mittels fusselfreier Tücher¹⁴³.

4.4.2 Sondenhalter für AFM-Untersuchungen

In der **Abbildung 26** sind die zwei für die Strukturuntersuchungen und Wachstumsexperimente verwendeten Sondenhalter dargestellt. Alle AFM-Untersuchungen erfolgten hier

¹³⁸35 %; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland

¹³⁹deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand von 18,2 MΩ · cm [4]

¹⁴⁰aus Polystyrol; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

¹⁴¹Ar⁺-Plasmareiniger (TPS 216); Binder Labortechnik; Hebertshausen, Deutschland

¹⁴²Procter & Gamble; Cincinnati; OH, USA

¹⁴³VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

in 3 ml einer CaCO_3 -Lösung¹⁴⁴. Das Bild (A) bzw. (B) zeigt den sogenannten „Resolve fluid cantilever holder¹⁴⁵“ bzw. den sogenannten „Resolve micro-volume fluid cantilever holder¹⁴⁶“. Beide Sondenhalter besitzen jeweils eine kleine Vertiefung für die Platzierung des Trägerchips und eine Metallklammer zur Fixierung des Trägerchips in der Halterung [4]. Nachdem die sorgfältige Reinigung des Sondenhalters und des Trägerchips gemäß der im vorangegangenen Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Prozedur erfolgte, wurde der Trägerchip mittels Pinzette in die Vertiefung gelegt und anschließend die Metallklammer auch mit Hilfe der Pinzette vorsichtig heruntergedrückt, ohne dass (1) der Trägerchip zerbrach, (2) der Trägerchip aus der Vertiefung heraussprang und (3) die AFM-Sonde abbrach [2, 4]. Der Trägerchip musste in der Halterung fest fixiert sein und durfte sich, insbesondere bei der AFM-Untersuchung, nicht bewegen.

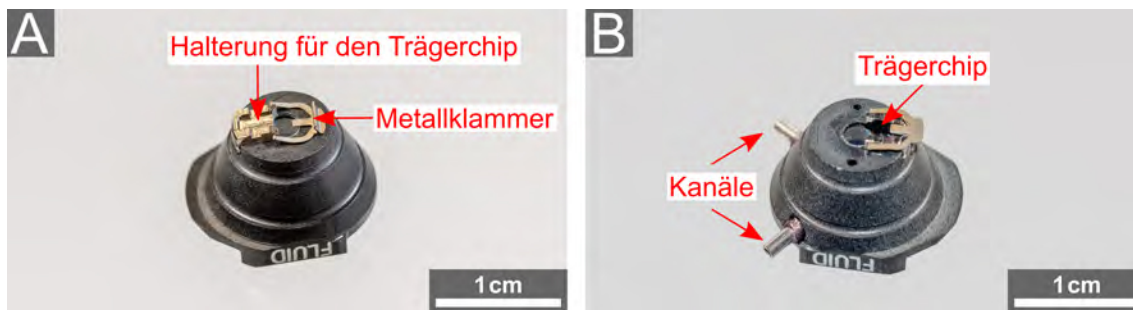


Abbildung 26: Verwendete Sondenhalter für die in CaCO_3 -Lösung durchgeführten AFM-Untersuchungen (Strukturcharakterisierungen und Wachstumsexperimente) mit dem Rasterkraftmikroskop BioScope Resolve™ der Firma Bruker. (A) „Resolve fluid cantilever holder (Resolve-FCH) und (B) Resolve micro-volume fluid cantilever holder (Resolve-UVOL-FCH)“. Mittels Metallklammer wurde der Trägerchip mit der angebrachten AFM-Sonde jeweils in der kleinen Vertiefung des Sondenhalters fixiert. Der Sondenhalter in (B) besitzt zusätzlich zwei Kanäle – Einlass und Auslass – mit denen Flüssigkeit während der AFM-Wachstumsexperimente ausgetauscht werden könnte.

Am zweiten Sondenhalter sind zusätzlich zwei kleine Kanäle angebracht. Mit dem Ein- und Auslass kann bei Verwendung einer Mikrovolumenkammer¹⁴⁷ die CaCO_3 -Lösung während der Wachstumsexperimente ausgetauscht werden. Da bei Nutzung dieser Mikrovolumenkammer jedoch nur ein gesamtes Lösungsvolumen von 60 μl verwendet werden kann, erfolgte weder die Nutzung der Kanäle noch der Mikrovolumenkammer [178]. Dieser zweite spezielle Sondenhalter wurde für die AFM-Untersuchungen nur verwendet, da

¹⁴⁴Dabei wurden CaCO_3 -Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen verwendet.

¹⁴⁵„Resolve-FCH“; Bruker; Billerica, MA, USA

¹⁴⁶„Resolve-UVOL-FCH“; Bruker; Billerica, MA, USA

¹⁴⁷englisch: micro-volume cell [178]

dort eine bessere Fixierung der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden und der ScanAsyst-Air AFM-Sonden möglich war.

4.4.3 AFM-Versuchsaufbau für Strukturuntersuchungen in Flüssigkeit und für Wachstumsexperimente

Im Folgenden wird die Prozedur zur Vorbereitung der AFM-Untersuchungen beschrieben und der AFM-Versuchsaufbau vorgestellt. Die **Abbildungen 27 und 28** zeigen (1) den AFM-Kopf, in dem der Sondenhalter mit fixiertem Trägerchip befestigt wurde, und (2) die sogenannte „EasyAlign™ station“, die zum Ausrichten des Infrarotlasers und der Photodiode Verwendung fand, sowie (3) das zur Probenuntersuchung genutzte AFM.

Nachdem der Trägerchip mit AFM-Sonde gemäß der oben beschriebenen Reinigungsprozedur gesäubert und anschließend in der Vertiefung des Sondenhalters mit Hilfe der Metallklammer fixiert wurde, erfolgte der Einbau des Sondenhalters in den AFM-Kopf [2, 4]. Dazu wurde der Sondenhalter vorsichtig per Hand von oben in die auf der Unterseite des AFM-Kopfs vorhandene Halterung geschoben, bis sich dieser nicht mehr bewegen konnte (siehe Bilder (A) und (B) in der Abb. 27). Dabei befand sich der AFM-Kopf in vertikaler Position auf der „EasyAlign™ station“, sodass die Halterung auf der Unterseite des AFM-Kopfs gut erreichbar war.

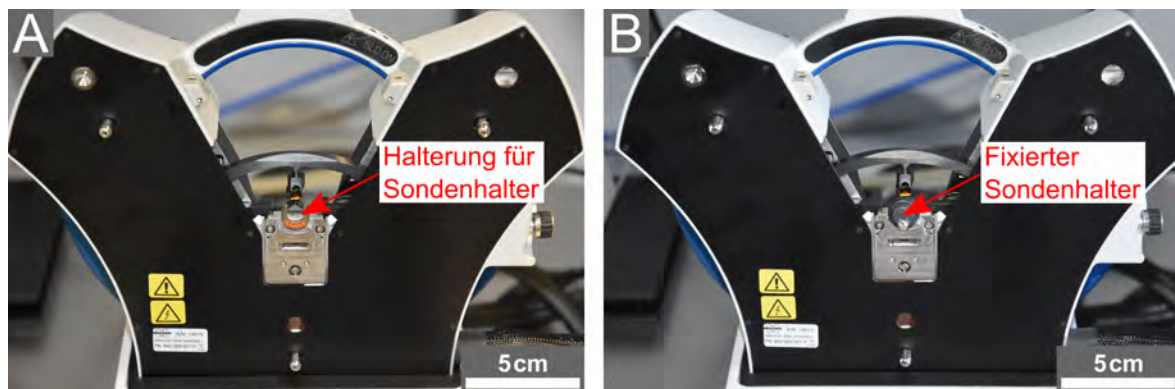


Abbildung 27: Rasterkraftmikroskop BioScope Resolve™ der Firma Bruker. Unterseite des AFM-Kopfs (A) mit Halterung für den Sondenhalter und (B) mit befestigtem Sondenhalter.

Nach dem Einbau des Sondenhalters wurde der AFM-Kopf in horizontaler Position auf der „EasyAlign™ station“ platziert (siehe Bild (A) in der Abb. 28). Nach Starten der AFM-Software erfolgte zunächst die Auswahl des für die Probenuntersuchung genutzten Modus¹⁴⁸ und der verwendeten AFM-Sondenart. Danach erfolgte die Ausrichtung des

¹⁴⁸Die Untersuchungen aller Probestücke erfolgten im PeakForce-Tapping-Modus. Dazu wurde in der

im AFM-Kopf eingebauten Infrarotlasers. Dazu wurde der Laserspot auf die Rückseite des Cantilevers, auf der sich eine dünne reflektierende Metallschicht¹⁴⁹ befand, ausgerichtet und dort möglichst nah am vorderen, freien Ende, an dem die Spitze angebracht ist, platziert [2, 4]. Anschließend erfolgte ebenfalls die Justierung der Photodiodenposition. Der von der Rückseite des Cantilevers reflektierte Laserstrahl musste auf die Mitte der Viersegment-Photodiode auftreffen [4, 124]. Die Position des Infrarotlasers und der Photodiode wurden so eingestellt, dass die von der Photodiode detektierte Intensität und somit das angezeigte Summensignal möglichst hoch war. Danach erfolgte die Benetzung der Spitze und des Cantilevers mit einem kleinen Tropfen der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung, in der am Anfang jedes AFM-Experiments das Abbilden der Probenoberflächen stattfand [4]. Dazu wurde der AFM-Kopf wieder in vertikaler Position platziert und die CaCO_3 -Lösung vorsichtig mit Hilfe einer Einmalspritze¹⁵⁰ und einer sterilen, feinen Kanüle¹⁵¹ von der Seite auf das untere, feste Ende des Cantilevers gegeben, sodass die CaCO_3 -Lösung langsam bis zum vorderen, freien Ende, an dem die Spitze angebracht war, herunterlaufen und dort einen größeren Tropfen bilden konnte. Dieser Lösungstropfen musste die Spitze vollständig umschließen. Danach wurde der AFM-Kopf vorsichtig in horizontale Position gebracht, ohne dass der Lösungstropfen abfiel, und die Position der Photodiode nachjustiert, bis das Summensignal wieder so hoch wie möglich war. Alle in dieser Arbeit gezeigten AFM-Untersuchungen, bei denen die PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden und die ScanAsyst-Air AFM-Sonden verwendet wurden, erfolgten bei einem Summensignal im Bereich von 2,5 V bis 4,5 V.

Anschließend fand zunächst die Kalibrierung der AFM-Sonde statt, die im AFM-Kopf eingebaut war und mit der später die Untersuchung der Probenoberfläche erfolgte. Nach Durchführung der Kalibrierung, deren genaue Beschreibung in Abschnitt 4.4.4 zu finden ist, wurde die Petrischale mit aufgeklebtem Probestück in einem entsprechenden Halter auf dem Proben Tisch des AFM platziert sowie mit Hilfe eines externen Vakuummoduls „angesaugt“ und so auf dem Proben Tisch fixiert. Danach wurde der AFM-Kopf von der „EasyAlignTM station“ auf den Proben Tisch des AFM gebracht und die Spitze an die zu untersuchende Probenoberfläche angenähert sowie ein geeigneter Probenbereich zur Untersuchung der Oberflächenstruktur bzw. für die direkte Beobachtung des Kristallwachstums ausgewählt.

AFM-Software zunächst „quantitative nanomechanical mapping in fluid“ und anschließend der Modus „PeakForce QNM in fluid“ ausgewählt.

¹⁴⁹Auf der Rückseite des Cantilevers der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden befindet sich jeweils eine dünne Goldschicht [122]. Die ScanAsyst-Air AFM-Sonden bestehen jeweils aus einem Cantilever, dessen Rückseite mit Aluminium beschichtet ist [123].

¹⁵⁰Injekt[®]-F Solo, zweiteilig, 1 ml Volumen; B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland

¹⁵¹Sterican[®] Gr. 2, 0,80 mm · 40 mm; B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland

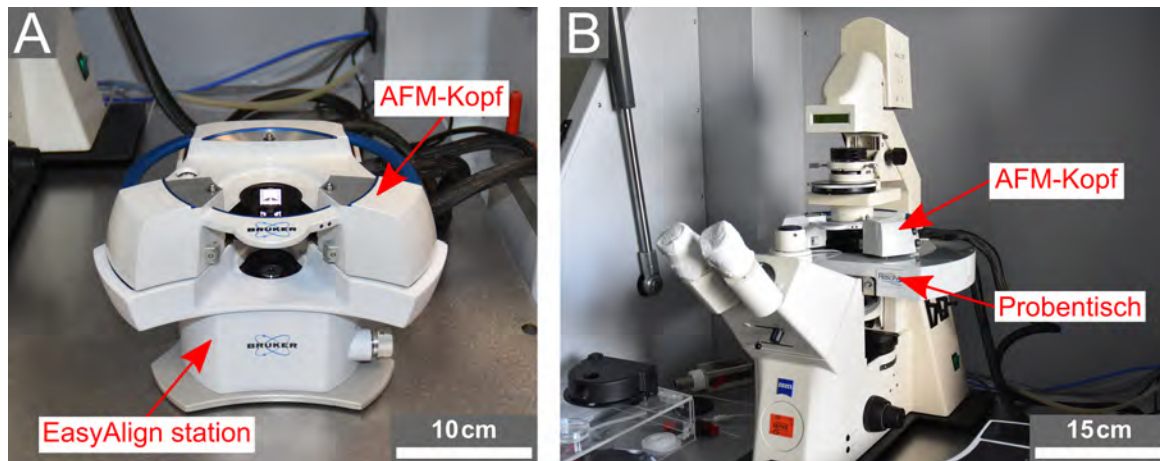


Abbildung 28: Rasterkraftmikroskop BioScope Resolve™ der Firma Bruker. (A) AFM-Kopf in horizontaler Position auf der „EasyAlign™ station“, die zum Ausrichten der Position des Infrarotlasers und der Photodiode verwendet wird. (B) AFM-Kopf auf dem Probenstisch des AFM.

4.4.4 Kalibrierung der AFM-Sonden

Vor den Strukturuntersuchungen und Wachstumsexperimenten wurde jeweils die zum Abbilden der Probenoberfläche und/oder zur Aufnahme der Kraftkarten verwendete AFM-Sonde – Cantilever mit Spitze¹⁵² – kalibriert, wobei zwei verschiedene Methoden, die „touch“-Kalibrierung und die „no touch“-Kalibrierung, Verwendung fanden. Die Kalibrierung musste stets in der gleichen Lösung, in der später auch die AFM-Untersuchung der Probenoberfläche erfolgte, stattfinden.

„Touch“-Kalibrierung

Bei dieser Kalibrierung wird die Spitze der AFM-Sonde in Kontakt mit einer harten Oberfläche gebracht, auf der die Aufnahme von Kraftkurven¹⁵³ erfolgt. Aus diesen Kraftkurven kann die Deflektionssensitivität und die Federkonstante des Cantilevers genau ermittelt werden¹⁵⁴. Bei den in dieser Arbeit gezeigten AFM-Untersuchungen erfolgte die „touch“-Kalibrierung stets auf dem Boden¹⁵⁵ einer aus Polystyrol bestehenden Petrischale¹⁵⁶, in der sich ebenfalls 3 ml der zum Abbilden der Probenoberfläche am Anfang jedes AFM-

¹⁵²Der Cantilever ist an einem Trägerchip angebracht [2, 4].

¹⁵³Erklärung siehe Abschnitt 3.1

¹⁵⁴Bei den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden beträgt die nominale Deflektionssensitivität $9,0 \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und die nominale Federkonstante $0,35 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ [122]. Die nominale Deflektionssensitivität der ScanAsyst-Air AFM-Sonden beträgt $30,0 \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und die nominale Federkonstante $0,4 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ [123].

¹⁵⁵Der Boden der Petrischale wird als harte Oberfläche angenommen.

¹⁵⁶35 mm Durchmesser, 10 mm Höhe, max. 10 ml Volumen; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

Experiments verwendeten CaCO_3 -Lösung (0,9 mM oder 1 mM) befanden, jedoch keine Probe.

Daher wurden nach der Probenpräparation zunächst 3 ml der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung in eine zweite Petrischale, in der sich kein Probestück befand, pipettiert. Nachdem der Trägerchip mit AFM-Sonde gereinigt und im Sondenhalter befestigt, der Sondenhalter im AFM-Kopf fixiert, der im AFM-Kopf eingebaute Infrarotlaser auf den Cantilever ausgerichtet, die Position der Photodiode eingestellt und die Spitze der AFM-Sonde mit einem Tröpfchen der zuvor verwendeten CaCO_3 -Lösung benetzt wurde, erfolgte die Fixierung der zweiten Petrischale mit den 3 ml der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung auf dem Probestisch des AFM [2, 4]. Anschließend wurde der AFM-Kopf mit befestigtem Sondenhalter, in dem der Trägerchip mit AFM-Sonde fixiert war, von der „EasyAlign™ Station“¹⁵⁷ auf den Probestisch gebracht. Dabei durfte der Lösungstropfen, der die Spitze benetzte, nicht herunterfließen. Danach erfolgte das Annähern der Spitze an die Oberfläche des Petrischalenbodens mittels AFM-Software. Dafür wurde der AFM-Kopf zunächst nur soweit abgesenkt, bis Cantilever und Spitze vollständig in die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eintauchten. Bevor die weitere Annäherung stattfinden konnte, musste die Position der Photodiode nachjustiert werden, bis die von der Photodiode detektierte Intensität des Infrarotlasers wieder maximal war. Danach wurde die Spitze mittels AFM-Software weiter an die Oberfläche des Petrischalenbodens angenähert und schließlich in Kontakt mit dieser gebracht. Nun erfolgte die Aufnahme von Kraftkurven auf dem Petrischalenboden, wobei immer mindestens zehn Kraftkurven aufgezeichnet wurden. Die Ermittlung der Deflektionssensitivität und Federkonstante erfolgte anschließend direkt aus den erhaltenen Kraftkurven mit der AFM-Software. Im Anschluss daran wurde der AFM-Kopf angehoben, bis der Sondenhalter mit Trägerchip keinen Kontakt mehr mit der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale hatte. Danach wurde der AFM-Kopf vom Probestisch heruntergenommen und auf die „EasyAlign™ Station“ gesetzt, ohne dabei den Sondenhalter und den Trägerchip sowie die Position der Photodiode und des Lasers zu verschieben. Schließlich erfolgte der Ausbau der Petrischale mit den 3 ml der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung aus dem AFM.

Nach Durchführung der beschriebenen Kalibrierungsprozedur konnte nun jeweils die AFM-Untersuchung der Probe erfolgen. Dazu wurde die Petrischale mit aufgeklebtem Probestück auf dem Probestisch des AFM fixiert und der AFM-Kopf wieder auf den Probestisch gesetzt sowie die Spitze mittels AFM-Software in Kontakt mit der Probenoberfläche gebracht.

¹⁵⁷Bruker; Billerica, MA, USA

„No touch“-Kalibrierung

Bei dieser Kalibrierung wird die Resonanzkurve der Cantileverschwingung¹⁵⁸ in der gleichen CaCO_3 -Lösung, in der später auch die AFM-Untersuchung der Probenoberfläche stattfindet, aufgenommen [179]. Durch Anpassen bzw. Fitten der Resonanzkurve mit einer Lorentz-Funktion erhält man die Federkonstante des Cantilevers [141].

Dazu wurde das Probestück gemäß den in Abschnitt 4.2 beschriebenen Präparationsmethoden für die AFM-Untersuchungen vorbereitet [4]. Anschließend erfolgte die Reinigung des Trägerchips mit AFM-Sonde, die Fixierung des Trägerchips im Sondenhalter, der Einbau des Sondenhalters in den AFM-Kopf, die Ausrichtung des Infrarotlasers auf den Cantilever, das Justieren der Position der Photodiode und die Benetzung der Spitze der AFM-Sonde mit der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung. Nach Einfüllen von 3 ml der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung in eine zweite Petrischale ohne Probestück wurde diese Petrischale auf dem Probenstisch des AFM fixiert sowie der AFM-Kopf auf den Probenstisch gebracht und mittels AFM-Software abgesenkt. Sobald der Cantilever mit Spitze vollständig in die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eintauchte, erfolgte die Aufnahme der Resonanzkurve. Danach wurde der AFM-Kopf wieder hochgefahren, vom Probenstisch heruntergenommen und auf die „EasyAlign™ Station“ gesetzt sowie die Petrischale aus dem AFM ausgebaut. Nach erfolgreicher Kalibrierung wurde nun das jeweilige Probestück mit dem AFM untersucht.

4.4.5 Austausch der CaCO_3 -Lösungen während der AFM-Wachstumsexperimente

Wie in Abschnitt 4.2.2 und Abschnitt 4.2.3 beschrieben, befanden sich die in der Petrischale fixierten Probestücke („flat pearls“ und Perlmutterpaltflächen) zu Beginn der Wachstumsexperimente jeweils noch in 3 ml einer 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung. Dabei entspricht die 0,9 mM CaCO_3 -Lösung einer gesättigten Lösung [4]. Um nun Wachstum von Aragonit- bzw. Calciumcarbonatkristallen auf den Probenoberflächen zu initiieren und so das Gleichgewicht zwischen Kristallbildung und -auflösung zugunsten der Kristallbildung zu verschieben, wurde jeweils während des Abbildens eines ausgewählten Probenbereichs mehrmals ein definiertes Teilvolumen der in der Petrischale vorhandenen CaCO_3 -Lösung entnommen und gegen das gleiche Volumen einer höher konzentrierten CaCO_3 -Lösung (2 mM, 4 mM oder 5 mM) ausgetauscht [4]. Die Austauschprozedur, deren Durchführung im Folgenden beispielhaft beschrieben wird, erfolgte jeweils nach bestimmten Zeiträumen. Die Anzahl der durchgeführten Lösungsaustausche und die dabei verwendeten Volumina

¹⁵⁸Erklärung siehe Abschnitt 3.1

sowie die Zeitspannen zwischen den Lösungsaustauschen sind in den Abschnitten 5.2 und 5.4 bei den jeweiligen Wachstumsexperimenten angegeben. Das Volumen der anfänglich in der Petrischale vorhandenen CaCO_3 -Lösung (3 ml) und die Volumina der ausgetauschten CaCO_3 -Lösungen mussten stets bekannt sein, um nach den Lösungsaustauschen jeweils die verwendete Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale berechnen zu können.

Da während eines Wachstumsexperiments immer derselbe Oberflächenbereich des Probestücks über einen Zeitraum von mehreren Stunden abgebildet wurde und die Petrischale mit festgeklebtem Probestück an der gleichen Position im AFM fixiert war, erfolgten die Austausche der CaCO_3 -Lösungen mit Hilfe einer Pipette und eines etwa 20 cm langen Silikonschlauchs. Bei einigen Wachstumsexperimenten fanden auch CaCO_3 -Lösungen, denen eine bestimmte Proteinkonzentration der löslichen organischen Matrix hinzugefügt wurde, Verwendung. Da diese Proteine nur schwer aus solchen Silikonschläuchen zu entfernen sind, wurden für die Lösungsaustausche zwei verschiedene Silikonschläuche, einer für reine¹⁵⁹ CaCO_3 -Lösungen und ein zweiter für CaCO_3 -Lösungen mit Proteinen der löslichen Matrix, genutzt. Diese Silikonschläuche mussten immer sehr sauber sein, um eine Abweichung der tatsächlichen Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale von der berechneten Konzentration zu vermeiden. Daher war es unbedingt notwendig, die Silikonschläuche vor jedem Wachstumsexperiment erneut sorgfältig zu reinigen, um mögliche Rückstände von Kristallen und die Proteine aus vorangegangenen Experimenten sicher zu entfernen [4].

Reinigungsprozeduren der Silikonschläuche

Der Silikonschlauch zum Austausch der reinen CaCO_3 -Lösungen wurde mit Hilfe einer Pipette zuerst mehrmals mit Ethanol und anschließend mehrfach mit Reinstwasser sorgfältig gespült. Danach erfolgte das Auskochen des Silikonschlauchs in einem Becherglas mit 500 ml Reinstwasser für 10 min. Während des Auskochens musste der Silikonschlauch möglichst vollständig mit Reinstwasser gefüllt sein. Anschließend wurde der Silikonschlauch erneut mehrfach mit Ethanol gereinigt und mehrmals mit Reinstwasser gespült. Da der Silikonschlauch möglichst trocken sein sollte, wurden danach alle im Schlauch verbliebenen Wassertropfen mittels Pipette herausgesogen. Bis zum jeweiligen Wachstumsexperiment erfolgte die Lagerung des gesäuberten Silikonschlauchs verpackt in Aluminiumfolie.

Nach Durchführung von ersten Wachstumsexperimenten, bei denen CaCO_3 -Lösungen mit bestimmten Proteinkonzentrationen der löslichen Matrix zum Einsatz kamen, wurde versucht, den Silikonschlauch entsprechend dem oben beschriebenen Verfahren zu reinigen. Bei diesen Wachstumsexperimenten stellte sich jedoch heraus, dass offenbar Rückstände

¹⁵⁹ohne Zugabe von Proteinen der löslichen Matrix

von Proteinen, die die Probenoberfläche während der AFM-Untersuchungen kontaminierten, im Silikonschlauch verblieben waren. Daher wurde der Silikonschlauch, der zum Austausch der CaCO_3 -Lösungen mit Proteinen der löslichen Matrix Verwendung fand, zunächst mittels Pipette mehrmals mit einer 1 M Natriumchlorid(NaCl)-Lösung gespült. Das weitere Säubern des Silikonschlauchs erfolgte gemäß der oben beschriebenen Reinigungsprozedur für den Silikonschlauch, der zum Austausch der reinen CaCO_3 -Lösungen zum Einsatz kam. Schließlich wurde der gereinigte Silikonschlauch ebenfalls in Aluminiumfolie verpackt gelagert.

Austauschprozedur

Am Anfang der Wachstumsexperimente wurde zunächst immer ein geeigneter Probenbereich zur Beobachtung des Kristallwachstums ausgewählt und mit der AFM-Spitze abgerastert. Erst nachdem die Kraft, die zum Abbilden dieses Probenbereichs notwendig war, stabil eingestellt und der Probenbereich ohne merkliche Verschiebung stabil über einen Zeitraum von etwa 15 Minuten bis zu 30 Minuten abgebildet werden konnte, erfolgte das Ansetzen der höher übersättigten CaCO_3 -Lösung (2 mM, 4 mM oder 5 mM). Diese CaCO_3 -Lösung wurde anschließend für eine weitere Zeitspanne von mindestens 30 Minuten unter die Abdeckung direkt neben das AFM gestellt, um eine Anpassung der Temperatur der höher übersättigten CaCO_3 -Lösung an die Temperatur der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale zu ermöglichen. Der Austausch der CaCO_3 -Lösungen während des Abbildens der Probenoberfläche erfolgte jeweils mit Hilfe des an der Pipette angeschlossenen und gemäß dem oben beschriebenen Verfahren gereinigten Silikonschlauchs.

Die Durchführung der Prozedur zum Austausch der CaCO_3 -Lösungen während eines AFM-Wachstumsexperiments wird im Folgenden konkret beschrieben: Beim ersten Lösungsaustausch erfolgte zuerst die Entnahme eines definierten Teilvolumens (z.B. 1 ml) der 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale mittels Pipette und Silikonschlauch. Anschließend wurde der Silikonschlauch zweimal mit 1 ml der verwendeten höher übersättigten CaCO_3 -Lösung gespült, um im Silikonschlauch verbliebene Tropfen der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung zu entfernen. Da jeweils nur der Austausch sehr kleiner Volumina erfolgte, war diese Spülprozedur notwendig, um Abweichungen der tatsächlichen Konzentrationen der CaCO_3 -Lösungen in der Petrischale von der jeweils berechneten Konzentration möglichst gering zu halten. Nach dem Spülvorgang wurde das gleiche zuvor aus der Petrischale entnommene Lösungsvolumen (z. B. 1 ml) in die Petrischale eingespült, jedoch fand hierbei die höher konzentrierte CaCO_3 -Lösung Verwendung. Um eine bessere Durchmischung der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale zu gewährleisten, wurde anschließend zweimal jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale in den Silikonschlauch

gesogen und danach direkt wieder langsam eingespült. Dabei durften allerdings keine Luftblasen in der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale erzeugt werden. Solche Luftblasen können unter den Cantilever und/oder die Spitze gelangen und so ein weiteres Abbilden der Probenoberfläche verhindern [4].

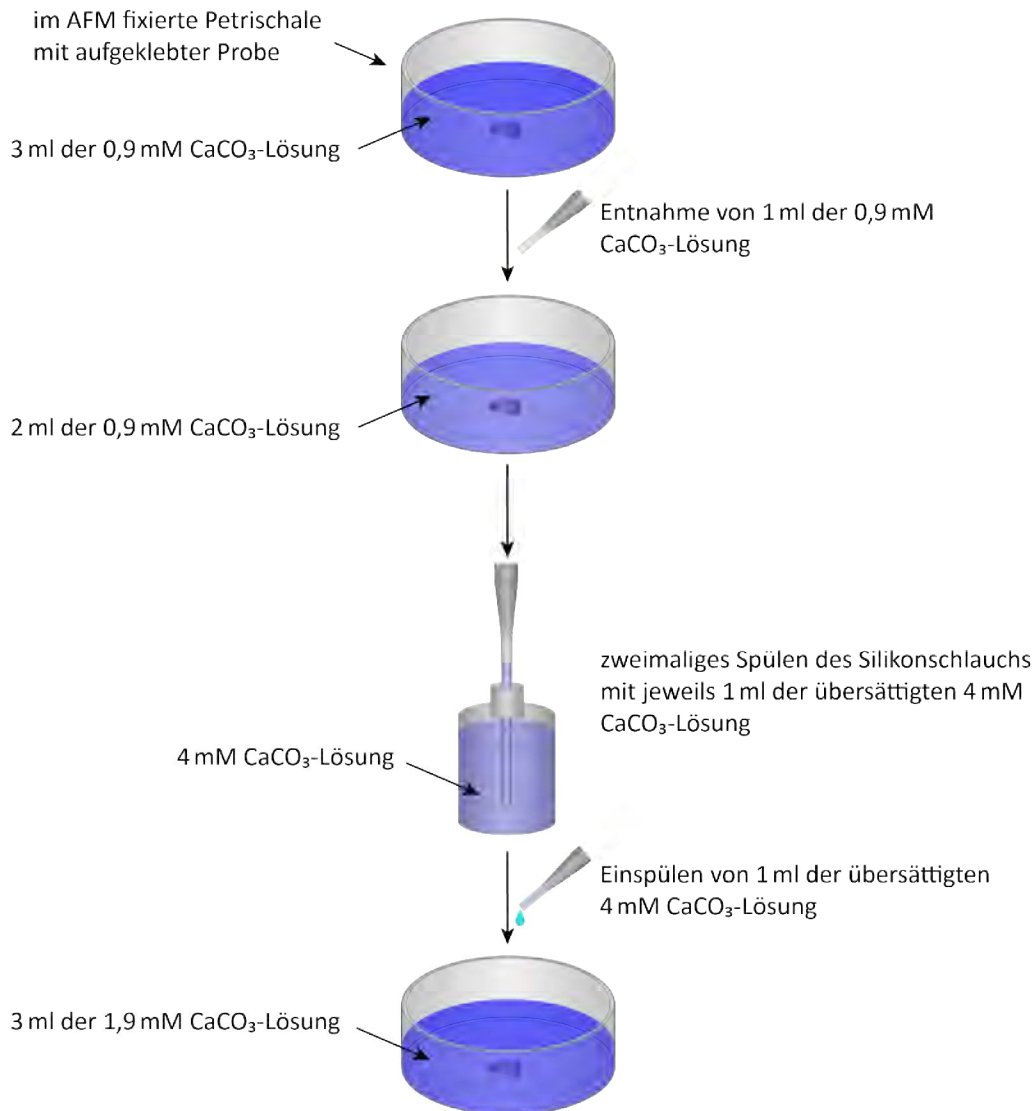


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Austauschprozedur der CaCO_3 -Lösungen während der AFM-Wachstumsexperimente. Zu Beginn befand sich das Probestück („flat pearl“ oder Perlmutterspaltfläche) in einer Petrischale mit 3 ml einer 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung. Die Petrischale mit aufgeklebtem Probestück war während des Wachstumsexperiments im AFM fixiert. Zur Initiierung des Kristallwachstums wurde nun ein definiertes Volumen (z. B. 1 ml) der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entnommen und gegen das gleiche Volumen einer höher übersättigten CaCO_3 -Lösung (2 mM, 4 mM oder 5 mM) ausgetauscht. Diese Austauschprozedur wurde während eines Wachstumsexperiments mehrmals wiederholt.

Die einzelnen Schritte der Austauschprozedur sind zur Veranschaulichung schematisch in der **Abbildung 29** dargestellt. Die weiteren Lösungsaustausche wurden ebenfalls entsprechend dieser Prozedur durchgeführt.

Bei den Lösungsaustauschen durfte der Silikonschlauch aus mehreren Gründen nur sehr vorsichtig und nahe dem Rand in die Petrischale eingebracht werden. Erstens hätte der Silikonschlauch die Probe, die in der Mitte der Petrischale festgeklebt war, beschädigen können und zweitens bestand die Gefahr, dass der Silikonschlauch die zum Abbilden der Probenoberfläche verwendete Spitze, die am Cantilever angebracht war, berührt und so beschädigt sowie den Trägerchip in der Halterung verschiebt. Bei Beschädigung oder gar Abbrechen der Spitze ist kein weiteres Abbilden der Probenoberfläche möglich. Für die Beobachtung des Kristallwachstums ist es zusätzlich und unbedingt notwendig, dass stets derselbe Oberflächenbereich über einen Zeitraum von mehreren Stunden abgebildet wird. Eine Verschiebung des Trägerchips in der Halterung würde zu einer deutlichen Verschiebung des abgebildeten Probenbereichs führen [2, 4].

Beim ersten Wachstumsexperiment auf der Oberfläche einer „flat pearl“ (siehe Abschnitt 5.2.1) wurde vor den Lösungsaustauschen immer das Abrastern der Probenoberfläche gestoppt und die Spitze mit der AFM-Software etwa 100 μm bis 200 μm von der Probenoberfläche weggefahren. Nach Entnahme und Einspülen der CaCO_3 -Lösungen erfolgte zunächst das Wiederannähern der Spitze an die Probenoberfläche mittels AFM-Software und anschließend wurde das Abrastern erneut gestartet. Bei diesen Lösungsaustauschen gelang es, dass sich der abgebildete Probenbereich nur marginal verschoben hat. Das erste Wachstumsexperiment zeigte, dass die beschriebene Austauschmethode der CaCO_3 -Lösungen für weitere AFM-Untersuchungen geeignet war. Bei allen weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Wachstumsexperimenten erfolgten die Lösungsaustausche dann immer direkt während des Abbildens der Probenoberfläche. Dabei konnte allerdings jeweils nur ein maximales Volumen von 2 ml entnommen und eingespült werden.

4.5 Erarbeitung einer Präparationsmethode für ergänzende REM-Untersuchungen

Sowohl nach Durchführung von AFM-Untersuchungen zur Charakterisierung der Probenoberflächen als auch nach AFM-Wachstumsexperimenten wurden dieselben Proben zusätzlich mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM)¹⁶⁰ untersucht.

Nach den AFM-Experimenten waren die zu untersuchenden Proben – „flat pearls“

¹⁶⁰Im Weiteren wird der Begriff Rasterelektronenmikroskop mit REM abgekürzt.
englisch: scanning electron microscope

oder Perlmutterpaltflächen – jeweils mittels Zweikomponentenkleber¹⁶¹ in der Mitte einer Petrischale¹⁶² aus Polystyrol fixiert, deren Rand eine Höhe von 10 mm aufwies. Um im REM nun eine gut aufgelöste Abbildung der jeweiligen Probenoberfläche zu erhalten, mussten zuerst die Ränder der Petrischalen aus verschiedenen Gründen entfernt werden. Erstens war der Rand der für die AFM-Untersuchungen verwendeten Petrischalenart mit 10 mm zu hoch, da der Arbeitsabstand¹⁶³, mit dem die REM-Untersuchungen der „flat pearls“ und Perlmutterpaltflächen erfolgten, im Bereich von 1,5 mm bis maximal 7 mm lag. Zur Veranschaulichung zeigt die **Abbildung 30** die innere Kammer des Rasterelektronenmikroskops, deren Aufnahme mit der internen Kamera erfolgte. Dort kennzeichnet der grüne Pfeil die elektronenoptische Säule bzw. die Mikroskopsäule des REM und der gelbe Pfeil die FIB¹⁶⁴-Säule. Durch die Anordnung der Mikroskopsäule, der FIB-Säule und der Petrischale mit Probe zueinander war es nicht möglich bei Vorhandensein des hohen Petrischalenrandes den Arbeitsabstand genügend zu verkleinern. Zweitens bestand die Gefahr beim Bewegen und Verkippen der Probe die elektronenoptische Säule mit dem Rand der Petrischale zu berühren.

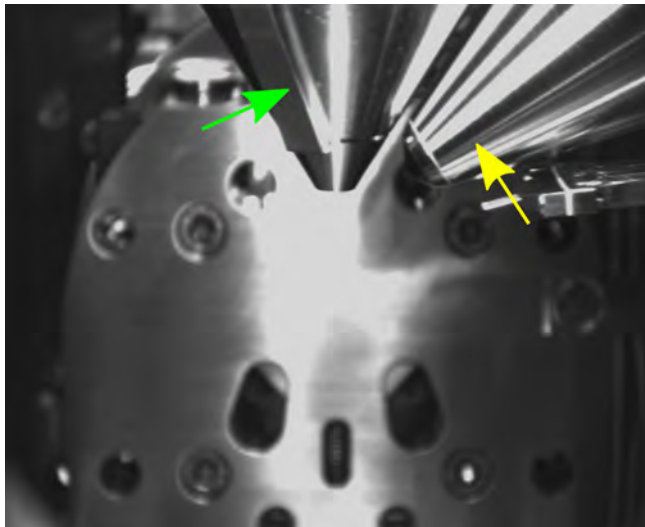


Abbildung 30: Innenkammer des Rasterelektronenmikroskops (REM) aufgenommen mit der internen Kamera. Der grüne Pfeil markiert die elektronenoptische Säule des REM und der gelbe Pfeil die FIB („focused ion beam“)-Säule. Der Probenhalter und der auf diesem angebrachte Probenhalter mit Probenteller und Petrischale, in der sich die Probe befand, sind hier nicht zu sehen.

Zum Entfernen des Petrischalenrandes wurde eine Apparatur entwickelt, die die Probe dabei hauptsächlich vor Verunreinigungen, insbesondere vor Kunststoffsplintern, schützt. Die **Abbildung 31** zeigt eine schematische Zeichnung dieser Apparatur. Die Apparatur besteht einerseits aus einem Aluminiumzylinder mit einem Durchmesser von 30 mm, der kleiner ist als der Durchmesser der verwendeten Petrischalen mit 35 mm, und ande-

¹⁶¹ Epoxykleber, max. 4 min Topfzeit; Bindulin; H.L. Schönleber GmbH; Fürth, Deutschland

¹⁶² 10 mm Höhe, 35 mm Durchmesser; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

¹⁶³ Abstand zwischen dem Polschuh der Objektivlinse und dem fokussierten Probenbereich [4, 146]

¹⁶⁴ englisch: focused ion beam; deutsch: fokussierter Ionenstrahl

rerseits aus einem Deckel aus Acrylglas. Der Deckel ist ein einseitig geschlossener und transparenter Hohlzylinder ebenfalls mit einem Durchmesser von 30 mm. Am unteren, offenen Ende ist zur besseren Abdichtung zusätzlich ein O-Ring aus Gummi eingefasst. Der Deckel, der in die Petrischale passt, sollte zum einen die Petrischale auf dem Aluminiumzylinder fixieren und zum anderen die Probe bei der weiteren Bearbeitung schützen. Dieser Deckel ist durchsichtig, damit beim Aufsetzen das in der Petrischale festgeklebte Probestück nicht beschädigt wird. Eine seitlich angebrachte Spannvorrichtung ermöglicht es, Deckel und Petrischale fest auf den Aluminiumzylinder zu drücken. Der O-Ring am unteren Ende des Deckels dichtet die Petrischale dabei so ab, dass die Probe vor Kunststoffspänen geschützt wird. Schließlich findet zum Entfernen des Petrischalenrandes ein Multifunktionswerkzeug¹⁶⁵ mit einem Trennsägeblatt aus Federstahl¹⁶⁶ (22 mm Durchmesser) zum Trennen von Kunststoff Verwendung.

Vor dem Einspannen der Petrischale zum Entfernen des Randes wurde die Auflagefläche der Petrischale auf dem Aluminiumzylinder mit Ethanol¹⁶⁷ gereinigt und mit einem fusselfreien Tuch¹⁶⁸ abgewischt sowie der Deckel mit dem Spülmittel *Ultra Joy*¹⁶⁹ mechanisch gesäubert, mit Reinstwasser¹⁷⁰ sorgfältig abgespült und mit einem fusselfreien Tuch getrocknet. Ebenso erfolgte das Säubern des Trennsägeblatts mit Ethanol und anschließend dessen Trocknung mit Hilfe eines fusselfreien Tuchs. Nach der Reinigung aller Einzelteile wurden die Petrischale und der Deckel mittels Spannvorrichtung auf dem Aluminiumzylinder fixiert. Zum Abtrennen des Randes wurde nun mehrfach mit dem Federstahlsägeblatt von unten in die überstehende Petrischale gesägt, bis der Rand komplett entfernt war. Das Ziel bestand darin, den Rand der Petrischale möglichst vollständig zu entfernen, sodass nur der Petrischalenboden mit aufgeklebter Probe für die weiteren Untersuchungen mit dem REM übrigblieb. Anschließend wurde der Rand des verbliebenen Petrischalenbodens zusätzlich mit Edelmetallschleifstiften¹⁷¹ (2,5 mm und 7,0 mm Durchmesser) geglättet. Vor Abnahme des Deckels erfolgte zuerst die Entfernung aller, größeren auf der Apparatur befindlichen Kunststoffspäne mit einem Ethanol befeuchteten, fusselfreien Tuch. Mit einem Stickstoffstrahl wurden zusätzlich auch die kleineren, noch vorhandenen Kunststoffspäne, insbesondere im Bereich der Abdichtung zwischen dem Petrischalenboden und dem in den Deckel eingefassten O-Ring, entfernt. Die Aufbewahrung

¹⁶⁵Dremel®, Dremel Europe; Breda, Niederlande

¹⁶⁶0,1 mm Dicke, Nr.: 28 830; www.proxxon.com

¹⁶⁷Ethanol absolut; VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; Fontenay-sous-Bois, Frankreich

¹⁶⁸VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

¹⁶⁹Procter & Gamble; Cincinnati, OH, USA

¹⁷⁰deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand von 18,2 MΩ · cm [4]

¹⁷¹2,5 mm Durchmesser, Zylinderform, gefertigt nach DIN 69 170, Nr.: 28 774; www.proxxon.com

7,0 mm Durchmesser, Konusform, gefertigt nach DIN 69 170, Nr.: 28 778; www.proxxon.com

der so für die REM-Untersuchungen präparierten Proben erfolgte jeweils in einer anderen, zusätzlich mit Parafilm¹⁷² verschlossenen, Petrischale¹⁷³ mit größerem Durchmesser von 60 mm im Kühlraum bei 6 °C.

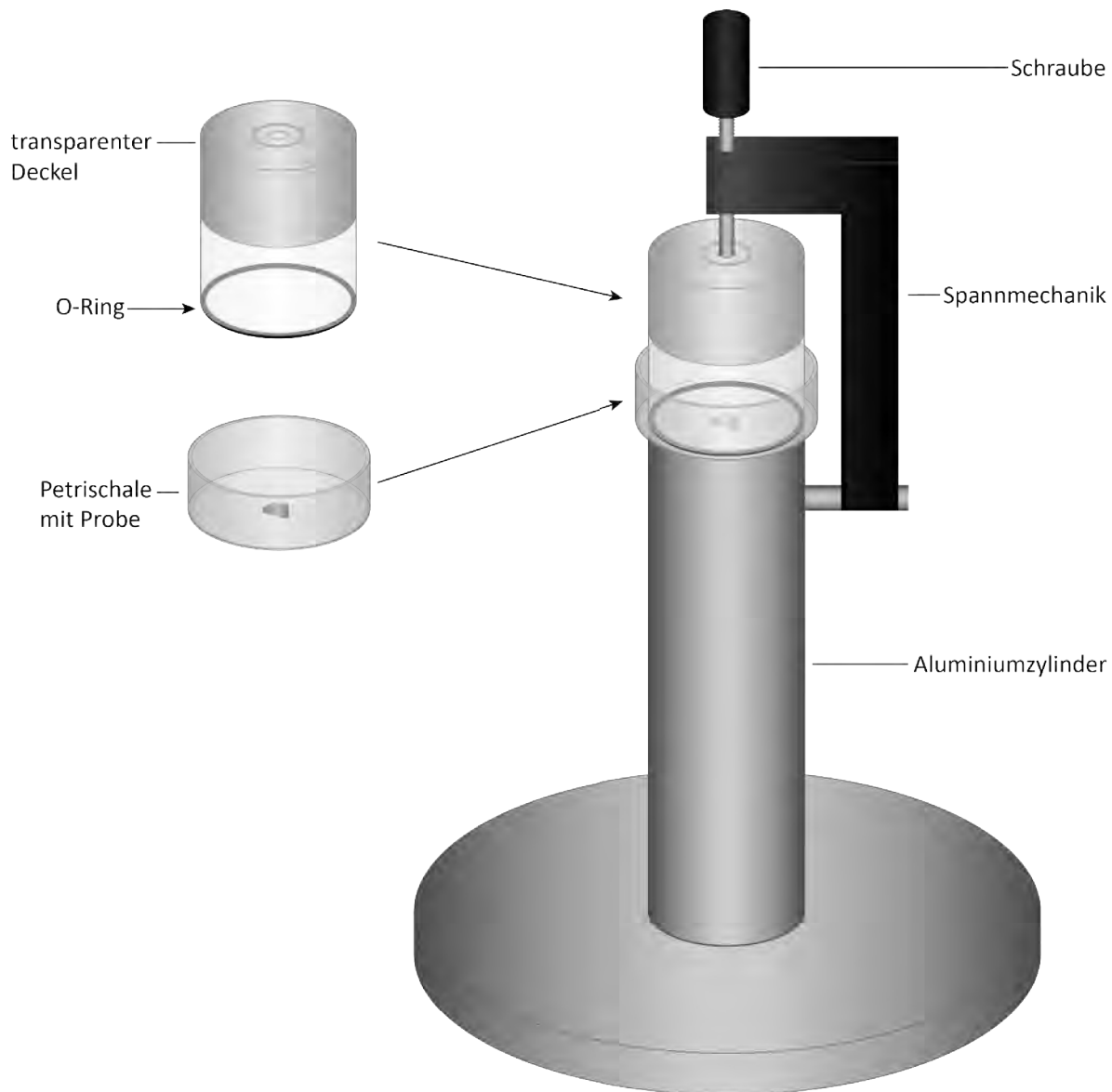


Abbildung 31: Apparatur zum Entfernen des Randes der Petrischale (35 mm Durchmesser) bestehend aus einem Aluminiumzylinder (30 mm Durchmesser) und einem transparenten, einseitig geschlossenen Hohlzylinder aus Acrylglas (30 mm Durchmesser) als Deckel. Der in den Deckel eingefasste O-Ring aus Gummi dient als Abdichtung zwischen Petrischalensboden und Deckel. Mit einer seitlich angebrachten Spannmekhanik kann die Petrischale beim Absägen des Randes fixiert werden.

¹⁷²VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

¹⁷³15 mm Höhe, aus Polystyrol; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

Für die REM-Untersuchungen wurde der übriggebliebene Petrischalenboden mit aufgeklebter Probe, entweder ein „flat pearl“-Probestück oder eine frisch gespaltene Perlmutteroberfläche, mit Hilfe eines 25 mm großen runden, elektrisch leitfähigen Haftaufklebers¹⁷⁴ auf einem runden Probenhalter¹⁷⁵ mit Durchmesser von 32 mm befestigt und anschließend mit einer Pinzette auf dem Haftaufkleber fest angedrückt. Zusätzlich musste der Petrischalenboden geerdet und dazu kontaktiert werden. Eine sonst bei REM-Untersuchungen übliche Goldbeschichtung war nicht sinnvoll, da die Untersuchung der Probe hier möglichst ohne Veränderung, d. h. ohne zusätzliche Beschichtung, stattfinden sollte. Diese Erdungsmaßnahmen waren nötig, um eine starke Aufladung der Probe und des Petrischalenbodens durch den Elektronenstrahl während der REM-Untersuchung zu vermeiden. Es zeigte sich außerdem, dass ohne Kontaktierung die Probe im REM kaum oder gar nicht erkennbar war.

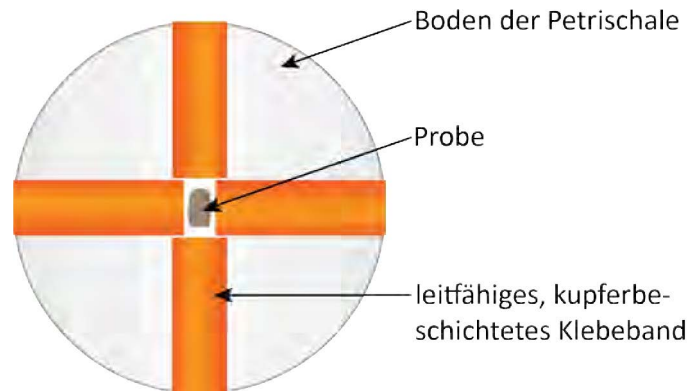


Abbildung 32: Schematische Zeichnung der Kontaktierung des Petrischalenbodens mit aufgeklebter Probe für die REM-Untersuchungen. Vier schmale Streifen des leitfähigen, kupferbeschichteten Klebebands werden sternförmig von der Probe aus bis auf den Probenhalter geklebt, um den Petrischalenboden mit Probe und den Probenhalter leitend miteinander zu verbinden.

Zur Kontaktierung wurden auf dem verbliebenen Petrischalenboden vier schmale Streifen aus leitendem, kupferbeschichtetem Klebeband¹⁷⁶ sternförmig von der Probe aus bis auf den Probenhalter geklebt (siehe **Abbildungen 32 und 33**). Die Befestigung dieser Streifen erfolgte dabei möglichst nahe an der Probe, jedoch ohne diese zu berühren. Dadurch gelang es, erstens ein Aufladen der Probe zu verhindern und zweitens den Probenort während der REM-Untersuchung besser zu lokalisieren. Der runde Probenhalter, auf dem die Probe mit dem verbliebenen Petrischalenboden leitend befestigt war, wurde

¹⁷⁴Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

¹⁷⁵Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

¹⁷⁶6,4 mm Breite, einseitig klebend; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

auf dem Probenhalter und dieser wiederum auf dem Probentisch in der evakuierbaren Innenkammer des REM fixiert.

In der Abbildung 33 sind beispielhaft Aufnahmen eines entsprechend dem oben beschriebenen Verfahren präparierten Probestücks dargestellt. Das Bild (A) zeigt die evakuierbare Innenkammer des REM mit dem Probentisch (blauer Pfeil), auf dem der Probenhalter (weißer Pfeil) mit befestigtem runden Probenteller (grüner Pfeil) angebracht wurde. Die Aufnahme der Innenkammer erfolgte hier ebenfalls mit der internen Kamera. Das Bild (B) zeigt eine REM-Aufnahme, die im sogenannten „fisheye“-Modus aufgenommen wurde. Daher ist es dort nicht möglich, einen Maßstab anzugeben. Die roten Pfeile in den Bildern (A) und (B) markieren jeweils das Probestück, eine Perlmutterpaltfläche. Von der Probe aus wurden auf dem Petrischalenboden die vier schmalen 6,4 mm breiten Streifen des leitfähigen kupferbeschichteten Klebebands aufgebracht. Die gelben Pfeile in den Bildern (A) und (B) kennzeichnen beispielhaft je einen der vier Klebebandstreifen. Diese Klebebandstreifen wurden dabei jeweils bis auf den Probenhalter geklebt, um den Petrischalenboden mit Probe und dem Probentisch leitend miteinander zu verbinden. Die hellen, weißen Bereiche auf dem Petrischalenboden (z. B. schwarzer Pfeil im Bild (B)) sind nur Abdrücke bedingt durch das Festdrücken des Petrischalenbodens mit der Pinzette auf dem Haftaufkleber.

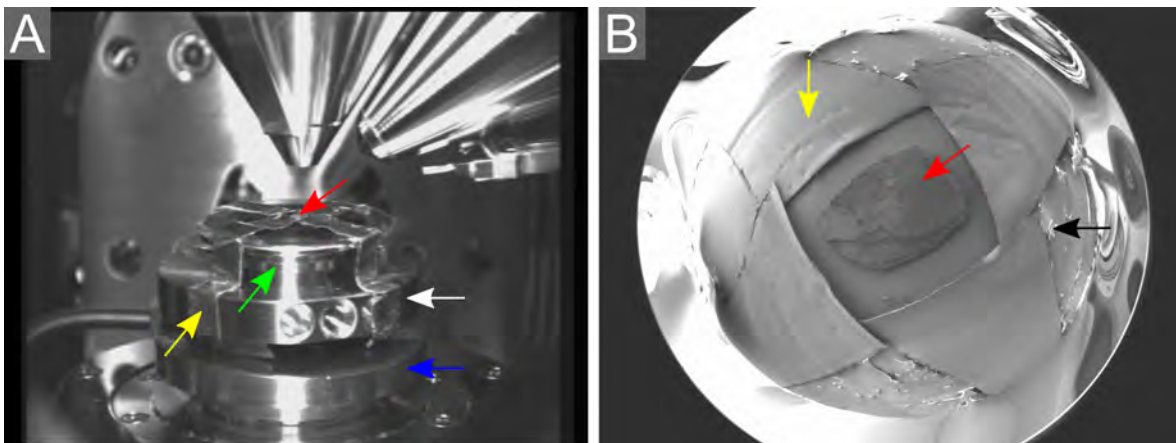


Abbildung 33: (A) Innenkammer des Rasterelektronenmikroskops (REM) aufgenommen mit der internen Kamera und (B) REM-Aufnahme eines Probestücks (Perlmutterpaltfläche) aufgenommen mit dem SE2-Detektor (Everhart-Thornley Detektor) im „fisheye“-Modus. Der Petrischalenboden mit der aufgeklebten Probe (rote Pfeile in (A) und (B)) wurde mit einem elektrisch leitfähigen Haftaufkleber auf einem runden Probenteller (grüner Pfeil in (A)) fixiert. Dieser Probenteller wurde wiederum auf dem Probenhalter (weißer Pfeil in (A)), der auf dem Probentisch (blauer Pfeil in (A)) befestigt war, angebracht. Zusätzlich erfolgte die Kontaktierung des Petrischalenbodens mit vier, sternförmig von der Probe aus bis auf den Probenhalter geklebten, Streifen des kupferbeschichteten Klebebands (gelbe Pfeile in (A) und (B)). Der schwarze Pfeil in (B) kennzeichnet beispielhaft einen der durch das Festdrücken des Petrischalenbodens mit der Pinzette entstandenen Abdrücke.

Für die REM-Untersuchungen der Probestücke der „flat pearls“ und der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen fanden Beschleunigungsspannungen von 0,60 kV bis maximal 2,5 kV Verwendung.

5 Ergebnisse und Diskussionen

5.1 Charakterisierung der Wachstumsfronten von „flat pearls“ mittels AFM

Zuerst wurde die Oberflächenstruktur der Wachstumsfronten, die aus „flat pearls“ stammen, mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) untersucht und charakterisiert. Anschließend erfolgte die direkte Beobachtung des Kristallwachstums von Calciumcarbonat auf den Wachstumsfronten mit dem AFM. Die Probestücke wurden gemäß den in Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Präparationsprozeduren für diese AFM-Untersuchungen vorbereitet. Bei den Strukturuntersuchungen und ebenfalls bei den später durchgeführten Wachstumsexperimenten fanden sowohl PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden als auch ScanAsyst-Air¹⁷⁷ AFM-Sonden Verwendung.

5.1.1 Charakterisierung der Oberflächenstruktur

Wie in Abschnitt 4.2.1 detailliert beschrieben, wurden zur Herstellung der „flat pearls“ runde Deckgläser mit Durchmessern von 10 mm und 12 mm für definierte Zeitspannen zwischen dem Mantelepithel des Schneckenkörpers und der Innenseite der Schale von lebenden Meeresschnecken inkubiert [4]. Die Untersuchung der Oberflächenstruktur mit dem AFM fand jeweils an einem etwa 5 mm · 5 mm großen Bruchstück einer „flat pearl“ statt. Dazu wurde mit dem Körner eine „flat pearl“ in mehrere kleinere Probestücke zerlegt und anschließend ein solches Probestück mit dem Zweikomponentenkleber¹⁷⁸, dessen Abbindezeit fünf Minuten betrug, in der Mitte einer Petrischale¹⁷⁹ mit Durchmesser von 35 mm fixiert. Sofort nach dem Aufkleben des Probestücks erfolgte dessen Benetzung mit einer gesättigten 0,9 mM CaCO₃-Lösung oder einer gering übersättigten 1 mM CaCO₃-Lösung [4]. Nach dem Abbinden des Zweikomponentenklebers wurden 3 ml derselben 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO₃-Lösung in die Petrischale pipettiert. Das genaue Volumen der in der Petrischale vorhandenen CaCO₃-Lösung musste bekannt sein, um später nach den Austausch der CaCO₃-Lösungen während der Wachstumsexperimente stets die verwendete Konzentration der CaCO₃-Lösung berechnen zu können. Allerdings nimmt die tatsächliche Konzentration der CaCO₃-Lösung in der Petrischale während der Wachstumsexperimente ab, da die Calciumionen (Ca²⁺-Ionen) und die Carbonationen (CO₃²⁻-Ionen) für das Wachstum des Aragonits benötigt werden [4]. Nach der Kalibrierung der verwendeten

¹⁷⁷Die Spezifikationen der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden und der ScanAsyst-Air AFM-Sonden sind im Anhang in Abschnitt 10.1 aufgelistet.

¹⁷⁸Epoxykleber, max. 4 min Topfzeit; Bindulin; H.L. Schönleber GmbH; Fürth, Deutschland

¹⁷⁹10 mm Höhe, max. 10 ml Volumen, aus Polystyrol; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

AFM-Sonde und dem anschließenden Einbau der Petrischale mit Probe ins AFM wurde ein geeigneter Probenbereich ausgewählt und abgebildet.

In diesem Abschnitt erfolgt die Beschreibung der Strukturuntersuchungen von mehreren verschiedenen Probestücken der Wachstumsfronten. Zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur wurden dabei nur AFM-Bilder, deren Aufnahmen mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden erfolgten, genutzt. Zum Vergleich der zwei verwendeten AFM-Sondenarten hinsichtlich der Auflösung der abgebildeten Strukturdetails sind in Abschnitt 5.1.3 einige mit den ScanAsyst-Air AFM-Sonden aufgenommene AFM-Bilder der Oberflächen verschiedener Wachstumsfrontprobestücke gezeigt.

Erste Probe - „stacks of coins“ und Höhenvermessung

Die **Abbildung 34** zeigt die mit dem AFM aufgenommene Oberfläche der Wachstumsfront eines wie oben beschrieben präparierten Probestücks einer nach 14-tägiger Inkubation entstandenen „flat pearl“ mit den zwei verschiedenen Scanflächen von $7,3\ \mu\text{m} \cdot 7,3\ \mu\text{m}$ beim Bild (A1) bzw. (A2) und von $3,4\ \mu\text{m} \cdot 3,4\ \mu\text{m}$ beim Bild (B1) bzw. (B2). Die Bilder mit dem Index 1, die im Weiteren auch als Höhenbilder bezeichnet werden, stellen jeweils das Höhsignal dar und die Bilder mit dem Index 2 zeigen jeweils das dazugehörige Fehlersignal. Im Folgenden meint die Bezeichnung „die Bilder (z. B. A)“ immer sowohl das Höhenbild (A1) als auch das Fehlersignalsbild (A2).

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Inkubation der verwendeten „flat pearl“ zwischen dem Mantelepithel und der Schaleninnenseite einer lebenden Meeresschnecke über einen Zeitraum von 14 Tagen [4]. Bei der Befeuchtung der Probenoberfläche während der Präparationsprozedur kam hier eine 1 mM CaCO_3 -Lösung zum Einsatz. Nach Abbinden des Zweikomponentenklebers, mit dem das Probestück in der Petrischale fixiert war, wurden 3 ml derselben 1 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale hinzugefügt. Nach der Probenpräparation erfolgte zunächst die Kalibrierung der für die Untersuchung verwendeten PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde gemäß der in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen „no touch“-Methode. Diese Kalibrierung fand vor dem Einbau der Probe ins AFM in einer weiteren Petrischale ohne Probe, in der sich nur 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung befanden, statt. Nach dem Einbau der Petrischale mit festgeklebter Probe und nachdem die abbildende Kraft stabil über mehrere Minuten eingestellt werden konnte, erfolgte das Abbilden des ausgewählten Probenbereichs mit der AFM-Sonde in 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung. Die Bilder wurden dabei mit einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von 0,901 Hz und einer abbildenden Kraft von 250 pN aufgenommen. Das Abrastern der Probenoberfläche fand mit möglichst minimaler Kraft statt, um insbesondere die organische Matrix nur wenig zu beschädigen. Bei der Untersuchung dieser Probe konnten keine Bilder

mit größeren Scanflächen als $7,3\ \mu\text{m} \cdot 7,3\ \mu\text{m}$ aufgenommen werden, da es dann nicht mehr möglich war, die abbildende Kraft über den für die Bildaufnahme benötigten Zeitraum von mehreren Minuten stabil einzustellen.

In den Bildern (A)¹⁸⁰ sind deutlich drei typische „stacks of coins“, die hier aus drei bis fünf einzelnen gut sichtbaren und übereinanderliegenden Aragonitplättchen bestehen, erkennbar. Dabei hat das obere Aragonitplättchen eine kleinere laterale Ausdehnung als die jeweils darunterliegenden Plättchen [3, 4]. Die roten Pfeile markieren beispielhaft zwei dieser „stacks of coins“. Der mit blauen Pfeilen gekennzeichnete, aus fünf einzelnen Aragonitplättchen mit polygonaler Form bestehende, „stack of coins“ ist in den Bildern (B) vergrößert dargestellt. Die oberen vier gut sichtbaren Aragonitplättchen sind dabei jeweils mit einem grünen Pfeil und von oben nach unten mit (1) bis (4) gekennzeichnet. Das unterste, mit weißem Pfeil markierte Aragonitplättchen ist nur schwer beobachtbar. Da die laterale Ausdehnung des obersten Aragonitplättchens noch gering ist, hat dieses Plättchen vermutlich erst kurze Zeit zuvor begonnen zu wachsen [4].

In den Zwischenräumen der drei verschiedenen gut erkennbaren „stacks of coins“ in den Bildern (A) und (B) befindet sich organische Matrix. Das blaue Dreieck im Bild (A2) kennzeichnet dabei beispielhaft diese organische Matrix. Die einzelnen Aragonitplättchen der drei „stacks of coins“ sind nur zum Teil von organischer Matrix umhüllt. So bedeckt die organische Matrix z. B. die untersten, mit (4) und (5) markierten, Aragonitplättchen des „stack of coins“ in den Bildern (B) fast vollständig (z. B. grünes Dreieck). Im Gegensatz dazu existiert keine organische Matrix auf den Oberflächen der Aragonitplättchen (1) und (2) [4]. In den Bildern (A) ist bereits die hochorganisierte, netzwerkartig verflochtene Struktur der organischen Matrix gut erkennbar [1, 2]. Im unteren, rechten Bereich des Bildes (B2) sind deutlichst die einzelnen, netzwerkartig angeordneten Filamente bzw. Fasern und die dazwischen befindlichen Löcher bzw. Poren sichtbar. Zur Veranschaulichung kennzeichnen die weißen Dreiecke dort jeweils ein solches einzelnes Filament. Die Poren bzw. Löcher (z. B. rote Dreiecke) weisen je nach Vernetzungslage und -grad der Filamente verschiedene Durchmesser auf, wie besonders bei den später in Abbildungen 36, 37 und 38 gezeigten AFM-Aufnahmen weiterer „flat pearl“-Probestücke beobachtbar ist [2, 4]. Das Abrastern der Probenoberfläche mit der Spitze der AFM-Sonde erzeugt zusätzlich Bildartefakte, nämlich horizontal verlaufende Streifen [3, 4]. Zwei dieser Streifen sind zur Demonstration in den Bildern (A) mit gelben Pfeilen markiert. Darüber hinaus ist das Abbilden der Filament-Netzwerkstruktur der weichen organischen Matrix, besonders bei zu hoher Kraft, schwierig. Die gelben Dreiecke in den Bildern (A) kennzeichnen zwei solche Stellen der organischen Matrix, an denen das Abbilden der Netzwerkstruktur nicht gelang.

¹⁸⁰Wie oben bereits erklärt, ist damit das Höhenbild (A1) und das Fehlersignalsbild (A2) gemeint.

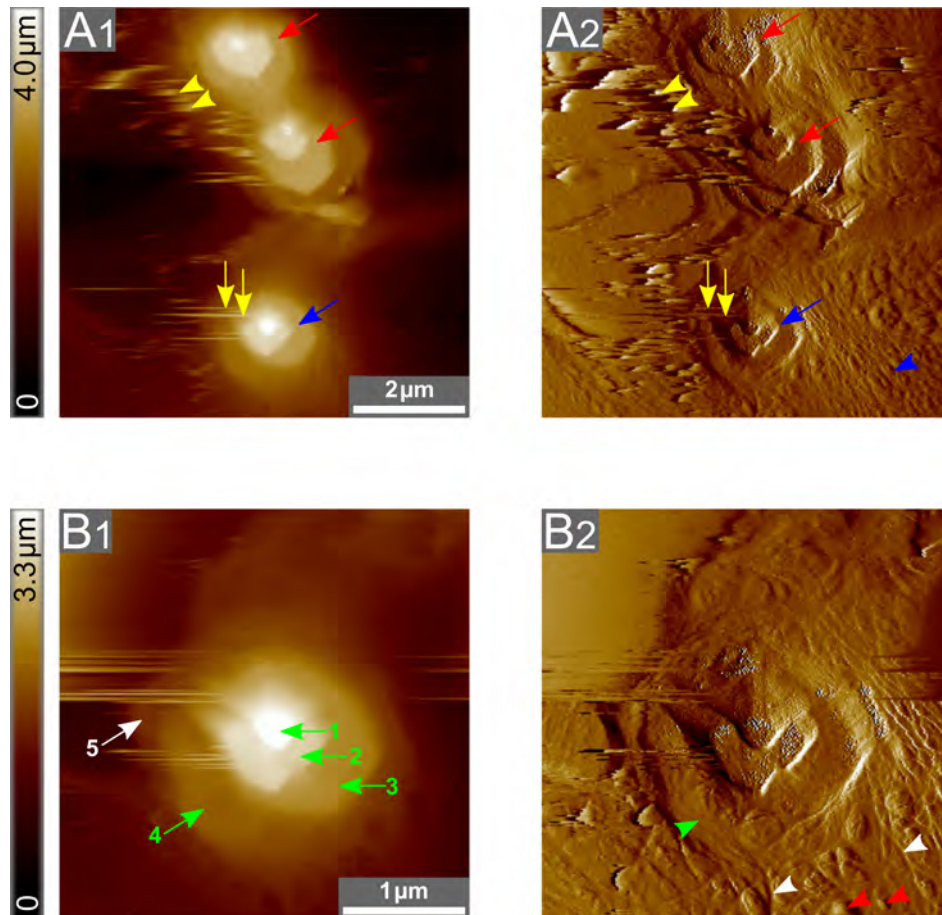


Abbildung 34: AFM-Aufnahmen der Oberfläche einer etwa $5\text{ mm} \cdot 5\text{ mm}$ großen Probe der Wachstumsfront, die aus einer „flat pearl“ nach 14-tägiger Inkubation gewonnen wurde, in 3 ml einer 1 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $7,3\text{ }\mu\text{m} \cdot 7,3\text{ }\mu\text{m}$ und (B) $3,4\text{ }\mu\text{m} \cdot 3,4\text{ }\mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen jeweils das Höhensignal und Bilder mit Index 2 (rechts) jeweils das entsprechende Fehlersignal. In (A) sind drei sogenannte „stacks of coins“ (rote und blaue Pfeile), die aus unterschiedlich großen und übereinander angeordneten Aragonitplättchen bestehen, erkennbar. Die laterale Ausdehnung der Aragonitplättchen nimmt dabei von oben nach unten zu [4]. In den Zwischenräumen der „stacks of coins“ befindet sich organische Matrix (blaues Dreieck in (A2)). (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des mit blauen Pfeilen markierten „stack of coins“ aus (A). Dort sind die einzelnen polygonalen Aragonitplättchen (grüne Pfeile und weißer Pfeil in (B1)) und das filamentartige Netzwerk der organischen Matrix (grünes Dreieck in (B2)) gut beobachtbar. Zur Verdeutlichung kennzeichnen die weißen Dreiecke in (B2) zwei einzelne Filamente und die roten Dreiecke in (B2) zwei verschieden große Poren zwischen den Filamenten. Die gelben Pfeile und die gelben Dreiecke in (A) markieren beispielhaft einige, durch das Abrastern der Probenoberfläche mit der Spitze der AFM-Sonde entstandene, Bildartefakte [3, 4].

Der Höhenunterschied zwischen den einzelnen übereinander angeordneten Aragonitplättchen lässt sich sehr gut aus den aufgenommenen Höhenbildern (Index 1) ausmessen.

Die Vermessung der Höhe einzelner Aragonitplättchen wird im Folgenden detailliert anhand der **Abbildung 35** erläutert. Das Bild (A) zeigt ein bereits in der Abbildung 34 dargestelltes AFM-Höhenbild, in dem die einzelnen Aragonitplättchen sehr deutlich beobachtbar sind. Mit Hilfe der AFM-Auswertungssoftware¹⁸¹ wurde nun ein Höhenprofil, das genau entlang der blauen Linie im Bild (A) verläuft, ermittelt. Der blaue Pfeil im Bild (A) markiert zusätzlich, zur besseren Sichtbarkeit, diese blaue Linie. Das entsprechende Höhenprofil ist im Bild (B) dargestellt. Dort kennzeichnen die roten, vertikalen Linien beispielhaft die Positionen der zwei Marker, die zur Bestimmung der Höhendifferenz zwischen den großen (001)-Oberflächen der mit (1) und (2) markierten Aragonitplättchen Verwendung fanden. Dabei wurde der erste Marker auf das oberste Aragonitplättchen (1) und der zweite Marker auf das darunterliegende Aragonitplättchen (2) gesetzt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Differenz zwischen den Höhenwerten an diesen zwei Markerpositionen. Diese Höhenvermessung wurde 16-mal an mehreren verschiedenen Stellen entlang des Höhenprofils durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Ausmessung der Höhe des Aragonitplättchens (1) jeweils wiederum 16-mal an verschiedenen Stellen entlang drei weiterer im Bild (A) ermittelter Höhenprofile. Diese weiteren Höhenprofile sind hier nicht gezeigt. Somit erfolgte die Vermessung der Höhendifferenz zwischen den großen Oberflächen der mit (1) und (2) markierten Aragonitplättchen insgesamt 64-mal. Aus allen erhaltenen Höhendifferenzen wurde danach der Mittelwert berechnet.

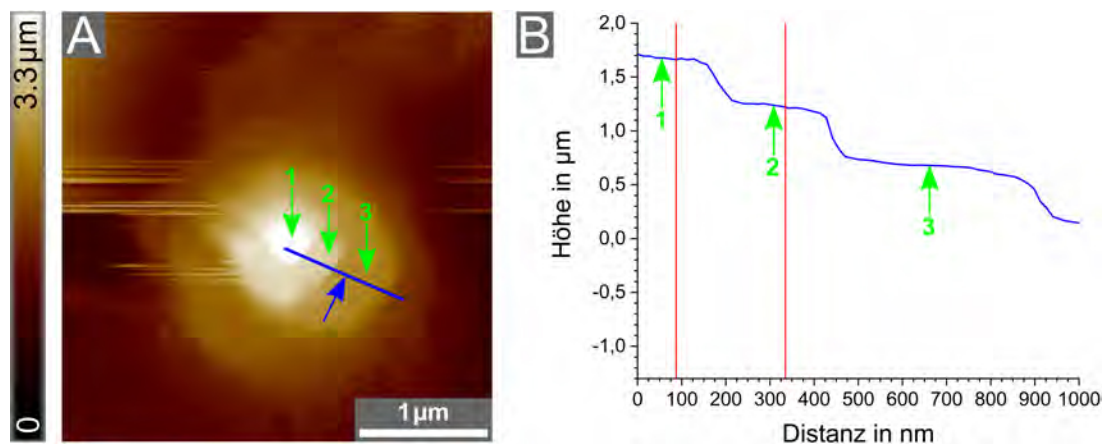


Abbildung 35: Vermessung der Höhen einzelner Aragonitplättchen. In (A) ist ein AFM-Höhenbild aus Abb. 34 dargestellt. (B) zeigt das entsprechende Höhenprofil, das entlang der in (A) eingezeichneten blauen Linie verläuft. Diese blaue Linie wurde zusätzlich mit einem blauen Pfeil markiert. Die zwei roten, vertikalen Linien in (B) kennzeichnen beispielhaft die zwei Markerpositionen zur Ermittlung der Höhendifferenz zwischen den großen (001)-Oberflächen der mit (1) und (2) markierten Aragonitplättchen.

¹⁸¹NanoScope Analysis 1.8; Bruker; Billerica, MA, USA

Damit erhielt man nun eine Höhe von (460 ± 30) nm für das oberste Aragonitplättchen des betrachteten „stack of coins“. Der Fehler der ermittelten Höhe wurde hier mit Hilfe der Standardabweichung berechnet. Dieser Fehler ergibt sich erstens aus der Ablesegenauigkeit und zweitens daraus, dass die Aragonitplättchenoberflächen selbst nicht glatt sind, sondern bereits viele Unebenheiten im Nanometerbereich („nanoasperities“) aufweisen [8, 77]. Man darf nicht vergessen, dass der relativ große Fehler auch aufgrund der Differenzmessung entsteht. Dieses Verfahren wurde bei den mit (2) und (3) gekennzeichneten Aragonitplättchen entsprechend wiederholt. Das Ausmessen der Höhen dieser Aragonitplättchen erfolgte mit Hilfe mehrerer weiterer, hier nicht gezeigter, Höhenprofile. Die Höhen betragen demnach (508 ± 35) nm beim Plättchen (2) und (503 ± 49) nm beim Plättchen (3). Bei den mit (4) und (5) im Höhenbild (B1) der Abbildung 34 gekennzeichneten Aragonitplättchen konnten die Höhen nicht bestimmt werden, da keine geeigneten Referenzpunkte vorhanden sind. Die ermittelten Höhen stimmen sehr gut mit der in der Literatur angegebenen Aragonitplättchenhöhe von etwa 500 nm überein [5].

Zweite Probe - Genaue Untersuchung der organischen Matrix

In der **Abbildung 36** sind AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur eines Bruchstücks¹⁸² einer anderen „flat pearl“ mit den Scanflächen von $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ bei den Bildern (A) und (B) sowie von $2,7 \mu\text{m} \cdot 2,7 \mu\text{m}$ bei den Bildern (C) dargestellt. Die jeweils linken Bilder (Index 1) zeigen wieder die Höhensignale und die rechten Bilder (Index 2) die entsprechenden Fehlersignale. Die Oberflächenstruktur des Probestücks wird hier ebenfalls diskutiert, da in den AFM-Aufnahmen die Netzwerkstruktur der organischen Matrix aus einzelnen Filamenten und Poren bzw. Löchern besonders deutlich zu erkennen ist [2, 4]. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte mit einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde in 3 ml einer $0,9 \text{ mM CaCO}_3$ -Lösung bei Verwendung einer Kraft von 300 pN bei den Bildern (A) und (B) sowie von 200 pN bei den Bildern (C). Alle gezeigten Bilder wurden mit einer Auflösung von 512×512 Pixel und einer Abtastrate von 0,398 Hz aufgenommen.

Die Inkubation des Deckgläschens zwischen dem Mantelepithel und der Schaleninnenseite derselben lebenden Meeresschnecke, die auch zur Herstellung der bei der zuvor beschriebenen AFM-Untersuchung genutzten „flat pearl“-Probe verwendet wurde, fand ebenfalls über einen Zeitraum von 14 Tagen statt [4]. Nach Gewinnung des Probestücks aus der „flat pearl“ und dem darauffolgenden Fixieren der Probe mittels Zweikomponentenkleber in der Petrischale wurde die Probenoberfläche mit einer $0,9 \text{ mM CaCO}_3$ -Lösung befeuchtet [4]. Nach fünf Minuten erfolgte das Hinzufügen von 3 ml derselben $0,9 \text{ mM CaCO}_3$ -Lösung in die Petrischale.

¹⁸²Größe ebenfalls etwa $5 \text{ mm} \cdot 5 \text{ mm}$

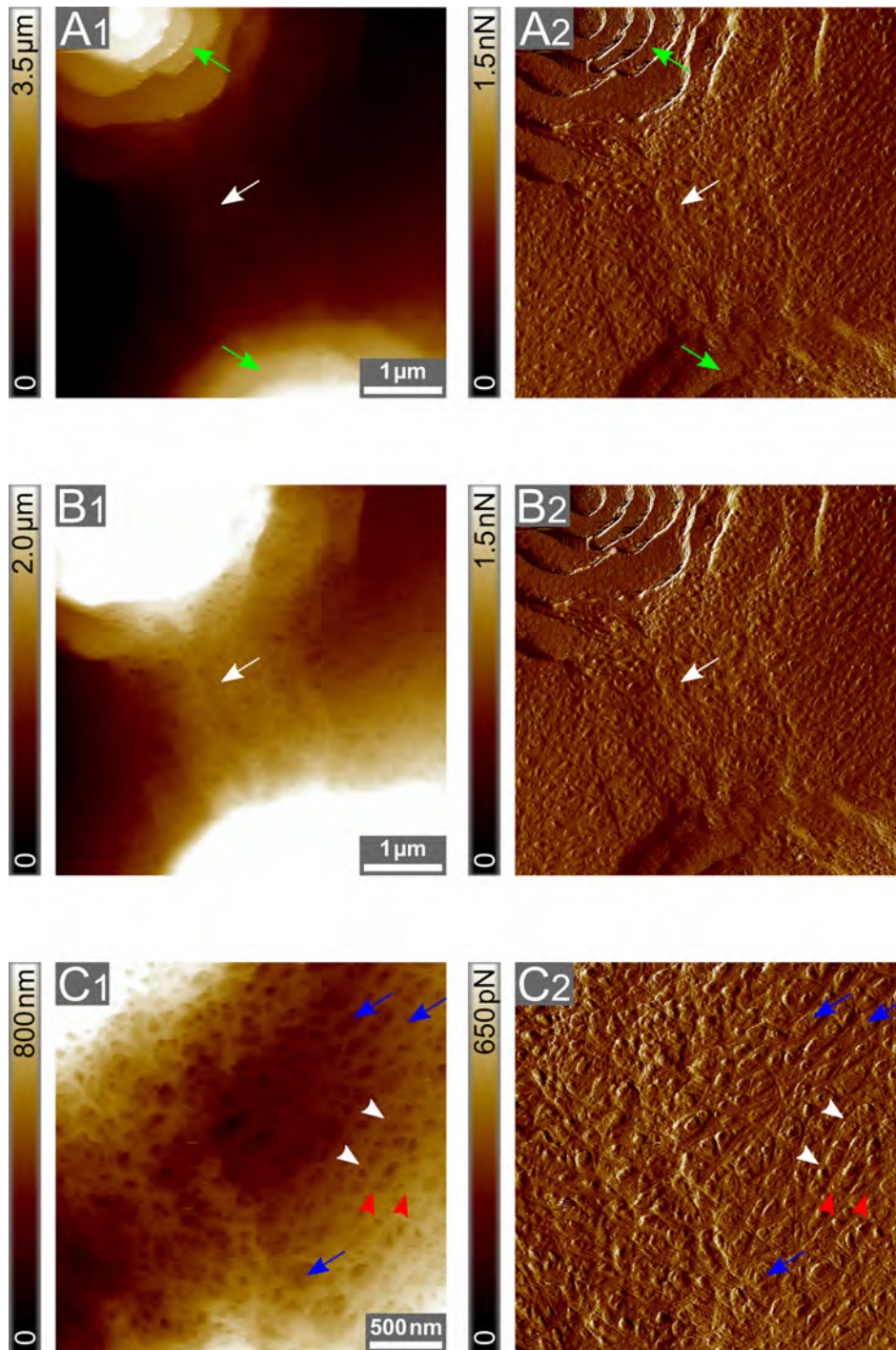


Abbildung 36: AFM-Aufnahmen der Oberfläche der Wachstumsfront eines weiteren „flat pearl“-Probestücks (14-tägige Inkubation zwischen dem Mantelepithel und der Schaleninnenseite) in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$, (B) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ und (C) $2,7 \mu\text{m} \cdot 2,7 \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen die Höhen-signale und Bilder mit Index 2 (rechts) die entsprechenden Fehlersignale. In den Bildern ist sehr deutlich die Struktur der organischen Matrix (weiße Pfeile in (A) und (B)) zwischen zwei „stacks of coins“ (grüne Pfeile in (A)) beobachtbar. (A) und (B) stellen denselben Oberflächenbereich dar, jedoch wurde bei (B1) die Höhe so skaliert, dass dort vor allem die organische Matrix zwischen den „stacks of coins“ sichtbar ist. (C) zeigt diesen Bereich der organischen Matrix vergrößert. Die organische Matrix ist ein Netzwerk aus verwobenen Filamenten (weiße und rote Dreiecke) und Poren bzw. Löchern (blaue Pfeile) [2, 4].

Vor dem Einbau der Petrischale mit festgeklebtem Probestück ins AFM wurde hier, im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen AFM-Untersuchung, mit der verwendeten AFM-Sonde eine „touch“-Kalibrierung¹⁸³ durchgeführt. Dabei erfolgte mit der AFM-Sonde die Aufnahme von Kraftkurven auf dem Boden einer weiteren Petrischale, in der sich nur 3 ml der 0,9 mM CaCO₃-Lösung und keine Probe befanden. Anschließend wurden aus den erhaltenen Kraftkurven die Federkonstante des Cantilevers und die Deflektionssensitivität ermittelt, sodass auch das später während der Probenuntersuchung aufgezeichnete Fehlersignal entsprechend kalibriert war. Die Ermittlung der Deflektionssensitivität und der Federkonstante aus den Kraftkurven erfolgte direkt mit der AFM-Software. Für die PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden¹⁸⁴ beträgt die nominale Deflektionssensitivität¹⁸⁵ $9,0 \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und die nominale Federkonstante $0,35 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ [122]. Die Kalibrierung der für dieses Experiment verwendeten AFM-Sonde ergab eine Deflektionssensitivität von $(12,0 \pm 1,5) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und eine Federkonstante von $0,20 \frac{\text{N}}{\text{m}}$.

Im abgebildeten Probenbereich (Bilder (A)) befinden sich zwei „stacks of coins“, ein „stack of coins“ am unteren Bildrand und ein weiterer „stack of coins“ am oberen Bildrand. Die grünen Pfeile kennzeichnen jeweils einen der „stacks of coins“. Die einzelnen Aragonitplättchen des „stack of coins“ am unteren Bildrand sind in den Höhenbildern (A1) und (B1) nicht gut erkennbar. Der zweite, am oberen Bildrand liegende, „stack of coins“ besteht aus einer größeren Anzahl von übereinanderliegenden Aragonitplättchen. Dabei sind die einzelnen Plättchen in den Bildern (A) und (B) deutlich sichtbar. Die organische Matrix überzieht wieder, wie bei der zuvor untersuchten Wachstumsfront, die untersten Aragonitplättchen, jedoch nicht die oberen Plättchen [4]. Im Bild (A2) ist bereits die netzwerkartige Filamentstruktur der organischen Matrix im Zwischenraum der „stacks of coins“ und auf den Aragonitplättchenoberflächen gut erkennbar [4]. Diese Netzwerkstruktur aus Filamenten und Poren bzw. Löchern kann man besser in den Bildern (B) und (C) beobachten. Das Bild (B1) bzw. (B2) zeigt denselben Oberflächenbereich wie das Bild (A1) bzw. (A2), jedoch wurde beim Bild (B1) die Höhenskala von $3,5 \mu\text{m}$ (Bild (A1)) auf $2,0 \mu\text{m}$ geändert, sodass dort insbesondere die organische Matrix zwischen den „stacks of coins“ sichtbar ist. Die weißen Pfeile in den Bildern (A) und (B) markieren diesen Bereich der organischen Matrix. Das Bild (C1) bzw. (C2) zeigt eine vergrößerte Aufnahme der organischen Matrix zwischen den „stacks of coins“, in der die einzelnen Filamente und die Poren noch wesentlich deutlicher zu erkennen sind. Im rechten Bildbereich ist die Beobachtung

¹⁸³Die Kalibrierungsprozedur ist in Abschnitt 4.4.4 beschrieben.

¹⁸⁴Die genauen Spezifikationen sind im Anhang in Abschnitt 10.1 zu finden.

¹⁸⁵Für die PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden konnte nur die nominale Deflektionssensitivität angegeben werden. Es sind keine Informationen über die minimal und maximal mögliche Deflektionssensitivität vorhanden.

der Netzwerkstruktur der organischen Matrix besonders gut möglich. Dort markieren die weißen und roten Dreiecke jeweils den Verlauf eines einzelnen Filaments [4]. Diese zwei Filamente sind fast senkrecht zueinander angeordnet und im Größenbereich der Darstellung fast geradlinig ausgerichtet [2]. Beide Filamente verlaufen netzwerkartig wiederum über und unter anderen ebenfalls nahezu geradlinig ausgerichteten Filamenten [1]. Im linken, unteren Bildbereich scheinen die Filamente jedoch nicht so strukturiert zu verlaufen. Die bereits von mir in [2, 4] und in der vorher beschriebenen AFM-Untersuchung beobachteten Poren bzw. Löcher entstehen durch diese netzwerkartige Anordnung der einzelnen miteinander verwobenen Filamente. Einige verschieden große Poren bzw. Löcher sind in den Bildern (C) mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Das hochorganisierte Netzwerk der organischen Matrix besteht sichtbar aus einzelnen Filamenten unterschiedlichen Durchmessers und aus verschieden großen Poren bzw. Löchern zwischen diesen Filamenten [1, 4].

Dritte Probe - Blick auf die Filament-Netzwerkstruktur nach nur 10-tägiger Inkubation

Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung der Oberflächenstruktur eines Probestücks einer weiteren „flat pearl“, die allerdings nur 10 Tage zwischen dem Mantelepithel und der Innenseite der Schale einer anderen lebenden Meeresschnecke verblieben ist, mit dem AFM [4]. Während der Präparationsprozedur wurde eine 0,9 mM CaCO_3 -Lösung verwendet. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte in 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung mit einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde bei Verwendung einer Abtastrate von 0,398 Hz und einer Auflösung von 512 x 512 Pixel. Die abbildende Kraft wurde dabei je nach Wahl der Scanfläche variiert. Die **Abbildungen 37 und 38** zeigen für fünf verschiedene Scanflächen jeweils links die Höhsignale (Bilder mit Index 1) und rechts die Fehlersignale (Bilder mit Index 2). Die Oberflächenstruktur dieses Probestücks ist hier ebenfalls gezeigt, da auf dieser Probe nach der Strukturuntersuchung auch ein Wachstumsexperiment durchgeführt wurde. Die detaillierte Beschreibung dieses Wachstumsexperiments, bei dem die direkte Beobachtung des induzierten Kristallwachstums mit dem AFM gelang, findet sich in Abschnitt 5.2.2.

Vor dem Probeneinbau wurde hier mit der verwendeten AFM-Sonde ebenfalls eine „touch“-Kalibrierung¹⁸⁶ durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte auf dem Boden einer Petrischale, in der sich keine Probe, sondern nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befanden. Aus den dabei aufgenommenen Kraftkurven wurden eine Deflektionssensitivität von $(11,0 \pm 1,7) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und eine Federkonstante von $0,21 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ mittels AFM-Software ermittelt.

¹⁸⁶Die Kalibrierungsprozedur ist in Abschnitt 4.4.4 beschrieben.

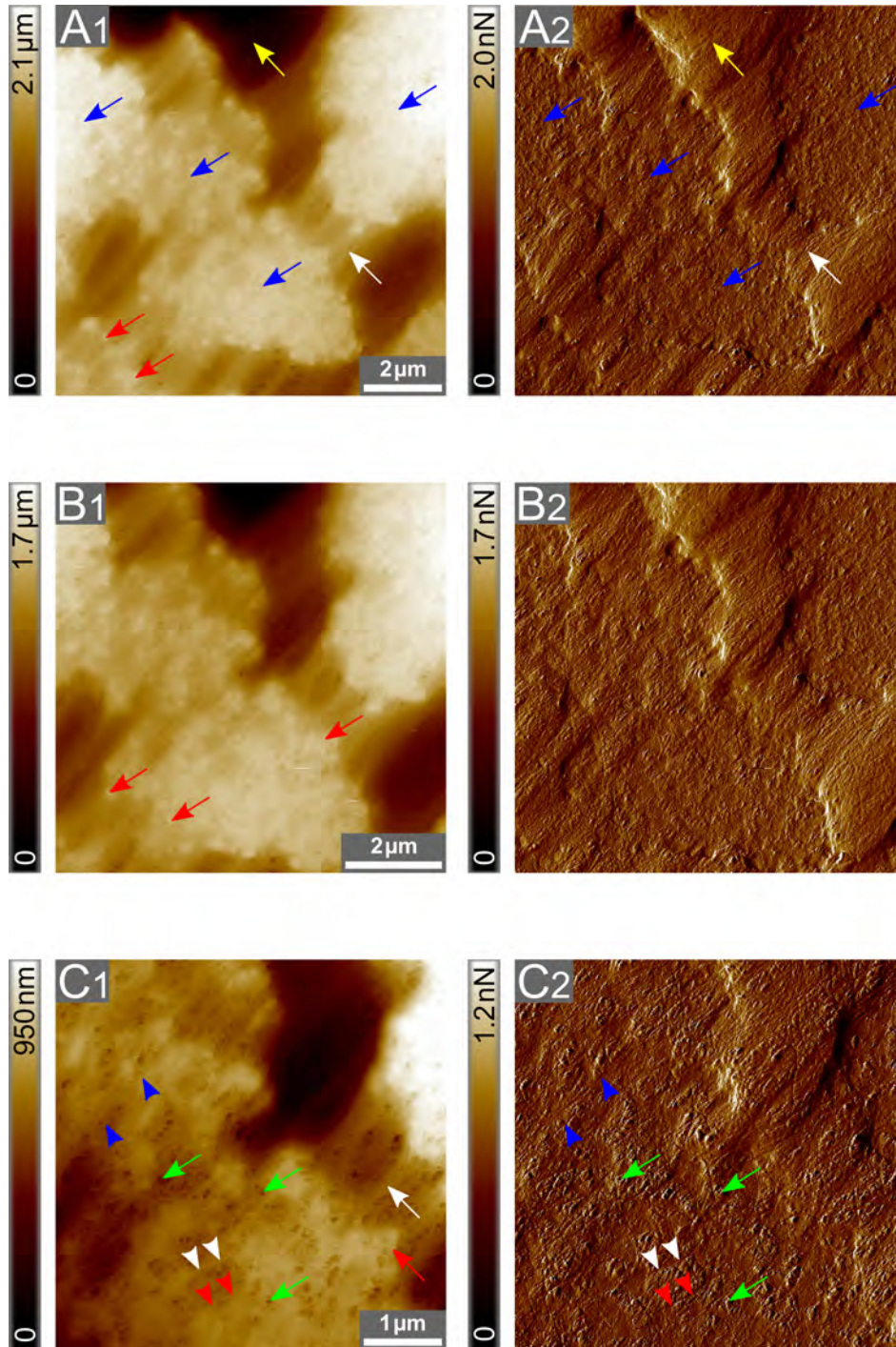


Abbildung 37: AFM-Aufnahmen der Oberfläche einer „flat pearl“, die nach nur 10-tägiger Inkubation zwischen dem Mantelepithel und der Schaleninnenseite entstanden ist, in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $10,0 \mu\text{m} \cdot 10,0 \mu\text{m}$, (B) $8,1 \mu\text{m} \cdot 8,1 \mu\text{m}$ und (C) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen die Höhsignale und Bilder mit Index 2 (rechts) die Fehlersignale. Die blauen Pfeile in (A) markieren vier inselartige Anordnungen, die vermutlich aus organischer Matrix und Mineral bestehen. Diese Inseln sind voneinander durch größere Zwischenräume getrennt (gelbe Pfeile in (A)), in denen sich teilweise organische Matrix befindet (weiße Pfeile in (A) und (C1)). In (C) ist die Netzwerkstruktur der organischen Matrix aus Filamenten (blaue, weiße und rote Dreiecke) und Poren (grüne Pfeile) deutlich sichtbar. An, unter und zwischen den Filamenten befinden sich bereits viele, zum Teil auch runde, Strukturen (rote Pfeile in (A1), (B1) und (C1)).

Die AFM-Aufnahmen in der **Abbildung 37** zeigen die Oberfläche der Wachstumsfront in den drei Scanflächen von $10,0\ \mu\text{m} \cdot 10,0\ \mu\text{m}$ bei den Bildern (A), von $8,1\ \mu\text{m} \cdot 8,1\ \mu\text{m}$ bei den Bildern (B) und von $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ bei den Bildern (C). Wie oben bereits beschrieben, wurde diese Wachstumsfront aus einer nach 10-tägiger Inkubation entstandenen „flat pearl“ gewonnen. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte mit einer Kraft von 800 pN bei den Bildern (A), von 600 pN bei den Bildern (B) und von 300 pN bei den Bildern (C).

In den Höhenbildern (A1), (B1) und (C1) ist die, hier eher inselartig angeordnete, organische Matrix sehr gut beobachtbar. Vermutlich befindet sich unterhalb dieser organischen Matrix bereits Mineral, das während des natürlichen Kristallwachstums entstanden ist. Zwischen den inselförmigen Anordnungen, die höchstwahrscheinlich aus organischer Matrix und Mineral bestehen, treten offensichtlich größere Lücken auf. Zur Veranschaulichung markieren die blauen Pfeile in den Bildern (A) beispielhaft vier solche inselartigen Anordnungen sowie die gelben und weißen Pfeile zwei der Zwischenräume dieser Inseln. In einem der Zwischenräume (gelbe Pfeile) existiert offenbar keine organische Matrix oder die organische Matrix ist bei der gewählten Höhenskala in den AFM-Bildern nicht sichtbar. Im Gegensatz dazu kennzeichnen die weißen Pfeile in den Bildern (A) und im Bild (C1) einen der Zwischenräume, in dem die organische Matrix gut erkennbar ist. Die Beobachtung der bereits vorher beschriebenen Netzwerkstruktur der organischen Matrix ist sowohl bei den inselartigen Anordnungen als auch zwischen den Inseln möglich. Besonders im Höhenbild (C1) sind die einzelnen miteinander verwobenen Filamente (blaue Dreiecke) und die unterschiedlich großen Poren (grüne Pfeile) sehr gut zu sehen [2, 4]. Die roten und weißen Dreiecke markieren dort den Verlauf von zwei zueinander parallel ausgerichteten Filamenten [4]. Zwischen, an und unter den einzelnen Filamenten befinden sich außerdem bereits viele, teilweise rund aussehende, natürlich entstandene Strukturen. Einige dieser Strukturen sind in den Höhenbildern (A1), (B1) und (C1) zur Verdeutlichung mit roten Pfeilen hervorgehoben. Bei diesen in den Bildern bei sehr genauem Betrachten gut zu erkennenden Strukturen handelt es sich vermutlich um kleine, aus Aragonit bestehende, natürlich gewachsene Kristalle, die während des Wachstumsexperiments als Nukleations- bzw. Kristallisationskeime für das induzierte Wachstum von Aragonit bzw. Calciumcarbonat dienen könnten [4]. Die globulär aussehenden Strukturen sind möglicherweise auch Proteinmoleküle, die unterschiedlich stark an den Chitinfilamenten gebunden sind [1, 2]. Solche Proteinmoleküle können auch als Nukleationskeime für das Wachstum wirken [1, 5]. In den gezeigten AFM-Aufnahmen (A) bis (C) ist allerdings nicht erkennbar, ob unterhalb der gut sichtbaren organischen Matrix bereits Mineral in Plättchenform gewachsen ist.

Die **Abbildung 38** zeigt weiter vergrößerte AFM-Aufnahmen des zuvor in der Abbildung 37 gezeigten Bruchstücks der „flat pearl“ mit den kleineren Scanflächen von $4,0\ \mu\text{m} \cdot$

4,0 μm bei den Bildern (D) und von 2,0 μm · 2,0 μm bei den Bildern (E), in denen insbesondere die Struktur der organischen Matrix noch besser zu sehen ist. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte mit einer Kraft von 400 pN bei den Bildern (D) und von 150 pN bei den Bildern (E).

Die einzelnen, netzwerkartig angeordneten Filamente verlaufen in mehreren Schichten über- und untereinander und die zwischen den Filamenten entstehenden Poren bzw. Löcher weisen unterschiedliche Durchmesser auf [1, 2]. Zur Veranschaulichung dieser Netzwerkstruktur markieren die blauen Dreiecke in den Bildern (E) den Verlauf von zwei einzelnen, nahezu senkrecht zueinander ausgerichteten, Filamenten und die grünen Pfeile in den Bildern (D) einige der Poren [4]. Wie im Höhenbild (E1) gut erkennbar ist, variieren auch die Durchmesser der einzelnen Filamente. Die Bestimmung der Durchmesser von 60 solchen Filamenten erfolgt in Abschnitt 5.1.2. Zusätzlich wurden im Höhenbild (E1) zwei verschieden große Poren mit einem gelben und einem grünen Dreieck hervorgehoben. Dabei kennzeichnet das gelbe Dreieck die größere der zwei Poren. Die Positionen dieser zwei Poren wurden im Bild (E2) ebenfalls mit gelben und grünen Dreiecken markiert. Wie zuvor erwähnt, hängt der Durchmesser der Poren von der Lage und dem Vernetzungsgrad der verschiedenen Filamente an den jeweiligen betrachteten Stellen in der organischen Matrix ab. Je weniger Filamente an einer Stelle vorhanden und dort miteinander verwoben sind, desto größer sind die Durchmesser der dort entstehenden Poren (z. B. gelbe Dreiecke). Bei dichter verlaufenden Filamenten bilden sich dementsprechend deutlich kleinere Poren aus (z. B. grüne Dreiecke). Solche kleineren Poren sind besonders im mittleren Bereich der Bilder (E) zu sehen. Wie von uns in [1, 2] gezeigt werden konnte, weisen die Poren bzw. Löcher in der interlamellaren organischen Matrix, die aus Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliothis laevigata* stammt, Durchmesser im Bereich von einigen zehn Nanometern bis zu 200 nm auf. Die roten Pfeile in den Höhenbildern (D1) und (E1) kennzeichnen auch die bereits in der vorangegangenen Abbildung 37 beobachteten Strukturen, die zwischen, an und unter den Filamenten auftreten und als Nukleations- bzw. Kristallisationskeime wirken könnten [4]. Diese Strukturen weisen ebenfalls unterschiedliche Größen auf.

Auch in diesen weiter vergrößerten AFM-Aufnahmen ist nicht erkennbar, ob sich unterhalb der organischen Matrix schon Mineral in Plättchenform befindet. Die später in Abschnitt 5.2.2.4 dargestellten REM-Aufnahmen derselben Probenoberfläche zeigen jedoch Mineral, das auf dem als Substrat verwendeten Deckglas inselartig gewachsen ist. Die Aufnahmen der REM-Bilder erfolgten allerdings erst nach der Durchführung des Wachstumsexperiments. Bei dem in den REM-Aufnahmen sichtbaren inselförmig entstandenen Mineral handelt es sich wahrscheinlich um natürlich gewachsene Calcitkristalle oder sphärolithische Aragonitkristalle [3, 180]. Der Vergleich zwischen den in Abbildungen 37

und 38 gezeigten AFM-Aufnahmen und den REM-Aufnahmen derselben Probenoberfläche (siehe Abb. 55 und 56) spricht dafür, dass sich unterhalb der organischen Matrix in den AFM-Bildern ebenfalls Mineral befindet, das inselförmig gewachsen ist.

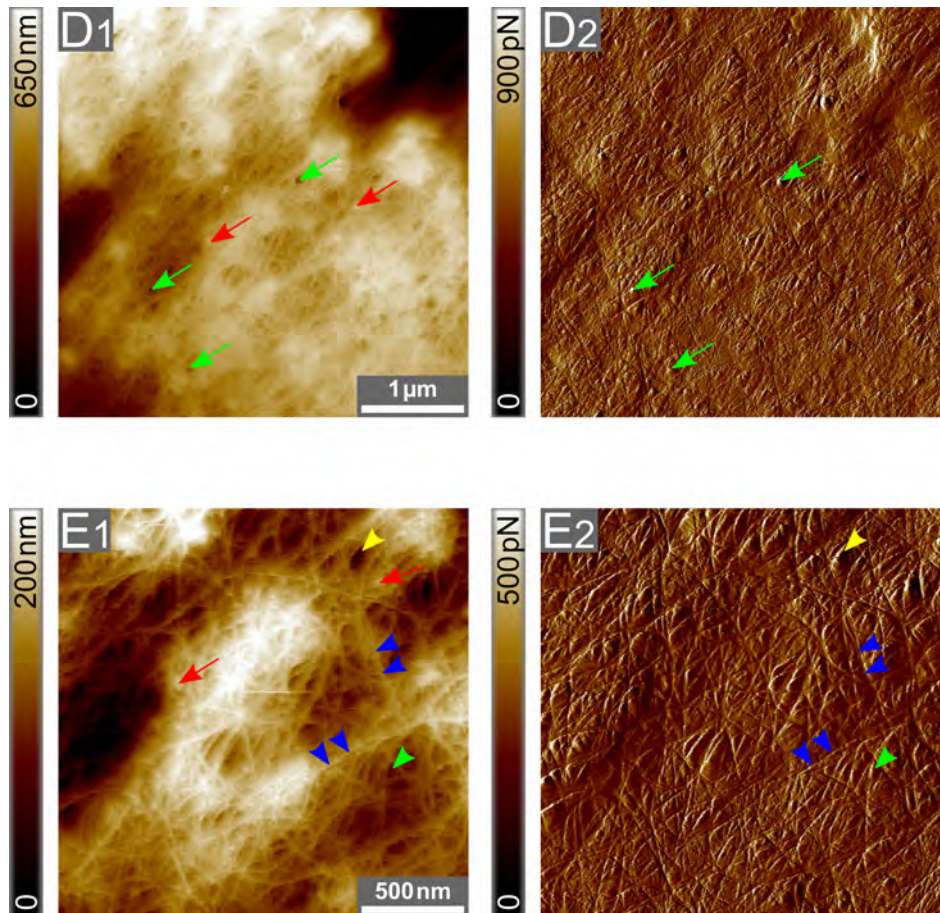


Abbildung 38: Weiter vergrößerte AFM-Aufnahmen der Oberfläche des bereits in Abb. 37 gezeigten Probestücks (Inkubation von 10 Tagen zwischen dem Mantelepithel und der Schaleninnenseite) in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (D) $4,0 \mu\text{m} \cdot 4,0 \mu\text{m}$ und (E) $2,0 \mu\text{m} \cdot 2,0 \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen die Höhengsignale und Bilder mit Index 2 (rechts) die Fehlersignale. In (D) sind bereits die einzelnen Filamente und Poren bzw. Löcher (grüne Pfeile) gut beobachtbar. Noch besser sind diese Filamente (blaue Dreiecke) und Poren (gelbe und grüne Dreiecke) in (E) sichtbar. Die Filamente, deren Durchmesser variieren, verlaufen dabei in mehreren Schichten über- und untereinander [4]. Die durch diese netzwerkartige Anordnung der Filamente hervorgerufenen Poren sind unterschiedlich groß [2]. Die roten Pfeile in (D1) und (E1) markieren einige der natürlich entstandenen Strukturen, die sich an, unter und zwischen den Filamenten befinden.

Zur besseren Sichtbarkeit einiger der in diesem Abschnitt 5.1.1 gezeigten Oberflächenstrukturen der drei „flat pearl“-Probestücke sind die dreidimensionalen Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen) der in Abbildungen 34 bis 38 dargestellten Höhengsignale zusätzlich

in den **Abbildungen 93 bis 96** im Anhang in Abschnitt 10.2 zu finden.

Die in allen gezeigten AFM-Aufnahmen der aus „flat pearls“ gewonnenen Wachstumsfronten beobachteten Poren bzw. Löcher in der organischen Matrix ermöglichen es, dass sich während des Aragonitwachstums Mineralbrücken ausbilden können und so die Kristallorientierung an das neu entstehende, darüberliegende Aragonitplättchen weitergegeben werden kann [4, 14]. Solche Mineralbrücken sind kristalline Verbindungen, die in vertikaler Richtung zwischen zwei direkt übereinanderliegenden Aragonitplättchen entstehen [5, 14]. In [18] konnte von Gries et al. mittels Elektronentomographie nachgewiesen werden, dass solche vertikalen, kristallinen Verbindungen, die einen Durchmesser von etwa 30 nm aufweisen, tatsächlich zwischen den übereinander angeordneten Aragonitplättchen vorhanden sind [4]. Darüber hinaus gestatten diese Poren bzw. Löcher ebenfalls die Diffusion der für die Kristallbildung benötigten Calciumionen (Ca^{2+} -Ionen) und Carbonationen (CO_3^{2-} -Ionen) sowie von organischen Bestandteilen [4, 5]. Wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, wurde z. B. von Weiss et al. in [73] gezeigt, dass die organische Matrix aus den Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis rufescens* aus Chitin besteht. Die organische Matrix, die von Meeresschnecken der Art *Haliotis tuberculata* stammt, ist offensichtlich ein hochorganisiertes aus Chitinfilamenten bzw. Chitinfasern und aus zwischen diesen Filamenten auftretenden Poren bzw. Löchern bestehendes Netzwerk [2, 4]. Zudem konnte von uns in [1] gezeigt werden, dass an den Chitinfilamenten der interlamellaren organischen Matrix aus Schneckenschalen der Art *Haliotis laevigata* zahlreiche globuläre Strukturen gebunden sind, bei denen es sich vermutlich um die angelagerten Proteine handelt [4].

5.1.2 Bestimmung der Filamentdurchmesser der organischen Matrix

Wie besonders gut in den AFM-Höhenbildern der Abbildung 38 erkennbar ist, unterscheiden sich die Durchmesser der einzelnen Filamente. Um eine quantitative Aussage über die auftretende Verteilung der Filamentdurchmesser zu erhalten, können jedoch aus den AFM-Aufnahmen nur die Höhen einzelner Filamente genau ausgemessen werden. Betrachtet man den Querschnitt eines solchen einzeln verlaufenden Filaments als exakt rund, so entspricht die ausgemessene Höhe gerade dem Filamentdurchmesser.

Wie in Abschnitt 4.4 bereits erwähnt, besitzt die Spitze einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde einen nominalen Radius von einem Nanometer¹⁸⁷ [122]. Die Breite bzw. die laterale Ausdehnung der verschiedenen Filamente in den AFM-Aufnahmen liegt offensichtlich im Bereich von wenigen Nanometern bis zu einigen zehn Nanometern. Die Geometrie und die endlichen Abmessungen¹⁸⁸ der Spitze der verwendeten AFM-Sonde füh-

¹⁸⁷Der Radius der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde kann bis zu zwei Nanometer betragen [122].

¹⁸⁸Radius, Höhe und Öffnungswinkel

ren zu einer Verbreiterung der lateralen Ausdehnung (Breite) der abgebildeten Filamente [181, 182]. Aufgrund dieses Verbreiterungseffektes können daher keine genauen Aussagen über die Breiten bzw. Durchmesser der Filamente aus den AFM-Aufnahmen erhalten werden [183, 184]. Allerdings lassen sich aus den AFM-Höhenbildern sehr gut Höhen bzw. Höhendifferenzen ausmessen.

Zur Vermessung der Höhendifferenzen können nur solche Stellen verwendet werden, an denen zwei Filamente übereinander verlaufen (siehe schematische Zeichnung in der **Abbildung 39**). Die Ermittlung der Höhendifferenz zwischen dem oberen Filament und einem Referenzpunkt oder Referenzniveau kann nur an diesen Stellen erfolgen, da nicht bekannt ist, welche Tiefen die Löcher bzw. Poren zwischen den verschiedenen Filamenten tatsächlich aufweisen. In Abhängigkeit der Tiefen dieser Löcher berührt die abbildende Spitze nicht notwendigerweise den Boden der Löcher, womit diese Löcher weniger tief erscheinen [125, 185]. Als Referenzpunkt bzw. Referenzniveau dient das unter dem oberen Filament angeordnete zweite Filament. Um nun die Höhe des oberen Filaments zu vermessen, wurde mit Hilfe der Auswertungssoftware ein Höhenprofil, das exakt entlang des unteren Filaments verläuft, in den jeweiligen Höhenbildern ermittelt. Das Ausmessen der Filamenthöhen erfolgte ebenfalls mit dem Auswertungsprogramm NanoScope Analysis 1.8¹⁸⁹.

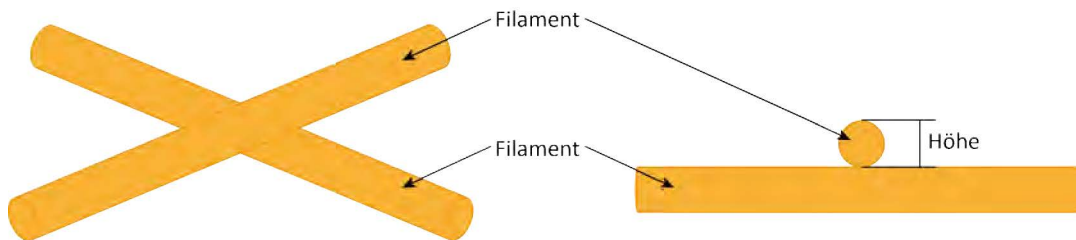


Abbildung 39: Schematische Zeichnung zur Demonstration der Höhenvermessung einzelner Filamente. Dabei kann die Höhe nur bei solchen Filamenten ermittelt werden, die genau über einem anderen Filament verlaufen.

In der **Abbildung 40** wird die Vermessung der Höhe eines einzelnen Filaments detailliert gezeigt. Dabei fand die Höhenausmessung analog zu der in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Bestimmung der Aragonitplättchenhöhen statt. Das Bild (A) zeigt ein AFM-Höhenbild aus der Abbildung 38, in dem die Filamente sehr deutlich erkennbar sind. Ein Höhenprofil, das genau entlang der blauen Linie im Bild (A) verläuft, findet sich im Bild (B). Zur besseren Sichtbarkeit ist diese blaue Linie mit einem weißen Pfeil hervorgehoben. Die drei roten, vertikalen Linien im Bild (B) zeigen beispielhaft die Positionen der Marker, die zur Ermittlung der Höhendifferenzen Verwendung fanden. Dabei wurde einer der Marker

¹⁸⁹Bruker; Billerica, MA, USA

stets auf dem höchsten Punkt des oberen Filaments platziert. Das Ausmessen der Filamenthöhe konnte nun mit zwei Methoden erfolgen. Bei der ersten Methode wurde, wie im Bild (B) gezeigt ist, zunächst die Differenz Δh_1 zwischen dem Höhenwert am höchsten Punkt des oberen Filaments (mittlere Markerposition (2) mit $h_{\text{Mitte}} = (25,3 \pm 0,5)$ nm) und der Höhe des unteren Filaments an der Markerposition auf der linken Seite (Markerposition (1) mit $h_{\text{links}} = (12,6 \pm 0,5)$ nm) ermittelt. Anschließend fand die Berechnung der Höhendifferenz Δh_2 zwischen den zwei Markerpositionen statt. Dafür wurde diesmal der zweite Marker auf dem unteren Filament auf der im Höhenprofil liegenden rechten Seite (Markerposition (3) mit $h_{\text{rechts}} = (11,4 \pm 0,5)$ nm) platziert. Die einzelnen Höhenwerte konnten dabei jeweils mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5$ nm aus dem Höhenprofil abgelesen werden. Damit ergaben sich hier die Höhendifferenzen $\Delta h_1 = (12,7 \pm 1,0)$ nm und $\Delta h_2 = (13,9 \pm 1,0)$ nm. Danach erfolgte die Berechnung des Mittelwerts der beiden zuvor ermittelten Höhendifferenzen. Damit erhielt man nun nach der ersten Methode eine Höhe von $\Delta h = (13,3 \pm 0,6)$ nm für das betrachtete Filament. Beim zweiten Verfahren wurde direkt eine „Nulllinie“ (schwarze Linie im Bild (B)) durch die Ausläufer des gemessenen Höhenprofils gelegt und die Differenz zwischen dem höchsten Punkt des oberen Filaments und dieser „Nulllinie“ an der mittleren Markerposition bestimmt. Der Höhenwert der „Nulllinie“ an der mittleren Markerposition betrug dabei $h_N = (12,0 \pm 0,5)$ nm. Bei dieser Methode ergab sich eine Höhe von $\Delta h = (13,3 \pm 1,0)$ nm für das untersuchte Filament. Wird der Filamentquerschnitt nun als exakt rund angenommen, so beträgt der Durchmesser dieses Filaments dementsprechend etwa 13,3 nm.

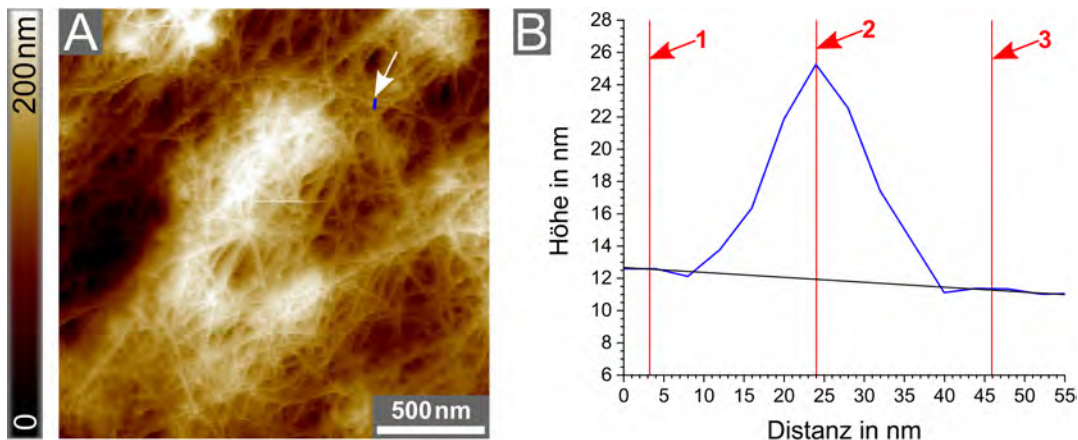


Abbildung 40: Vermessung der Höhe eines einzelnen Filaments. In (A) ist eines der AFM-Höhenbilder aus Abb. 38 dargestellt. (B) zeigt das Höhenprofil, das entlang der in (A) blau hervorgehobenen Linie verläuft. Der weiße Pfeil in (A) markiert zusätzlich, zur besseren Sichtbarkeit, die blaue Linie. In (B) sind die Markerpositionen (rote, vertikale Linien) und die „Nulllinie“ (schwarze Linie) zur Ermittlung der Filamenthöhe eingezeichnet.

Aus allen bei der Strukturuntersuchung dieses Probetsücks aufgenommenen AFM-Bildern wurden die Höhen von insgesamt 60 einzeln verlaufenden Filamenten gemäß dem oben geschilderten Verfahren ausgemessen. Die **Abbildung 41** zeigt das Histogramm, d. h. die Anzahl der Filamente in den entsprechenden 1 nm breiten Höhenintervallen. Die Vermessung der Höhe gelang nur bei 60 verschiedenen Filamenten, da es sich als schwierig erwies, geeignete Stellen in den Höhenbildern zu finden. Bei den AFM-Aufnahmen mit größeren Scanflächen als $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ konnten die Filamenthöhen nicht bestimmt werden, da die Auflösung dieser aufgenommenen Bilder dafür nicht ausreichte. Die ausgemessene Höhe entspricht bei Annahme eines runden Filamentquerschnitts dem Durchmesser des Filaments. Es treten also Filamente mit Durchmessern zwischen 3 nm und 18 nm in der organischen Matrix der hier untersuchten Wachstumsfront auf. Dabei sind am häufigsten Filamente mit Durchmessern im Bereich von 5 nm bis 13 nm anzutreffen, wobei Filamentdurchmesser zwischen 6 nm und 7 nm sowie zwischen 9 nm und 10 nm in der Messung sehr stark vertreten sind.

Möglicherweise ergaben sich bei der Vermessung keine größeren Filamentdurchmesser als 18 nm, da die Ermittlung der Höhe nur bei solchen Filamenten erfolgen konnte, die einzeln und genau über einem anderen Filament verlaufen. Chitin ist ein Polysaccharid, das aus langen, linearen Polymerketten besteht, die in der Natur je nach Acetylierungsgrad aus β -(1,4)-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin-Monomeren und Glucosamin-Monomeren gebildet werden [186, 187]. Je nach Anordnung und Orientierung¹⁹⁰ dieser linearen Polymerketten zueinander unterscheidet man α -, β - und γ -Chitin [188, 189]. Die Ausdehnung der Monomermoleküle, die Anordnung der linearen Polymerketten und die vorhandenen Restgruppen sowie deren Anordnung bestimmen den minimal möglichen Durchmesser eines Chitinfilaments.

Beim Strukturaufbau der Cuticula¹⁹¹ von Gliederfüßern (Arthropoda) wird allgemein angenommen, dass 18 bis 25 solcher Polymerketten, die sich jeweils antiparallel anordnen, dünne α -Chitinnanofasern bilden [191]. Diese Nanofasern weisen jeweils einen Durchmesser von etwa 3 nm und eine Länge von etwa 300 nm auf [190, 191]. Mehrere dünne Nanofasern, die zusätzlich von Proteinen umhüllt sind, bilden zusammen wiederum Chitin-Protein-Fasern mit einem deutlich größeren Durchmesser von etwa 20 nm [190]. So gelang es, z. B. 3 nm dicke Nanofasern aus α -Chitin im Exoskelett der Krabbenart *Carcinus maenas* nachzuweisen [192]. Im Vergleich dazu konnten z. B. Falini et al. in [79] anhand von Röntgenbeugungsuntersuchungen zeigen, dass die organische Matrix, die aus dem Gladius¹⁹² des Kalmars *Loligo sanpaulensis* gewonnen wurde, aus β -Chitin aufgebaut ist. Dieser

¹⁹⁰parallel und/oder antiparallel

¹⁹¹Die Cuticula bildet dabei das Exoskelett (Außenskelett) [190].

¹⁹²englisch: pen

Kalmar gehört ebenfalls wie die Meeresschnecken (Gastropoda) zum Stamm der Weichtiere (Mollusca), ist aber nach der biologischen Klasseneinteilung ein Kopffüßer (Cephalopoda) [193]. Weitere Untersuchungen der organischen Matrix aus Schalen von unterschiedlichen Mollusken in [81, 91, 194] legen die Vermutung nahe, dass auch die organische Matrix, die aus Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis tuberculata* stammt, aus β -Chitin besteht. Allerdings gibt es dazu bisher keine genaueren Untersuchungen.

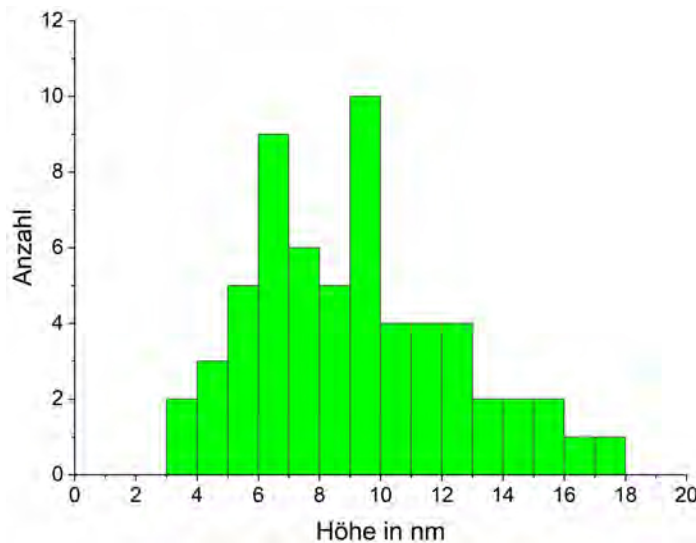


Abbildung 41: Histogramm der ausgemessenen Höhen, die dem Filamentdurchmesser entsprechen, für 60 Filamente. Dabei ist die Anzahl bzw. Häufigkeit der auftretenden Höhen in 1 nm breiten Intervallen dargestellt.

In meinen AFM-Untersuchungen treten offenbar aus Chitin bestehende Nanofilamente bzw. Nanofasern mit einem Durchmesser von etwa 3 nm bis 6 nm auf, die sich wiederum mit weiteren Chitinfasern zu größeren Faseraggregaten mit Durchmessern im Bereich von 6 nm bis 18 nm zusammenlagern können. Außerdem sind an diesen Filamenten in der organischen Matrix, wie von uns in [1, 2] für die interlamellare Matrix aus Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis laevigata* gezeigt wurde, zahlreiche Proteinmoleküle gebunden.

5.1.3 Vergleichsuntersuchung zur Eignung der beiden AFM-Sondenarten

Wie bisher gezeigt, konnte die Oberflächenstruktur der Wachstumsfronten aus „flat pearls“ mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden sehr gut aufgelöst abgebildet werden. Dabei gelang die Beobachtung der Struktur der „stacks of coins“ aus einzelnen übereinanderliegenden Aragonitplättchen und organischer Matrix sowie der Netzwerkstruktur der organischen Matrix mit den einzelnen Filamenten und Poren bzw. Löchern.

Da bei den später durchgeführten Wachstumsexperimenten auch die ScanAsyst-Air AFM-Sonden Verwendung fanden sollten, wurden diese AFM-Sonden ebenfalls für die Untersuchung der Oberflächenstruktur der Wachstumsfronten getestet.

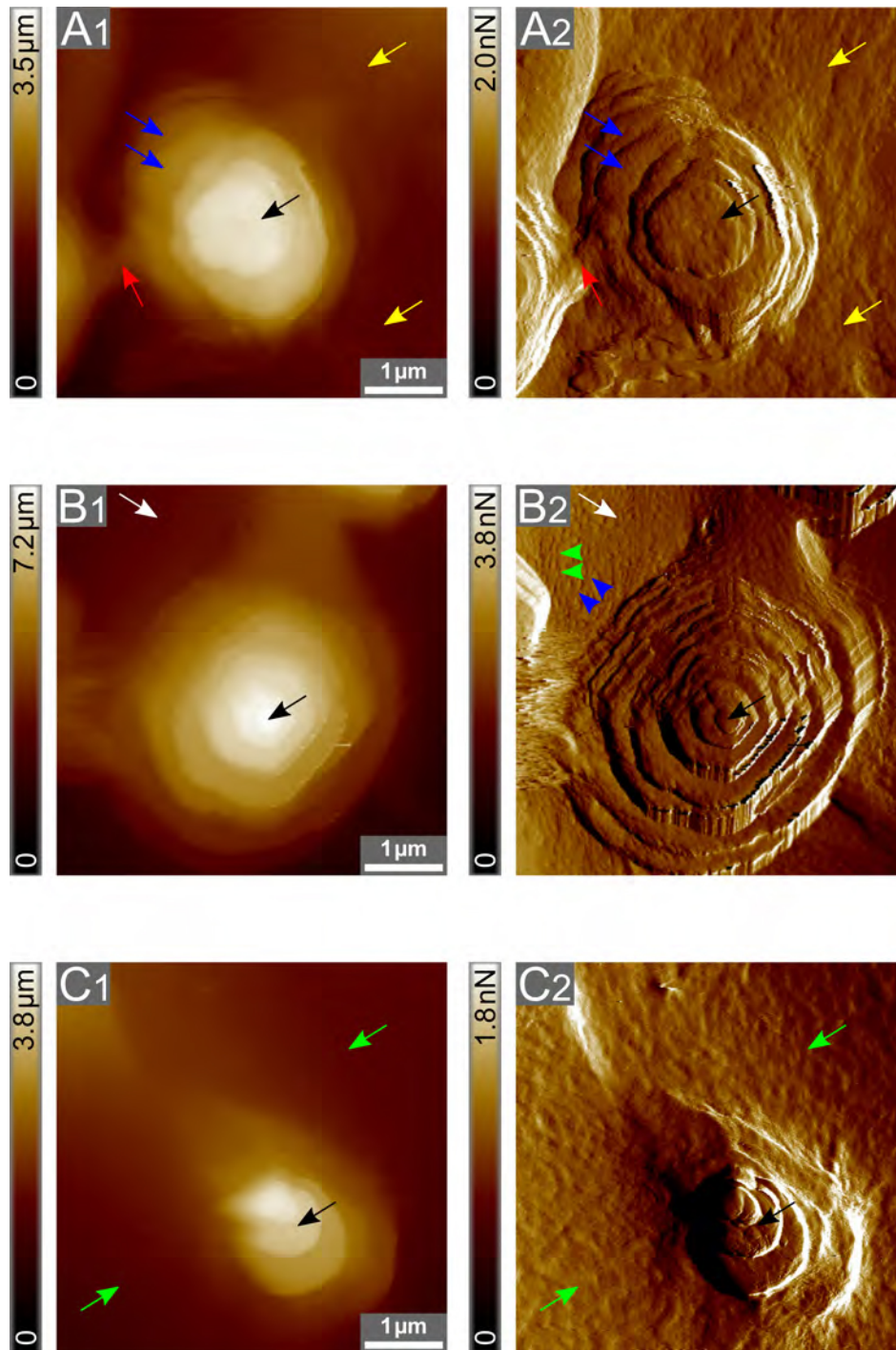


Abbildung 42: AFM-Aufnahmen der Oberfläche drei verschiedener Probestücke von Wachstumsfronten aufgenommen mit ScanAsyst-Air AFM-Sonden jeweils in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Die Probestücke wurden aus nach 14-tägiger Inkubation entstandenen „flat pearls“ gewonnen. Scanflächen: (A), (B) und (C) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$. Die linken Bilder (Index 1) zeigen die Höhengsignale und die rechten Bilder (Index 2) die entsprechenden Fehlersignale. Jeweils ein „stack of coins“ (schwarze Pfeile) und die einzelnen Aragonitplättchen sind sichtbar. Die Struktur der organischen Matrix auf den Aragonitplättchen (blaue Pfeile in (A)) und zwischen den „stacks of coins“ (rote, gelbe, weiße und grüne Pfeile) ist in den Höhenbildern nicht erkennbar. Die netzwerkartige Struktur der organischen Matrix aus einzelnen Filamenten (blaue und grüne Dreiecke in (B2)) und Poren bzw. Löchern ist nur teilweise in (A2), (B2) und (C2) beobachtbar.

Die **Abbildung 42** zeigt die mit dem AFM aufgenommenen Oberflächen der Wachstumsfronten von drei verschiedenen „flat pearl“-Probestücken mit der Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ bei den Bildern (A), (B) und (C). Dabei stellen die Bilder mit dem Index 1 die Höhengsignale und die Bilder mit dem Index 2 die entsprechenden Fehlersignale dar. Die Präparationen aller Probestücke fanden ebenfalls analog zu den in Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Verfahren statt. Die Inkubation der „flat pearls“, aus denen diese Probestücke gewonnen wurden, erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen zwischen dem Mantelepithel und der Schaleninnenseite verschiedener lebender Meeresschnecken [4]. Für die Benetzung der Probenoberfläche während der Präparationsprozedur kam jeweils eine $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung zum Einsatz. Nach Abbinden des Zweikomponentenklebers, mit dem die Fixierung der Probestücke in den Petrischalen erfolgte, wurden jeweils $3\ \text{ml}$ der $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung in die Petrischalen hinzugefügt. Nach der Probenpräparation fand zunächst jeweils die Kalibrierung der für die Untersuchung verwendeten ScanAsyst-Air AFM-Sonde gemäß den in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen Verfahren statt.

Vor der Probenuntersuchung der in den Bildern (A) gezeigten Wachstumsfront erfolgte für die genutzte AFM-Sonde eine „touch“-Kalibrierung. Bei dieser Kalibrierung ergaben sich eine Federkonstante von $0,43\ \frac{\text{N}}{\text{m}}$ für den Cantilever und eine Deflektionssensitivität¹⁹³ von $(25,3 \pm 0,4)\ \frac{\text{nm}}{\text{V}}$. Die Aufnahme der Bilder (A) erfolgte mit einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von $0,300\ \text{Hz}$ und einer abbildenden Kraft von $801\ \text{pN}$. Vor den Untersuchungen der Probestücke, deren Oberflächenstrukturen in den Bildern (B) und (C) gezeigt sind, wurden die jeweiligen, zum Abbilden der Probenoberflächen verwendeten AFM-Sonden ebenfalls nach der „touch“-Methode kalibriert. Dabei ergaben sich jeweils sehr ähnliche Werte für die Deflektionssensitivität und die Federkonstante. Das Abbilden der Probenoberfläche bei den Bildern (B) erfolgte mit einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von $0,300\ \text{Hz}$ und einer Kraft von $1100\ \text{pN}$. Die Bilder (C) wurden mit einer Auflösung von 512×512 Pixel, einer Abtastrate von $0,398\ \text{Hz}$ und einer abbildenden Kraft von $1000\ \text{pN}$ aufgenommen. Die dreidimensionalen Rekonstruktionen der in **Abbildung 42** dargestellten Höhengsignale sind in der **Abbildung 97** im Anhang in Abschnitt 10.2 gezeigt.

In allen Bildern (A) bis (C) sind jeweils ein „stack of coins“ (schwarze Pfeile) und die einzelnen Aragonitplättchen mit nach oben abnehmenden lateralen Ausdehnungen erkennbar [4]. Die meisten, besonders die unteren, Aragonitplättchen des „stack of coins“ in den Bildern (A) scheinen mit organischer Matrix bedeckt zu sein. Die blauen Pfeile kennzeichnen dort zwei der unteren Aragonitplättchen dieses „stack of coins“, der auch

¹⁹³Die nominale Deflektionssensitivität der ScanAsyst-Air AFM-Sonden beträgt $30,0\ \frac{\text{nm}}{\text{V}}$. Es können keine Informationen über die minimal und maximal mögliche Deflektionssensitivität angegeben werden.

von organischer Matrix (gelbe Pfeile) umgeben ist. Zur besseren Sichtbarkeit markieren die roten Pfeile die organische Matrix zwischen diesem „stack of coins“ und dem nur teilweise am linken Bildrand sichtbaren zweiten „stack of coins“. Die Beobachtung der vorher beschriebenen Netzwerkstruktur der organischen Matrix ist im Höhenbild (A1) weder auf den einzelnen Aragonitplättchen noch zwischen den „stacks of coins“ möglich. Im Bild (A2) ist die netzwerkartige Filamentstruktur der organischen Matrix auch nur ansatzweise erkennbar. Der „stack of coins“ in den Bildern (B) besteht aus einer größeren Anzahl von übereinanderliegenden Aragonitplättchen als die anderen beiden abgebildeten „stacks of coins“. Neben diesem „stack of coins“ sind im linken Bereich des Bildes (B2) die einzelnen miteinander verwobenen Filamente (z.B. blaue und grüne Dreiecke) und die zwischen diesen Filamenten auftretenden Poren bzw. Löcher sichtbar [4]. Die weißen Pfeile in den Bildern (B) markieren diesen Bereich der organischen Matrix. Auch bei höherer Auflösung von 512x512 Pixel sowie bei etwa gleicher abbildender Kraft und Abtastrate verglichen mit den Bildern (B) ist die Struktur der organischen Matrix in den Bildern (C) nicht besser erkennbar (grüne Pfeile). Möglicherweise konnten die Oberflächenstrukturen der in den Bildern (A) bis (C) gezeigten Wachstumsfronten mit den ScanAsyst-Air AFM-Sonden nicht besser aufgelöst abgebildet werden, da es nicht möglich war, die jeweils zum Abbilden der Probenoberflächen notwendige Kraft weiter zu reduzieren.

Insgesamt gelang es, mit den ScanAsyst-Air AFM-Sonden zwar die einzelnen Aragonitplättchen der „stacks of coins“ aufzunehmen, jedoch erwies es sich als äußerst schwierig, die Netzwerkstruktur der weichen organischen Matrix abzubilden. Jedoch konnten die obersten Aragonitplättchen recht gut abgebildet werden. Die Beobachtung des Wachstums von Calciumcarbonatkristallen ist demnach bei Verwendung der ScanAsyst-Air AFM-Sonden nur direkt auf den obersten Aragonitplättchen möglich. Daher wurden diese AFM-Sonden auch bei den Wachstumsexperimenten genutzt.

5.2 Direkte Beobachtung des induzierten Wachstums auf „flat pearl“-Oberflächen

Nach der Charakterisierung der Oberflächenstruktur der Wachstumsfronten, die im vorherigen Abschnitt 5.1 ausführlich beschrieben ist, erfolgte die Durchführung von mehreren Wachstumsexperimenten auf dieser Art von Oberfläche. Dabei fanden zum Abbilden der Probenoberflächen sowohl PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden als auch ScanAsyst-Air¹⁹⁴ AFM-Sonden Verwendung. Obwohl mit den ScanAsyst-Air AFM-Sonden keine gut aufgelöste Abbildung der Oberflächenstruktur der Wachstumsfronten gelang, wurden diese

¹⁹⁴Spezifikationen beider AFM-Sondenarten siehe Anhang (Abschnitt 10.1)

AFM-Sonden auch für die direkte Beobachtung des Kristallwachstums getestet. Allerdings konnte bei Verwendung der ScanAsyst-Air AFM-Sonden kein Wachstum von Calciumcarbonatkristallen auf den „flat pearl“-Probestücken beobachtet werden.

Im Folgenden finden sich daher nur die detaillierten Beschreibungen der Durchführung und der Ergebnisse von zwei Wachstumsexperimenten, bei denen die Probenoberflächen mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden abgebildet wurden. Dabei gelang es auch, das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen direkt mit dem AFM zu beobachten und aufzunehmen.

5.2.1 Erstes Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche

5.2.1.1 Aufnahme der AFM-Bildsequenz

Dieses Wachstumsexperiment wurde auf einem Probestück der Wachstumsfront einer „flat pearl“, das eine Größe von etwa $4\text{ mm} \cdot 4\text{ mm}$ aufwies, durchgeführt. Dafür verblieb die verwendete „flat pearl“ bis zur Entnahme 14 Tage im extrapallialen Raum zwischen dem Mantelepithel und der Schaleninnenseite [4]. Die Vorbereitung des Probestücks erfolgte analog zu der Präparationsprozedur für die Strukturuntersuchungen. Dazu wurde die „flat pearl“ in mehrere kleinere Bruchstücke zerlegt, das letztendlich ausgewählte Probestück mittels Zweikomponentenkleber in einer Petrischale fixiert, die Probe nach dem Aufkleben mit einer 1 mM CaCO_3 -Lösung benetzt und anschließend, nach dem Abbinden des Zweikomponentenklebers, ein Volumen von 3 ml derselben 1 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale pipettiert [4]. Vor der Probenuntersuchung fand die Kalibrierung der verwendeten AFM-Sonde gemäß der in Abschnitt 4.4.4 geschilderten „no touch“-Methode statt. Diese Kalibrierung erfolgte in einer zweiten Petrischale ohne Probestück und mit 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung. Wie bereits bei den Strukturuntersuchungen beschrieben, wurde nach dem Einbau der präparierten Probe ins AFM zunächst ein geeigneter Probenbereich ausgewählt.

Sobald das Abbilden des ausgewählten Probenbereichs, auf dem die Beobachtung der Nukleation und des Wachstums von Calciumcarbonat stattfinden sollte, stabil über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten gelang, wurde die kontinuierliche Aufnahme der Bilder für das Wachstumsexperiment gestartet. Da es hier bei größeren Scanflächen als $5,0\text{ }\mu\text{m} \cdot 5,0\text{ }\mu\text{m}$ kaum möglich war, die abbildende Kraft stabil über einen längeren Zeitraum einzustellen, fand die Aufnahme der Bilder mit dieser maximal möglichen Scanfläche von $5,0\text{ }\mu\text{m} \cdot 5,0\text{ }\mu\text{m}$ statt. Zusätzlich wurde wieder darauf geachtet, die Probenoberfläche mit möglichst minimaler Kraft abzurastern, um insbesondere die organische Matrix nur wenig zu beschädigen.

Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte mit einer PeakForce-HiRs-F-A¹⁹⁵ AFM-Sonde bei Verwendung einer Abtastrate von 0,400 Hz, einer Auflösung von 256 x 256 Pixel und einer Kraft von 250 pN. Mit den gewählten Einstellungen dauerte die Aufnahme eines Bildes etwa 11 Minuten. Während des gesamten Wachstumsexperiments wurden daher prinzipiell alle 11 Minuten Bilder über einen Gesamtzeitraum von 572 Minuten aufgenommen.

Die **Abbildung 43** zeigt ausgewählte Bilder aus der aufgezeichneten AFM-Bildsequenz der Wachstumsfront einer, nach 14-tägiger Inkubation aus dem extrapallialen Raum entnommenen, „flat pearl“. Dort sind die Höhenbilder (Index 1) jeweils oben und die Fehler-signalbilder (Index 2) jeweils unten dargestellt. Im Folgenden bezeichnet die Angabe „die Bilder (z. B. A)“ wie bereits zuvor immer das Höhenbild (A1) und das Fehlersignalbild (A2). Die einzelnen Bilder (A) bis (H) zeigen denselben Bereich der Probenoberfläche mit einer Scanfläche von $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ über einen Zeitraum von 491 Minuten, jedoch zu verschiedenen Zeitpunkten. Die zeitlichen Abstände zwischen diesen ausgewählten gezeigten Bildern sind dabei nicht gleich und im Weiteren detailliert beschrieben.

Während dieses Wachstumsexperiments wurde insgesamt dreimal ein definiertes Volumen (0,75 ml oder 1 ml) der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale gegen das gleiche Volumen einer höher übersättigten 2 mM CaCO_3 -Lösung ausgetauscht, um das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen auf der Probenoberfläche des „flat pearl“-Bruchstücks zu initiieren [4]. Das Ansetzen aller CaCO_3 -Lösungen erfolgte immer im Chemielabor bei einer nahezu konstanten Umgebungstemperatur von etwa 24 °C, wohingegen die Durchführung der AFM-Experimente im AFM-Raum meistens bei einer deutlich anderen¹⁹⁶ Umgebungstemperatur stattfand. Daher musste die hergestellte 2 mM CaCO_3 -Lösung nach dem Ansetzen zunächst für etwa 30 Minuten unter die Abdeckung direkt neben das AFM gestellt werden, damit eine Anpassung der Temperatur der übersättigten 2 mM CaCO_3 -Lösung an die Temperatur der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale stattfinden konnte. Das Austauschen der CaCO_3 -Lösungen während des Wachstumsexperiments erfolgte gemäß der in Abschnitt 4.4.5 beschriebenen Prozedur mit Hilfe einer Pipette und eines Silikonschlauchs. Dazu musste der Silikonschlauch vor dem Experiment entsprechend der in Abschnitt 4.4.5 geschilderten Reinigungsprozedur sorgfältig gesäubert werden, um kristalline Rückstände aus zuvor durchgeführten AFM-Untersuchungen sicher zu entfernen [4].

¹⁹⁵Die nominale Deflektionssensitivität der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden beträgt $9,0\ \frac{\text{nm}}{\text{V}}$.

¹⁹⁶vor allem in den Sommermonaten

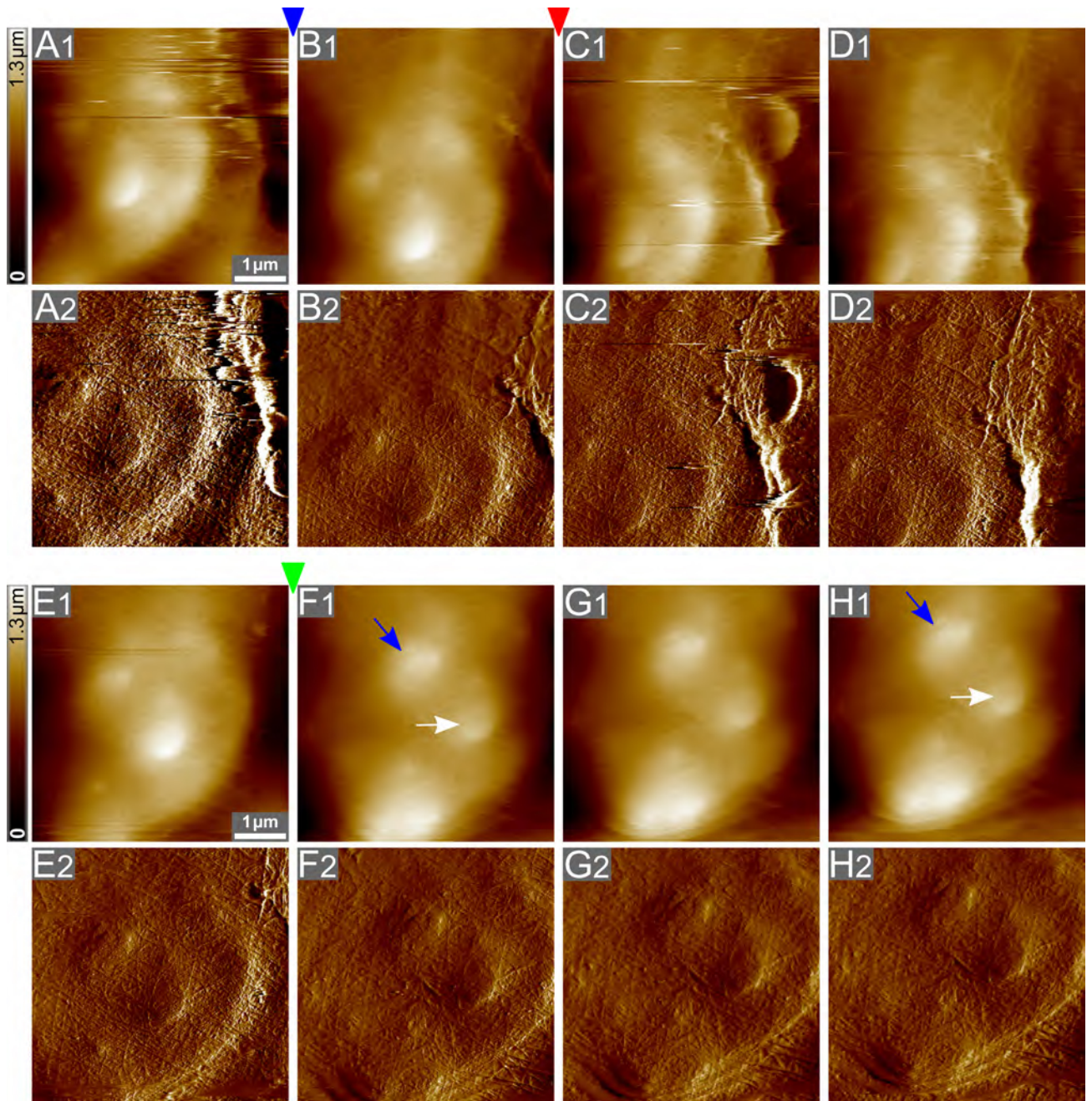


Abbildung 43: Erstes Wachstumsexperiment: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz desselben Probenbereichs eines „flat pearl“-Bruchstücks mit der Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ über einen Zeitraum von 491 Minuten. Bilder mit Index 1 (jeweils oben) zeigen die Höhsignale und Bilder mit Index 2 (jeweils unten) die Fehler-signale. Bei (A) befand sich die Probe in 3 ml einer 1 mM CaCO_3 -Lösung. Das blaue, rote und grüne Dreieck markieren jeweils den Austausch der CaCO_3 -Lösungen. Beim blauen Dreieck wurden 0,75 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und das gleiche Volumen einer 2 mM CaCO_3 -Lösung eingespült. Weiterhin erfolgte zweimal (rotes und grünes Dreieck) das Einspülen von jeweils 1 ml einer 2 mM CaCO_3 -Lösung. Damit ergaben sich folgende Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale: (A) 1 mM, (B) 1,25 mM, (C) bis (E) 1,5 mM und (F) bis (H) 1,7 mM. Die Zeitspannen zwischen den Bildern betragen: (A) bis (B) 119 min, (B) bis (C) 30 min, (C) bis (D) 74 min, (D) bis (E) 119 min, (E) bis (F) 39 min, (F) bis (G) und (G) bis (H) jeweils 55 min.

Im Folgenden findet sich als Beispiel die genaue Beschreibung der gesamten Austauschprozedur für dieses Wachstumsexperiment, bei dem die Lösungsaustausche nicht direkt während des Abbildens der Probenoberfläche durchgeführt wurden. Beim ersten Austausch erfolgte zuerst die Entnahme von 0,75 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale. Dafür wurde das Abrastern der Probenoberfläche gestoppt und die Spitze etwa 100 μm bis 200 μm von der Probenoberfläche mittels AFM-Software weggefahren sowie anschließend die CaCO_3 -Lösung vorsichtig mittels Pipette und Silikonschlauch aus der Petrischale entnommen. Danach fanden zwei Spülvorgänge des Silikonschlauchs mit der 2 mM CaCO_3 -Lösung statt (jeweils zweimal 1 ml). Nach dem Spülen erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens (0,75 ml) der übersättigten 2 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale. Um eine bessere Durchmischung der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale zu gewährleisten, wurde nach dem Einfüllen der 2 mM CaCO_3 -Lösung zusätzlich zweimal jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale vorsichtig herausgesogen und direkt wieder eingespült. Bei dieser Austauschprozedur durften erstens keine Luftblasen in der CaCO_3 -Lösung, die sich in der Petrischale befand, entstehen. Diese Luftblasen hätten sonst nämlich unter den Cantilever gelangen können und so ein weiteres Abbilden der Probenoberfläche verhindert [4]. Zweitens durfte sich der abgebildete Probenbereich beim Lösungsaustausch nicht merklich verschieben, da für die Beobachtung des Kristallwachstums derselbe Probenbereich über einen längeren Zeitraum (mehrere Stunden) aufgenommen werden musste. Nach dem Austausch erfolgten das Wiederannähern der Spitze an die Probenoberfläche und das erneute Starten des Abrasterns mittels AFM-Software. Bedingt durch das Wegfahren und das Wiederannähern der Spitze hat sich nach dem Austausch der CaCO_3 -Lösungen der abgebildete Oberflächenbereich etwas verschoben. Beim zweiten und dritten Lösungsaustausch wurden jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entnommen und 1 ml der 2 mM CaCO_3 -Lösung eingespült. Die drei verschiedenfarbigen Dreiecke (blaues, rotes und grünes Dreieck) in der Abbildung 43 kennzeichnen jeweils den Austausch der CaCO_3 -Lösungen während des Wachstumsexperiments.

Da das anfängliche Volumen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale (3 ml) genau bekannt ist und definierte Volumina von Lösungen ausgetauscht wurden, kann die neue bzw. verwendete Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale nach jedem Austausch berechnet werden. Allerdings nehmen die Konzentrationen der Calciumionen und der Carbonationen während des Wachstums der Calciumcarbonatkristalle bzw. des Aragonits ab, wodurch die tatsächlich vorhandene Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale nicht bekannt ist [4]. Die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und die Zeitspannen, in der sich das Probestück in der jeweiligen CaCO_3 -Lösung befand, sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Im Weiteren ist dieses Wachstumsexperiment detailliert beschrieben. Zur besseren Übersicht zeigt die **Abbildung 44** einen Zeitstrahl, der die Abfolge des Wachstumsexperiments in allen Einzelheiten schematisch darstellt. Dort sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die Zeitpunkte der einzelnen Bildaufnahmen und der Austausch der CaCO_3 -Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben. Zusätzlich erfolgt auch die Nennung der Zeitabstände, die zwischen den Aufnahmen der einzelnen Bilder (A) bis (H) vergingen.

Konzentration der CaCO_3 -Lösung	Gesamtzeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
1 mM	150 Minuten	(A)
1,25 mM	107 Minuten	(B)
1,5 mM	224 Minuten	(C) bis (E)
1,7 mM	219 Minuten	(F) bis (H)

Tabelle 2: Verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung während des ersten Wachstumsexperiments auf einer „flat pearl“-Oberfläche (siehe Abb. 43). Die Bilder (A) bis (H) zeigen die Probenoberfläche über einen Zeitraum von 491 Minuten. Das Probestück befand sich vor dem ersten Austausch bereits 150 Minuten in der 1 mM CaCO_3 -Lösung.

Das Abbilden der Probenoberfläche zu Beginn des Wachstumsexperiments (Bilder (A)) erfolgte noch in den 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung, die nach der Probenpräparation in die Petrischale pipettiert wurden. Die Probe befand sich bis zur Aufnahme der Bilder (A) etwa 136 Minuten in der 1 mM CaCO_3 -Lösung. Ein für Wachstumsfronten typischer „stack of coins“ und die übereinander angeordneten Aragonitplättchen, aus denen dieser „stack of coins“ besteht, sind deutlich erkennbar. Das oberste in der Mitte befindliche Aragonitplättchen weist nur eine geringe laterale Ausdehnung von etwa $650 \text{ nm} \cdot 650 \text{ nm}$ auf und hat vermutlich gerade erst begonnen zu wachsen [4]. Die organische Matrix, deren Netzwerkstruktur in allen Bildern beobachtbar ist, bedeckt die einzelnen sichtbaren Aragonitplättchen vollständig. Vor dem ersten Austausch der CaCO_3 -Lösungen befand sich die Probe insgesamt etwa 150 Minuten in der 1 mM CaCO_3 -Lösung.

Nach der Aufnahme der Bilder (A) wurden 0,75 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale gegen 0,75 ml der 2 mM CaCO_3 -Lösung ausgetauscht (blaues Dreieck in der Abb. 43). Die verwendete Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betrug danach 1,25 mM. Zwischen den Bildern (A) und (B) ist eine Zeitspanne von 119 Minuten vergangen. Wie bereits zuvor erwähnt, hat sich der abgebildete Probenbereich nach dem Austausch bedingt durch das Wegfahren und das Wiederannähern der Spitze marginal verschoben. Zusätzlich bewegte sich der anfangs abgebildete Probenbereich beim Abras-

tern während der 119 Minuten nach unten. Die Probe befand sich bereits 105 Minuten in der 1,25 mM CaCO_3 -Lösung als die Bilder (B) aufgenommen wurden.

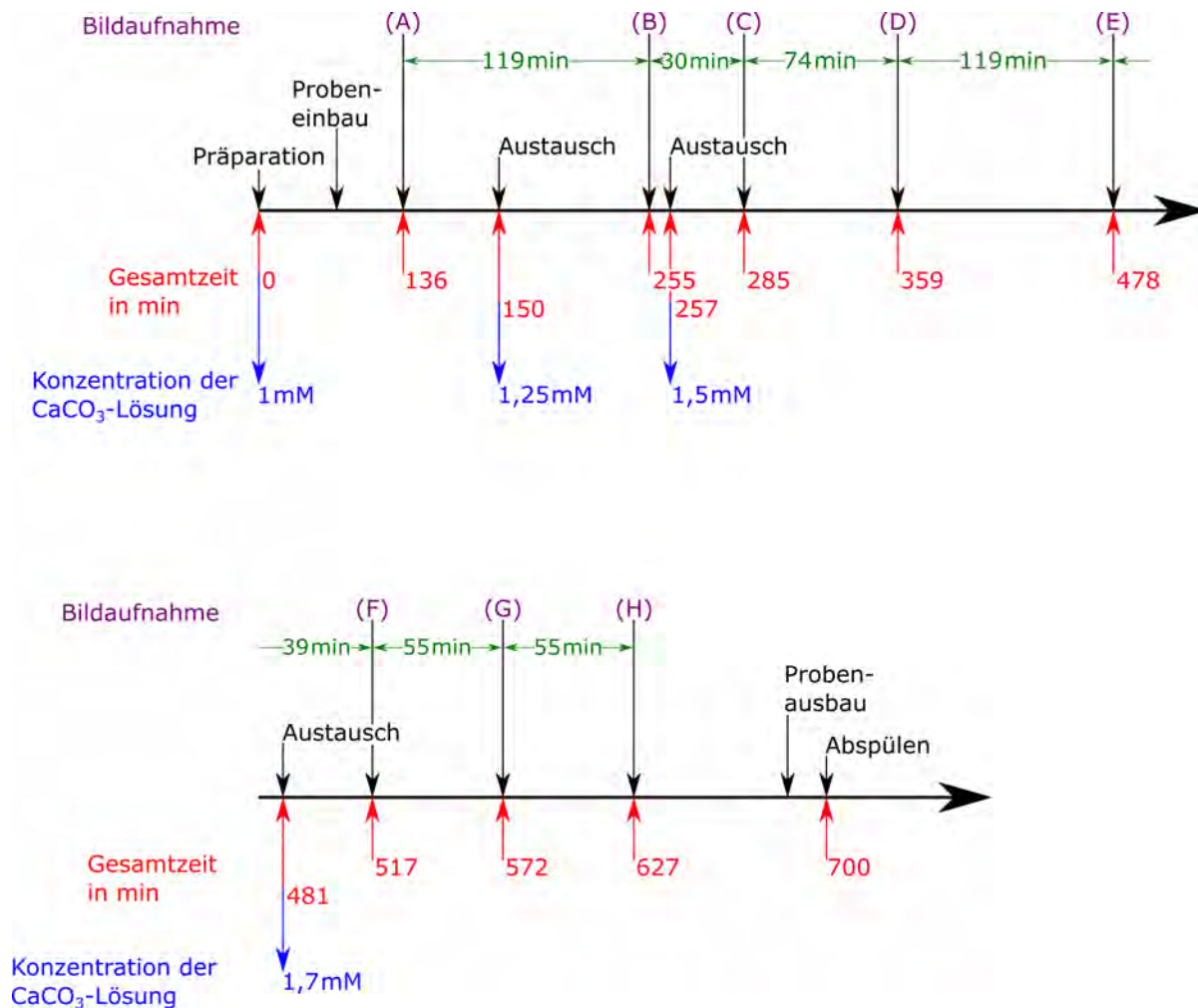


Abbildung 44: Zeitstrahl der detaillierten Abfolge des ersten Wachstumsexperiments auf einer „flat pearl“-Oberfläche aus Abb. 43. Angegeben sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen, die zwischen den Aufnahmen der Bilder vergangenen Zeitspannen und die Zeitpunkte der Austausche der CaCO_3 -Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments.

Direkt nach der Aufnahme der Bilder (B) erfolgte der erneute Austausch der CaCO_3 -Lösungen (rotes Dreieck in der Abb. 43). Dafür wurde diesmal 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und 1 ml der übersättigten 2 mM CaCO_3 -Lösung eingespült. Das Abbilden der Probe fand daher über einen Zeitraum von 107 Minuten in 3 ml der 1,25 mM CaCO_3 -Lösung statt. Nach diesem Austausch wies die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eine Konzentration von 1,5 mM auf. Die Bilder (B) und (C) wurden nur in

einem zeitlichen Abstand von 30 Minuten aufgenommen. Der abgebildete Probenbereich hat sich bei diesem Lösungsaustausch erneut leicht verschoben.

Von den Bildern (C) bis (E) befand sich die Probe über einen Zeitraum von 193 Minuten in der 1,5 mM CaCO_3 -Lösung. Hier fällt besonders bei Betrachtung der Bilder (C) und (D) auf, dass sich der anfangs abgebildete Probenbereich während des fortlaufenden Abrasterns nach unten bewegte. Daher wurde vor der Aufnahme der Bilder (E) der Probenbereich mittels AFM-Software so verschoben, dass der bereits beobachtete „stack of coins“ wieder in der Bildmitte lag. Zwischen den Bildern (C) und (D) bzw. zwischen den Bildern (D) und (E) sind 74 Minuten bzw. 119 Minuten vergangen. Insgesamt befand sich das Probestück 224 Minuten in der 1,5 mM CaCO_3 -Lösung.

Das grüne Dreieck in der Abbildung 43 kennzeichnet den letztmaligen Austausch der CaCO_3 -Lösungen während dieses Wachstumsexperiments. Dabei wurde wieder 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und 1 ml der 2 mM CaCO_3 -Lösung eingespült. Zwischen den Aufnahmen der Bilder (E) und (F) sind nur 39 Minuten verstrichen. Nach dem Austausch wies die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eine Konzentration von 1,7 mM auf. Die Probenoberfläche wurde von den Bildern (F) bis (H) 110 Minuten in der 1,7 mM CaCO_3 -Lösung abgebildet. Dabei verging zwischen den Bildern (F) und (G) bzw. (G) und (H) jeweils eine Zeitspanne von 55 Minuten. Bis die Probe aus dem AFM ausgebaut und mit Reinstwasser abgespült wurde, befand sich diese nach dem letzten Austausch 219 Minuten in der 1,7 mM CaCO_3 -Lösung.

In den Bildern (A) bis (E) ist nur schwer erkennbar, ob Nukleation und/oder Wachstum von Calciumcarbonat auf und/oder unterhalb der organischen Matrix stattfand. Möglicherweise waren die zwei¹⁹⁷ bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Konzentrationen von 1,25 mM und 1,5 mM und der bis dahin betrachtete Zeitraum zu gering, um definiert Wachstum zu beobachten, da es vermutlich auch einige Zeit dauert bis die Calciumionen und die Carbonationen, die für das Wachstum des Calciumcarbonats benötigt werden, zu den entsprechenden Nukleationsstellen diffundieren [4]. Bei den Bildern (F) bis (H) war die Konzentration der CaCO_3 -Lösung mit 1,7 mM etwas höher. Allerdings ist dort das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen auch nicht eindeutig beobachtbar. Die blauen und weißen Pfeile in den Bildern (F1) und (H1) markieren jeweils einen kleinen Bereich, in dem zwischen den Aufnahmen der Bilder (F) und (H) wahrscheinlich Wachstum von Calciumcarbonat erfolgte.

Zur besseren Sichtbarkeit von möglicherweise während dieses AFM-Experiments gewachsenen Kristallen wurde der mittlere Bildbereich nach der Aufnahme der Bilder (H)

¹⁹⁷Die 1 mM CaCO_3 -Lösung, in der das Abbilden der Probenoberfläche zu Beginn des Wachstumsexperiments erfolgte, wurde dabei nicht mitgezählt.

nochmal mit einer kleineren Scanfläche, d. h. einer höheren Vergrößerung, untersucht. Dementsprechend zeigt die **Abbildung 45** weiter vergrößerte AFM-Bilder der Oberfläche des „flat pearl“-Probestücks aus der Abbildung 43. Dabei sind bei den Bildern (A) und (B) die Höhsignale wieder links und die Fehlersignale rechts dargestellt. Das Bild (A1) bzw. (A2) zeigt nochmals das Bild (H1) bzw. (H2) mit der Scanfläche von $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ aus der Abbildung 43. Der in den Bildern (A) blau hervorgehobene Bereich ist in den Bildern (B) entsprechend vergrößert dargestellt. Dabei zeigen die Bilder (B) die Probenoberfläche mit der Scanfläche von $2,3\ \mu\text{m} \cdot 2,3\ \mu\text{m}$. Im Bild (C) ist die 3D-Rekonstruktion des im Bild (B1) dargestellten Höhsignals zu sehen.

Die Beobachtung der bereits in Abschnitt 5.1.1 ausführlich beschriebenen Netzwerkstruktur der organischen Matrix ist in den Bildern (B) besonders gut möglich. Dort sind die einzelnen Filamente und die durch die Anordnung dieser Filamente entstehenden Poren bzw. Löcher gut sichtbar [1, 2]. Die zwei roten Pfeile markieren jeweils einen Bereich in den Bildern (B1) und (C), der im Gegensatz zur restlichen abgebildeten Probenoberfläche schon deutlich höher ist. Vermutlich fand dort unterhalb der organischen Matrix bereits Wachstum von Calciumcarbonat- bzw. Aragonitkristallen statt. Zusätzlich sind zwischen den Filamenten bereits einige kleine dünnere und vermutlich etwa $20\ \text{nm}$ bis $30\ \text{nm}$ ¹⁹⁸ hohe Strukturen sichtbar. Die grünen Pfeile kennzeichnen beispielhaft mehrere dieser Strukturen, bei denen es sich bereits um kleine gewachsene Calciumcarbonatkristalle handeln könnte. Diese Strukturen könnten aber auch Bildartefakte sein, die durch das Abrastern mit der AFM-Spitze entstanden sind. Allerdings ist nicht eindeutig, ob das Kristallwachstum während des AFM-Experiments oder noch während der Inkubation der „flat pearl“ im extrapallialen Raum zwischen Mantelepithel und Schaleninnenseite der lebenden Meeresschnecke erfolgte [4].

Die Betrachtung der Bilder (F) bis (H) in der Abbildung 43 und der Bilder (A) bis (C) in der Abbildung 45 erlaubt bereits die Annahme, dass die Calciumcarbonatkristalle nicht vorzugsweise auf der Oberfläche der organischen Matrix wachsen, sondern das Calciumcarbonat vor allem unterhalb der organischen Matrix nukleiert und nach oben weiterwächst. Demzufolge nukleiert das Calciumcarbonat zunächst auf den Aragonitplättchen, die jeweils mit organischer Matrix überzogen sind, und anschließend wachsen die Calciumcarbonatkristalle durch die vorhandenen Poren bzw. Löcher in der organischen Matrix weiter nach oben in die nächste Schicht [4, 14]. Diese Beobachtung unterstützt das Modell des Aragonitwachstums über sogenannte Mineralbrücken. Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, sind Mineralbrücken kristalline Verbindungen, die sich in vertikaler Richtung zwischen den übereinanderliegenden Aragonitplättchen ausbilden [4, 18].

¹⁹⁸Die genaue Höhe dieser Strukturen konnte hier nicht ermittelt werden.

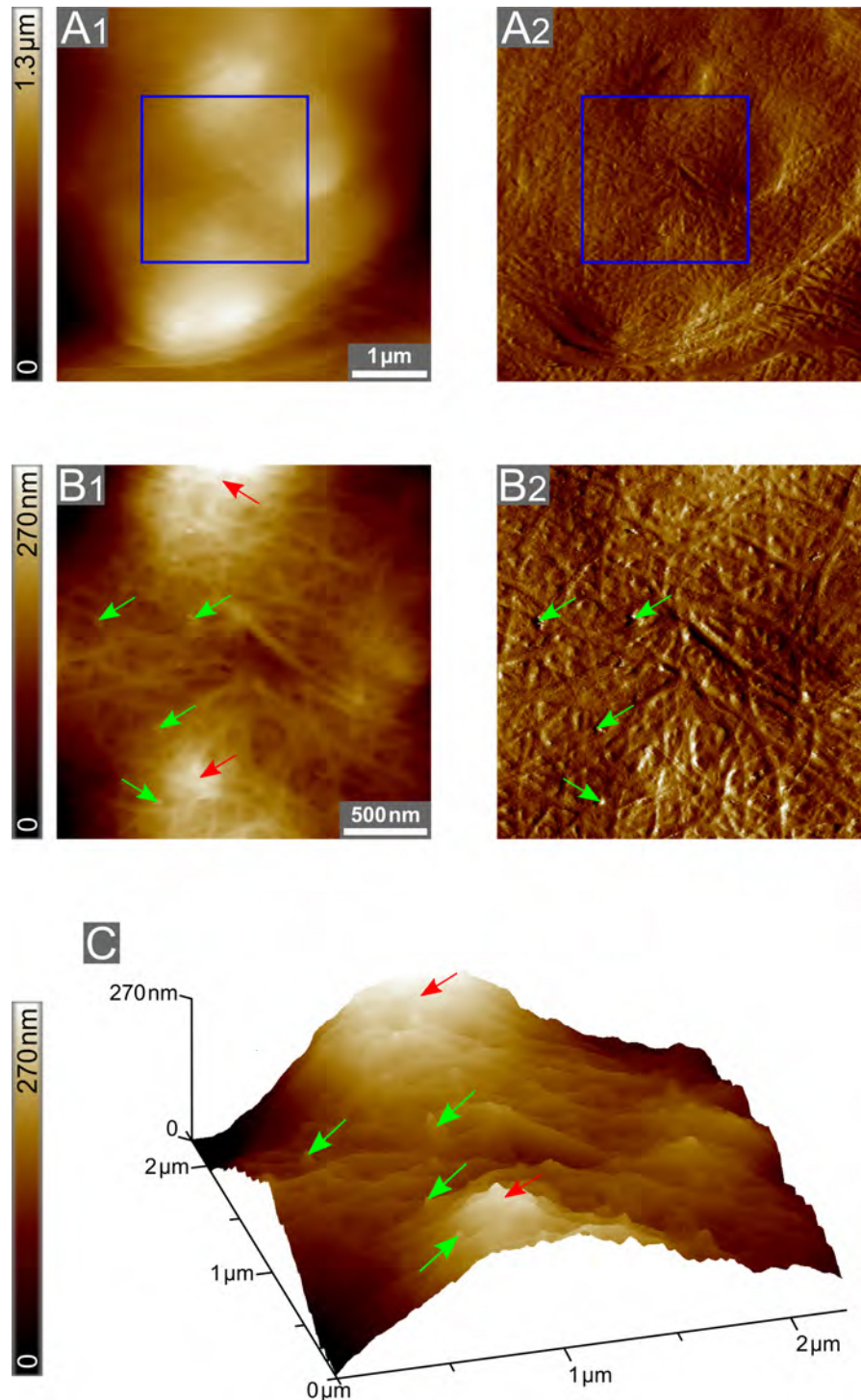


Abbildung 45: Vergrößerte AFM-Aufnahmen und dreidimensionale Rekonstruktion der Oberfläche des „flat pearl“-Probestücks aus Abb. 43. Scanflächen: (A) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$, (B) $2,3 \mu\text{m} \cdot 2,3 \mu\text{m}$ und (C) $2,3 \mu\text{m} \cdot 2,3 \mu\text{m}$. Das Bild (A1) bzw. (A2) zeigt nochmals das Bild (H1) bzw. (H2) aus Abb. 43. Der in (A) blau hervorgehobene Bereich ist in (B) vergrößert dargestellt. Dabei zeigen Bilder mit Index 1 (links) die Höhsignale und Bilder mit Index 2 (rechts) die Fehlersignale. In (C) ist die 3D-Rekonstruktion des in (B1) dargestellten Höhsignals gezeigt. Die roten Pfeile in (B1) und (C) kennzeichnen zwei bereits deutlich höhere Bereiche auf der Probenoberfläche. Zusätzlich sind zwischen den einzelnen Filamenten einige höhere Strukturen (grüne Pfeile in (B) und (C)) zu beobachten. Diese Strukturen könnten bereits kleine gewachsene CaCO_3 -Kristalle und/oder Bildartefakte sein.

Um die Wachstumsgeschwindigkeit eines Calciumcarbonatkristalls zu bestimmen, muss jeweils ein Höhenprofil, das entlang des zu vermessenden Calciumcarbonatkristalls verläuft, in zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommenen Höhenbildern (z. B. (F1) und (H1) in der Abb. 43) ermittelt werden. Anschließend erfolgt anhand dieser Höhenprofile die Bestimmung der Höhendifferenzen $\Delta h_1(t_1)$ und $\Delta h_2(t_2)$ des Calciumcarbonatkristalls bezüglich eines gewählten Referenzpunktes oder -niveaus zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten t_1 und t_2 . Mit den erhaltenen Höhendifferenzen und der zwischen den Aufnahmen beider Höhenbilder vergangenen Zeitspanne $\Delta t = t_2 - t_1$ kann die Wachstumsgeschwindigkeit v des Kristalls prinzipiell gemäß der Formel $v = \frac{\Delta h_2(t_2) - \Delta h_1(t_1)}{\Delta t}$ berechnet werden.

Allerdings war die Ermittlung von Wachstumsgeschwindigkeiten aus den Höhenbildern in der Abbildung 43 nicht möglich, da erstens das Kristallwachstum während dieses Wachstumsexperiments nicht so eindeutig beobachtet werden konnte und zweitens in den aufgenommenen Höhenbildern keine geeigneten Referenzpunkte oder Referenzniveaus zur Bestimmung der Höhendifferenzen zur Verfügung standen. Im Gegensatz dazu gelang die direkte Beobachtung des Wachstums von vielen nadelförmigen Calciumcarbonatkristallen auf der Oberfläche eines weiteren „flat pearl“-Probestücks mit dem AFM im zweiten, in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen, Wachstumsexperiment. Dort konnten die Wachstumsgeschwindigkeiten mehrerer Calciumcarbonatkristalle in verschiedenen Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung sehr gut ermittelt werden.

5.2.1.2 Ergänzende Charakterisierung der Wachstumsfront nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM

Sofort nach der Durchführung des AFM-Wachstumsexperiments wurde die Petrischale, in der sich das Bruchstück der „flat pearl“ und die 3 ml der nun 1,7 mM CaCO_3 -Lösung befanden, aus dem AFM ausgebaut und die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale mit Hilfe einer Pipette entnommen. Um eine Sekundärkristallisation auf der Probenoberfläche zu verhindern, erfolgte danach das mehrfache sorgfältige Spülen des in der Petrischale fixierten Probestücks mit Reinstwasser. Nach anschließendem Entfernen der restlichen in der Petrischale vorhandenen Flüssigkeit mit einem fusselfreien Tuch¹⁹⁹ wurde das Probestück im Kühlraum bei 6 °C über einen Zeitraum von drei Wochen getrocknet [4]. Die weitere Vorbereitung der Probe für die REM-Untersuchung fand gemäß der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Prozedur statt. Dazu wurde der Rand der Petrischale mit der entwickelten Apparatur abgesägt sowie der übriggebliebene Petrischalenboden mit aufgeklebter Probe

¹⁹⁹VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

mittels elektrisch leitfähigem Haftaufkleber²⁰⁰ auf einem runden Probenhalter²⁰¹ befestigt und zusätzlich mit leitfähigem, kupferbeschichtetem Klebeband²⁰² kontaktiert. Die Probe wurde für die REM-Untersuchung nicht – wie sonst üblich – leitfähig beschichtet [4].

Die Aufnahmen der Bilder erfolgten mit dem SE2-Detektor²⁰³. Dabei fanden eine Beschleunigungsspannung von 1 kV und ein Neigungswinkel des Probenhalters von 0° sowie ein Aperturblendendurchmesser von 30 µm Verwendung [4]. Die **Abbildung 46** zeigt REM-Aufnahmen verschiedener Oberflächenbereiche des bereits in Abbildungen 43 und 45 dargestellten und mit dem AFM untersuchten „flat pearl“-Probestücks. Dabei ist die Probenoberfläche in verschiedenen Abmessungen von 22 µm · 30 µm beim Bild (A), von 11 µm · 14 µm beim Bild (B), von 10 µm · 13 µm bei den Bildern (C), (D) und (E) sowie von 5 µm · 7 µm beim Bild (F) gezeigt.

Die Struktur der für Wachstumsfronten typischen „stacks of coins“ aus einzelnen Aragonitplättchen und organischer Matrix sowie die organische Matrix in den Zwischenräumen der „stacks of coins“ sind in allen Bildern sehr gut erkennbar [4, 5]. Die weißen Pfeile im Bild (A) markieren zwei solche „stacks of coins“ und die gelben Pfeile kennzeichnen dort beispielhaft die organische Matrix zwischen den „stacks of coins“. Das Abrastern der Probenoberfläche mittels Elektronenstrahl hat Aufladungen hervorgerufen, die oftmals die Bildaufnahme erschweren [4]. Solche hellen, weißen Bereiche (z. B. grüne Pfeile in den Bildern (A) und (D)) sind in allen gezeigten Bildern sichtbar. Bei der REM-Untersuchung traten vor allem Aufladungen der organischen Matrix zwischen den „stacks of coins“ auf [4]. Im Bild (C) sind sehr viele übereinanderliegende Aragonitplättchen sichtbar. Die blauen und roten Pfeile kennzeichnen dort mehrere der Aragonitplättchen, aus denen einer der „stacks of coins“ besteht. Die ganz unten befindlichen Aragonitplättchen (weiß-rote Pfeile) weisen große laterale Ausdehnungen auf und stoßen bereits mit anderen Plättchen zusammen, sodass sich dort teilweise schon geschlossene Aragonitschichten gebildet haben. Diese Schichten bestehen dann aus einzelnen Aragonitplättchen getrennt durch die intertabulare organische Matrix (ITM) [4]. Auf dem Aragonitplättchen (3) sind zwei „neue“ Aragonitplättchen (rote Pfeile, gekennzeichnet mit (2a) und (2b)) direkt nebeneinander entstanden. Da diese „neuen“ Aragonitplättchen direkt nebeneinander begonnen haben zu wachsen, ist zu erwarten, dass die vollständigen lateralen Ausdehnungen dieser Plättchen nach Weiterführung des Wachstums deutlich kleiner sind als die lateralen Ausdehnungen der „normal gewachsenen“ einzelnen Aragonitplättchen. Das Wachstum von mehreren „neuen“ Plättchen auf der Oberfläche eines „alten“ Aragonitplättchens, das offenbar

²⁰⁰25 mm Durchmesser, rund; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁰¹32 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁰²6,4 mm Breite, einseitig klebend; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁰³Everhart-Thornley Detektor, siehe Abschnitt 3.2

auch öfter auftritt (z. B. rote Pfeile im Bild (B)), wird durch die Netzwerkstruktur der organischen Matrix ermöglicht [3]. In den Poren zwischen den miteinander verwobenen Filamenten können sich vermutlich auch mehrere Mineralbrücken ausbilden [1, 3].

Das Bild (F) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des grün hervorgehobenen Bereichs aus dem Bild (E). Dort ist die Beobachtung der detaillierten Struktur der „stacks of coins“, die abwechselnd aus Aragonitplättchen und dünnen Schichten der organischen Matrix aufgebaut sind, besonders gut möglich [4, 5]. Jeweils fünf bis sieben übereinander angeordnete Aragonitplättchen mit polygonaler Form bilden die zwei gut erkennbaren „stacks of coins“. Dabei besitzt das jeweils untere Aragonitplättchen eine größere laterale Ausdehnung als das direkt darüberliegende Plättchen [4]. Auf den untersten Aragonitplättchen beider „stacks of coins“ existiert organische Matrix. Die oberen Aragonitplättchen sind jedoch nicht von organischer Matrix bedeckt [4]. Das blaue Dreieck kennzeichnet beispielhaft die organische Matrix auf einer der unteren Plättchenoberflächen. Dort sind größere Löcher in der organischen Matrix erkennbar. Auch in der organischen Matrix im Bild (D) treten mehrere untypisch große Löcher auf. Zur besseren Sichtbarkeit markiert das rote Dreieck im Bild (D) einen Bereich der organischen Matrix zwischen den „stacks of coins“, in dem viele dieser größeren Löcher existieren. Diese Löcher sind vermutlich bei der Trocknung der Probe und/oder während der REM-Untersuchung durch das Abrastern mit dem Elektronenstrahl entstanden [4]. Bei einem der „stacks of coins“ im Bild (F) haben sich auf einer der Plättchenoberflächen wieder zwei Aragonitplättchen direkt nebeneinander gebildet (weiße Dreiecke). In der Mitte der obersten Aragonitplättchen aller „stacks of coins“ im Bild (F) sind bereits neue Aragonitplättchen entstanden. Die gelben Dreiecke markieren zwei dieser neu gewachsenen Aragonitplättchen. Zusätzlich sind auf den Oberflächen der Aragonitplättchen sehr kleine kristalline Strukturen beobachtbar. Die grünen Dreiecke in den Bildern (D) und (F) kennzeichnen einige dieser kristallinen Strukturen, bei denen es sich vermutlich um Calciumcarbonatkristalle handelt, die während des AFM-Wachstumsexperiments auf den Plättchenoberflächen gewachsen sind [4].

Da die Aufnahmen der Bilder bei einem Neigungswinkel des Probenstückes von 0° erfolgten, kann keine Aussage über die Höhen und die Form dieser kleinen kristallinen Strukturen auf den Plättchenoberflächen getroffen werden. Diese Beobachtung unterstützt trotzdem die bei der Beschreibung des AFM-Wachstumsexperiments aufgestellte Vermutung, dass das Calciumcarbonat zunächst auf den Aragonitplättchen unterhalb der organischen Matrix nukleiert und die neuen Kristalle anschließend nach oben durch die filamentstrukturbedingten Poren bzw. Löcher in der interlamellaren organischen Matrix weiterwachsen [1, 4]. Allerdings konnte bei dem in Abbildung 43 gezeigten AFM-Experiment das Wachstum solcher Calciumcarbonatkristalle nicht direkt beobachtet werden.

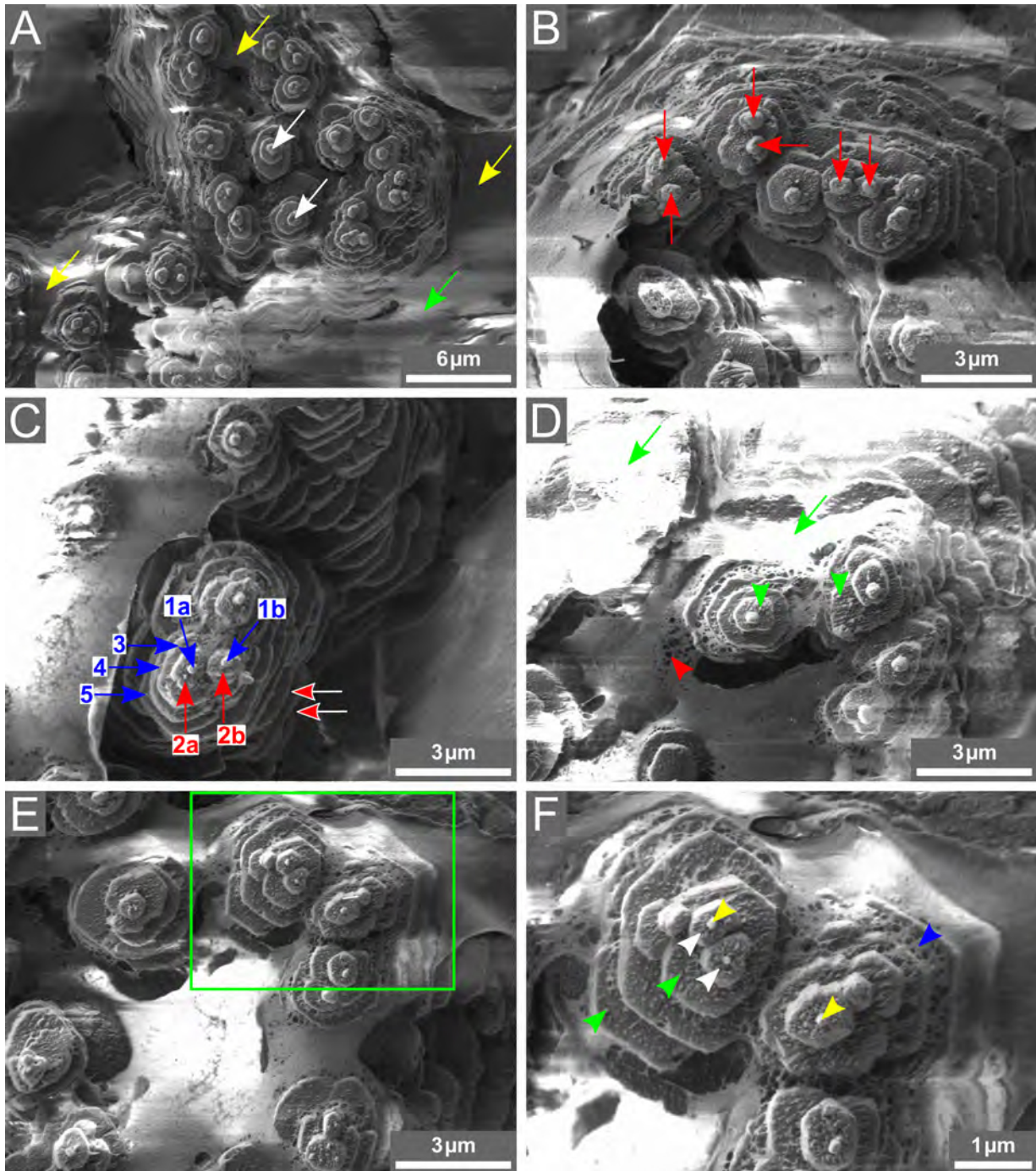


Abbildung 46: REM-Aufnahmen ausgewählter Oberflächenbereiche des bereits in Abb. 43 und 45 gezeigten „flat pearl“-Bruchstücks nach dem AFM-Wachstumsexperiment. Scanflächen: (A) $22\ \mu\text{m} \cdot 30\ \mu\text{m}$, (B) $11\ \mu\text{m} \cdot 14\ \mu\text{m}$, (C) $10\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$, (D) $10\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$, (E) $10\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$ und (F) $5\ \mu\text{m} \cdot 7\ \mu\text{m}$; Neigungswinkel des Probenstückes: 0° . Die „stacks of coins“ (weiße Pfeile in (A)) und die einzelnen Aragonitplättchen (Pfeile in (C)) sowie die organische Matrix auf den Plättchenoberflächen (blaues Dreieck in (F)) und zwischen den „stacks of coins“ (gelbe Pfeile in (A)) sind gut erkennbar. Das Abrastern mittels Elektronenstrahl ruft Aufladungen der Probenoberfläche hervor (weiße, helle Bereiche) [4]. Die größeren Löcher in der organischen Matrix (rotes Dreieck in (D)) sind vermutlich Artefakte. (F) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des in (E) grün markierten Bereichs. Auf den Oberflächen der Aragonitplättchen sind kleine kristalline Strukturen (grüne Dreiecke in (D) und (F)) und bereits neue Aragonitplättchen (gelbe Dreiecke in (F)) gewachsen.

5.2.1.3 Bestimmung der lateralen Ausdehnungen einzelner Aragonitplättchen

Wie bereits in [4] von mir erprobt, wurden hier auch die lateralen Ausdehnungen bzw. Durchmesser einzelner gut erkennbarer Aragonitplättchen ermittelt. Die **Abbildung 47** zeigt die zur Vermessung ausgewählten Aragonitplättchen mehrerer „stacks of coins“ aus den Bildern (E) und (F) der Abbildung 46. Die Kennzeichnung der verschiedenen „stacks of coins“ erfolgte mit verschiedenfarbigen Pfeilen und die einzelnen Aragonitplättchen, die die „stacks of coins“ bilden, wurden jeweils von oben nach unten mit (1), (2) oder (3) markiert. Die Unterscheidung von zwei direkt nebeneinander gewachsenen Aragonitplättchen erfolgte durch die zusätzliche Angabe von (a) bzw. (b). Beim Ausmessen wurden die, in der Mitte der jeweils mit (1) gekennzeichneten Aragonitplättchen beobachtbaren, bereits neu entstandenen, sehr kleinen Aragonitplättchen nicht betrachtet [4].

Insgesamt erfolgte die Bestimmung der lateralen Ausdehnungen der gut sichtbaren Aragonitplättchen von vier verschiedenen „stacks of coins“, wobei jeweils nur die größte laterale Ausdehnung eines Plättchens vermessen wurde [4]. Im Bild (B) der Abbildung 47 ist eine blaue Linie auf dem mit (1b) markierten Aragonitplättchen eingezeichnet, die das Vermessen eines Aragonitplättchens veranschaulicht [4]. Wie von mir in [4] beschrieben, mussten zuerst die zwei Marker jeweils manuell im Bild auf den gegenüberliegenden Kanten eines Aragonitplättchens platziert werden, wobei diese Kanten in den REM-Bildern sehr oft nicht scharf abgebildet sind, und erfolgte anschließend eine Differenzbildung aus diesen zwei Markerpositionen. Daher wurde für die gemessenen lateralen Ausdehnungen hier ein Größtfehler von $\pm 0,05 \mu\text{m}$ angenommen [4]. In der Tabelle 3 sind die lateralen Ausdehnungen aller ausgewählten Aragonitplättchen zusammengefasst.

Durchmesser der obersten Plättchen	Durchmesser der zweiten Plättchen	Durchmesser der dritten Plättchen
(1) $(0,65 \pm 0,05) \mu\text{m}$	(2) $(1,79 \pm 0,05) \mu\text{m}$	(3) $(2,14 \pm 0,05) \mu\text{m}$
(1a) $(0,61 \pm 0,05) \mu\text{m}$ (1b) $(0,74 \pm 0,05) \mu\text{m}$	(2) $(1,78 \pm 0,05) \mu\text{m}$	(3) $(2,84 \pm 0,05) \mu\text{m}$
(1) $(1,25 \pm 0,05) \mu\text{m}$	(2) $(1,85 \pm 0,05) \mu\text{m}$	(3) $(2,41 \pm 0,05) \mu\text{m}$
(1) $(0,91 \pm 0,05) \mu\text{m}$	—————	—————

Tabelle 3: Ausgemessene größte laterale Ausdehnungen bzw. Durchmesser einzelner Aragonitplättchen aus Abb. 47. Die Aragonitplättchen eines „stack of coins“ sind mit gleichfarbigen Pfeilen und von oben nach unten mit (1), (2) bzw. (3) markiert.

Die vermessenen Aragonitplättchen, auf denen teilweise organische Matrix vorhanden ist, weisen laterale Ausdehnungen meist im Bereich von wenigen Mikrometern auf, wobei die Durchmesser der obersten Aragonitplättchen noch etwas kleiner sind [4]. Die Abstände zwischen den verschiedenen „stacks of coins“ sind, wie in der Abbildung 47 zu sehen

ist, recht unterschiedlich, liegen aber abgeschätzt im Bereich weniger hundert Nanometer bis zu mehreren Mikrometern. Ebenso interessant für das Verhältnis von Höhen- und Breitenwachstum ist, dass die Stufenbreite zwischen den übereinander angeordneten Aragonitplättchen der „stacks of coins“ beim Wachstum nahezu identisch bleibt. Da die charakteristischen Größen d der Strukturen (sowohl Abstände als auch Plättchendurchmesser) meist im Bereich weniger Mikrometer liegen und damit für diese Strukturen $d \geq \lambda$ gilt, wobei λ die Lichtwellenlänge ist, erscheint die Wachstumsfront mit den „stacks of coins“ bei natürlicher Beleuchtung aufgrund der nahezu wellenlängenunabhängigen Mie-Streuung weißlich [4].

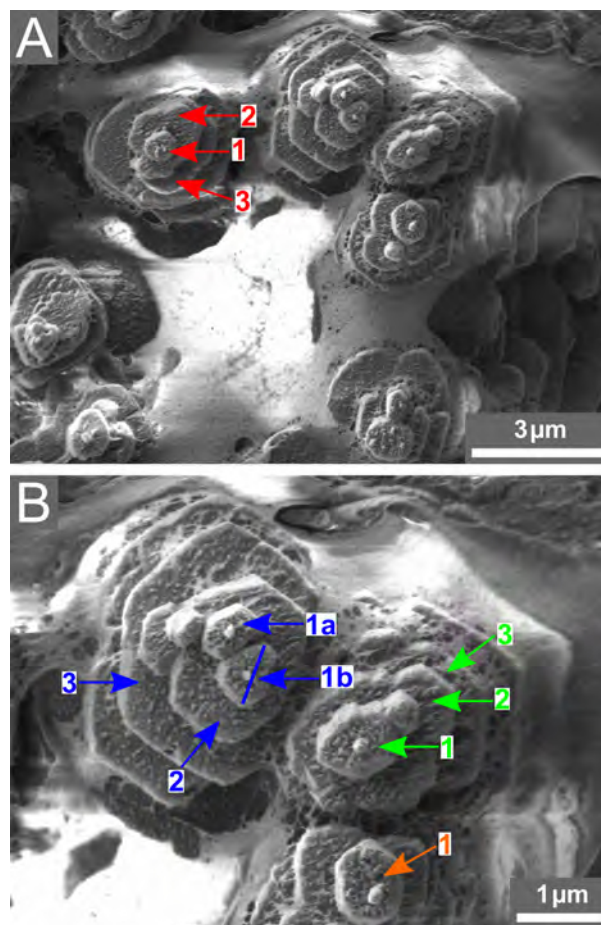


Abbildung 47: REM-Aufnahmen aus Abb. 46 zur Ausmessung der größten Durchmesser einzelner Aragonitplättchen. Scanflächen: (A) $10\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$ und (B) $5\ \mu\text{m} \cdot 7\ \mu\text{m}$. Die ausgewählten gut erkennbaren Aragonitplättchen eines „stack of coins“ sind mit gleichfarbigen Pfeilen und von oben nach unten jeweils mit (1), (2) oder (3) gekennzeichnet. Zur Unterscheidung der zwei direkt nebeneinander gewachsenen Aragonitplättchen in (B) wurden diese Plättchen zusätzlich mit (a) bzw. (b) markiert [4].

Da die einzelnen Aragonitplättchen keine hexagonale Form, sondern eine polygonale Form aufweisen und zuvor jeweils nur die größte laterale Ausdehnung der Plättchen ermittelt wurde, erfolgte zusätzlich die Berechnung der genauen Flächen der großen (001)-Oberflächen der betrachteten Aragonitplättchen mit dem Programm ImageJ²⁰⁴. Dafür wurde zuerst der Umriss eines Aragonitplättchens im aufgenommenen Bild (z. B. Bild (B) in der Abb. 47) manuell nachgezeichnet und anschließend mit dem gespeicherten Maßstab die Fläche des Aragonitplättchens automatisch berechnet. Die Aufnahme des Maßstabs fand immer zeitgleich mit der Aufnahme der REM-Bilder statt. Die Ermittlung der Oberflächen erfolgte für die ausgewählten Aragonitplättchen aus der Abbildung 47. Dabei konnten die Flächen der Aragonitplättchen (3) von den mit roten und grünen Pfeilen markierten „stacks of coins“ nicht berechnet werden, da die Ränder bzw. Kanten dieser Plättchen nicht vollständig sichtbar sind. Für die ermittelten Oberflächen wurde jeweils ein Größtfehler von $\pm 0,05 \mu\text{m}^2$ angenommen, da der Umriss eines Aragonitplättchens jeweils per Hand festgelegt wurde und die Kanten der Plättchen, wie zuvor erwähnt, in den REM-Bildern nicht scharf abgebildet sind [4]. Die Oberflächen der jeweils oberen Aragonitplättchen sind noch deutlich kleiner als die Oberflächen der direkt darunterliegenden Plättchen, wie für die „stacks of coins“ von Wachstumsfronten typisch ist [4, 9].

Oberfläche der obersten Plättchen	Oberfläche der zweiten Plättchen	Oberfläche der dritten Plättchen
(1) $(0,36 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$	(2) $(1,94 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$	—————
(1a) $(0,27 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$ (1b) $(0,30 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$	(2) $(2,28 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$	(3) $(4,59 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$
(1) $(0,72 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$	(2) $(2,21 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$	—————
(1) $(0,54 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$	—————	—————

Tabelle 4: Berechnete Flächen der großen (001)-Oberflächen der ausgewählten Aragonitplättchen aus Abb. 47. Die Aragonitplättchen eines „stack of coins“ sind mit gleichfarbigen Pfeilen und von oben nach unten mit (1), (2) bzw. (3) markiert.

5.2.2 Zweites Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche

5.2.2.1 Aufnahme der AFM-Bildsequenz

Die **Abbildungen 48 und 49** zeigen jeweils ausgewählte Bilder aus der aufgenommenen AFM-Bildsequenz eines weiteren Wachstumsexperiments, dessen Durchführung auf der Oberfläche des bereits bei den Strukturuntersuchungen in den Abbildungen 37 und 38 dargestellten Probestücks einer Wachstumsfront erfolgte. Wie zuvor in Abschnitt 5.1.1

²⁰⁴ImageJ 1.53a; Wayne Rasband, National Institutes of Health; USA

detailliert beschrieben, wurde das Probestück aus einer „flat pearl“ gewonnen und mittels Zweikomponentenkleber in einer Petrischale fixiert, die Probenoberfläche während der Präparationsprozedur mit einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung benetzt und nach Abbinden des Zweikomponentenklebers ein Volumen von 3 ml derselben 0,9 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale pipettiert [4]. Die zwischen Mantelepithel und Schaleninnenseite erfolgte Inkubation des Deckglases, auf dem die für dieses Wachstumsexperiment verwendete „flat pearl“ entstanden ist, fand nur über einen Zeitraum von 10 Tagen statt [4]. Die Entnahme dieser „flat pearl“ aus dem extrapallialen Raum erfolgte außerdem nur 24 Stunden vor dem AFM-Experiment. Vor dem Einbau der Probe ins AFM wurde die zum Abbilden der Probenoberfläche verwendete PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde gemäß dem „touch“-Verfahren aus Abschnitt 4.4.4 kalibriert. Diese Kalibrierung erfolgte in einer zweiten Petrischale, in der sich keine Probe, sondern nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befanden. Aus den dabei aufgenommenen Kraftkurven wurden eine Federkonstante von $0,21 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine Deflektionssensitivität von $(11,0 \pm 1,7) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ mittels AFM-Software ermittelt.

Nachdem zunächst die Untersuchung der Oberflächenstruktur verschiedener Probenbereiche erfolgte, wurde ein geeigneter Probenbereich zur direkten Beobachtung des Kristallwachstums ausgewählt. Sobald das Abbilden dieses Probenbereichs stabil über einen Zeitraum von etwa 15 Minuten gelang, wurde die kontinuierliche Bildaufnahme für das Wachstumsexperiment gestartet. Während des gesamten Wachstumsexperiments erfolgte das Abbilden der Probenoberfläche mit einer Scanfläche von $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ bei Verwendung einer Abtastrate von 0,598 Hz, einer Auflösung von 256×256 Pixel und einer Kraft von 450 pN. Dabei fand die Bildaufnahme über einen Zeitraum von insgesamt 325 Minuten statt. Die Auflösung und die Abtastrate wurden so eingestellt, dass die Aufnahme eines AFM-Bildes etwa 7 Minuten dauerte. Damit gelang es, für die Bildsequenz aufeinanderfolgende Bilder im zeitlichen Abstand von jeweils 7 Minuten aufzuzeichnen.

In den Abbildungen 48 und 49 sind nun ausgewählte Bilder aus der AFM-Bildsequenz desselben Oberflächenbereichs des Probestücks der Wachstumsfront mit jeweils einer Scanfläche von $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die Bilder mit dem Index 1 (jeweils oben) zeigen die Höhensignale und die Bilder mit dem Index 2 (jeweils unten) die Fehlersignale. Zwischen den Bildern (A) und (P) ist ein Zeitraum von 311 Minuten vergangen. Dabei zeigen die Bilder (A) bis (H) in der Abbildung 48 die Probenoberfläche über einen Zeitraum von 191 Minuten und die Bilder (I) bis (P) in der Abbildung 49 die Probenoberfläche über eine Zeitspanne von weiteren 106 Minuten. Die zeitlichen Abstände zwischen den ausgewählten Bildern sind dabei nicht gleich. Da das Wachstum von vielen Calciumcarbonatkristallen besonders deutlich in den Bildern (G) bis (P) beobachtbar ist, wurden ab den Bildern (G) für die Darstellung die Zeitabstände zwischen den Bildern

kürzer gewählt. Demzufolge liegt zwischen den gezeigten Bildern (A) bis (G) bzw. (G) bis (P) jeweils ein Zeitabstand von etwa 30 Minuten bzw. 15 Minuten.

Im Folgenden findet sich die genauere Beschreibung des zweiten Wachstumsexperiments auf einer Wachstumsfront. Hier fand im Vergleich zum ersten Wachstumsexperiment eine noch stärker übersättigte, jetzt 5 mM CaCO_3 -Lösung Verwendung. Nach dem Ansetzen wurde diese CaCO_3 -Lösung zunächst für mindestens 30 Minuten neben das AFM gestellt, bevor der erste Austausch der bis zu diesem Zeitpunkt in der Petrischale vorhandenen 0,9 mM CaCO_3 -Lösung erfolgte. Damit sollte sich die Temperatur der 5 mM CaCO_3 -Lösung an die Temperatur der Lösung in der Petrischale anpassen. Während der gesamten aufgezeichneten AFM-Bildsequenz wurde dreimal jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und anschließend stets 1 ml der 5 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale hinzugefügt. Dabei fand der Austausch gemäß der in Abschnitt 4.4.5 beschriebenen Prozedur statt, jedoch wurden hier, im Gegensatz zum ersten Wachstumsexperiment, die CaCO_3 -Lösungen erstmals direkt während des Abbildens der Probenoberfläche ausgetauscht. Die verschiedenfarbigen Dreiecke (blaues, rotes und grünes Dreieck) in den Abbildungen 48 und 49 markieren jeweils den Lösungsaustausch. Die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und die Verweilzeiträume der Probe in der jeweiligen CaCO_3 -Lösung sind in der Tabelle 5 aufgelistet. Zum besseren Vergleich der verschiedenen²⁰⁵ Wachstumsexperimente zeigt die **Abbildung 50** wieder einen Zeitstrahl, der diesmal den detaillierten Ablauf des zweiten Wachstumsexperiments schematisch darstellt. Dort sind die verschiedenen Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Lösungsaustausche, die zwischen den Aufnahmen der einzelnen Bilder (A) bis (P) vergangenen Zeiträume sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben.

In allen Höhenbildern kann man, wie bei der Strukturuntersuchung in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, inselartige Anordnungen, die durch größere Zwischenräume getrennt sind, beobachten. Diese inselförmigen Anordnungen bestehen sichtbar aus organischer Matrix und vermutlich auch aus Mineral, das bereits während des natürlichen Kristallwachstums unterhalb der organischen Matrix entstanden ist. Entweder existiert in den zwei abgebildeten Zwischenräumen keine organische Matrix oder die organische Matrix ist dort bei der gewählten Höhenskala nicht sichtbar. Die dünnen, miteinander verwobenen Filamente und die dazwischen auftretenden Poren bzw. Löcher, die die Netzwerkstruktur der organischen Matrix bilden, sind gut in den Höhenbildern erkennbar [2]. Die Beobachtung des Verlaufs einzelner Filamente ist jedoch in den Bildern (A2) bis (P2) einfacher. Bereits in

²⁰⁵In Abschnitt 5.4 sind ebenfalls mehrere Wachstumsexperimente auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen bzw. Perlmutterpaltflächen beschrieben.

der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung (Bilder (A)) befinden sich zwischen, an und unter den einzelnen Filamenten viele, teilweise rund aussehende Strukturen, die als Nukleationskeime für das Aragonitwachstum wirken könnten. Bei diesen Strukturen handelt es sich vermutlich um kleine, aus Aragonit bestehende, natürlich gewachsene Kristalle und/oder um Proteinkomplexe, die an den Chitinfilamenten der organischen Matrix angelagert sind [1, 4].

Bei den Bildern (A) zum Anfang des Wachstumsexperiments erfolgte das Abbilden der Probenoberfläche noch in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Als die Bilder (A) aufgenommen wurden, befand sich die Probe bereits über einen Zeitraum von etwa 291 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Kurz nach der Aufnahme der Bilder (A) fand erstmals ein Austausch von 1 ml der in der Petrischale vorhandenen 0,9 mM CaCO_3 -Lösung gegen 1 ml der übersättigten 5 mM CaCO_3 -Lösung statt. Daher befand sich das Probestück der Wachstumsfront über etwa 302 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betrug nach dem ersten Austausch 2,3 mM. Die Probenoberfläche wurde dann über einen Zeitraum von 70 Minuten in der 2,3 mM CaCO_3 -Lösung abgebildet. Vor der Aufnahme der Bilder (D) erfolgte nochmals der Austausch von 1 ml der CaCO_3 -Lösungen, sodass die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale danach eine Konzentration von 3,2 mM aufwies. Das Probestück verblieb 60 Minuten in den 3 ml der nun 3,2 mM CaCO_3 -Lösung. Nach dem erneuten und letzten Austausch der CaCO_3 -Lösungen vor der Aufnahme der Bilder (F) wies die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eine Konzentration von 3,8 mM auf. Danach wurde kein weiterer Lösungsaustausch mehr vorgenommen, da die verwendete Konzentration von 3,8 mM zu diesem Zeitpunkt schon sehr hoch war. Damit wurde das Probestück innerhalb von 163 Minuten in der 3,8 mM CaCO_3 -Lösung mehrfach abgebildet (Bilder (F) bis (P)). Nach der Aufnahme der Bilder (P) erfolgte das Entfernen der Petrischale mit fixierter Probe aus dem AFM. Danach wurde die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale mit Hilfe einer Pipette entnommen, die Probe mit Reinstwasser mehrmals abgespült und die restliche in der Petrischale vorhandene Flüssigkeit mit fusselfreien Tüchern²⁰⁶ entfernt [4]. Das Abspülen der Probe verhinderte eine Sekundärkristallisation auf der Probenoberfläche nach dem AFM-Experiment [4, 172]. Bis zum Abspülen befand sich die Probe über eine Zeitspanne von 188 Minuten in der 3,8 mM CaCO_3 -Lösung.

Bei diesem Wachstumsexperiment gelang es, denselben Probenbereich stabil über den gesamten Zeitraum abzubilden. Hierbei hat sich der abgebildete Probenbereich bei den Austauschen der CaCO_3 -Lösungen nicht merkbar verschoben, da die Entnahme und das Einspülen der CaCO_3 -Lösungen direkt während des Abrasterns der Probenoberfläche mit der AFM-Spitze erfolgten.

²⁰⁶VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

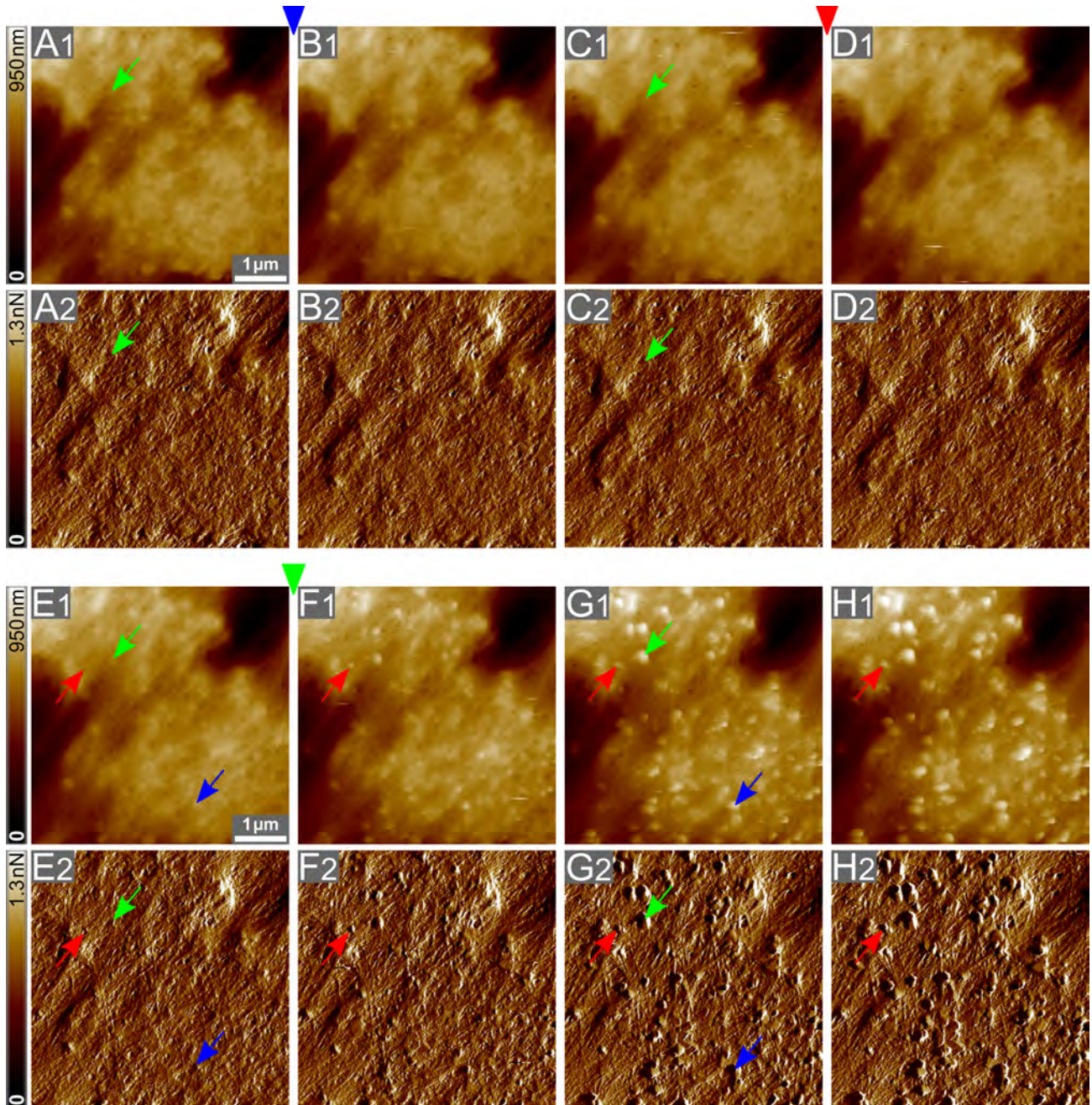


Abbildung 48: Zweites Wachstumsexperiment: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz desselben Oberflächenbereichs eines „flat pearl“-Bruchstücks mit der Scanfläche von jeweils $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ über einen Zeitraum von 191 Minuten. Bilder mit Index 1 (jeweils oben) zeigen die Höhengsignale und Bilder mit Index 2 (jeweils unten) die Fehlersignale. Bei (A) befand sich die Probe in 3 ml einer $0,9 \text{ mM}$ CaCO_3 -Lösung. Die verschiedenfarbigen Dreiecke (blaues, rotes und grünes Dreieck) kennzeichnen die Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Dabei wurde jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und 1 ml einer übersättigten 5 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale pipettiert. Damit ergaben sich folgende Konzentrationen: (A) $0,9 \text{ mM}$, (B) bis (C) $2,3 \text{ mM}$, (D) bis (E) $3,2 \text{ mM}$ und (F) bis (H) $3,8 \text{ mM}$. Zwischen den Bildern (A) bis (G) bzw. zwischen den Bildern (G) und (H) ist jeweils ein Zeitraum von etwa 30 Minuten bzw. von 14 Minuten vergangen. Die grünen, blauen und roten Pfeile markieren beispielhaft jeweils einen CaCO_3 -Kristall, dessen Höhe im Verlauf der Bilder zunimmt bzw. der wächst.

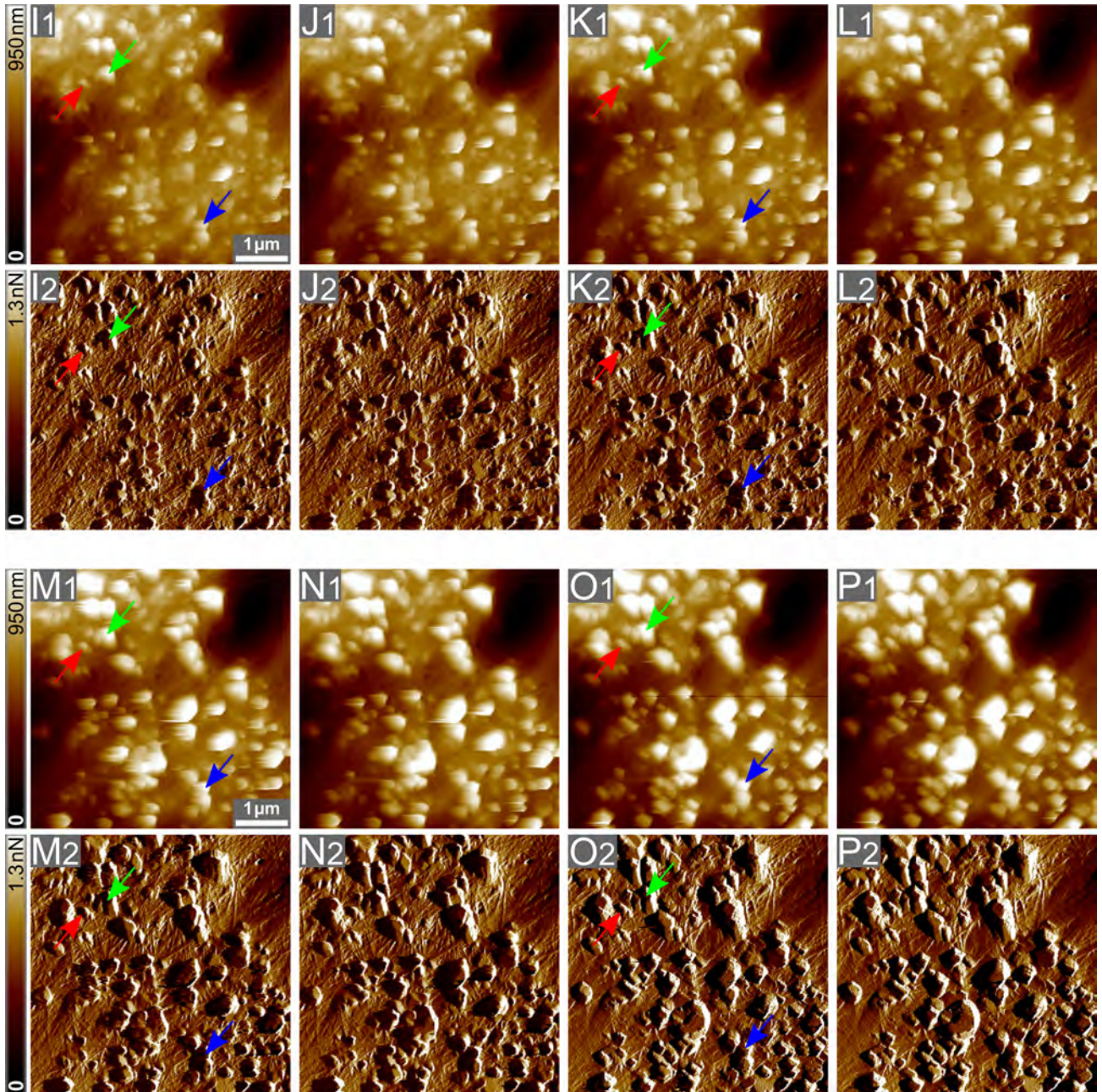


Abbildung 49: Zweites Wachstumsexperiment: Fortsetzung der AFM-Bildsequenz aus Abb. 48 mit ausgewählten Aufnahmen desselben Probenbereichs des „flat pearl“-Bruchstücks mit der Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ über weitere 106 Minuten. Bei (I) befand sich die Probe bereits in 3 ml einer $3,8\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung. Da die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale zu diesem Zeitpunkt schon sehr hoch war, wurde kein weiterer Austausch der CaCO_3 -Lösungen vorgenommen. Damit betrug die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale von (I) bis (P) $3,8\ \text{mM}$. Die gezeigten Bilder (I) bis (P) wurden jeweils in einem Zeitabstand von etwa 15 Minuten aufgenommen. Die grünen, blauen und roten Pfeile markieren dieselben CaCO_3 -Kristalle wie in Abb. 48. In allen Bildern ist deutlich das Wachstum vieler CaCO_3 -Kristalle zu beobachten.

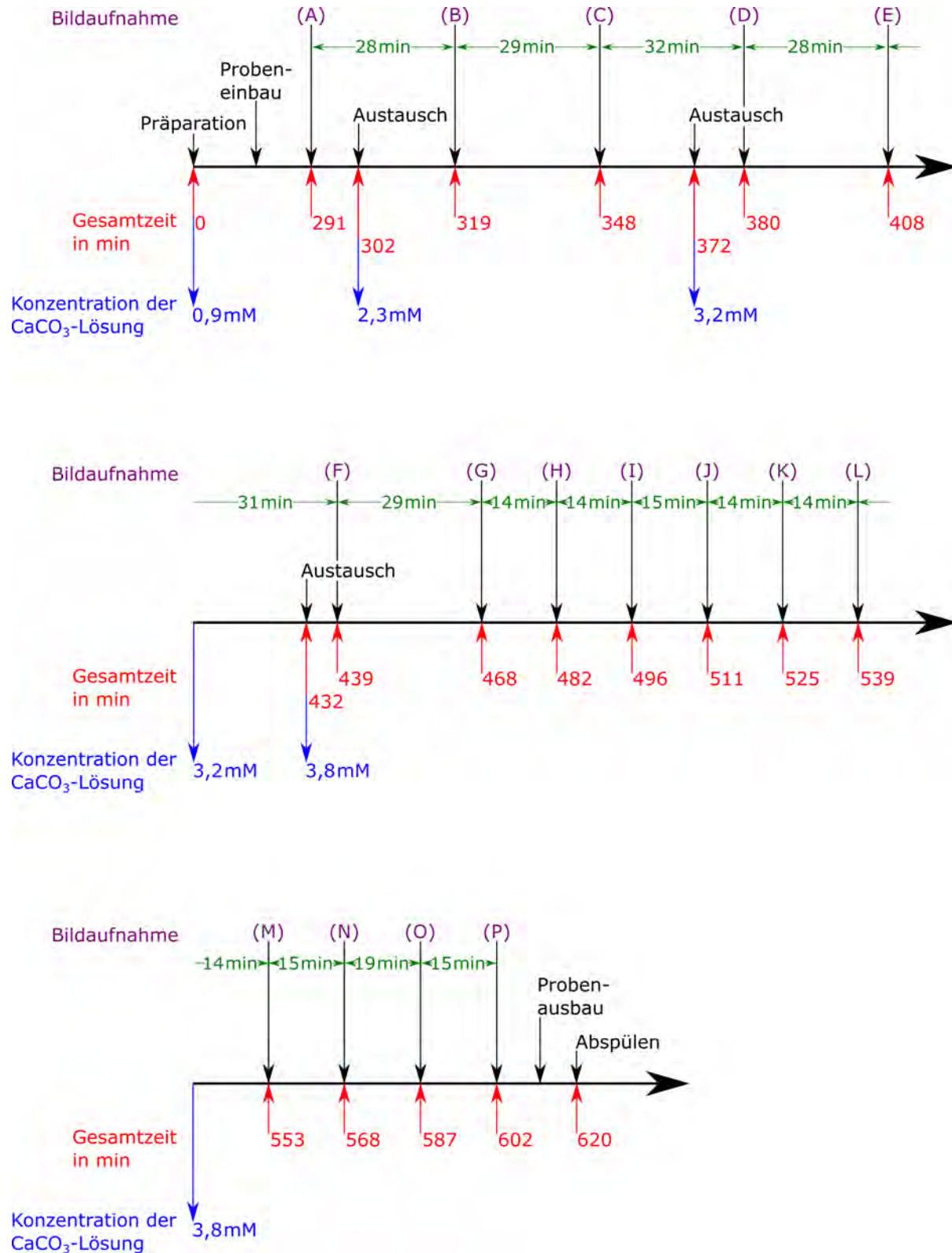


Abbildung 50: Zeitstrahl, der den detaillierten Ablauf des zweiten Wachstumsexperiments auf einer „flat pearl“-Oberfläche aus Abb. 48 und 49 zeigt. Hier sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO₃-Lösung in der Petrischale, die genauen zwischen den gezeigten Bildern vergangenen Zeitspannen, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO₃-Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben.

In der Abbildung 48 ist ab den Bildern (E) das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen deutlich erkennbar, wobei die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale zu diesem Zeitpunkt schon eine Konzentration von 3,2 mM aufwies. Allerdings war die dann beim Wachstum verbleibende Konzentration in der Petrischale geringer, da hierbei die Calcium- und Carbonationen benötigt wurden [4]. Wie schon beim ersten Wachstumsexperiment beobachtet, dauert es vermutlich einige Zeit, bis die Calcium- und Carbonationen bis zu den entsprechenden Nukleations- bzw. Kristallisationsstellen diffundieren. Nach dem erneuten Austausch der CaCO_3 -Lösungen nach der Aufnahme der Bilder (E) betrug die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale 3,8 mM. In allen nachfolgenden Bildern (F) bis (P) in den Abbildungen 48 und 49 ist eindeutig das Wachstum einer Vielzahl von Calciumcarbonatkristallen auf der Probenoberfläche sichtbar. Dabei nahmen die Höhen dieser Kristalle vom Bild (G1) bis zum Bild (P1) deutlich zu. Die genaue Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten mehrerer dieser Calciumcarbonatkristalle erfolgt in Abschnitt 5.2.2.3.

Konzentration der CaCO_3 -Lösung	Gesamtzeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
0,9 mM	302 Minuten	(A)
2,3 mM	70 Minuten	(B) bis (C)
3,2 mM	60 Minuten	(D) bis (E)
3,8 mM	188 Minuten	(F) bis (P)

Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung während des zweiten Wachstumsexperiments auf einer „flat pearl“-Oberfläche (siehe Abb. 48 und 49). Alle Bilder der Probenoberfläche (A) bis (P) wurden über einen Zeitraum von 311 Minuten aufgenommen. Die Probe befand sich vor dem ersten Lösungsaustausch bereits 302 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.

Zum besseren Vergleich sind ab den Bildern (E) in jedem zweiten darauffolgenden Bild beispielhaft zwei Calciumcarbonatkristalle jeweils mit grünen und blauen Pfeilen gekennzeichnet. Die grünen Pfeile in den Bildern (A) und (C) markieren die Stelle auf der Probenoberfläche, an der später einer der beiden gekennzeichneten Calciumcarbonatkristalle gewachsen ist. Man sieht, das Wachstum dieses Kristalls fand gerade dort statt, wo am Anfang des Wachstumsexperiments (Bilder (A)) bereits eine natürlich entstandene Struktur zwischen bzw. an den Filamenten vorhanden war. Auch mehrere andere Calciumcarbonatkristalle sind genau an solchen Stellen gewachsen. Die anfänglich bereits vorhandenen natürlich entstandenen Strukturen zwischen, an und unter den Filamenten konnten anscheinend tatsächlich als Nukleationskeime für das Kristallwachstum wirken.

Darüber hinaus sind auch mehrere Kristalle, von denen einer mit roten Pfeilen markiert ist, durch die in der organischen Matrix vorhandenen Poren gewachsen.

An vielen Stellen in den AFM-Bildern ist nicht eindeutig erkennbar, ob das Calciumcarbonat auf der Oberfläche der interlamellaren organischen Matrix nukleiert ist und die neuen Kristalle anschließend nach oben weitergewachsen sind oder die Calciumcarbonatkristalle von dem darunterliegenden Mineral durch die vorhandenen Poren bzw. Löcher in der interlamellaren organischen Matrix nach oben in die nächste Schicht gewachsen sind [4, 14]. Wie in Abschnitt 5.1.1 erwähnt, befindet sich vermutlich unterhalb der inselartig angeordneten organischen Matrix in den AFM-Aufnahmen bereits Mineral. Vermutlich fand hier Kristallwachstum sowohl in den Poren bzw. Löchern zwischen den einzelnen Filamenten als auch auf der Oberfläche der organischen Matrix statt.

Um eindeutiger klären zu können, wo die Nukleation des Calciumcarbonats vorzugsweise stattfindet und wie das weitere Kristallwachstum erfolgt, müsste entweder (1) die Auflösung, mit der die Aufnahme der einzelnen Bilder erfolgt, von 256 x 256 Pixel auf 512 x 512 Pixel oder auf noch höhere Auflösungen erhöht werden oder (2) bei Verwendung der Auflösung von 256 x 256 Pixel der abgebildete Probenbereich noch weiter verkleinert werden, d. h. eine viel kleinere Scanfläche gewählt werden. Leider nimmt jedoch bei Erhöhung der Auflösung die benötigte Zeit für das Abrastern des gewählten Probenbereichs deutlich zu. Der für die Aufnahme eines Bildes erforderliche Zeitraum und somit auch die Zeitspanne zwischen zwei nacheinander aufgezeichneten Bildern musste so gewählt werden, dass die Beobachtung von möglichst allen Nukleations- und Wachstumsereignissen gelang. Bei sehr kleinen Scanflächen (z. B. von $1,0 \mu\text{m} \cdot 1,0 \mu\text{m}$) ist es sehr wahrscheinlich, dass genau im ausgewählten Probenbereich kein Kristallwachstum stattfindet.

5.2.2.2 Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder

Zur Verdeutlichung und zur besseren Sichtbarkeit des Wachstums bzw. der Höhenzunahme der Calciumcarbonatkristalle sind in den **Abbildungen 51 und 52** die dreidimensionalen Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen) jedes zweiten Höhenbildes (Index 1) aus den Abbildungen 48 und 49 dargestellt. Das Bild (C) der Abbildung 51 zeigt z. B. die dreidimensionale Rekonstruktion des Höhenbildes (C1) aus der Abbildung 48. Bei allen 3D-Rekonstruktionen wurde die gleiche Höhenskala wie bei den Höhenbildern verwendet. Da hier die dreidimensionalen Rekonstruktionen jedes zweiten Höhenbildes gezeigt sind, betragen die Zeitspannen zwischen den Bildern (A), (C), (E) und (G) in der Abbildung 51 jeweils etwa 60 Minuten. Die Zeitabstände zwischen den 3D-Rekonstruktionen in der Abbildung 52 betragen jeweils etwa 30 Minuten.

Die roten Pfeile im Bild (C) der **Abbildung 51** kennzeichnen beispielhaft mehrere

durch das Abrastern der Probenoberfläche mit der feinen Spitze der AFM-Sonde entstandene kleine „Kratzer“ in der weichen organischen Matrix. Vergleicht man diese dreidimensionale Rekonstruktion (C) mit dem tatsächlich aufgenommenen Höhenbild (C1) in der Abbildung 48, so ist ersichtlich, dass es sich bei diesen mit roten Pfeilen gekennzeichneten Strukturen wirklich um Bildartefakte handelt. Um solche Bildartefakte möglichst zu vermeiden, erfolgte das Abbilden der Probenoberfläche mit so wenig Kraft wie möglich. Wie zuvor beschrieben wurde und in den Abbildungen 51 und 52 deutlich erkennbar ist, sind nach dem dritten Austausch der CaCO_3 -Lösungen (hier ab dem Bild (G)) viele Calciumcarbonatkristalle auf der Probenoberfläche gewachsen. Die entstandenen Calciumcarbonatkristalle weisen eine eher spitze und nadelartige Form auf, sind jedoch aufgrund der endlichen Abmessungen und der Geometrie²⁰⁷ der AFM-Spitze in den dreidimensionalen Rekonstruktionen lateral verbreitert²⁰⁸ dargestellt [181, 182]. Bereits bei Betrachtung der Bilder (A) bis (E) ist das Wachstum einiger Calciumcarbonatkristalle beobachtbar. Die blauen und schwarzen Dreiecke sowie das rote Dreieck im Bild (E) markieren beispielhaft mehrere bis zu diesem Zeitpunkt im abgebildeten Probenbereich gewachsene Kristalle. Bei der Aufnahme des Bildes (E) betrug die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale 3,2 mM. Die roten Dreiecke kennzeichnen einen Kristall, dessen Höhe in den 60 Minuten zwischen den Bildern (E) und (G) stärker zugenommen hat als die Höhen der zwei mit schwarzen Dreiecken hervorgehobenen Calciumcarbonatkristalle. Demzufolge sind diese verschiedenen Kristalle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten gewachsen. Dabei werden die Wachstumsgeschwindigkeiten der Calciumcarbonatkristalle auch von den verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale abhängen. Öfters erfolgte auch das Wachstum von zwei oder mehr Kristallen recht dicht nebeneinander. Jeweils zwei solche Kristalle sind im Bild (G) mit blauen, grünen bzw. schwarzen Pfeilen markiert. Darüber hinaus ist ab dem Bild (G) das Wachstum eines Kristalls (grünes Dreieck) zwischen den inselartigen Anordnungen beobachtbar.

Die verschiedenfarbigen Dreiecke und Pfeile in der **Abbildung 52** markieren jeweils dieselben Calciumcarbonatkristalle wie in der Abbildung 51. Die Höhen der zwei in Abbildung 51 mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten Calciumcarbonatkristalle nahmen im weiteren Verlauf des Kristallwachstums in den Bildern (I) bis (O) in der Abbildung 52 deutlich zu, allerdings sind diese zwei Kristalle bis zur Aufnahme des Bildes (O) noch nicht zu einem größeren, einzelnen Kristall zusammengewachsen. Aus mehreren anderen Kristallen haben sich im Bild (O) anscheinend bereits einzelne, größere Kristalle gebildet. Die grünen Pfeile markieren dort einen solchen vermutlich größeren zusammengewachsenen

²⁰⁷Radius, Höhe und Öffnungswinkel

²⁰⁸Die Kristalle sind in allen AFM-Bildern lateral verbreitert dargestellt [181, 182].

Calciumcarbonatkristall. Eine Überprüfung der Aussage z. B. mittels REM-Untersuchung ist erforderlich, da die einzelnen Kristalle bei der AFM-Messung verbreitert dargestellt werden und bei sehr dicht nebeneinander auftretenden, hohen Kristallen der möglicherweise vorhandene Zwischenraum der Kristalle nicht mehr gut mit der AFM-Spitze abgebildet werden kann. Auch die Höhe des Kristalls (grünes Dreieck), der in einem der größeren Zwischenräume der inselartigen Anordnungen entstanden ist, hat merklich zugenommen. Zusätzlich fand das Wachstum weiterer Kristalle im Randbereich dieses Zwischenraums statt. Die weißen Dreiecke im Bild (O) kennzeichnen zwei dieser Kristalle.

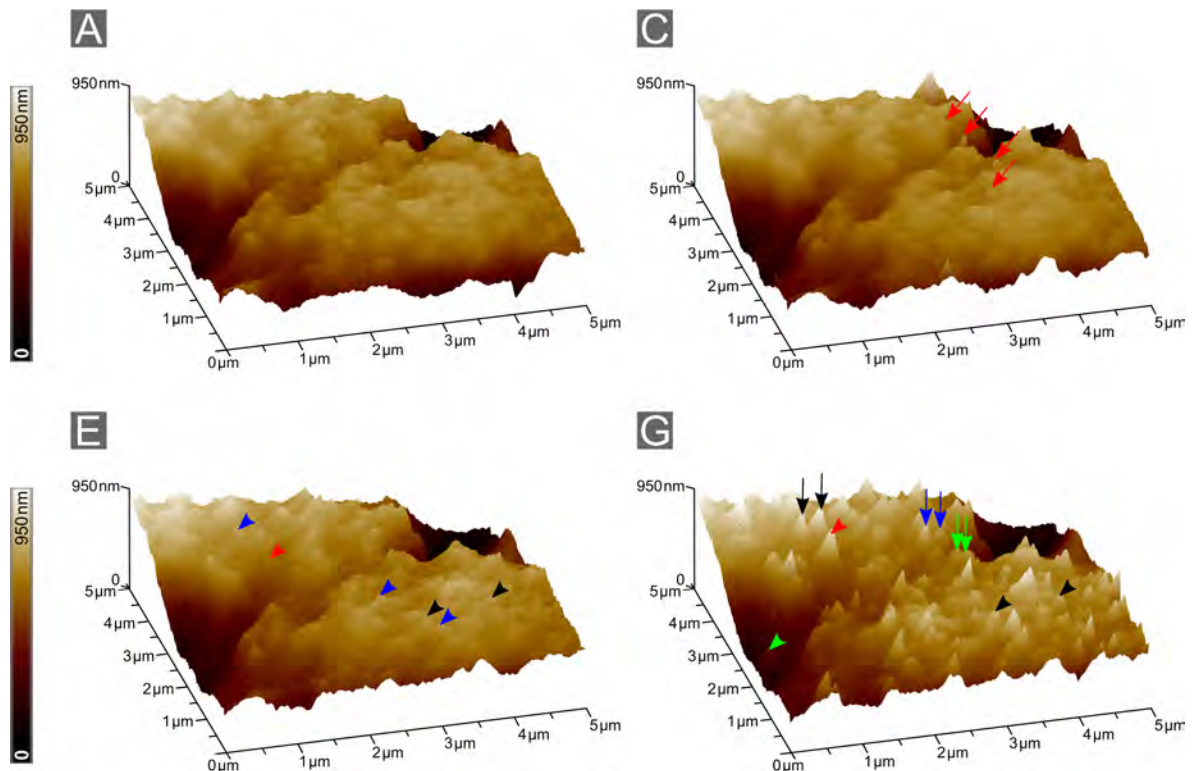


Abbildung 51: Dreidimensionale Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen) der in Abb. 48 dargestellten Höhengsignale (Bilder mit Index 1 und Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$). Beginnend mit der 3D-Rekonstruktion des Höhenbildes (A1) sind die 3D-Rekonstruktionen jedes zweiten Höhenbildes dargestellt. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) bis (C) $2,3\ \text{mM}$, (D) bis (E) $3,2\ \text{mM}$ und (F) bis (H) $3,8\ \text{mM}$. Die roten Pfeile in (C) markieren mehrere Bildartefakte, die durch das Abrastern der Probenoberfläche mit der AFM-Spitze entstanden sind (siehe zum Vergleich Höhenbild (C1) in Abb. 48). Ab der Konzentration von $3,2\ \text{mM}$ in (E) ist das Wachstum mehrerer CaCO_3 -Kristalle auf der Probenoberfläche beobachtbar. Einige Kristalle, die mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten gewachsen sind, sind in (E) und (G) mit verschiedenfarbigen Dreiecken und Pfeilen markiert. Die jeweils mit schwarzen, grünen und blauen Pfeilen markierten Kristalle haben sich dicht nebeneinander gebildet.

Die während des Wachstumsexperiments auf der Probenoberfläche gewachsenen Calciumcarbonatkristalle weisen deutlich nadelartige Formen auf. Die Bezeichnung „nadelartig“ oder „nadelförmig“ bedeutet dabei, dass die Länge bzw. die Höhe des Kristalls viel größer ist als dessen Breite bzw. laterale Ausdehnung. Offensichtlich ist das Calciumcarbonat zu Beginn des AFM-Experiments zunächst in der Form von kleinen, spitzen und nadelförmigen Kristallen entlang der \vec{c} -Achse in [001]-Richtung gewachsen. Später sind diese kleinen nadelartigen Calciumcarbonatkristalle ab einer bestimmten Höhe bereits verstärkt in die lateralen Richtungen²⁰⁹ entlang der \vec{a} - und \vec{b} -Achsen weitergewachsen und im weiteren Verlauf teilweise schon zu größeren Kristallen zusammengewachsen [3, 5].

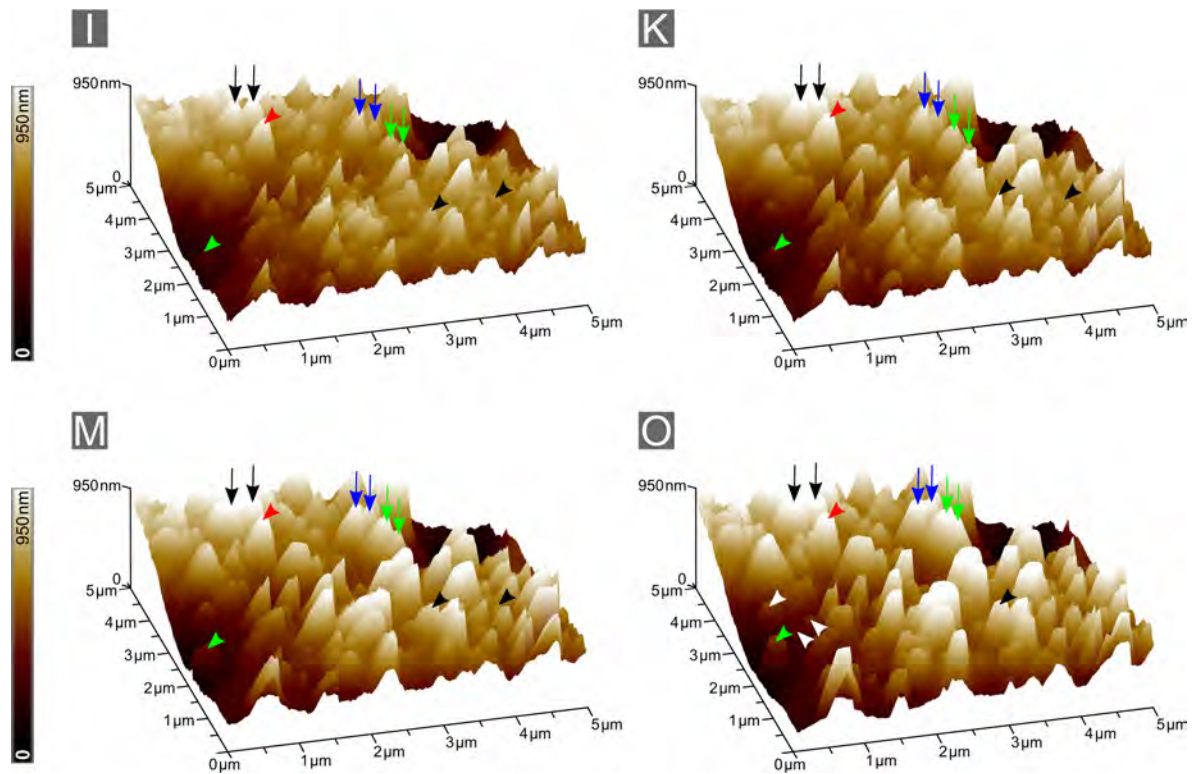


Abbildung 52: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 49 dargestellten Höhenprofile (Bilder mit Index 1 und Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$). Dabei sind die 3D-Rekonstruktionen jedes zweiten Höhenbildes gezeigt. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betrug von (I) bis (P) $3,8\ \text{mM}$. Das Wachstum vieler spitzer, nadelförmiger CaCO_3 -Kristalle ist deutlichst erkennbar. Die verschiedenfarbigen Dreiecke und Pfeile kennzeichnen dieselben Kristalle wie in Abb. 51. Öfters sind zwei oder mehr Kristalle recht dicht nebeneinander gewachsen (z. B. jeweils schwarze, grüne und blaue Pfeile), die dann im weiteren Verlauf des Kristallwachstums vermutlich teilweise bereits einzelne, größere Kristalle gebildet haben.

²⁰⁹[100]- und [010]-Richtung

Die während dieses zweiten Wachstumsexperiments erhaltenen AFM-Aufnahmen (siehe Abb. 48 bis 52) und die Erkenntnisse aus dem ersten Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche (siehe Abb. 43 bis 47) erlauben die Annahme, dass das Calciumcarbonat einerseits auf dem Mineral, das durch die organische Matrix bedeckt ist, nukleiert und die neu entstehenden Kristalle anschließend als spitze Nadeln durch die vorhandenen Poren in der interlamellaren organischen Matrix in die nächste Schicht weiterwachsen. Diese spitzen nadelartigen Kristalle wachsen danach verstärkt in die lateralen Richtungen ([100]- und [010]-Richtung) weiter und bilden größere Kristalle [3, 5]. Andererseits entstehen die Calciumcarbonatkristalle vermutlich auch direkt auf der Oberfläche der organischen Matrix [14].

Bis jetzt wurden nur qualitative Aussagen über die Geschwindigkeiten, mit der sich die Höhen der betrachteten Calciumcarbonatkristalle änderten, getroffen. Daher erfolgt im nachfolgenden Abschnitt die quantitative Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten mehrerer ausgewählter Kristalle.

5.2.2.3 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten

Zur Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit eines Calciumcarbonatkristalls wird sowohl die Änderung der Höhe des Kristalls als auch die Zeitspanne dieser Höhenänderung benötigt. Dazu muss zunächst die Bestimmung der Höhendifferenzen desselben Calciumcarbonatkristalls bezüglich eines Referenzpunktes in zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommenen Höhenbildern erfolgen. Die **Abbildung 53** zeigt beispielhaft die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit eines einzelnen Calciumcarbonatkristalls aus den Höhenbildern (F1) und (G1) der Abbildung 48. In beiden Höhenbildern (F1) und (G1) wurde jeweils entlang der blauen Linie, deren Hervorhebung zusätzlich jeweils mit einem blauen Pfeil erfolgte, mit Hilfe der AFM-Software ein horizontal verlaufendes Höhenprofil ermittelt. Diese Höhenprofile sollten dabei möglichst mittig und an der höchsten Stelle durch den zu vermessenden Kristall verlaufen. Die erhaltenen Höhenprofile sind jeweils unter dem entsprechenden Höhenbild in der Abbildung 53 dargestellt. Zur besseren Sichtbarkeit kennzeichnen die grünen Pfeile den betrachteten Kristall sowohl in den Höhenbildern als auch in den Höhenprofilen.

Betrachtet man nun das Höhenbild (F1) und das zugehörige Höhenprofil, so kennzeichnen die zwei roten Linien die Positionen der zwei Marker, die zur Ermittlung der Höhendifferenz Verwendung fanden. Dabei wurde der eine Marker auf die höchste Stelle des Calciumcarbonatkristalls gesetzt und der zweite Marker auf einen gewählten Referenzpunkt. Anhand der bei den zwei verschiedenen Markerpositionen abgelesenen Höhen h_{1a}^{210}

²¹⁰ h_{1a} entspricht dem an der höchsten Stelle des Kristalls abgelesenen Höhenwert.

und h_{1b} ²¹¹ erfolgte nun die Berechnung der Höhendifferenz $\Delta h_1 = h_{1a} - h_{1b}$ des Calciumcarbonatkristalls im Höhenbild (F1). Analog wurde die Höhendifferenz $\Delta h_2 = h_{2a} - h_{2b}$ desselben Kristalls aus dem Höhenprofil, das im Höhenbild (G1) ebenfalls entlang der blauen Linie verläuft, bestimmt. Ist der Kristall zwischen den hier gezeigten Höhenbildern (F1) und (G1) gewachsen, so muss für die ermittelten Höhendifferenzen $\Delta h_2 > \Delta h_1$ gelten, d. h. die aus dem zweiten Höhenbild (G1) berechnete Höhendifferenz Δh_2 muss größer sein als die Höhendifferenz Δh_1 aus dem Höhenbild (F1). Anschließend wurde aus beiden Höhendifferenzen die Höhenänderung Δh des Calciumcarbonatkristalls zwischen den beiden Bildern mit $\Delta h = \Delta h_2 - \Delta h_1$ berechnet. Da zusätzlich die Zeitpunkte, an denen die Aufnahmen der jeweiligen Höhenbilder erfolgten, bekannt sind, konnte der zwischen den zwei Höhenbildern verstrichene Zeitraum Δt ermittelt werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit v des Calciumcarbonatkristalls ergab sich nun als Quotient aus der Höhenänderung Δh und dem zwischen den Bildern vergangenen Zeitraum Δt gemäß der Formel $v = \frac{\Delta h}{\Delta t} = \frac{\Delta h_2 - \Delta h_1}{\Delta t}$.

Wie sowohl in den Höhenbildern selbst als auch in den Höhenprofilen erkennbar ist, fand Wachstum des betrachteten Calciumcarbonatkristalls (grüner Pfeil) zwischen den Aufnahmen der zwei Höhenbilder (F1) und (G1) statt. Aus den Höhenbildern ergaben sich Höhendifferenzen von $\Delta h_1 = (220 \pm 10)$ nm und $\Delta h_2 = (320 \pm 10)$ nm für den Kristall. Damit wurde die Höhenänderung des Calciumcarbonatkristalls zu $\Delta h = (100 \pm 20)$ nm bestimmt. Der Zeitraum zwischen den Aufnahmen der beiden Höhenbilder betrug dabei $\Delta t = (29 \pm 2)$ min bzw. $\Delta t = (1740 \pm 120)$ s. Somit ergab sich die Wachstumsgeschwindigkeit des betrachteten Calciumcarbonatkristalls zwischen den Höhenbildern (F1) und (G1) zu $v = (3, 4 \pm 0, 9) \frac{\text{nm}}{\text{min}} = (5, 7 \pm 1, 5) \cdot 10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$.

Der Fehler der angegebenen Wachstumsgeschwindigkeit wurde wie folgt ermittelt. Die einzelnen Höhendifferenzen Δh_1 und Δh_2 konnten jeweils mit einer Genauigkeit von ± 10 nm aus den entsprechenden Höhenprofilen abgelesen werden²¹². Da anschließend eine Differenzbildung aus diesen zwei ermittelten Höhendifferenzen erfolgte, ergab sich für die Höhenänderung Δh ein Fehler von ± 20 nm, der hier einem relativen Fehler von 20 % entspricht. Für die Zeitdifferenz Δt zwischen den Aufnahmen der Höhenbilder wurde ein Fehler von ± 2 min bzw. von ± 120 s angenommen, da die Angabe der Zeitpunkte der Bildaufnahmen jeweils mit einer Genauigkeit von ± 1 min erfolgte. Der Fehler der Zeitdifferenz entspricht hier einem relativen Fehler von etwa 7 %. Da die Wachstumsgeschwindigkeit gemäß der Formel $v = \frac{\Delta h}{\Delta t}$ berechnet wurde, erhielt man nun für die ermittelte Wachstumsgeschwindigkeit des betrachteten Kristalls einen relativen Fehler von etwa 27 %.

²¹¹ h_{1b} entspricht dem Höhenwert des gewählten Referenzpunktes.

²¹²Die Ermittlung der Höhendifferenzen erfolgte direkt mit dem Auswertungsprogramm NanoScope Analysis 1.8.

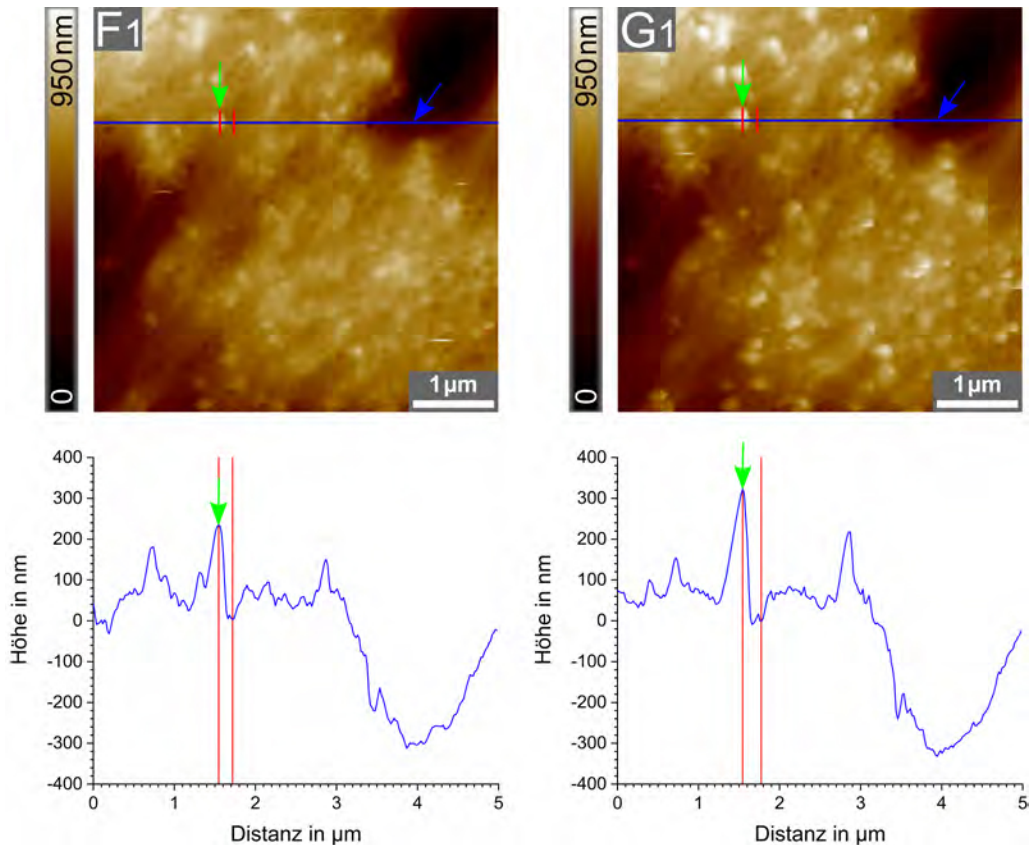


Abbildung 53: Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit eines CaCO_3 -Kristalls aus den Höhenbildern (F1) und (G1) der Abb. 48. Aus jedem Höhenbild wurde dazu ein Höhenprofil, das jeweils entlang der blauen Linie verläuft, ermittelt. Die Höhenprofile sind jeweils unter dem entsprechenden Höhenbild dargestellt. Die roten Linien in den Höhenbildern und den Höhenprofilen kennzeichnen jeweils die Markerpositionen zur Ermittlung der Höhendifferenz.

Insgesamt erfolgte die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten von 20 verschiedenen Calciumcarbonatkristallen aus den Höhenbildern (D1) bis (P1). Die Wachstumsgeschwindigkeiten wurden dabei ab dem Bild (D1) bestimmt, da das Kristallwachstum erst ab diesem Zeitpunkt auf der Probenoberfläche deutlich sichtbar ist. Die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten der ausgewählten Kristalle erfolgte separat für die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale von 3,2 mM (Bild (D1) bis kurz vor dem dritten Austausch) und von 3,8 mM (Bilder (F1) bis (P1)). Für die Konzentration von 3,8 mM wurden zusätzlich die Wachstumsgeschwindigkeiten in den ersten 29 Minuten vom Bild (F1) bis zum Bild (G1) ermittelt. Dabei fand die Aufnahme des Bildes (F1) nur sieben Minuten nach dem dritten Lösungsaustausch statt. In der **Abbildung 54** sind die betrachteten Kristalle jeweils mit einem grünen Pfeil und fortlaufend mit (1) bis (20) gekennzeichnet. Die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten in der Einheit $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ für

diese Kristalle in den zwei unterschiedlichen Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung (3,2 mM und 3,8 mM) finden sich in der Tabelle 6. Die Fehler dieser Wachstumsgeschwindigkeiten wurden genauso wie bereits zuvor für den mit (1) markierten Kristall berechnet.

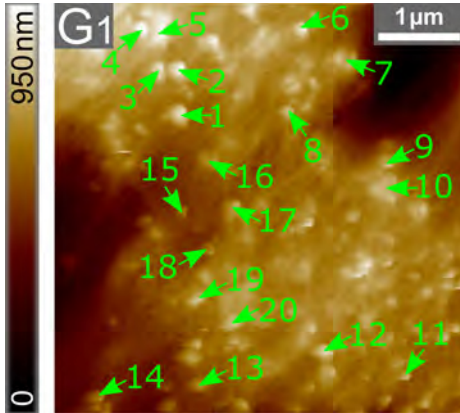


Abbildung 54: Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten ausgewählte CaCO_3 -Kristalle. Dargestellt ist das AFM-Höhenbild (G1) aus Abb. 48. Die einzelnen betrachteten Kristalle sind jeweils mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet und mit (1) bis (20) nummeriert. Die zu den Kristallen ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten finden sich in Tabelle 6.

Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten von mehreren der ausgewählten Calciumcarbonatkristalle in der 3,2 mM CaCO_3 -Lösung vom Höhenbild (D1, 380. Minute) bis zum dritten Austausch (432. Minute) gelang nicht. Entweder konnte dort noch kein Kristallwachstum beobachtet werden oder die ermittelten Höhenänderungen der betrachteten Kristalle waren nur sehr gering. Bei diesen sehr kleinen Höhenänderungen ergaben sich hier relative Fehler von 80 % bis 90 % für die Wachstumsgeschwindigkeiten. Daher wurden diese Wachstumsgeschwindigkeiten nicht weiter betrachtet und nicht angegeben. Auch die relativen Fehler der in Tabelle 6 angegebenen Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle in der 3,2 mM CaCO_3 -Lösung betragen größtenteils etwa 40 % bis 50 % aufgrund kleiner Höhenzunahmen. Dennoch sind die Kristalle in der 3,2 mM CaCO_3 -Lösung über den Zeitraum von 49 Minuten langsamer gewachsen als im Zeitraum von 29 Minuten (Bilder (F1) bis (G1)) bei Verwendung der Konzentration von 3,8 mM. Dabei fand der Lösungsaustausch kurz vor der Aufnahme der Bilder (F) statt. Die Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle unterscheiden sich auch bei gleicher genutzter Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale. Bei Betrachtung der Wachstumsgeschwindigkeiten für die ersten 29 Minuten (Bilder (F1) bis (G1)), in denen sich das Probestück in der 3,8 mM CaCO_3 -Lösung befand, fällt auf, dass das Kristallwachstum dort etwa 1,2-fach bis 3-fach schneller ablief als in den gesamten 163 Minuten von den Bildern (F1) bis (P1). Die Tabelle 19 im Anhang in Abschnitt 10.3 zeigt die ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten aus der Tabelle 6 in der Einheit $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$.

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$		
		bei der Konzentration von 3,2 mM über den Zeitraum von 49 min (Bild (D1) bis kurz vor dem Austausch)	bei der Konzentration von 3,8 mM über den Zeitraum von 29 min (Bilder (F1) bis (G1))	bei der Konzentration von 3,8 mM über den Zeitraum von 163 min (Bilder (F1) bis (P1))
Calcium-carbonat-kristall	(1)	$2,2 \pm 0,8$	$5,7 \pm 1,5$	$2,8 \pm 0,4$
	(2)	$1,5 \pm 0,7$	$5,5 \pm 1,5$	$3,7 \pm 0,3$
	(3)	—————	$6,6 \pm 1,6$	$3,8 \pm 0,3$
	(4)	$1,6 \pm 0,8$	$5,7 \pm 1,5$	$2,8 \pm 0,3$
	(5)	$2,6 \pm 0,8$	$6,1 \pm 1,6$	$2,8 \pm 0,3$
	(6)	$1,5 \pm 0,8$	$6,7 \pm 1,6$	$2,2 \pm 0,3$
	(7)	—————	$4,3 \pm 1,4$	$3,6 \pm 0,3$
	(8)	—————	$4,0 \pm 1,4$	$3,1 \pm 0,3$
	(9)	—————	$2,8 \pm 1,3$	$2,3 \pm 0,3$
	(10)	—————	$3,1 \pm 1,4$	$2,5 \pm 0,3$
	(11)	—————	$3,4 \pm 1,4$	$1,1 \pm 0,2$
	(12)	—————	$5,7 \pm 1,5$	$1,8 \pm 0,2$
	(13)	$1,7 \pm 0,7$	$3,7 \pm 1,4$	$1,6 \pm 0,2$
	(14)	—————	$6,2 \pm 1,6$	$2,4 \pm 0,3$
	(15)	—————	$4,2 \pm 1,4$	$2,1 \pm 0,3$
	(16)	—————	$2,9 \pm 1,3$	$2,2 \pm 0,3$
	(17)	$1,7 \pm 0,7$	$4,6 \pm 1,4$	$2,0 \pm 0,2$
	(18)	—————	$5,2 \pm 1,5$	$3,5 \pm 0,3$
	(19)	—————	$3,1 \pm 1,4$	$2,5 \pm 0,3$
	(20)	$1,6 \pm 0,8$	$5,9 \pm 1,6$	—————

Tabelle 6: Aus den AFM-Höhenbildern der Abb. 48 und 49 berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ von 20 verschiedenen CaCO_3 -Kristallen in zwei der verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale (3,2 mM und 3,8 mM). Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte ab dem Bild (D1), da erst ab diesem Zeitpunkt das Kristallwachstum auf der Probenoberfläche deutlich beobachtbar ist.

Die Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle sind offenbar direkt nach dem Austausch der CaCO_3 -Lösungen (Bilder (F1) bis (G1)) am höchsten und nehmen während des weiteren Kristallwachstums im Verlauf der Bilder (G1) bis einschließlich (P1) wieder ab. Direkt nach dem Lösungsaustausch stehen viele Calciumionen (Ca^{2+} -Ionen) und Carbonationen (CO_3^{2-} -Ionen) für das Wachstum zur Verfügung, sodass das Kristallwachstum offenbar zunächst schnell erfolgen kann. Während des weiteren Wachstums nehmen die Geschwindigkeiten, mit der sich die Höhen der einzelnen Calciumcarbonatkristalle ändern, wieder ab. Dafür gibt es drei Gründe. (1) Die in der Petrischale verbleibende Konzentration der CaCO_3 -Lösung wird geringer, da die Calcium- und Carbonationen für

das Wachstum benötigt werden [4]. (2) Entsprechend der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Gleichgewichtsreaktion stellt sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht zwischen Zersetzung und Wachstum des Calciumcarbonats ein, sodass der Austausch der CaCO_3 -Lösungen während des Wachstumsexperiments möglichst in regelmäßigen Abständen erfolgen sollte [4, 10]. (3) Wie zuvor beschrieben, bilden sich vermutlich zunächst vor allem spitze, nadelartige Kristalle in Wachstumsrichtung entlang der \vec{c} -Achse, die anschließend auch verstärkt in die lateralen Richtungen entlang der \vec{a} - und \vec{b} -Achsen weiterwachsen [3, 5]. Deshalb können die Wachstumsgeschwindigkeiten von den Bildern (F1) bis (G1) auch höher sein als die Wachstumsgeschwindigkeiten von den Bildern (F1) bis (P1). Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der verwendeten Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale konnte bei diesem Wachstumsexperiment nicht detailliert genug untersucht werden. Zum besseren Vergleich müsste die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten über vergleichbare Gesamtzeiträume, in denen sich die Probe jeweils in einer anderen Konzentration der CaCO_3 -Lösung befand, stattfinden. Der Vergleich der bei diesem AFM-Experiment ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten mit den Wachstumsgeschwindigkeiten, die bei verschiedenen Wachstumsexperimenten auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen erhalten wurden, erfolgt später in Abschnitt 5.4.

5.2.2.4 Ergänzende Charakterisierung der Wachstumsfront nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM

Nach Abschluss des AFM-Wachstumsexperiments und dem darauffolgenden Ausbau der Petrischale mit fixierter Probe aus dem AFM wurde die in der Petrischale vorhandene CaCO_3 -Lösung mittels Pipette entnommen und die Probe mehrfach mit Reinstwasser sorgfältig abgespült. Anschließend erfolgte das Entfernen von kleinen in der Petrischale übriggebliebenen Lösungstropfen mit fusselreifen Tüchern²¹³ und die Trocknung der Probe über einen Zeitraum von 10 Tagen im Kühlraum bei 6 °C [4]. Die Vorbereitung des getrockneten Probestücks für die REM-Untersuchung fand gemäß dem in Abschnitt 4.5 beschriebenen Präparationsverfahren statt. Dazu wurde der Petrischalenrand entfernt sowie der übriggebliebene Petrischalenboden mit fixierter Probe mittels elektrisch leitfähigem Haftaufkleber²¹⁴ auf einem runden Probesteller²¹⁵ befestigt und zusätzlich mit leitfähigem, kupferbeschichtetem Klebeband²¹⁶ kontaktiert. Die Untersuchung der Probe mit dem REM erfolgte im unbeschichteten Zustand, d. h. ohne zusätzliche leitfähige Beschichtung

²¹³VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

²¹⁴25 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²¹⁵32 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²¹⁶6,4 mm Breite, einseitig klebend; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

der Probenoberfläche [4]. Alle Bilder wurden mit dem SE2-Detektor²¹⁷ aufgenommen, wobei ein Aperturblendendurchmesser von 30 μm und ein Neigungswinkel des Proben­tisches von 0° Verwendung fanden [4].

In den **Abbildungen 55 und 56** ist die mit dem REM aufgenommene Oberfläche des „flat pearl“-Probestücks nach dem AFM-Wachstumsexperiment (siehe Abb. 48 und 49) dargestellt. Die Abbildung 55 zeigt die Probenoberfläche mit den Scanflächen von 650 μm · 867 μm beim Bild (A), von 127 μm · 169 μm beim Bild (B), von 83 μm · 111 μm beim Bild (C), von 32 μm · 43 μm beim Bild (D), von 40 μm · 54 μm beim Bild (E) und von 40 μm · 53 μm beim Bild (F). Dabei wurden für die Aufnahmen der Bilder (A), (B) und (F) eine Beschleunigungsspannung von 0,75 kV und für die Aufnahmen der Bilder (C) bis (E) eine Beschleunigungsspannung von 0,60 kV verwendet. Die Abbildung 56 zeigt die Probenoberfläche dann viel besser aufgelöst mit den Scanflächen von 28 μm · 38 μm beim Bild (A), von 14 μm · 18 μm beim Bild (B), von 7 μm · 10 μm beim Bild (C), von 6 μm · 7 μm beim Bild (D), von 9 μm · 13 μm beim Bild (E) und von 13 μm · 17 μm beim Bild (F). Dort fand bei den Aufnahmen der Bilder (A) bis (F) eine Beschleunigungsspannung von 0,75 kV Verwendung [4].

In den Übersichtsaufnahmen (A) bis (C) der **Abbildung 55** ist inselförmig gewachsenes Mineral, bei dem es sich wahrscheinlich um natürlich entstandene Calcitkristalle oder natürlich entstandene sphärolithische Aragonitkristalle handelt, auf dem darunter befindlichen Deckgläschen sichtbar [3, 180]. Die grünen Pfeile in den Bildern (A) und (B) markieren mehrere solche inselartigen Mineralanordnungen. Der Vergleich dieser REM-Aufnahmen mit den AFM-Aufnahmen des Probestücks (siehe Abb. 37, 38, 48 und 49) erlaubt die Annahme, dass die in den REM-Aufnahmen sichtbaren Mineralinseln bei dem frisch präparierten Probestück der Wachstumsfront ursprünglich mit organischer Matrix bedeckt waren²¹⁸. Zwischen den verschiedenen Mineralinseln ist das Deckglas, dessen Inkubation im extrapallialen Raum zwischen dem Mantelepithel und der Innenseite der Schale ursprünglich für 10 Tage erfolgte, beobachtbar. Vermutlich ist dieses Deckgläschen dort ebenfalls mit organischer Matrix bedeckt [3, 4]. Die weißen Pfeile in den Bildern (A) und (B) markieren beispielhaft das Deckglas in den Zwischenräumen der Mineralinseln, das sich bei der REM-Untersuchung trotz der Verwendung nur kleiner Beschleunigungsspannungen von 0,60 kV oder 0,75 kV sehr schnell aufgrund des Abrasterns der Probenoberfläche mittels Elektronenstrahl aufgeladen hat. Diese Aufladungen sind an den hellen, weißen Bereichen auf der Probenoberfläche erkennbar [4].

²¹⁷siehe Abschnitt 3.2

²¹⁸Da das Probestück für die REM-Untersuchung nicht leitfähig beschichtet wurde, ist die möglicherweise vorhandene organische Matrix in den REM-Aufnahmen nicht sichtbar [4].

Bereits in den Bildern (B) und (C) ist erkennbar, dass sich auf den Oberflächen dieser inselartigen Mineralanordnungen jeweils kleine dünne, aus Calciumcarbonat bestehende, Kristalle befinden. Die roten Pfeile kennzeichnen beispielhaft mehrere Mineralinseln, auf denen viele solcher kleineren sehr dicht nebeneinander gewachsenen Kristalle existieren. In den Bildern (D) bis (F) sind viele dieser Calciumcarbonatkristalle, die eindeutig nadelartige Formen aufweisen, besser beobachtbar. Die gelben Pfeile im Bild (D) markieren mehrere einzelne nadelförmige Kristalle. Auf der Probenoberfläche treten einerseits Bereiche auf, in denen die nadelförmigen Kristalle über die gesamten Mineralinseln gewachsen sind und andererseits Bereiche, in denen diese Kristallnadeln verstärkt oder nur am Rand der Mineralinseln vorhanden sind. Die blauen Pfeile in den Bildern (B) und (C) kennzeichnen im Gegensatz zu den roten Pfeilen Bereiche, in denen die Calciumcarbonatkristalle nur am Rand der Mineralinseln auftreten. Die Bilder (E) und (F) zeigen weitere mit dem REM aufgenommene Oberflächenbereiche des Probestücks, in denen besonders viele dieser nadelförmigen Kristalle mit sehr hohen Oberflächendichten gewachsen sind.

Um die einzelnen auf den Mineralinseln gewachsenen Kristalle noch besser zu charakterisieren, wurden weitere REM-Aufnahmen mit höheren Auflösungen aufgenommen. Die **Abbildung 56** zeigt nun REM-Aufnahmen des Probestücks mit höheren Vergrößerungen, d. h. kleineren Scanflächen, deren Angabe schon erfolgte. Bereits im Bild (A) ist gut erkennbar, dass die auf der Oberfläche des inselartig gewachsenen Minerals vorhandenen Kristalle eindeutig nadelförmig sind. Der grün hervorgehobene Bereich aus dem Bild (A) ist im Bild (B) entsprechend vergrößert dargestellt und das Bild (C) zeigt eine noch weiter vergrößerte Aufnahme des Bildes (B). Die gelben Dreiecke im Bild (B) markieren sechs verschiedene nadelartige Calciumcarbonatkristalle. Diese Kristalle weisen dabei unterschiedliche Höhen und verschiedene laterale Ausdehnungen bzw. Durchmesser auf. Zum Aspektverhältnis, das sich aus Höhe und Durchmesser der Kristallnadeln ergeben würde, können keine Aussagen getroffen werden, da die Aufnahmen der REM-Bilder unter einem schrägen Winkel²¹⁹ zwischen Probenoberfläche und SE2-Detektor erfolgten und dadurch Höhe und Durchmesser nur sehr ungenau bestimmt werden können. Die roten Dreiecke im Bild (C) kennzeichnen z. B. zwei Kristalle, die jeweils nur eine geringe laterale Ausdehnung und eine geringe Höhe aufweisen. Diese zwei Kristalle haben vermutlich erst kurze Zeit zuvor begonnen zu wachsen. Die blauen, grünen und weißen Dreiecke markieren hingegen bereits deutlich höhere Kristalle. Dabei weisen die mit grünen Dreiecken hervorgehobenen Kristalle größere laterale Ausdehnungen bzw. Durchmesser auf als die mit weißen und blauen Dreiecken gekennzeichneten Kristalle. Die Bildung dieser zwei größeren, mit grünen Drei-

²¹⁹Die REM-Untersuchung erfolgte bei einem Neigungswinkel des Probenstisches von 0°, jedoch ist der SE2-Detektor seitlich in einem schrägen Winkel zum Probenstisch angebracht (siehe Abschnitt 3.2) [148].

ecken markierten Kristalle ist vermutlich jeweils durch das Zusammenwachsen von zwei oder mehr dünnen, sehr dicht nebeneinander entstandenen Kristallnadeln bedingt. Das Wachstum anderer spitzer, nadelförmiger Calciumcarbonatkristalle erfolgte ebenfalls in unmittelbarer Nähe voneinander, jedoch sind diese Kristalle nicht zusammengewachsen (weiße Dreiecke). Die mit blauen Dreiecken gekennzeichneten Kristallnadeln sind eher einzeln gewachsen und recht dünn. Im Bild (D) sind einige der vorhandenen Kristallnadeln offenbar abgebrochen bzw. „umgeknickt“ (rot-weiße Dreiecke). Dieses „Abknicken“ ist vermutlich durch die Präparation der Probe für die REM-Untersuchung bedingt. Das Bild (E) zeigt einen Probenbereich, in dem viele der Calciumcarbonatnadeln mit einer sehr hohen Oberflächendichte gewachsen sind und sogar das darunterliegende Mineral nicht mehr erkennbar ist. Im Bild (F) hingegen tritt nur eine geringe Anzahl dieser nadelartigen Kristalle auf. Einige dieser Kristalle sind im Bild (F) in einem Bereich, in dem das Wachstum erst angefangen hat, mit weiß-schwarzen Pfeilen markiert.

Die während des AFM-Experiments erfolgte direkte Beobachtung des Wachstums mehrerer nadelartiger Calciumcarbonatkristalle auf der Wachstumsfront (siehe Abb. 48 und 49) und die anschließende Charakterisierung desselben „flat pearl“-Probestücks mit dem REM (siehe Abb. 55 und 56) ermöglichen die Schlussfolgerung, dass die in den REM-Aufnahmen sehr deutlich erkennbaren nadelförmigen Calciumcarbonatkristalle während des AFM-Wachstumsexperiments auf dem darunterliegenden inselartig geformten Mineral gewachsen sind. Vermutlich erfolgte das Wachstum der Calciumcarbonatnadeln größtenteils durch die in den AFM-Aufnahmen gut beobachtbaren Poren bzw. Löcher zwischen den verschiedenen Chitinfilamenten der organischen Matrix, aber auch auf der Oberfläche dieser organischen Matrix [5, 14].

Betrachtet man im Bild (D) einen Oberflächenbereich von $6\ \mu\text{m} \cdot 7\ \mu\text{m}$, so zählt man dort etwa 145 ± 20 nadelförmige Calciumcarbonatkristalle [4]. Einerseits kann bei mehreren Kristallen in der REM-Aufnahme nur schwer entschieden werden, ob jeweils das Wachstum von mehreren Kristallnadeln direkt nebeneinander stattfand oder es sich bereits um einen einzelnen größeren Kristall handelt [4]. Andererseits liegen auch mehrere abgebrochene Kristalle auf der Probenoberfläche. Damit ergab sich für den im Bild (D) gezeigten Probenbereich eine Oberflächendichte der Calciumcarbonatnadeln von $(3,5 \pm 0,5)\ \mu\text{m}^{-2}$. Allerdings wurde hier für die Ermittlung der Oberflächendichte nur ein kleiner Probenbereich mit einer hohen Dichte von etwa in gleichem Abstand zueinander gewachsenen Kristallnadeln betrachtet. In den REM-Aufnahmen bei größeren Scanflächen²²⁰ ist deutlich zu sehen, dass diese nadelförmigen Calciumcarbonatkristalle jedoch nicht homogen über die gesamte Oberfläche verteilt sind.

²²⁰Eine größere Scanfläche entspricht einer geringeren Vergrößerung.

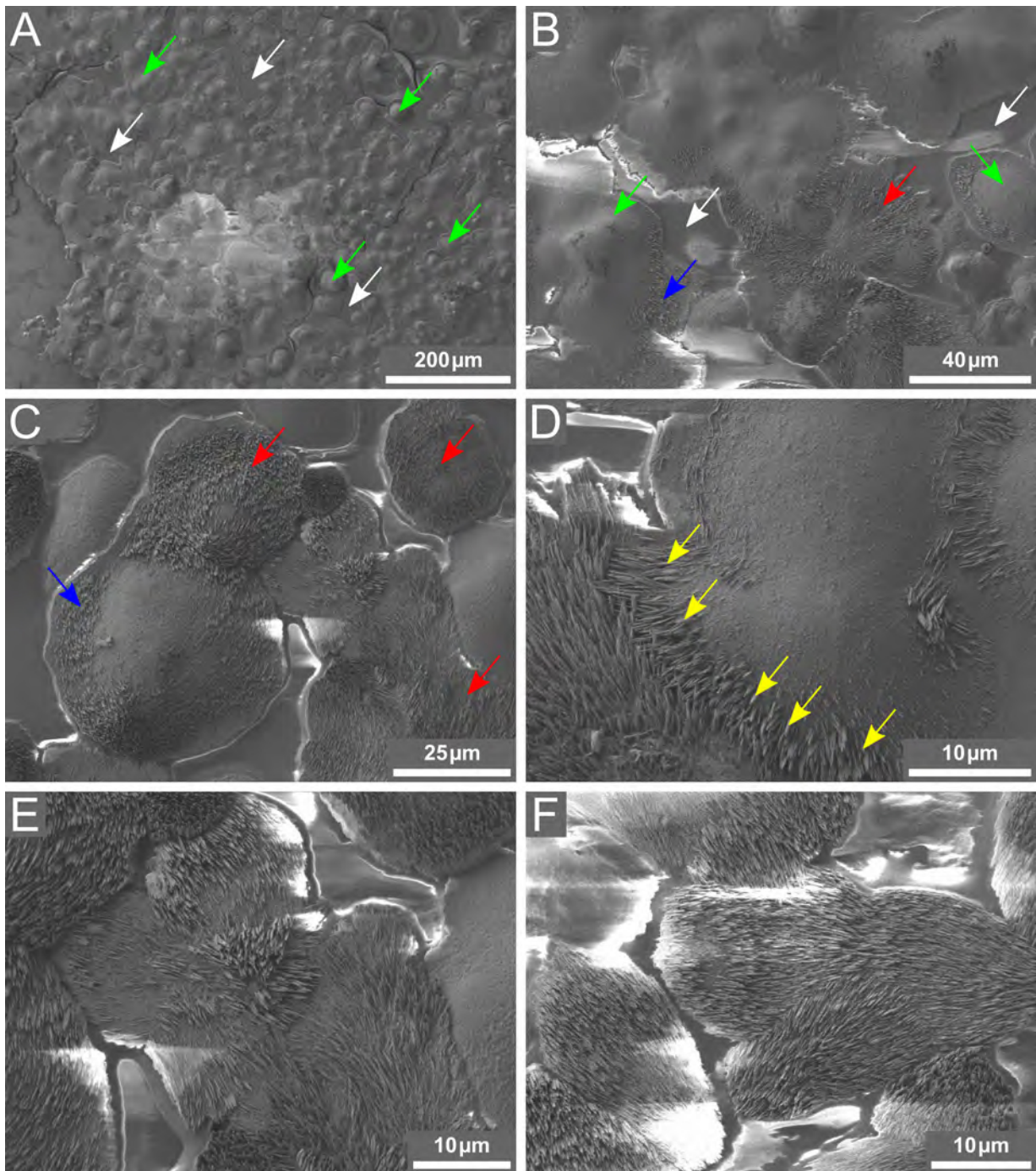


Abbildung 55: REM-Aufnahmen des „flat pearl“-Bruchstücks (Inkubation von 10 Tagen zwischen dem Mantelepithel des Schneckenkörpers und der Schaleninnenseite) nach dem AFM-Wachstumsexperiment (siehe Abb. 48 und 49). Scanflächen: (A) $650\ \mu\text{m} \cdot 867\ \mu\text{m}$, (B) $127\ \mu\text{m} \cdot 169\ \mu\text{m}$, (C) $83\ \mu\text{m} \cdot 111\ \mu\text{m}$, (D) $32\ \mu\text{m} \cdot 43\ \mu\text{m}$, (E) $40\ \mu\text{m} \cdot 54\ \mu\text{m}$ und (F) $40\ \mu\text{m} \cdot 53\ \mu\text{m}$; Neigungswinkel des Probestisches: 0° . Auf dem zwischen Mantelepithel und Schale inkubierten Deckgläschen (weiße Pfeile in (A) und (B)) ist deutlich inselförmig gewachsenes Mineral (grüne Pfeile in (A) und (B)) zu erkennen (vgl. [3]). Auf den Oberflächen dieser Mineralinseln befinden sich viele, vermutlich während des AFM-Experiments entstandene, Kristalle (rote und blaue Pfeile in (B) und (C)). Die gelben Pfeile in (D) markieren beispielhaft mehrere einzelne nadelförmige CaCO_3 -Kristalle auf dem darunterliegenden Mineral. (E) und (F) zeigen weitere Oberflächenbereiche des Probestücks.

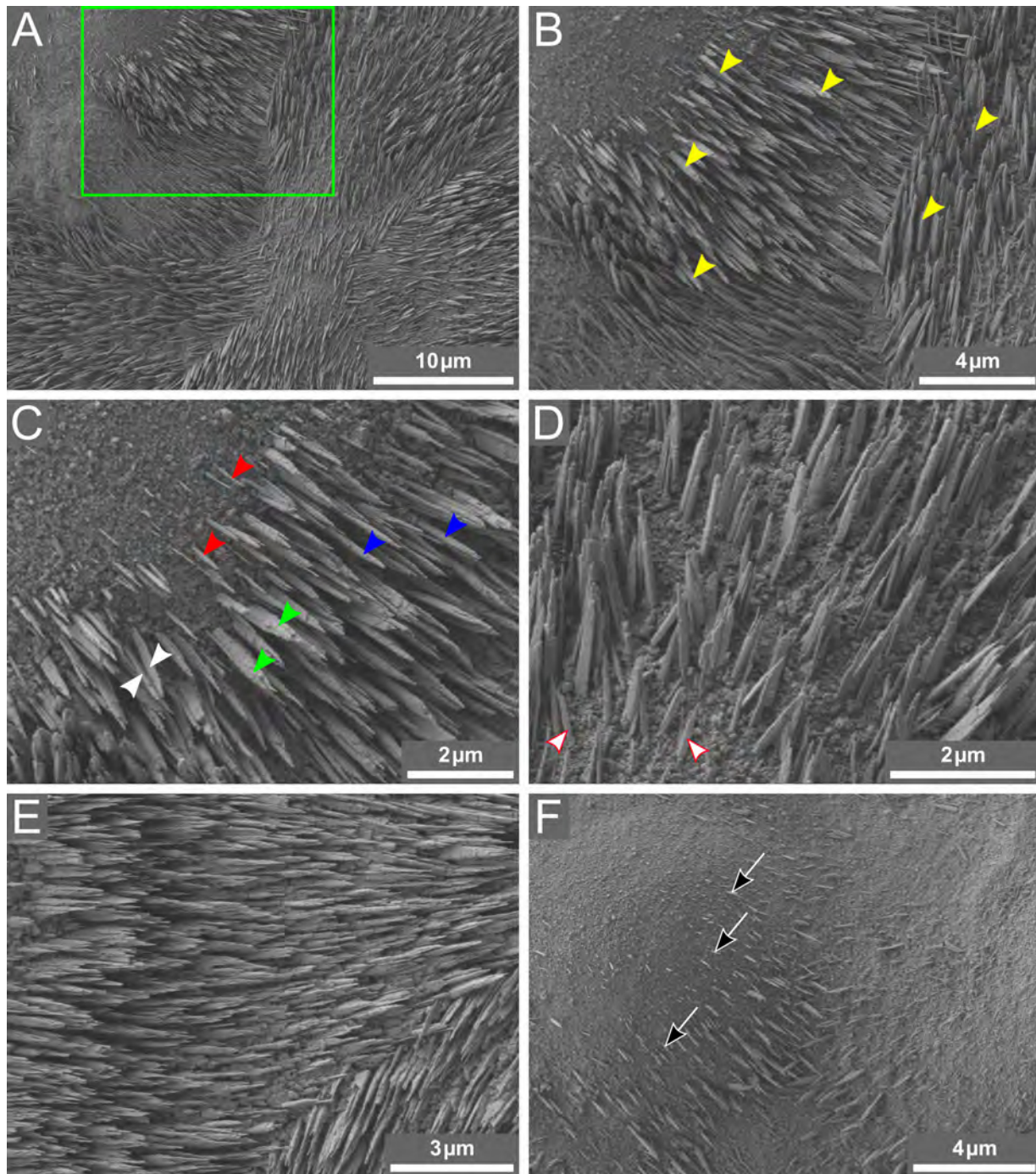


Abbildung 56: REM-Aufnahmen des bereits in Abb. 55 gezeigten „flat pearl“-Probestücks bei weiterer Vergrößerung. Scanflächen: (A) $28\ \mu\text{m} \cdot 38\ \mu\text{m}$, (B) $14\ \mu\text{m} \cdot 18\ \mu\text{m}$, (C) $7\ \mu\text{m} \cdot 10\ \mu\text{m}$, (D) $6\ \mu\text{m} \cdot 7\ \mu\text{m}$, (E) $9\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$ und (F) $13\ \mu\text{m} \cdot 17\ \mu\text{m}$; Neigungswinkel des Probestücks: 0° . Der grün hervorgehobene Bereich aus (A) ist in (B) entsprechend vergrößert dargestellt. Auf dem inselförmig gewachsenen Mineral sind offensichtlich viele nadelartige CaCO_3 -Kristalle entstanden (gelbe Dreiecke in (B)). Dabei weisen die nadelartigen Kristalle unterschiedliche Höhen und Durchmesser bzw. laterale Ausdehnungen auf (verschiedenfarbige Dreiecke in (C)). Einige der CaCO_3 -Kristalle sind, vermutlich bedingt durch die Probenpräparation für die REM-Untersuchung, abgebrochen bzw. „umgeknicht“ (rot-weiße Dreiecke in (D)). Es existieren einerseits Bereiche, in denen viele CaCO_3 -Kristalle mit hohen Oberflächendichten auftreten (Bild (E)) und andererseits Bereiche, in denen bisher nur wenige Kristalle entstanden sind (weiß-schwarze Pfeile in (F)).

In diesem Wachstumsexperiment konnte das induzierte Wachstum von vielen nadel-förmigen Calciumcarbonatkristallen auf dem betrachteten Probenbereich der nach nur 10-tägiger Inkubation entstandenen Wachstumsfront direkt mit dem AFM beobachtet werden (siehe Abb. 48 und 49). Zusätzlich gelang es, nach dem AFM-Wachstumsexperiment die Wachstumsgeschwindigkeiten der Calciumcarbonatkristalle zu ermitteln (siehe Tab. 6) und die nadelförmige Struktur der gewachsenen Kristalle mit dem REM zu beobachten (siehe Abb. 55 und 56). Da die auf der Probenoberfläche gewachsenen Kristalle eine charakteristische nadelförmige bzw. nadelartige Wachstumsgeometrie zeigen, bestehen diese Kristallnadeln vermutlich aus Aragonit.

Zum Vergleich und um weitere Hinweise zum Aragonitwachstum im Perlmutter zu erhalten, erfolgte die Durchführung von mehreren AFM-Wachstumsexperimenten mit verschiedenen übersättigten CaCO_3 -Lösungen auch auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen. Dabei konnte bei verschiedenen Perlmutterpalftflächen ebenfalls das Wachstum von nadelförmigen Calciumcarbonatkristallen direkt beobachtet werden (siehe Abschnitt 5.4). Für die Wachstumsexperimente auf den frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen erfolgt ebenfalls die Berechnung der Oberflächendichten der gewachsenen Calciumcarbonatnadeln.

5.3 Charakterisierung der Perlmutterpalftflächen mittels AFM

Wie zuvor bei den Wachstumsfronten erfolgten zuerst die Untersuchung und die Charakterisierung der Oberflächenstruktur der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen bzw. Perlmutterpalftflächen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM). Die Erzeugung der Perlmutterpalftflächen und die Vorbereitungen der Probestücke für die AFM-Untersuchungen fanden gemäß der in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Präparationsprozedur statt. Anschließend wurde das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen auch auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen direkt mit dem AFM beobachtet. Bei den Strukturuntersuchungen und ebenfalls bei den Wachstumsexperimenten fanden sowohl PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden als auch ScanAsyst-Air²²¹ AFM-Sonden Verwendung.

5.3.1 Charakterisierung der Oberflächenstruktur

Die Strukturuntersuchungen fanden jeweils an einer frisch präparierten Perlmutterpalftfläche statt, die eine Größe von maximal $4\text{ mm} \cdot 4\text{ mm}$ aufwies. Die Erzeugung der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen erfolgte durch gezielte Hammerschläge aus den Schalen von bereits gestorbenen Meeresschnecken der Art *Haliotis tuberculata*, die bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$

²²¹Spezifikationen der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden und der ScanAsyst-Air AFM-Sonden siehe Anhang (Abschnitt 10.1)

eingefroren waren und nur für die Präparation kurzzeitig aufgetaut wurden [4]. Direkt nach Gewinnung der Perlmutterpaltflächen erfolgte deren Befeuchtung mit einer gesättigten 0,9 mM CaCO_3 -Lösung oder einer gering übersättigten 1 mM CaCO_3 -Lösung [4]. Nach Auswahl eines geeigneten Probestücks wurde dieses zuerst mit Hilfe des Zweikomponentenklebers²²² in der Mitte einer 35 mm großen Petrischale²²³ fixiert und anschließend die Probenoberfläche sofort mit der zuvor verwendeten CaCO_3 -Lösung (0,9 mM oder 1 mM) erneut benetzt. Die ständige Befeuchtung der Perlmutterpaltfläche während der Präparationsprozedur verhinderte das Austrocknen der Probe [4]. Nach Abbinden des zur Probenfixierung verwendeten Zweikomponentenklebers wurde zusätzlich ein Volumen von 3 ml der für das Feuchthalten der Probenoberfläche benutzten CaCO_3 -Lösung in die Petrischale pipettiert. Vor Einbau der Petrischale mit präparierter Probe ins AFM fand jeweils die Kalibrierung der für die Untersuchung genutzten AFM-Sonde gemäß den in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen Verfahren statt. Anschließend wurde die Probe ins AFM eingebaut und ein geeigneter Probenbereich zum Abbilden ausgewählt.

Bei mehreren verschiedenen und in unterschiedlichen Präparationsansätzen frisch erzeugten Perlmutterpaltflächen wurde nun die Oberflächenstruktur mit dem AFM genauer untersucht. Dabei konnten die Oberflächenstrukturen einzelner Aragonitplättchen mit beiden AFM-Sondenarten gut aufgelöst abgebildet werden. Im Folgenden finden sich AFM-Aufnahmen einiger dieser frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen. Auf zwei der in diesem Abschnitt gezeigten Perlmutterpaltflächen wurden jeweils sofort nach der Strukturuntersuchung auch Experimente zum Wachstum von Calciumcarbonat durchgeführt. Die detaillierte Beschreibung dieser AFM-Wachstumsexperimente erfolgt in Abschnitt 5.4.

Erste Probe - Untersuchung der Oberflächen einzelner Aragonitplättchen

In der **Abbildung 57** ist die mit dem AFM aufgenommene Oberfläche einer frisch präparierten Perlmutterpaltfläche, die sich in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befand, mit den zwei Scanflächen von $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ bei den Bildern (A) und von $3,2\ \mu\text{m} \cdot 3,2\ \mu\text{m}$ bei den Bildern (B) dargestellt. Dort zeigen die Bilder mit dem Index 1 (links) wieder die Höhensignale und die Bilder mit dem Index 2 (rechts) die entsprechenden Fehlersignale. Im Weiteren bezeichnet die Angabe „die Bilder (z. B. A)“ wie zuvor immer sowohl das Höhenbild (A1) als auch das Fehlersignalsbild (A2). Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte mit einer ScanAsyst-Air AFM-Sonde. Die Aufnahme der Bilder (A) fand mit einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von 0,795 Hz und einer abbildenden Kraft von 4 nN statt. Die für das Abbilden der wesentlich gleichmäßigeren Oberfläche eines

²²²Epoxykleber, max. 4 min Topfzeit; Bindulin; H.L. Schönleber GmbH; Fürth, Deutschland

²²³10 mm Höhe, max. 10 ml Volumen, aus Polystyrol; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

einzelnen Aragonitplättchens notwendige Kraft konnte bei der Aufnahme der Bilder (B) im Vergleich zur Bildaufnahme (A) deutlich reduziert werden. Daher erfolgte die Aufnahme der Bilder (B) mit einer kleineren abbildenden Kraft von 400 pN sowie mit einer höheren Auflösung von 512 x 512 Pixel und einer kleineren Abtastrate von 0,398 Hz.

Während der Präparation des Probestücks wurde eine 0,9 mM CaCO_3 -Lösung verwendet. Die Kalibrierung der AFM-Sonde erfolgte vor Probeneinbau auf dem Boden einer weiteren Petrischale, in der sich nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befanden. Diese „touch“-Kalibrierung lieferte für den Cantilever eine Federkonstante von $0,48 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine Deflektionssensitivität²²⁴ von $(25,9 \pm 1,4) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$.

Die Bilder (A) zeigen deutlich zwei direkt übereinanderliegende Schichten, die aus einzelnen Aragonitplättchen bestehen. Die blauen Pfeile markieren dort die obere, aus Aragonitplättchen aufgebaute, Schicht und die roten Pfeile kennzeichnen die untere Aragonitschicht. Die drei abgebildeten Aragonitplättchen in der oberen Schicht, die jeweils mit einem grünen Pfeil und mit (1), (2) bzw. (3) markiert sind, und deren Kanten bzw. Ränder sind besonders gut erkennbar. Dabei sind allerdings jeweils nicht die vollständigen Aragonitplättchen, sondern nur Teile der drei Plättchenoberflächen abgebildet. Die vollständigen lateralen Abmessungen bzw. Ausdehnungen der einzelnen Plättchen, deren Bestimmung aus den in Abschnitt 5.4.2.4 gezeigten REM-Aufnahmen derselben Perlmutterpaltfläche erfolgte, liegen im Bereich von etwa 4 μm bis 9 μm . Dabei konnte jedoch nicht die Vermessung genau derselben Aragonitplättchen, die hier in den AFM-Aufnahmen in der Abbildung 57 gezeigt sind, erfolgen. Die weißen Pfeile in allen Bildern heben den gut sichtbaren Verlauf der Ränder bzw. Kanten der drei dicht aneinandergrenzenden Aragonitplättchen in der oberen Schicht hervor. Bereits im Bild (A1) ist beobachtbar, dass in der Oberfläche des mit (1) markierten Aragonitplättchens eine lateral breitere Vertiefung bzw. ein lateral breiteres Loch (weißes Dreieck) existiert.

Die Höhe des mit (1) bzw. (2) gekennzeichneten Aragonitplättchens beträgt (450 ± 25) nm bzw. (460 ± 40) nm. Dabei erfolgte die Bestimmung der Aragonitplättchenhöhen und der entsprechenden Fehler analog zu dem in Abschnitt 5.1.1 detailliert beschriebenen Verfahren, bei dem die Höhen der einzelnen Aragonitplättchen eines „stack of coins“ ermittelt wurden. Die Ausmessung der Höhendifferenzen zwischen den Oberflächen der zwei ausgewählten in der oberen Schicht befindlichen Aragonitplättchen und der unteren Aragonitschicht erfolgte jeweils 16-mal an mehreren unterschiedlichen Stellen entlang vier verschiedener Höhenprofile. Für jedes Aragonitplättchen wurde die Höhendifferenz somit insgesamt 64-mal vermessen. Ein Höhenprofil, das beispielhaft die Vermessung der Höhe

²²⁴Die nominale Deflektionssensitivität der ScanAsyst-Air AFM-Sonden beträgt $30,0 \frac{\text{nm}}{\text{V}}$. Es sind keine Informationen über die minimal und maximal mögliche Deflektionssensitivität verfügbar.

des mit (1) markierten Aragonitplättchens zeigt, ist in der **Abbildung 101** im Anhang²²⁵ zu finden. Aus den erhaltenen Höhendifferenzen erfolgte anschließend jeweils die Berechnung des Mittelwerts. Der Fehler der ermittelten Aragonitplättchenhöhe wurde jeweils mit Hilfe der Standardabweichung berechnet. Die hier ermittelten Höhen der einzelnen Aragonitplättchen stimmen gut überein: (1) mit den in Abschnitt 5.1.1 ausgemessenen Höhen der Aragonitplättchen des „stack of coins“ und (2) mit der in der Literatur angegebenen Aragonitplättchenhöhe von etwa 500 nm [5].

In den Bildern (A) ist schon erkennbar, dass die einzelnen in einer Schicht gewachsenen Aragonitplättchen, deren Höhen etwa der mittleren Wellenlänge des sichtbaren Lichts entsprechen, nach Fertigstellung des Wachstums aneinanderstoßen und lateral nur durch die dünne intertabulare organische Matrix voneinander getrennt werden [4, 5]. Viele aneinandergrenzende Aragonitplättchen bilden dann lateral ausgedehnte Aragonitschichten, die wiederum über und unter anderen Schichten angeordnet sind [4]. Diese Aragonitschichten sind dann in vertikaler Richtung jeweils durch eine etwa 30 nm bis 50 nm dicke Schicht der interlamellaren organischen Matrix voneinander getrennt [1, 5].

Das Bild (B1) bzw. (B2) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des mit (1) markierten Aragonitplättchens aus dem Bild (A1) bzw. (A2). Dort ist die Oberflächenstruktur dieses Aragonitplättchens noch viel besser sichtbar. Auf dem Aragonitplättchen existieren viele, bereits einige Nanometer bis zu wenigen zehn Nanometern hohe, natürlich gewachsene kristalline Strukturen, d. h. die Aragonitplättchenoberfläche ist nicht glatt [4, 77]. Die blauen Dreiecke kennzeichnen beispielhaft einige dieser kleineren kristallinen Strukturen. Diese natürlich entstandenen Strukturen sind vermutlich sowohl sogenannte „nanoasperities“, d. h. nanoskalierte, durch die Kristallisation hervorgerufene Unebenheiten auf den großen horizontalen (001)-Oberflächen der Aragonitplättchen, als auch sehr kleine, nadelförmige Aragonitkristalle, die bereits während des Aragonitwachstums in der Schnecken- schale gewachsen sind [4, 77]. Allerdings ist eine genaue Unterscheidung zwischen den nanoskalierten, durch die Kristallisation hervorgerufenen Unebenheiten und kleinen, bereits nadelförmig gewachsenen Aragonitkristallen in den AFM-Aufnahmen hier nicht möglich [4]. Da für die Benetzung des Probestücks während der Präparationsprozedur eine 0,9 mM CaCO_3 -Lösung Verwendung fand, dürfte auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche bis zu diesem Zeitpunkt noch kein induziertes Kristallwachstum stattgefunden haben [4]. Wie in den Bildern (A) kennzeichnen die weißen Pfeile in den Bildern (B) auch den Verlauf der Ränder bzw. Kanten der drei sichtbaren dicht aneinandergrenzenden Aragonitplättchen in der oberen Schicht.

²²⁵siehe Abschnitt 10.4

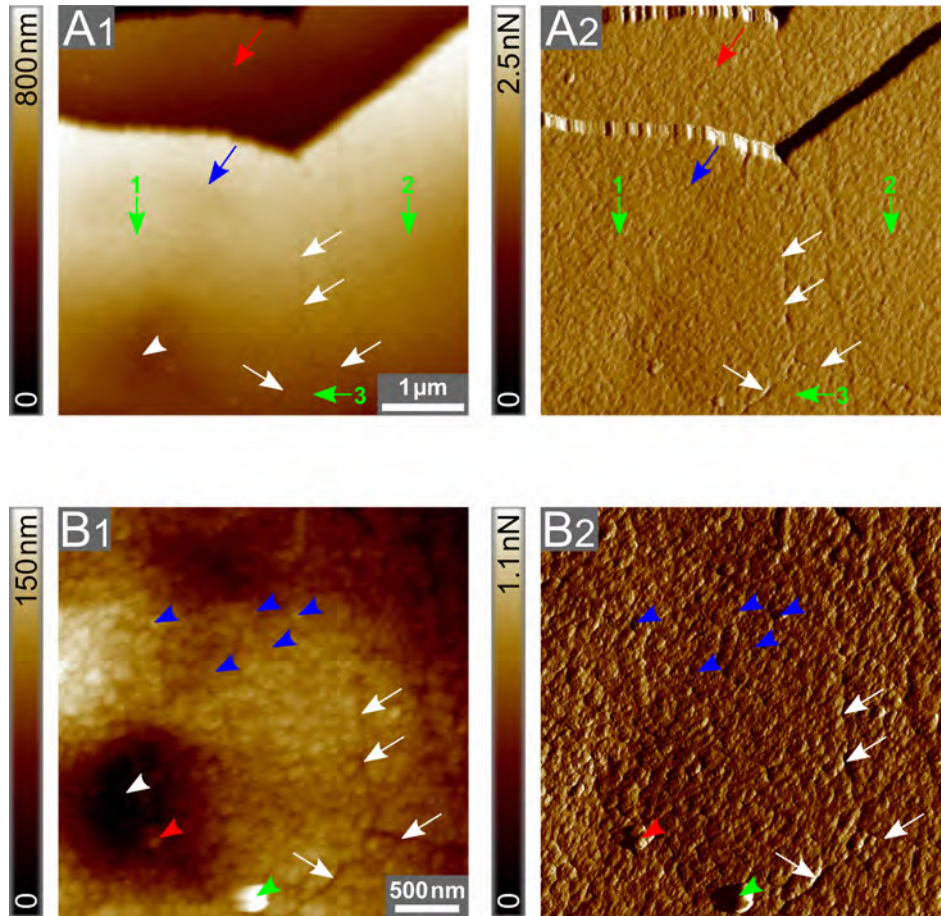


Abbildung 57: AFM-Aufnahmen einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ und (B) $3,2 \mu\text{m} \cdot 3,2 \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen die Höhengsignale und Bilder mit Index 2 (rechts) die Fehler-signale. In (A) sind deutlich zwei übereinanderliegende Schichten bestehend aus einzelnen Aragonitplättchen beobachtbar, wobei die blauen Pfeile die obere Schicht und die roten Pfeile die untere Schicht markieren [4]. Der gut erkennbare Verlauf der Ränder bzw. Kanten der drei aneinandergrenzenden Aragonitplättchen in der oberen Schicht (grüne Pfeile und gekennzeichnet mit (1) bis (3)) ist in allen Bildern mit weißen Pfeilen hervorgehoben. In der Oberfläche des Aragonitplättchens (1) befindet sich eine Vertiefung bzw. ein Loch (weißes Dreieck in (A1)). (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des linken, mit (1) gekennzeichneten, Aragonitplättchens aus der oberen Schicht. Dort ist die Vertiefung bzw. das Loch noch wesentlich besser erkennbar (weißes Dreieck in (B1)). Zusätzlich sind auf der Plättchenoberfläche viele, bereits einige Nanometer bis zu wenigen zehn Nanometern hohe, natürlich gewachsene kristalline Strukturen vorhanden (blaue Dreiecke). Die roten und grünen Dreiecke markieren deutlich höhere auf der Plättchenoberfläche existierende natürlich gewachsene Aragonitkristalle.

Wie bereits im Bild (A1) beobachtet, tritt in der Oberfläche des Aragonitplättchens (1) eine lateral breitere Vertiefung bzw. ein Loch auf. Im Bild (B1) ist dieses Loch (weißes Dreieck) viel deutlicher erkennbar. Vermutlich befand sich in diesem Loch vor der Erzeugung

der Perlmutterspaltfläche eine Mineralbrücke, die die ursprünglich übereinander angeordneten Aragonitplättchen miteinander verband. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, handelt es sich bei den Mineralbrücken um kristalline Verbindungen mit einem Durchmesser von etwa 30 nm und einer Höhe von etwa 30 nm bis 50 nm²²⁶, die sich in vertikaler Richtung zwischen zwei übereinanderliegenden Aragonitplättchen ausbilden [4, 14]. Ursprünglich vorhandene Mineralbrücken könnten während der Präparation der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen aus den Schneckenschalen durch Hammerschläge abgebrochen sein [4]. Am unteren, rechten Rand der Vertiefung bzw. des Lochs befindet sich bereits ein etwas höherer Kristall, dessen genaue Höhe hier jedoch nicht ermittelt werden konnte. Die roten Dreiecke in den Bildern (B1) und (B2) markieren zur besseren Sichtbarkeit diesen Kristall. Die Höhe des Kristalls könnte bei induziertem, d. h. durch Einspülen von höher übersättigten CaCO₃-Lösungen hervorgerufenem, Wachstum zunehmen. Dieser Kristall ist vermutlich ein präparationsbedingtes Bruchstück einer Mineralbrücke oder ein Ansatz für eine neue Mineralbrücke. Auf der Oberfläche des Aragonitplättchens existiert zudem ein etwa 60 nm hoher, höchstwahrscheinlich aus Aragonit bestehender, Kristall (grüne Dreiecke). Dieser Kristall, der, wie später in der 3D-Rekonstruktion (siehe Abb. 58) gezeigt wird, über die üblichen Abmaße der „nanoasperities“ hinausgeht, ist vermutlich ebenfalls während des natürlichen Aragonitwachstums entstanden und eventuell ein präparationsbedingtes Bruchstück einer Mineralbrücke. Das Bild (B1) bzw. (B2) zeigt den Bereich der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, auf dem später das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen durch die Verwendung von höher übersättigten CaCO₃-Lösungen induziert und direkt mit dem AFM beobachtet wurde.

Zum Vergleich und zur besseren Sichtbarkeit der einzelnen Strukturen auf der Aragonitplättchenoberfläche zeigt die **Abbildung 58** zusätzlich die dreidimensionale Rekonstruktion des in Abbildung 57 dargestellten Höhengsignals (B1). Für die Darstellung ist diese dreidimensionale Rekonstruktion im Vergleich zum Höhenbild (B1) um einen Winkel von 16° nach rechts gedreht. Als Ergänzung findet sich die dreidimensionale Rekonstruktion des in Abbildung 57 gezeigten Höhengsignals (A1) in der **Abbildung 100** im Anhang in Abschnitt 10.4.

In der Abbildung 58 sind deutlich der etwa 60 nm hohe, natürlich gewachsene Aragonitkristall (grünes Dreieck) und die kleinen, einige Nanometer bis zu wenigen zehn Nanometern hohen, kristallinen Strukturen (blaue Dreiecke) auf den Plättchenoberflächen sowie die Vertiefung bzw. das Loch (weißes Dreieck) in der Oberfläche des linken Aragonitplättchens und der Kristall im unteren, rechten Bereich des Lochs (rotes Dreieck) sicht-

²²⁶Die Höhe der Mineralbrücken entspricht etwa der Schichtdicke der interlamellaren organischen Matrix zwischen zwei übereinanderliegenden Aragonitplättchen [5, 18].

bar. Der eine wesentlich höhere, mit grünem Dreieck markierte, natürlich gewachsene Aragonitkristall auf der linken Plättchenoberfläche weist eine nadelartige, gestreckte Form in $[001]$ -Richtung entlang seiner \vec{c} -Achse auf. Wie bereits zuvor erwähnt, bedeutet die Bezeichnung „nadelartig“ oder „nadelförmig“ hier, dass die Länge bzw. die Höhe des Kristalls viel größer ist als dessen Breite bzw. laterale Ausdehnung. Aufgrund des Verbreiterungseffektes bedingt durch die endlichen Abmessungen und die Geometrie²²⁷ der zum Abbilden verwendeten Spitze der AFM-Sonde ist die laterale Ausdehnung dieses Kristalls in den AFM-Aufnahmen zusätzlich verbreitert dargestellt [181, 182]. Eine Angabe zum Aspektverhältnis dieser Kristallnadel ist daher nicht möglich.

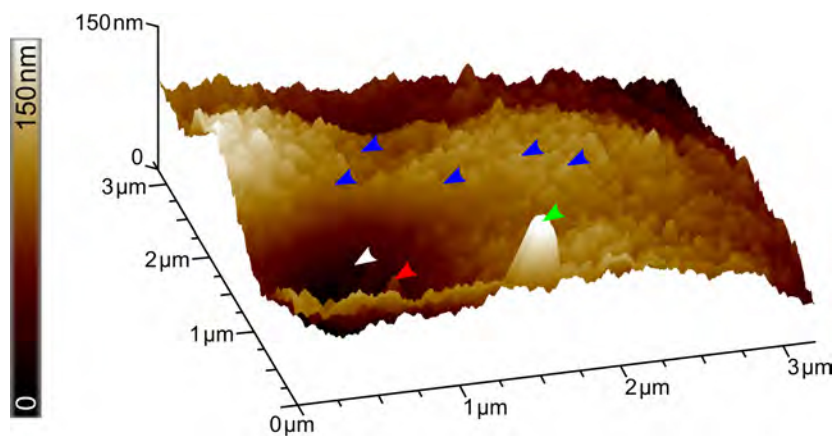


Abbildung 58: Dreidimensionale Rekonstruktion des in Abb. 57 dargestellten Höhenbildes (B1) mit der Scanfläche von $3,2\ \mu\text{m} \cdot 3,2\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktion ist im Vergleich zum Höhenbild um einen Winkel von 16° nach rechts gedreht. Auf der Probenoberfläche sind ein nadelförmiger, etwa $60\ \text{nm}$ hoher, natürlich gewachsener Aragonitkristall (grünes Dreieck) und viele kleine, einige Nanometer bis zu wenigen zehn Nanometern hohe, kristalline Strukturen (blaue Dreiecke) beobachtbar. Die blauen Dreiecke kennzeichnen hier nicht genau dieselben Strukturen wie in Abb. 57. Diese kleinen kristallinen Strukturen sind vermutlich bereits nadelförmige, natürlich gewachsene Aragonitkristalle und/oder „nanoasperities“, d. h. durch Kristallisation bedingte Unebenheiten auf den großen, horizontalen (001) -Oberflächen der Aragonitplättchen [4, 77]. Das weiße Dreieck markiert die breitere Vertiefung bzw. das Loch, in dem sich vermutlich vor Probenpräparation eine Mineralbrücke befand [4]. In diesem Loch ist im unteren, rechten Bereich ein ebenfalls nadelförmiger natürlich gewachsener Aragonitkristall vorhanden (rotes Dreieck).

Auch die lateralen Abmessungen der nur einige Nanometer hohen, auf der Plättchenoberfläche vorhandenen natürlich gewachsenen Kristallstrukturen sind dadurch verbreitert abgebildet. Diese kleineren kristallinen Strukturen sind sowohl nanoskalierte Unebenheiten („nanoasperities“) auf der Aragonitplättchenoberfläche als auch sehr kleine, nadelförmige

²²⁷Radius, Höhe und Öffnungswinkel

natürlich gewachsene Aragonitkristalle [4, 77]. Die blauen Dreiecke markieren hier beispielhaft mehrere dieser kleineren kristallinen Strukturen, jedoch nicht dieselben Strukturen wie im Höhenbild (B1) der Abbildung 57. Der im Loch auf der rechten Seite gewachsene Aragonitkristall (rotes Dreieck), von dem hier im Bild vermutlich nur der obere Teil sichtbar ist, erscheint ebenfalls nadelförmig. Das Wachstum dieses Aragonitkristalls hat vermutlich bereits stattgefunden, als die Meeresschnecke noch lebte [4]. Wahrscheinlich ist der Aragonitkristall dabei von dem darunterliegenden Aragonitplättchen aus nach oben durch die Poren der interlamellaren organischen Matrix in die nächste Schicht gewachsen und damit ein Ansatz für eine neue Mineralbrücke [4, 5].

Zweite Probe - Genauere Untersuchung der Plättchenoberflächen mittels PeakForce HiRs-F-A AFM-Sonden

Um die Oberflächenstrukturen einzelner Aragonitplättchen noch besser aufgelöst abzubilden und damit auch besser zu charakterisieren, wurden zusätzlich, zum Vergleich mit der vorangegangenen AFM-Untersuchung, mehrere frisch gespaltene Perlmuttoberflächen mit Hilfe der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden untersucht. Die **Abbildung 59** zeigt nun AFM-Aufnahmen der Oberfläche einer weiteren aus der Schale einer anderen, ebenfalls bereits gestorbenen, Meeresschnecke präparierten Perlmuttspaltfläche mit der Scanfläche von $2,9\ \mu\text{m} \cdot 2,9\ \mu\text{m}$. Dort zeigen die Bilder mit dem Index 1 (links) die Höhengsignale und die Bilder mit dem Index 2 (rechts) die entsprechenden Fehlersignale. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte wieder in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung und bei Verwendung einer Auflösung von 512×512 Pixel, einer Abtastrate von 0,398 Hz sowie einer Kraft von 200 pN.

Das Probestück wurde während der Präparationsprozedur mehrfach mit einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befeuchtet [4]. Vor dem Einbau der Petrischale, in der sich das Probestück und ein Volumen von 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befanden, erfolgte die Kalibrierung der AFM-Sonde in einer weiteren Petrischale mit nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Bei dieser „touch“-Kalibrierung ergaben sich eine Federkonstante von $0,22\ \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine Deflektionssensitivität von $(11,5 \pm 1,8)\ \frac{\text{nm}}{\text{V}}$.

Die AFM-Aufnahmen in der Abbildung 59 zeigen einen Teil der Oberfläche eines einzelnen Aragonitplättchens. Dort ist in den Bildern (A1) und (A2) die Oberflächenstruktur dieses Aragonitplättchens noch deutlicher erkennbar als die Strukturen auf den Plättchenoberflächen der vorher in den Abbildungen 57 und 58 gezeigten frisch gespaltenen Perlmuttoberfläche. Auch hier existieren auf der Plättchenoberfläche bereits viele kleine, natürlich gewachsene, kristalline Strukturen (blaue Dreiecke). Diese Strukturen, bei denen es sich entweder um „nanoasperities“ oder kleine, nadelförmige Aragonitkristalle

handelt, sind hier besser aufgelöst abgebildet als bei der zuerst untersuchten Perlmutterpaltfläche [4, 77]. In der Plättchenoberfläche tritt ebenfalls eine Vertiefung bzw. ein Loch (weißes Dreieck) auf, das hier jedoch lateral weniger stark ausgeprägt ist. Offenbar befindet sich in diesem Loch kristallines und/oder organisches Material (blauer Pfeil). Entweder ist die Mineralbrücke, die zwischen diesem und dem ursprünglich darüberliegenden Aragonitplättchen existierte, bei der Präparation der Perlmutterpaltfläche abgebrochen und so kristallines Material im Loch zurückgeblieben oder das Loch ist hier größtenteils von organischer Matrix bedeckt [4]. Vermutlich überzieht die organische Matrix einen Großteil des Aragonitplättchens. Auf der Plättchenoberfläche existieren mehrere Bereiche, in denen offenbar noch organische Matrix vorhanden ist. Die schwarzen Pfeile markieren beispielhaft einige dieser Bereiche. Dort sind teilweise dünne, längere filamentähnliche Strukturen, offensichtlich die Chitinfilamente der organischen Matrix, beobachtbar. Die grünen Pfeile markieren einige dieser nur bei sehr genauem Betrachten der Bilder zu erkennenden Filamente. Im oberen Bildbereich ist auch ein größerer Teil einer Plättchenkante, die hier nicht andere Aragonitplättchen berührt, gut erkennbar. Die roten Pfeile in den Bildern (A) kennzeichnen den Verlauf dieser Kante. Zudem sind im Höhenbild (A1) mehrere horizontal verlaufende Linien, die sich über das ganze Bild erstrecken, sichtbar. Diese horizontalen Streifen sind Artefakte und durch das Abrastern der Probenoberfläche mit der AFM-Spitze entstanden [3, 4]. Sie sind vermutlich bedingt durch nicht ausreichende Dämpfung des AFM gegenüber äußeren Störungen, wie z. B. Gebäudeschwingungen.

Auf dem im Bild (A1) bzw. (A2) gezeigten Bereich des Aragonitplättchens erfolgte später die Durchführung eines weiteren Wachstumsexperiments. Dieser Probenbereich wurde dafür ausgewählt, da dort sowohl die Oberfläche des Aragonitplättchens mit der Vertiefung bzw. dem Loch, in dem sich ursprünglich vermutlich eine Mineralbrücke befand, und mit den bereits natürlich gewachsenen kristallinen Strukturen als auch die Kante des Aragonitplättchens deutlich erkennbar sind [4]. Vermutlich findet gerade an der Plättchenkante und/oder in dem Loch das induzierte Wachstum neuer Calciumcarbonatkristalle statt. Die Beschreibung der Durchführung und die Diskussion der Ergebnisse des Wachstumsexperiments finden sich in Abschnitt 5.4.2.

Für das Abbilden dieser frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche (siehe Abb. 59) wurde, wie zuvor erwähnt, eine PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde verwendet, wohingegen bei der AFM-Untersuchung der ersten Probe einer Perlmutterpaltfläche (siehe Abb. 57 und 58) eine ScanAsyst-Air AFM-Sonde genutzt wurde. Obwohl die mit der ScanAsyst-Air AFM-Sonde aufgenommenen Bilder schon sehr gut die verschiedenen Strukturen der Oberflächen der Aragonitplättchen zeigen, liefern die PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden noch besser aufgelöste Aufnahmen der Plättchenoberflächen. Dort sind insbesondere die kleineren kris-

tallinen Strukturen, deren Wachstum bereits während des natürlichen Schalenwachstums stattfand, viel deutlicher erkennbar.

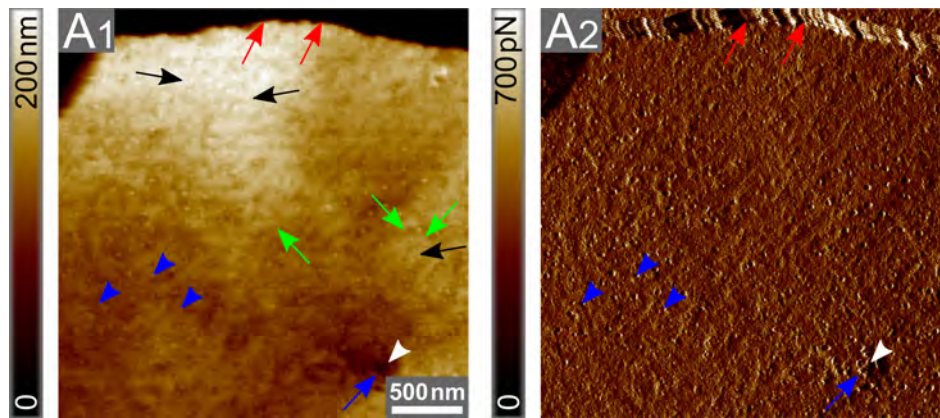


Abbildung 59: AFM-Aufnahmen einer weiteren frisch präparierten Perlmutterpaltfläche in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanfläche: (A) $2,9 \mu\text{m} \cdot 2,9 \mu\text{m}$. Das Höhsignal (Index 1) ist links und das entsprechende Fehlersignal (Index 2) rechts dargestellt. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte hier nun mit einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde. Das Aragonitplättchen und dessen Oberflächenstruktur sind dadurch deutlicher erkennbar. Die roten Pfeile in (A) markieren den Verlauf einer „freien“ Kante dieses Aragonitplättchens, das im oberen Bildbereich nicht mit weiteren Aragonitplättchen zusammenstößt. Die auf der Plättchenoberfläche existierenden kleinen, natürlich gewachsenen, kristallinen Strukturen (blaue Dreiecke), bei denen es sich um „nanoasperities“ oder um kleine, während des Schalenwachstums entstandene, nadelförmige Aragonitkristalle handelt, sind noch besser aufgelöst sichtbar [4]. Vermutlich befindet sich in einigen Bereichen auf dem Aragonitplättchen noch organische Matrix (z.B. schwarze Pfeile). Die grünen Pfeile kennzeichnen dort dünne filamentartig erscheinende Strukturen. Zusätzlich ist hier in der Plättchenoberfläche auch eine Vertiefung bzw. ein Loch zu beobachten (weiße Dreiecke und blaue Pfeile). Die im Höhenbild (A1) teilweise auftretenden horizontal verlaufenden Linien sind Bildartefakte [3, 4].

Die Vertiefung bzw. das Loch und die Kanten des Aragonitplättchens sind ebenfalls gut in der in **Abbildung 60** dargestellten dreidimensionalen Rekonstruktion des Höhsignals (A1) aus der Abbildung 59 erkennbar. Das weiße Dreieck kennzeichnet wieder die Vertiefung bzw. das Loch und die roten Pfeile markieren wieder den Verlauf der Plättchenkante. Hier ist noch besser sichtbar, dass die Oberfläche des Aragonitplättchens nicht glatt ist, sondern viele kleine natürlich gewachsene kristalline Strukturen – „nanoasperities“ und/oder kleine Aragonitkristalle – auf der Plättchenoberfläche vorhanden sind [4, 77]. Die blauen Dreiecke markieren beispielhaft einige solche während des natürlichen Schalenwachstums entstandenen kristallinen Strukturen, jedoch nicht dieselben Kristallstrukturen wie in der Abbildung 59. Die schwarzen Dreiecke kennzeichnen zwei bereits höhere feine, nadelförmige Aragonitkristalle. Auf dem Aragonitplättchen ist in einigen Bereichen wahr-

scheinlich noch organische Matrix vorhanden (z.B. schwarze Pfeile). Dort bedeckt die organische Matrix vermutlich viele der natürlich entstandenen kristallinen Strukturen, die zum Teil auch durch die Poren der organischen Matrix nach oben gewachsen sind.

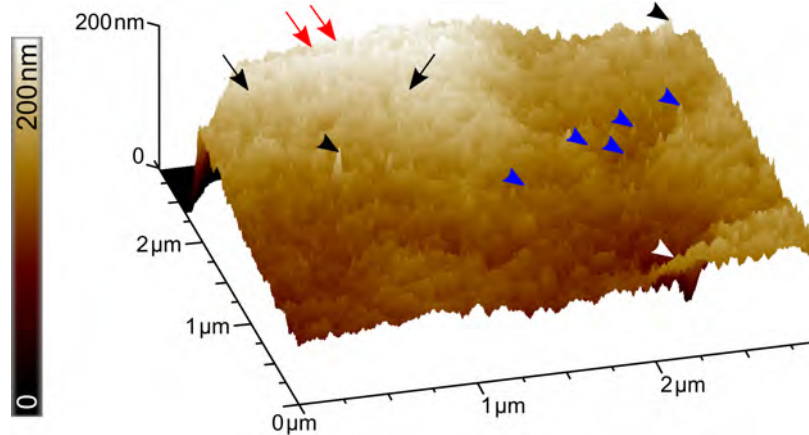


Abbildung 60: Dreidimensionale Rekonstruktion des in Abb. 59 dargestellten Hörsignals (A1) mit der Scanfläche von $2,9\ \mu\text{m} \cdot 2,9\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktion ist im Vergleich zum Höhenbild um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Oberfläche des Aragonitplättchens mit der Vertiefung bzw. dem Loch (weißes Dreieck) und den kleinen, natürlich gewachsenen, kristallinen Strukturen (blaue und schwarze Dreiecke) ist sehr deutlich erkennbar. Die schwarzen Pfeile markieren beispielhaft Bereiche auf der Plättchenoberfläche, in denen vermutlich noch organische Matrix existiert. Die organische Matrix bedeckt dort wahrscheinlich viele der während des Schalenwachstums natürlich entstandenen kristallinen Strukturen. Eine „freie“ Plättchenkante, die nicht weitere Aragonitplättchen berührt, ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Dritte Probe - Reste der intertabularen organischen Matrix auf den oberen Aragonitplättchen

Die **Abbildung 61** zeigt AFM-Aufnahmen von zwei weiteren frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen, deren Untersuchung jeweils in 3 ml einer $0,9\ \text{mM}\ \text{CaCO}_3$ -Lösung erfolgte. In den Bildern (A) und (B) sind ausgewählte Probenbereiche der zwei verschiedenen Perlmutterpaltflächen mit der Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ dargestellt. Dabei zeigen die Bilder mit dem Index 1 (links) wieder die Hörsignale und die Bilder mit dem Index 2 (rechts) die Fehlersignale. Das Abbilden der in den Bildern (A) gezeigten Probenoberfläche erfolgte mit einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde bei Verwendung einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von $1,01\ \text{Hz}$ und einer Kraft von $200\ \text{pN}$. Die Bilder (B) wurden mit einer ScanAsyst-Air AFM-Sonde bei Verwendung einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von $0,795\ \text{Hz}$ und einer abbildenden Kraft von $250\ \text{pN}$

aufgenommen. Vor beiden AFM-Untersuchungen erfolgte für die jeweils verwendete AFM-Sonde eine „touch“-Kalibrierung auf dem Boden einer weiteren Petrischale, in der sich nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung und keine Probe befanden. Für die PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde ergaben sich eine Deflektionssensitivität von $(9,9 \pm 0,5) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und eine Federkonstante von $0,15 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Die Kalibrierung der ScanAsyst-Air AFM-Sonde, mit der die in den Bildern (B) gezeigte frisch gespaltene Perlmutteroberfläche untersucht wurde, lieferte eine Federkonstante von $0,20 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine Deflektionssensitivität von $(40,9 \pm 0,6) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$.

Bei beiden Perlmutterpaltflächen sind die einzelnen Aragonitplättchen und deren Kanten bzw. Ränder sowie die vorher detailliert beschriebene Oberflächenstruktur der Plättchen mit den natürlich entstandenen kristallinen Strukturen, bei denen es sich um „nanoasperities“ und/oder kleine, nadelförmige Aragonitkristalle handelt, und mit oftmals einer Vertiefung bzw. einem Loch erkennbar [4]. Die Vertiefung bzw. das Loch befindet sich dabei meist in der Mitte des jeweiligen betrachteten Aragonitplättchens.

In den Bildern (A) sind die Kanten bzw. Ränder von drei in der oberen Schicht befindlichen und nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen erkennbar. Zur besseren Sichtbarkeit heben die weißen Pfeile den Verlauf dieser Kanten hervor. Auf den Plättchenoberflächen dieser drei Aragonitplättchen befinden sich Reste der intertabularen organischen Matrix (ITM) von der ursprünglich darüber angeordneten Aragonitschicht [2]. Die polygonal geformten Aragonitplättchen, die sich vor Probenpräparation in der darüberliegenden Schicht befanden, waren ursprünglich von dieser intertabularen organischen Matrix in vertikaler Richtung umgeben und – wie vom Perlmutteraufbau her zu erwarten – zu den in den Bildern (A) sichtbaren Aragonitplättchen versetzt angeordnet [4, 5]. Die dadurch entstandene polygonale, wabenförmige Struktur der ITM und deren versetzte Anordnung zu den hier sichtbaren Aragonitplättchen sind in den Bildern (A) gut zu erkennen [2]. Die blauen und grünen Pfeile kennzeichnen beispielhaft mehrere dieser bei der Präparation der Perlmutterpaltfläche übriggebliebenen Reste der intertabularen organischen Matrix. Dabei weisen diese Reste unterschiedliche Höhen auf. So sind z. B. die mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Reste der ITM etwa 50 nm hoch. Im Gegensatz dazu besitzen die mit grünen Pfeilen markierten ITM-Reste nur geringe Höhen von einigen Nanometern [2].

Auch auf einem der Aragonitplättchen der zweiten Perlmutterpaltfläche, das in den Bildern (B) gut sichtbar ist, sind Reste der intertabularen Matrix, die eines der ursprünglich darüber angeordneten Plättchen in vertikaler Richtung umgab, beobachtbar. Die ITM-Reste sind dort etwa (25 ± 6) nm hoch. Die Ermittlung der Höhe und des entsprechenden Fehlers erfolgte gemäß den in Abschnitten 5.1.1 und 5.3.1 beschriebenen Verfahren, bei denen die Plättchenhöhen erstens bei einem „stack of coins“ (siehe Abschnitt 5.1.1 - erste Probe) und zweitens bei einer Perlmutterpaltfläche (siehe Abschnitt 5.3.1 - erste Probe)

ermittelt wurden.

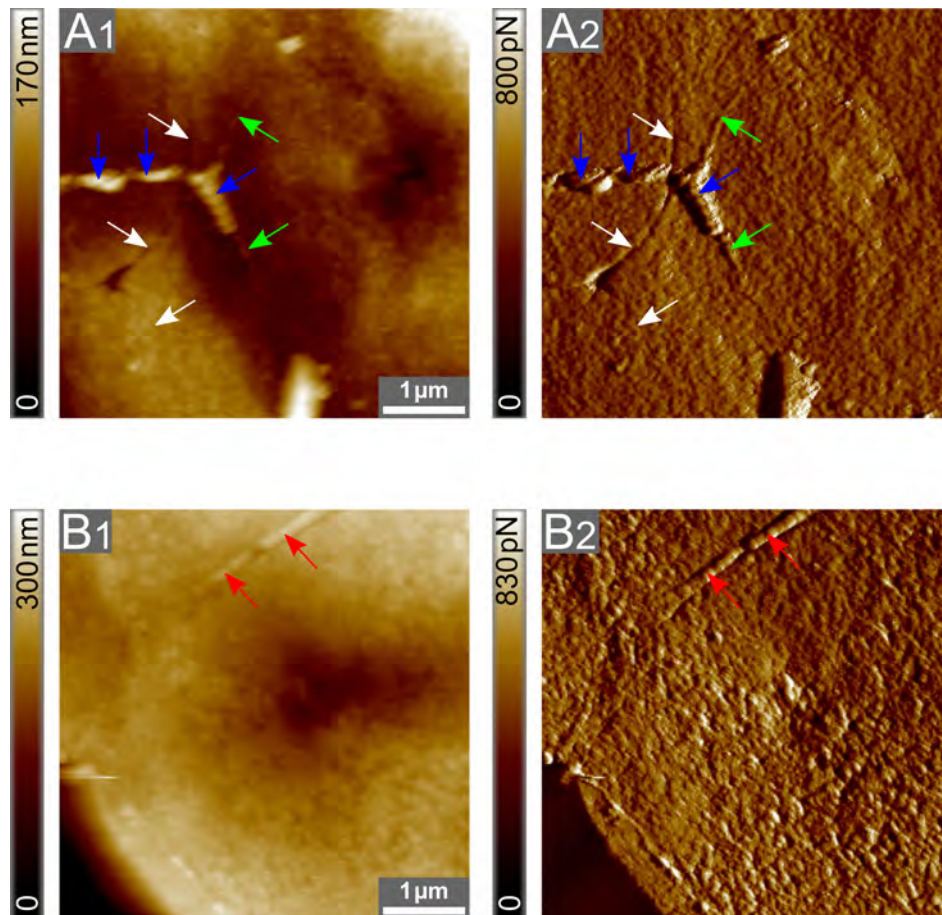


Abbildung 61: AFM-Aufnahmen von ITM-Resten auf den Oberflächen von zwei weiteren frisch präparierten Perlmutterpaltflächen in jeweils 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ und (B) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen die Höhengsignale und Bilder mit Index 2 (rechts) die Fehlersignale. In (A) und (B) ist jeweils ein ausgewählter Probenbereich der zwei verschiedenen Perlmutterpaltflächen dargestellt. Dort sind die einzelnen Aragonitplättchen mit den natürlich gewachsenen kristallinen Strukturen („nanoasperities“ und/oder kleine, nadelförmige Aragonitkristalle) und mit jeweils einer größeren Vertiefung bzw. einem Loch, das sich meist in der Plättchenmitte befindet, deutlich erkennbar [4]. In (A) kennzeichnen die weißen Pfeile den Verlauf der gut sichtbaren Kanten bzw. Ränder der nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen. Auf den Oberflächen der Plättchen sind hier außerdem Reste der intertabularen organischen Matrix (ITM), die die Aragonitplättchen in der ursprünglich darüber angeordneten Schicht in vertikaler Richtung umgab, vorhanden [2]. Die ITM-Reste weisen dort unterschiedliche Höhen von etwa 50 nm (blaue Pfeile) und von einigen Nanometern (grüne Pfeile) auf. Auch auf einem der in (B) zu erkennenden Aragonitplättchen sind Reste der ITM sichtbar (rote Pfeile), die dort eine Höhe von etwa 25 nm aufweisen.

Vierte Probe - Aragonitplättchen bei Bedeckung mit organischer Matrix

Die **Abbildung 62** zeigt die mit dem AFM aufgenommene Oberfläche einer weiteren frisch präparierten Perlmutterpaltfläche. Die Untersuchung dieses Probestücks erfolgte ebenfalls in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Die Bilder (A) bzw. (B) stellen ausgewählte Bereiche der Probenoberfläche in der Scanfläche von $3,0\ \mu\text{m} \cdot 3,0\ \mu\text{m}$ bzw. von $1,0\ \mu\text{m} \cdot 1,0\ \mu\text{m}$ dar. Links sind wieder die Höhensignale (Bilder mit Index 1) und rechts die Fehlersignale (Bilder mit Index 2) gezeigt. Das Abbilden der Perlmutterpaltfläche erfolgte mit einer ScanAsyst-Air AFM-Sonde bei Verwendung einer Auflösung von 256×256 Pixel und einer Kraft von 201 pN. Als Abtastrate, mit der das Abrastern des ausgewählten Probenbereichs stattfand, wurde bei den Bildern (A) 0,501 Hz und bei den Bildern (B) 0,994 Hz gewählt. Zur Befeuchtung des Probestücks während der Präparationsprozedur wurde eine 0,9 mM CaCO_3 -Lösung verwendet [4]. Die vor Probeneinbau durchgeführte „touch“-Kalibrierung der AFM-Sonde ergab eine Federkonstante von $0,39\ \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine Deflektionssensitivität von $(27,8 \pm 1,9)\ \frac{\text{nm}}{\text{V}}$. Die Kalibrierung erfolgte, wie bei den zuvor beschriebenen AFM-Untersuchungen der Perlmutterpaltflächen, auf dem Boden einer weiteren Petrischale mit nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.

Die Bilder (A) zeigen vermutlich die Oberfläche eines Aragonitplättchens, das fast vollständig von organischer Matrix bedeckt ist. Die roten Pfeile markieren das betrachtete Aragonitplättchen. Diese Plättchenoberfläche sieht deutlich anders aus als die Oberflächen der Aragonitplättchen der bisherigen in Abbildungen 57 bis 61 gezeigten frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen. Hier sind in den Bildern (A) ein Teil einer Kante des mit roten Pfeilen markierten Aragonitplättchens sowie ein zwischen diesem Plättchen und einem weiteren Aragonitplättchen auftretender Spalt, dessen Hervorhebung mit weißen Pfeilen erfolgte, erkennbar. Im unteren Bildbereich ist vermutlich der Randbereich einer Vertiefung bzw. eines Lochs (weißes Dreieck) in der Plättchenoberfläche sichtbar. Solche Vertiefungen bzw. Löcher konnten bei allen zuvor untersuchten Probestücken der Perlmutterpaltflächen bereits beobachtet werden. Um die Oberflächenstruktur des Aragonitplättchens noch genauer zu untersuchen, wurde die Plättchenoberfläche nach der Aufnahme der Bilder (A) mit einer kleineren Scanfläche, d. h. mit einer höheren Vergrößerung, mit der AFM-Sonde abgerastert. Die Bilder (B) zeigen nun eine vergrößerte Aufnahme eines kleinen Teils der Plättchenoberfläche aus den Bildern (A). Dort sind zwischen den gut zu erkennenden höheren Strukturen (z. B. blaue Dreiecke) bei genauem Betrachten auch einzelne dünne, längere filamentähnliche Strukturen (z. B. grüne Pfeile) beobachtbar. Bei diesen dünnen Filamenten handelt es sich höchstwahrscheinlich um die Chitinfilamente der organischen Matrix. Die hier mit blauen Dreiecken markierten Strukturen, bei denen es sich vermutlich um die bei den vorangegangenen AFM-Untersuchungen der Perlmutterpaltflächen beobachte-

ten natürlich gewachsenen kristallinen Strukturen handelt, sind von organischer Matrix überzogen [4]. Diese Beobachtungen erlauben die Annahme, dass die Plättchenoberfläche hier fast vollständig mit einer Schicht der organischen Matrix bedeckt ist.

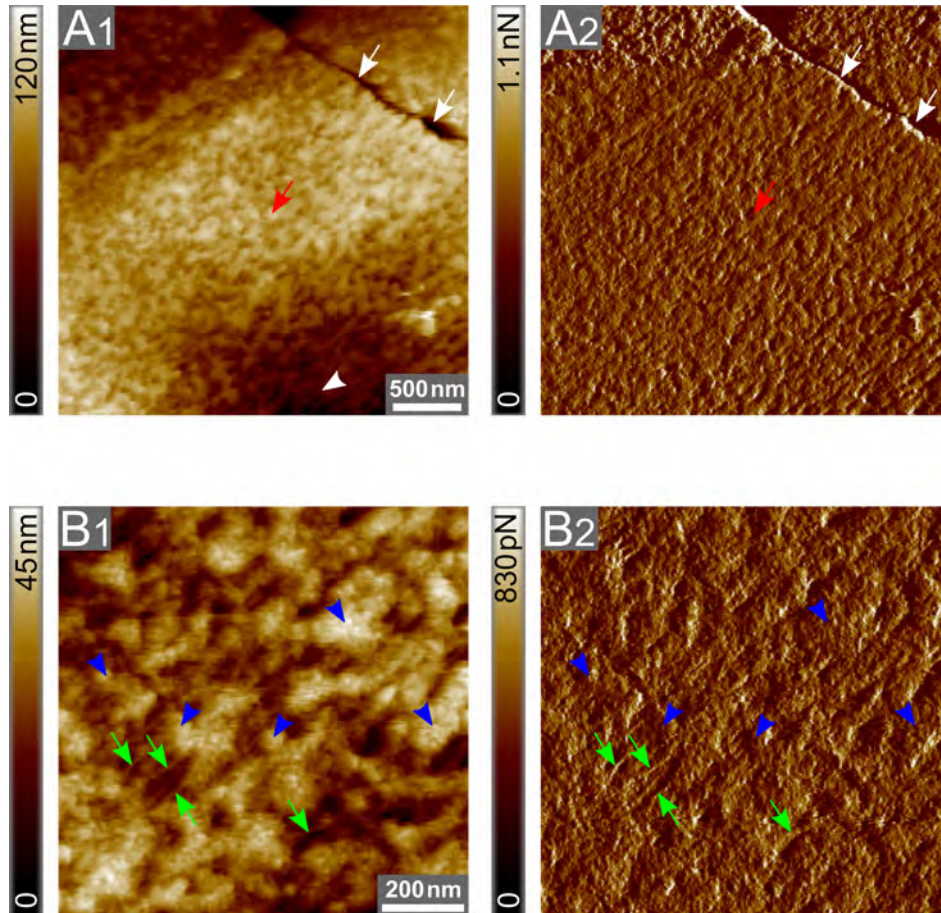


Abbildung 62: AFM-Aufnahmen einer vierten frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $3,0\ \mu\text{m} \cdot 3,0\ \mu\text{m}$ und (B) $1,0\ \mu\text{m} \cdot 1,0\ \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen die Höhsignale und Bilder mit Index 2 (rechts) die Fehlersignale. In (A) ist die Oberfläche eines Aragonitplättchens (rote Pfeile) dargestellt, die jedoch deutlich anders aussieht als die Plättchenoberflächen bei den zuvor untersuchten Perlmutterpaltflächen (siehe Abb. 57 bis 61). Im abgebildeten Probenbereich sind ein kleiner Teil einer Plättchenkante des mit roten Pfeilen markierten Aragonitplättchens und ein Spalt zwischen den verschiedenen Plättchen (weiße Pfeile) sowie der Randbereich einer Vertiefung bzw. eines Lochs (weißes Dreieck) beobachtbar. Vermutlich überzieht eine Schicht der organischen Matrix dieses Aragonitplättchen. (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Teilbereichs der Oberfläche des in (A) gezeigten, mit roten Pfeilen markierten, Aragonitplättchens. Zwischen den natürlich gewachsenen kristallinen Strukturen (blaue Dreiecke), die von organischer Matrix bedeckt sind, kann man einzelne dünne, längere Filamente (grüne Pfeile) der organischen Matrix erkennen.

In den in Abbildungen 57 bis 61 gezeigten AFM-Aufnahmen von mehreren verschie-

denen frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen konnten deutlich einzelne Aragonitplättchen und deren Plättchenkanten bzw. -ränder beobachtet werden. Bei den AFM-Untersuchungen gelang es auch, die Oberflächenstrukturen der Aragonitplättchen detailliert und in hoher Auflösung abzubilden. Alle betrachteten Plättchenoberflächen wiesen dabei viele natürlich gewachsene kristalline Strukturen auf. Bei diesen während des natürlichen Schalenwachstums entstandenen Kristallstrukturen handelt es sich um sogenannte „nanoasperities“ und/oder kleine, nadelförmige Aragonitkristalle [4]. Die „nanoasperities“ sind kristallisationsbedingte Unebenheiten mit Höhen von wenigen Nanometern auf den (001)-Oberflächen, also den großen, horizontalen Oberflächen der Aragonitplättchen, die die Haftreibung zwischen den Aragonitplättchen sowie zwischen den Plättchen und der organischen Matrix erhöhen [4, 77]. Damit tragen diese nanoskalierten Unebenheiten auf den Plättchenoberflächen zur Stabilität und Elastizität des Perlmutts bei [4, 8]. Zudem konnte in vielen der Plättchenoberflächen eine breitere Vertiefung bzw. ein breiteres Loch, das oft in der Mitte des Aragonitplättchens auftrat, beobachtet werden. In diesen Löchern waren vermutlich vor der Probenpräparation jeweils eine oder mehrere Mineralbrücken vorhanden [3, 4]. Bei den Mineralbrücken handelt es sich um kristalline Verbindungen, die sich zwischen zwei in vertikaler Richtung direkt übereinanderliegenden Aragonitplättchen ausbilden sowie einen Durchmesser von etwa 30 nm und eine Höhe von etwa 30 nm bis zu 50 nm aufweisen [4, 14]. Die Höhe der Mineralbrücken entspricht dabei der Schichtdicke der zwischen den übereinanderliegenden Aragonitplättchen vorhandenen interlamellaren organischen Matrix [2, 18]. Die Mineralbrücken können beim Aragonitwachstum während der Perlmutterbildung die Kristallorientierung an das nächste, in der darüberliegenden Schicht neu entstehende Aragonitplättchen weitergeben [4, 14]. Darüber hinaus konnten auf den Aragonitplättchen in den Abbildungen 57 bis 61 bereits einige auf den Probenoberflächen vorhandene höhere natürlich gewachsene Aragonitkristalle beobachtet werden, die offenbar eine charakteristische nadelförmige bzw. nadelartige Wachstumsgeometrie zeigen. In der Abbildung 62 waren nun sogar dünne, längere Filamente der organischen Matrix auf dem dort untersuchten Aragonitplättchen sichtbar.

5.4 Direkte Beobachtung des induzierten Wachstums auf Perlmutterpaltflächen

Nach der Charakterisierung der Oberflächenstruktur der frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen bzw. Perlmutterpaltflächen, die im vorherigen Abschnitt 5.3 detailliert beschrieben ist, erfolgte hier die Durchführung von mehreren Wachstumsexperimenten auf verschiedenen Perlmutterpaltflächen. Da sowohl mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden als auch

mit den ScanAsyst-Air²²⁸ AFM-Sonden die Oberflächenstruktur der Perlmutterpaltflächen gut aufgelöst abgebildet werden konnte, fanden beide Arten der AFM-Sonden zum Abbilden der Probenoberflächen bei den Wachstumsexperimenten Verwendung.

Vermutlich ist zu erwarten, dass das induzierte Wachstum der Calciumcarbonatkristalle auf den frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen während der AFM-Wachstumsexperimente insbesondere: (1) in der Vertiefung bzw. dem Loch in der Plättchenoberfläche und (2) im Bereich um die Vertiefung bzw. das Loch auf den einzelnen Aragonitplättchen sowie (3) an den Kanten bzw. Rändern der Aragonitplättchen stattfindet. Diese Annahme wird unterstützt durch die Untersuchungen, die z. B. von Bezares et al. in [6] und von Nudelman et al. in [82] durchgeführt wurden. Wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, gelangen Bezares et al. in [6] der Nachweis von verschiedenen Makromolekülen an unterschiedlichen Stellen in der organischen Matrix, die aus Schneckenschalen der Art *Haliothis rufescens* gewonnen wurde. Jeweils in der Mitte der wabenförmigen Anordnungen der organischen Matrix, die sich durch das Herauslösen der Aragonitplättchen ergaben, fand sich ein zentraler Bereich, in dem vor allem Carboxylgruppen und sogenannte aragonitnukleierende Proteine vorkamen. Dieser zentrale Bereich ist wiederum von einem ringförmigen Bereich, der viele Sulfatgruppen enthält, umgeben [5, 14]. Auch fanden Bezares et al. in [6], dass Carboxylgruppen und Sulfatgruppen sowie aragonitnukleierende Proteine im Bereich der intertabularen organischen Matrix (ITM) vorkommen. Solche aragonitnukleierenden Proteine, die an den Chitinfilamenten der organischen Matrix gebunden sind, fördern die Nukleation des Polymorphs Aragonit [1, 5]. In den verschiedenen Modellen, die das Wachstum des Aragonits bei der Perlmutterbildung beschreiben, wird auch angenommen, dass Carboxyl- und Sulfatgruppen die Nukleation und das Wachstum des Aragonits begünstigen [5, 14].

Im Folgenden findet sich *erstens* die detaillierte Beschreibung der Durchführung und der Ergebnisse von drei Wachstumsexperimenten auf verschiedenen frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen. Zwei dieser Wachstumsexperimente erfolgten dabei auf dem ersten und dem zweiten in Abschnitt 5.3.1 mit dem AFM voruntersuchten Probestück. *Zweitens* werden auch die Ergebnisse von drei weiteren Wachstumsexperimenten auf frisch präparierten Perlmutterpaltflächen zusammengefasst. Auf allen gezeigten Probenoberflächen gelang es, das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen mit dem AFM zu beobachten. Dabei konnte auch mit beiden AFM-Sondenarten das Wachstum der Calciumcarbonatkristalle aufgenommen werden. Bei diesen sechs im Folgenden gezeigten Wachstumsexperimenten erfolgte die Initiierung des Kristallwachstums jeweils durch das Einspülen definierter Volumina höher übersättigter CaCO_3 -Lösungen. Insgesamt wurden 20 verschiedene Wachstumsexperimente auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen durchgeführt. Dabei gelang die

²²⁸genaue Spezifikationen beider AFM-Sondenarten siehe Anhang (Abschnitt 10.1)

direkte Beobachtung des Kristallwachstums bei mehreren dieser Wachstumsexperimente.

Die Vorbereitung aller Probestücke für die Wachstumsexperimente erfolgte analog zu der Präparationsprozedur für die Strukturuntersuchungen. Dazu wurden die frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen jeweils aus der Schale einer Meeresschnecke der Art *Haliotis tuberculata* durch Hammerschläge erzeugt und sofort mit einer 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung benetzt sowie anschließend mit Hilfe des Zweikomponentenklebers²²⁹ in der Mitte einer 35 mm großen Petrischale²³⁰ fixiert und erneut mit der zuvor verwendeten CaCO_3 -Lösung (0,9 mM oder 1 mM) befeuchtet [4]. Nach Abbinden des Zweikomponentenklebers erfolgte das Hinzufügen von 3 ml der für das Feuchthalten der Probenoberfläche verwendeten CaCO_3 -Lösung in die Petrischale. Vor Probeneinbau fand jeweils die Kalibrierung der für die Untersuchung genutzten AFM-Sonde gemäß den in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen Verfahren statt. Anschließend wurde die Petrischale mit fixiertem Probestück ins AFM eingebaut und ein geeigneter Probenbereich zum Abbilden ausgewählt. Zu Beginn der AFM-Wachstumsexperimente erfolgte das Abbilden der Probenoberfläche somit jeweils in 3 ml einer einfach gesättigten CaCO_3 -Lösung (0,9 mM) oder einer leicht übersättigten CaCO_3 -Lösung (1 mM) [4]. Anschließend wurden über einen längeren Zeitraum (mehrere Stunden) viele aufeinanderfolgende AFM-Bilder desselben Probenbereichs aufgenommen und während der Aufnahme dieser AFM-Bildsequenz mehrmals nach verschiedenen Zeitspannen jeweils 1 ml bis maximal 2 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale gegen das gleiche Volumen höher übersättigter CaCO_3 -Lösungen (2 mM, 4 mM oder 5 mM) ausgetauscht, um Kristallwachstum auf den Perlmutterpaltflächen zu initiieren [4].

Um zusätzlich den Einfluss von Proteinen der löslichen Matrix auf das Kristallwachstum zu untersuchen, wurden noch zwei weitere Wachstumsexperimente auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen durchgeführt, bei denen die Initiierung des Wachstums jeweils durch Einspülen einer höher übersättigten CaCO_3 -Lösung, der eine bestimmte Proteinkonzentration der löslichen Matrix hinzugefügt wurde, erfolgte. Da bei diesen AFM-Experimenten das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen jedoch nicht direkt beobachtet werden konnte, sind diese Wachstumsexperimente hier nicht beschrieben.

5.4.1 Erstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche

5.4.1.1 Voruntersuchung: AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur

In der **Abbildung 63** ist die mit dem AFM aufgenommene Oberfläche einer frisch präparierten Perlmutterpaltfläche, die sich in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befand, mit den zwei Scanflächen von $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ bei den Bildern (A) und von $3,0 \mu\text{m} \cdot 3,0 \mu\text{m}$ bei den

²²⁹Epoxykleber, max. 4 min Topfzeit; Bindulin; H.L. Schönleber GmbH; Fürth, Deutschland

²³⁰10 mm Höhe, max. 10 ml Volumen, aus Polystyrol; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

Bildern (B) dargestellt. Die Bilder mit dem Index 1 (jeweils links) zeigen die Höhengsignale und die Bilder mit dem Index 2 (jeweils rechts) die entsprechenden Fehlersignale. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte hier mit einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde bei Verwendung einer Kraft von 200 pN. Die Aufnahme der Bilder (A) fand mit einer Auflösung von 256 x 256 Pixel und einer Abtastrate von 0,901 Hz statt. Die Bilder (B) wurden mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel und einer Abtastrate von 0,497 Hz aufgenommen. Während der Präparationsprozedur wurde hier eine 0,9 mM CaCO_3 -Lösung verwendet. Die „touch“-Kalibrierung²³¹ der AFM-Sonde ergab eine Deflektionssensitivität von $(12,7 \pm 2,5) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und eine Federkonstante von $0,14 \frac{\text{N}}{\text{m}}$.

Die Plättchenkanten bzw. -ränder und die einzelnen Aragonitplättchen selbst sind in den Bildern (A) und (B) nicht deutlich zu erkennen. Auf der hier, in den AFM-Bildern, gezeigten Probenoberfläche befinden sich viele natürlich gewachsene kristalline Strukturen, die bereits Höhen im Bereich von mehreren zehn Nanometern bis zu etwa 80 nm aufweisen. Die weißen Pfeile in den Bildern (A) kennzeichnen beispielhaft einige dieser höheren kristallinen Strukturen. Wie in Abschnitt 5.3.1 detailliert beschrieben, sind die Oberflächen der einzelnen Aragonitplättchen typischerweise nicht glatt, sondern weisen kristallisationsbedingte Unebenheiten mit Höhen von wenigen Nanometern, die sogenannten „nanoasperities“, auf [76, 77]. Allerdings existieren hier offenbar auf der Probenoberfläche schon viele höher gewachsene, nadelförmige Calciumcarbonatkristalle. Im unteren, linken Teil des Bildes (A1) bzw. (A2) ist ein Bereich, in dem nur wenige dieser sehr hohen, natürlich gewachsenen, kristallinen Strukturen auftreten, beobachtbar. Die blauen Pfeile in den Bildern (A) markieren zur Veranschaulichung diesen Oberflächenbereich. Das Bild (B1) bzw. (B2) zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Teilausschnitts des Bildes (A1) bzw. (A2), in der insbesondere dieser mit blauen Pfeilen gekennzeichnete Bereich vergrößert zu sehen ist. Dort kann man gut erkennen, dass in diesem Bereich tatsächlich deutlich weniger von den sehr hohen natürlich gewachsenen Kristallstrukturen vorhanden sind. Obwohl die Aragonitplättchen hier nicht sichtbar sind, existieren einige Spalte auf der Probenoberfläche. Zur besseren Sichtbarkeit markieren die roten Pfeile in den Bildern (B) den Verlauf eines solchen Spalts. Die Spalte befinden sich vermutlich zwischen den Kanten bzw. Rändern von nebeneinanderliegenden und bereits größtenteils zusammenstoßenden Plättchen [4]. Zudem sind im Bild (B1) auf der Probenoberfläche kleine Löcher bzw. Poren, von denen beispielhaft vier mit weißen Dreiecken markiert wurden, gut erkennbar. Zusätzlich kennzeichnen die weißen Dreiecke im Bild (B2) die Positionen dieser Löcher.

²³¹Diese Kalibrierung erfolgte wieder auf dem Boden einer zweiten Petrischale, in der sich nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befanden.

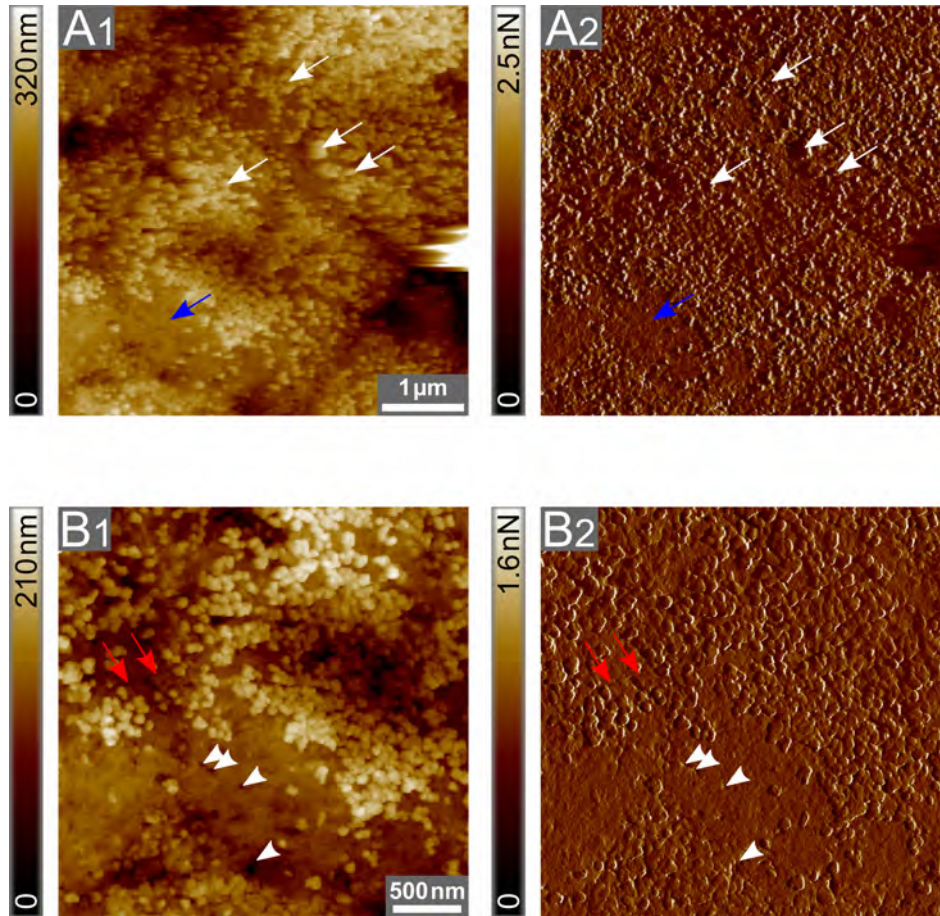


Abbildung 63: AFM-Aufnahmen der Oberfläche der frisch präparierten Perlmutterpaltfläche, auf der später das erste Wachstumsexperiment (siehe Abb. 65 und 66) durchgeführt wurde, in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ und (B) $3,0 \mu\text{m} \cdot 3,0 \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (links) zeigen die Höhengsignale und Bilder mit Index 2 (rechts) die Fehlersignale. Auf der Probenoberfläche befinden sich bereits viele, mehrere zehn Nanometer bis zu etwa 80 nm hohe, natürlich gewachsene kristalline Strukturen (weiße Pfeile in (A)). Die blauen Pfeile in (A) markieren einen Oberflächenbereich, in dem nur wenige solcher höheren natürlich gewachsenen Kristalle vorhanden sind. (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme dieses in (A) mit blauen Pfeilen markierten Probenbereichs. Dort kennzeichnen die weißen Dreiecke kleine Löcher bzw. Poren auf der Probenoberfläche. Zusätzlich sind auf der Probenoberfläche einige Kanten, bei denen es sich wahrscheinlich um Aragonitplättchenränder bzw. -kanten handelt, und Spalte erkennbar. Zur besseren Sichtbarkeit markieren die roten Pfeile in (B) beispielhaft den Verlauf eines Spalts, der sich vermutlich zwischen verschiedenen Aragonitplättchen befindet.

Bis zur Aufnahme der Bilder (A) befand sich das Probestück bereits etwa 160 Minuten in den 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung, die nach dem Abbinden des Zweikomponentenklebers in die Petrischale pipettiert wurden. Da die 0,9 mM CaCO_3 -Lösung einer gesättigten Lösung entspricht, sollte in dieser Lösung weder Wachstum noch Abbau des

Calciumcarbonats stattfinden [4]. Die Lagerung und die Untersuchung des Probestücks in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung erklärt somit nicht das Vorhandensein so vieler bereits bis zu etwa 80 nm hoher kristalliner Strukturen auf der Probenoberfläche zu diesem Zeitpunkt. Da die frisch präparierte Perlmutterpaltfläche bis zu diesem Zeitpunkt nur in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung untersucht wurde, muss die Entstehung dieser Kristalle mit der typischen nadelförmigen Geometrie schon während des natürlichen Schalenwachstums, d. h. als die Meeresschnecke noch lebte, stattgefunden haben [4].

Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Bereiche, die auf der Probenoberfläche erkennbar sind, und zur besseren Beobachtung der Form der auf der Probenoberfläche existierenden kristallinen Strukturen zeigt die **Abbildung 64** die dreidimensionale Rekonstruktion des in Abbildung 63 dargestellten Höhengsignals (B1). Die Skalierung der Höhe bei der 3D-Rekonstruktion erfolgte genauso wie im Höhenbild (B1). In der Abbildung 64 ist gut erkennbar, dass auf dem Großteil der hier abgebildeten Probenoberfläche, im Gegensatz zu den in Abschnitt 5.3.1 untersuchten und charakterisierten Perlmutterpaltflächen, viele deutlich höhere kristalline Strukturen auftreten. Dabei weisen die meisten dieser unter natürlichen Bedingungen gewachsenen Kristalle schon Höhen im Bereich von etwa 40 nm bis 80 nm auf. Wie in der 3D-Rekonstruktion ebenfalls gut zu sehen ist, besitzen die Kristalle eindeutig nadelartige Formen, da deren Höhen wesentlich größer sind als deren laterale Ausdehnungen bzw. Breiten. Wie bereits zuvor erwähnt, werden die Kristalle beim Abbilden mit der AFM-Spitze lateral verbreitert dargestellt [181, 182]. Die weißen Pfeile kennzeichnen auch hier beispielhaft vier solche nadelförmigen Kristalle, die jedoch alle bereits Höhen von etwa 80 nm aufweisen. Auch der Bereich auf der Probenoberfläche, in dem nur wenige solcher sehr hohen, nadelartigen Kristalle existieren, ist sichtbar. Der blaue Pfeil kennzeichnet hier wie in den Bildern (A) der Abbildung 63 diesen Probenbereich. Dort sind auch kristalline Strukturen vorhanden, die allerdings nur einige Nanometer bis zu wenigen zehn Nanometern hoch sind. Der grüne und schwarze Pfeil markieren zwei solche kleineren Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Höhen. Eine Unterscheidung zwischen sehr kleinen bereits nadelförmig gewachsenen Kristallen und den „nanoasperities“, d. h. den durch Kristallisation bedingten nanoskalierten Unebenheiten, ist sehr schwer und oft nicht möglich [4, 77]. Alle diese natürlich entstandenen kristallinen Strukturen bestehen vermutlich aus dem Polymorph Aragonit [4]. Somit sind auf der in Abbildungen 63 und 64 gezeigten Probenoberfläche neben den „nanoasperities“ bereits viele nadelförmige Aragonitkristalle vorhanden. Obwohl die einzelnen Aragonitplättchen und die Kanten bzw. Ränder dieser Aragonitplättchen auch aufgrund der verwendeten Scanfläche nicht deutlich beobachtbar sind, erfolgte trotzdem die Durchführung eines Wachstumsexperiments auf dem in den Bildern (B) der Abbildung 63 dargestellten Probenbereich. Auch in den

später, nach erfolgreichem Wachstumsexperiment, in Abbildungen 70 und 71 gezeigten REM-Aufnahmen dieser Perlmutterpaltfläche, sind die einzelnen Aragonitplättchen und die Plättchenkanten bzw. -ränder nicht sichtbar. Aus den REM-Bildern weiterer Probestücke (siehe Abb. 76 bis 79 und Abb. 84) weiß man, dass die lateralen Abmessungen bzw. Ausdehnungen der Aragonitplättchen im Bereich von etwa $4\ \mu\text{m}$ bis $9\ \mu\text{m}$ liegen [4].

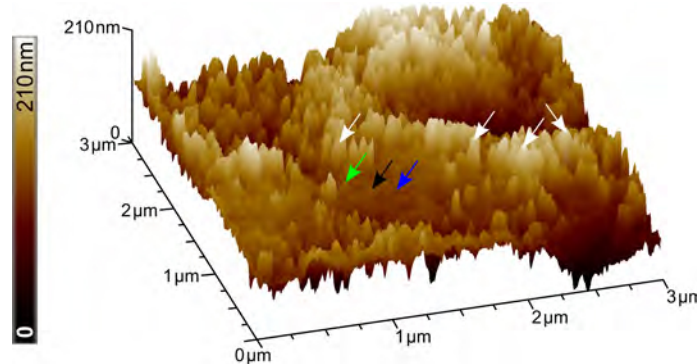


Abbildung 64: Dreidimensionale Rekonstruktion des in Abb. 63 gezeigten Höhsignals (B1). Auf der Probenoberfläche sind deutlich nadelartige, vermutlich aus Aragonit bestehende Kristalle beobachtbar. Dabei treten viele Kristalle auf, die schon Höhen im Bereich von etwa $40\ \text{nm}$ bis zu $80\ \text{nm}$ aufweisen (weiße Pfeile). Andere kristalline Strukturen auf der Probenoberfläche sind noch wesentlich kleiner (schwarzer und grüner Pfeil). Bei diesen Strukturen handelt es sich um „nanoasperities“ und/oder nadelartige Aragonitkristalle mit einer sehr geringen Höhe [4, 77]. Die „nanoasperities“ und alle nadelartigen Aragonitkristalle sind bereits während des natürlichen Schalenwachstums entstanden [4]. Der blaue Pfeil kennzeichnet wie in Abb. 63 den Bereich auf der Probenoberfläche, in dem kaum höhere natürlich gewachsene Aragonitkristalle auftreten.

Die Aragonitkristalle wachsen auf den Aragonitplättchen in der Schneckenschale unter natürlichen Bedingungen anscheinend zunächst als einzelne spitze, nadelartige bzw. nadelartige Kristalle in Richtung ihrer \vec{c} -Achse. Vermutlich wachsen diese Aragonitkristalle anschließend ab einer gewissen Höhe verstärkt in die lateralen Richtungen entlang der \vec{a} - und \vec{b} -Achsen weiter und bilden dann größere Kristalle [14, 5]. Nach einer bestimmten Zeit bilden sich wahrscheinlich aus mehreren größeren, lateral bereits zusammengewachsenen Kristallen bei weiterem Kristallwachstum die einzelnen Aragonitplättchen, bis diese mit benachbarten, gleichzeitig gewachsenen Aragonitplättchen in lateraler Richtung zusammenstoßen [4, 5].

5.4.1.2 Aufnahme der AFM-Bildsequenz

Im Folgenden erfolgt die Beschreibung des Wachstumsexperiments, dessen Durchführung auf der in Abbildungen 63 und 64 gezeigten frisch präparierten Perlmutterpaltfläche statt-

fund. Für die direkte Beobachtung des Kristallwachstums wurde der in den Bildern (B) der Abbildung 63 dargestellte Probenbereich ausgewählt. Die Aufnahme der aufeinanderfolgenden Bilder dieses Oberflächenbereichs der Perlmutterpaltfläche wurde erst gestartet, nachdem die zum Abbilden der Probenoberfläche benötigte Kraft stabil eingestellt werden konnte und das Abrastern des Probenbereichs mit den gewählten Einstellungen über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten gelang. Das Abbilden des ausgewählten Probenbereichs während des Wachstumsexperiments erfolgte mit der PeakForce-HiRes-F-A AFM-Sonde nun bei Verwendung einer Kraft von 200 pN und einer Abtastrate von 0,795 Hz. Allerdings wurde hier die Auflösung im Vergleich zur Strukturuntersuchung von 512 x 512 Pixel auf 256 x 256 Pixel reduziert, damit die für das Abrastern dieses Probenbereichs benötigte Zeit nur etwa sechs Minuten betrug. So konnten während des Wachstumsexperiments die Aufnahmen von aufeinanderfolgenden Bildern in einem Zeitabstand von etwa sechs Minuten erfolgen. Dadurch gelang die Beobachtung von möglichst vielen Nukleations- bzw. Wachstumsereignissen. Insgesamt wurde das Kristallwachstum auf der Probenoberfläche mit dem AFM über einen Zeitraum von 510 Minuten beobachtet.

Die **Abbildungen 65 und 66** zeigen nun ausgewählte Aufnahmen aus der mit dem AFM aufgenommenen Bildsequenz desselben Oberflächenbereichs der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten. Jeweils oben (Bilder mit Index 1) sind die Höhsignale und jeweils unten (Bilder mit Index 2) die entsprechenden Fehlersignale dargestellt. Zwischen den Aufnahmen der Bilder (A) und (P) ist ein Zeitraum von 464 Minuten vergangen. Dabei zeigen die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $3,0\ \mu\text{m} \cdot 3,0\ \mu\text{m}$ in der Abbildung 65 die Probenoberfläche über einen Zeitraum von 348 Minuten und die Bilder (I) bis (P) mit der Scanfläche von jeweils $1,76\ \mu\text{m} \cdot 1,76\ \mu\text{m}$ in der Abbildung 66 die Probenoberfläche über eine Zeitspanne von weiteren 110 Minuten. Zwischen den Bildern (H) und (I) sind zusätzlich sechs Minuten vergangen. Die zeitlichen Abstände zwischen den gezeigten Bildern sind dabei nicht gleich und im Weiteren beschrieben.

Zu Beginn des Wachstumsexperiments (Bilder (A)) befand sich das Probestück noch in 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Wie zuvor beschrieben, existierten zu diesem Zeitpunkt größtenteils im untersuchten Probenbereich der Perlmutterpaltfläche bereits viele natürlich gewachsene, mehrere zehn Nanometer bis zu etwa 80 nm hohe, kristalline Strukturen, die schon nadelartige Formen aufwiesen. Im unteren, linken Bildausschnitt ist ein Bereich, in dem nur wenige dieser höheren kristallinen Strukturen auftraten, beobachtbar. Bis zur Aufnahme der Bilder (A) befand sich das Probestück über einen Zeitraum von etwa 160 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.

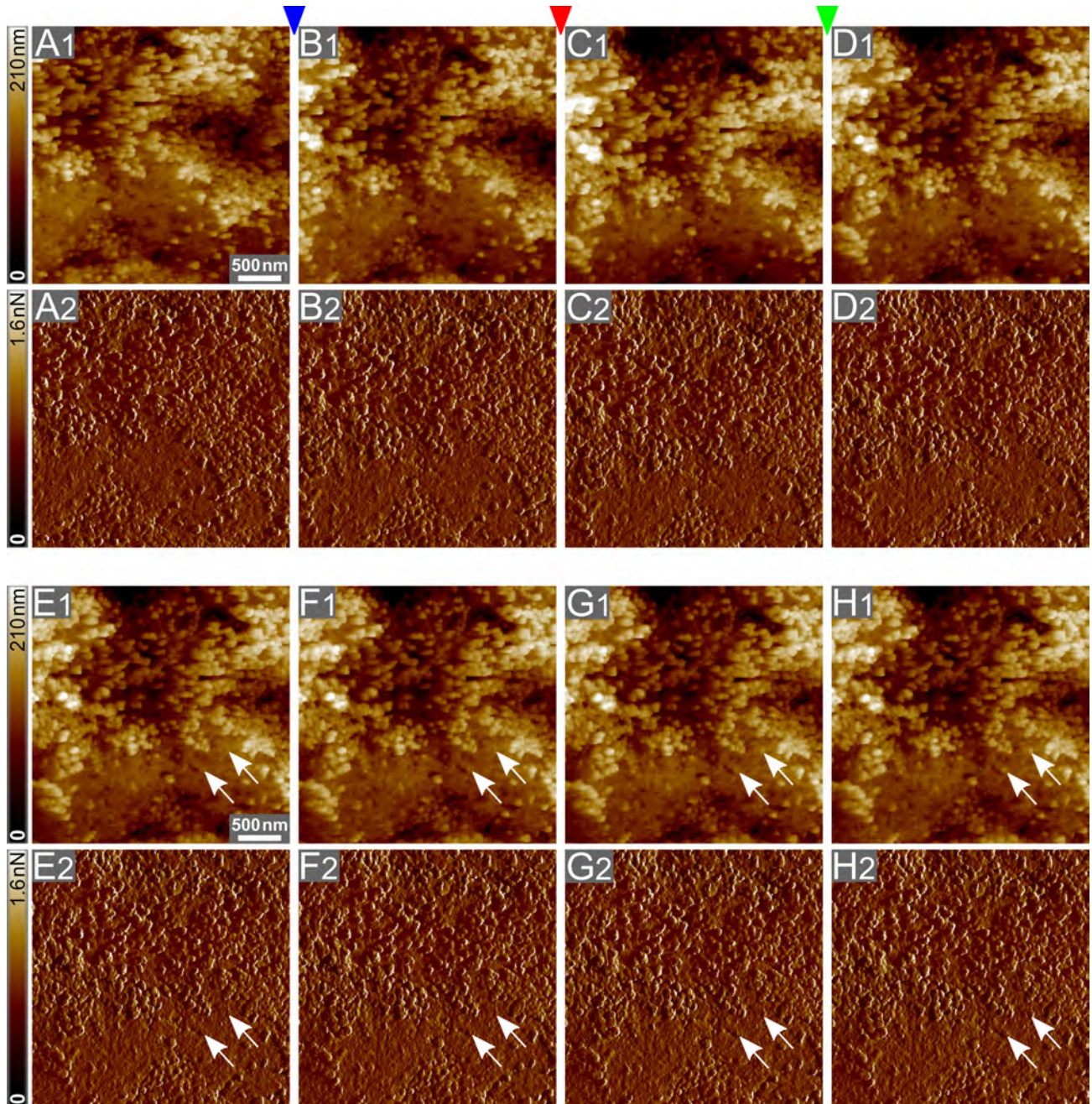


Abbildung 65: Erstes Wachstumsexperiment: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, deren Voruntersuchung in Abb. 63 gezeigt wurde. Die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $3,0\ \mu\text{m} \cdot 3,0\ \mu\text{m}$ stellen denselben Probenbereich über einen Zeitraum von 348 Minuten dar. Bilder mit Index 1 (jeweils oben) zeigen die Höhensignale und Bilder mit Index 2 (jeweils unten) die Fehler-signale. Zu Beginn (A) befand sich die Probe in 3 ml einer $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung. Das blaue, rote und grüne Dreieck kennzeichnen die Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Dabei wurde jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und 1 ml einer übersättigten $4\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung eingespült. Damit ergaben sich folgende Konzentrationen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) $2,6\ \text{mM}$ und (D) bis (H) $3,1\ \text{mM}$. Die Zeitspannen zwischen den Bildern betragen: (A) bis (B) 109 min, (B) bis (C) 63 min, (C) bis (D) 80 min und (D) bis (H) jeweils etwa 23 min bis 26 min. Die weißen Pfeile markieren beispielhaft zwei auf der Probenoberfläche in (G) und (H) gewachsene CaCO_3 -Kristalle.

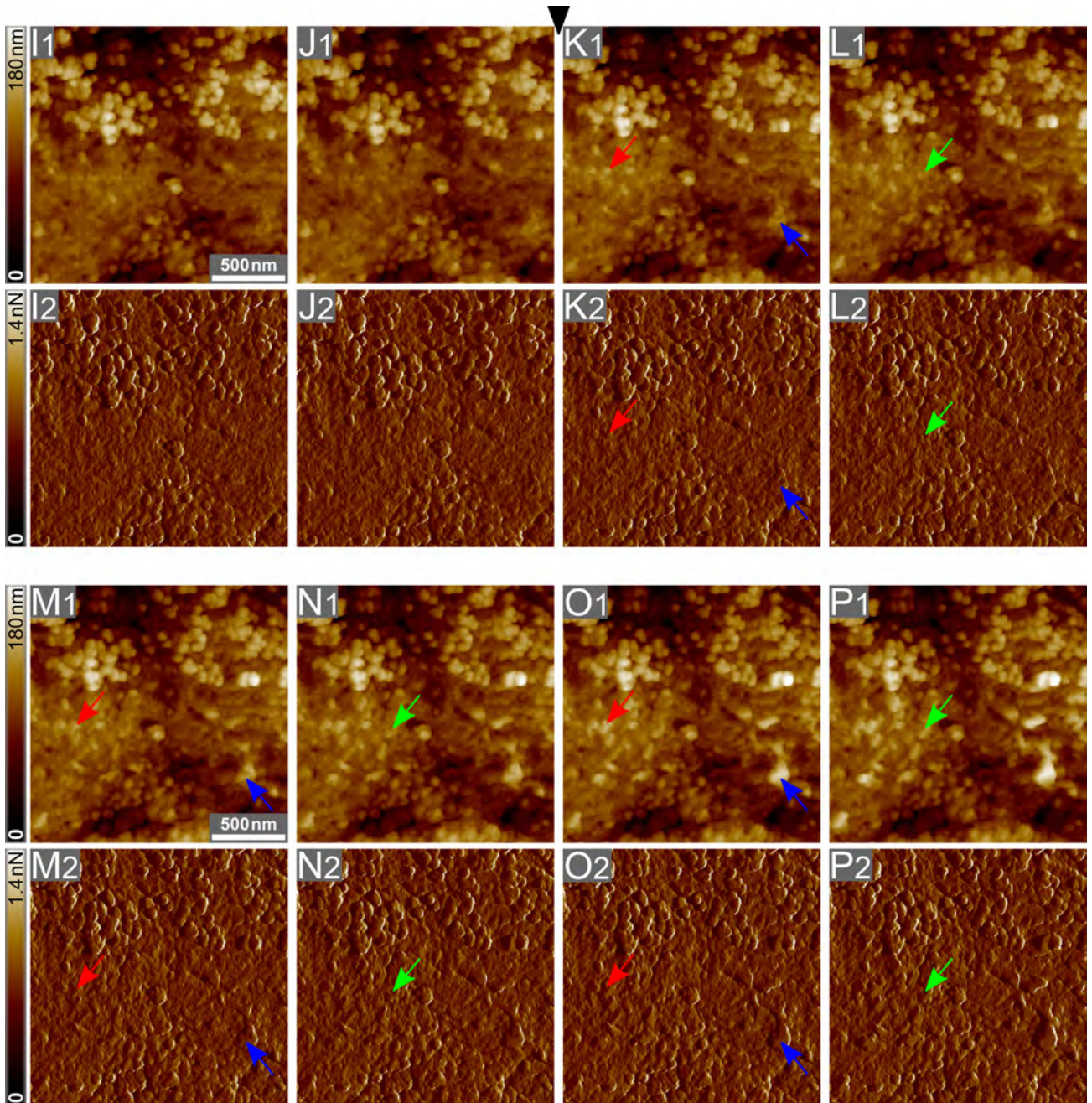


Abbildung 66: Erstes Wachstumsexperiment: Fortsetzung der AFM-Bildsequenz aus Abb. 65 mit ausgewählten Aufnahmen der Perlmutterpaltfläche. Nach der Aufnahme der Bilder (H) wurde der untere Bereich der in Abb. 65 dargestellten Probenoberfläche mit einer höheren Vergrößerung untersucht. Die Bilder (I) bis (P) mit der Scanfläche von jeweils $1,76 \mu\text{m} \cdot 1,76 \mu\text{m}$ zeigen diesen Probenbereich über einen Zeitraum von weiteren 110 Minuten. Bei (I) befand sich die Probe bereits in 3 ml einer 3,1 mM CaCO_3 -Lösung. Das schwarze Dreieck kennzeichnet den erneuten Austausch der CaCO_3 -Lösungen, wobei wieder 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und anschließend 1 ml der übersättigten 4 mM CaCO_3 -Lösung eingespült wurde. Damit ergaben sich folgende Konzentrationen: (I) bis (J) 3,1 mM und (K) bis (P) 3,4 mM. Die Bilder wurden in einem Zeitabstand von jeweils 12 min bis 23 min (siehe Abb. 67) aufgenommen. Die roten, blauen und grünen Pfeile markieren beispielhaft jeweils einen ausgewählten CaCO_3 -Kristall, dessen Höhe deutlich zunimmt.

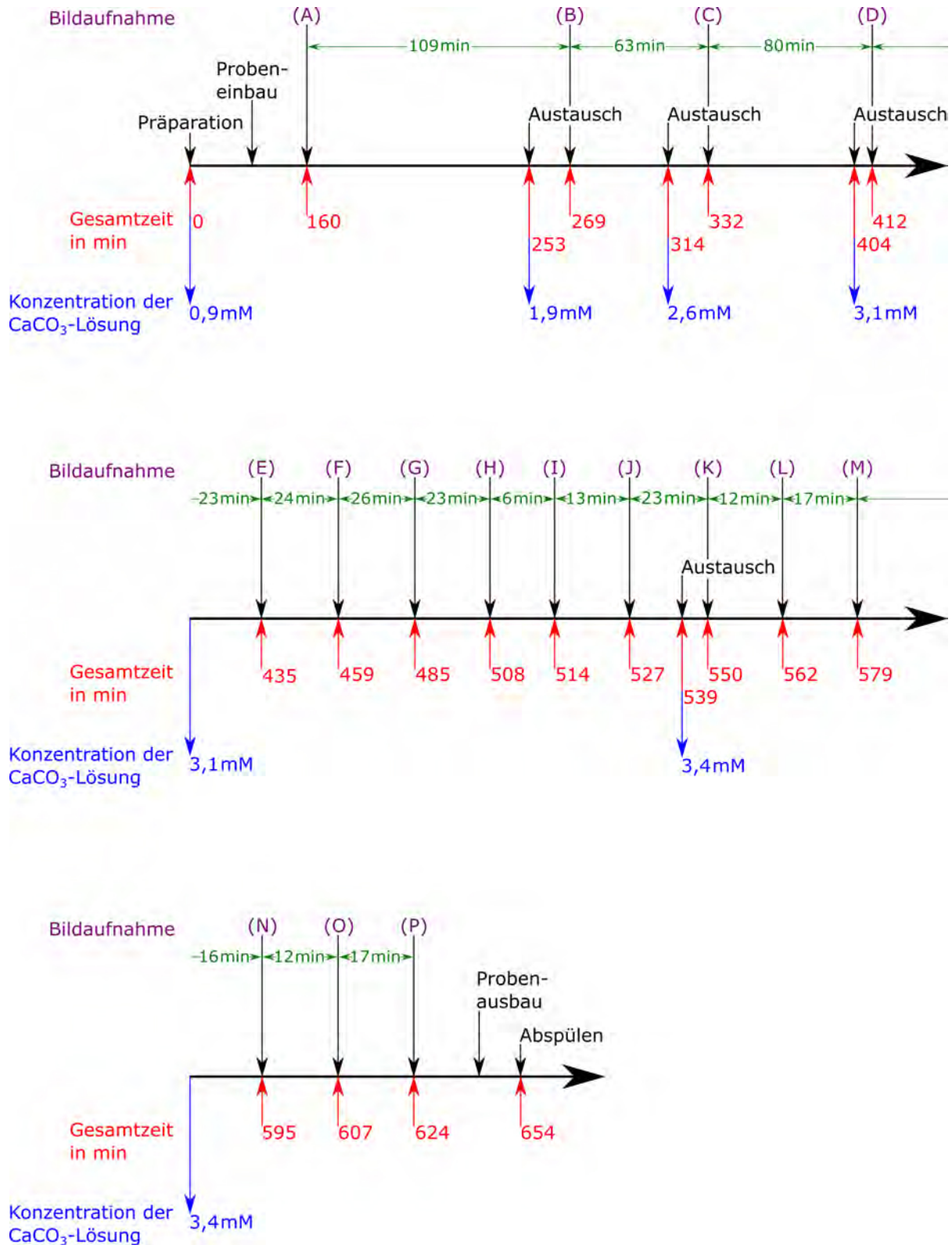


Abbildung 67: Zeitstrahl, der den detaillierten Ablauf des ersten in Abb. 65 und 66 gezeigten Wachstumsexperiments auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche darstellt. Hier sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die genauen zwischen den gezeigten Bildern vergangenen Zeitspannen, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO_3 -Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben.

Zur Initiierung des Kristallwachstums auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche fand hier eine übersättigte 4 mM CaCO_3 -Lösung Verwendung. Wie bereits bei den Wachstumsexperimenten auf „flat pearl“-Oberflächen in Abschnitt 5.2 beschrieben, wurde vor der Ausführung des ersten Austausches die 4 mM CaCO_3 -Lösung für einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten direkt neben das AFM gestellt, um eine Anpassung der Temperatur der 4 mM CaCO_3 -Lösung an die Temperatur der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale zu gewährleisten. Während der gesamten über den Zeitraum von 464 Minuten aufgezeichneten Bildsequenz fanden nun vier Austausche der CaCO_3 -Lösungen statt. Dabei wurde zunächst jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale mittels Pipette und Silikon Schlauch entnommen und anschließend immer 1 ml der 4 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale eingespült. Alle Lösungsaustausche fanden, wie bereits bei dem zweiten in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche, direkt während des Abbildens der Probenoberfläche statt. Die verschiedenfarbigen Dreiecke in den Abbildungen 65 und 66 kennzeichnen die Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Zur besseren Übersicht dieses Wachstumsexperiments und zum besseren Vergleich mit allen durchgeführten Wachstumsexperimenten sowohl auf den frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen als auch auf den Wachstumsfronten aus „flat pearls“ sind die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und die Zeitspannen, in der sich die Probe in der jeweiligen Lösung befand, in der Tabelle 7 aufgelistet. Die **Abbildung 67** zeigt zusätzlich wieder einen Zeitstrahl, der den detaillierten Ablauf dieses Wachstumsexperiments schematisch darstellt. Dort sind die verwendeten bzw. berechneten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die zwischen den Aufnahmen der ausgewählten Bilder (A) bis (P) vergangenen Zeiträume, die Zeitpunkte der Aufnahmen der gezeigten Bilder und der vier Austausche der CaCO_3 -Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben. Im Folgenden sind die wichtigsten Schritte und Aspekte des in Abbildungen 65 und 66 gezeigten Wachstumsexperiments zusammengefasst.

Der erste Austausch erfolgte 16 Minuten vor der Aufnahme der Bilder (B). Daher befand sich das Probestück über etwa 253 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Nach dem Austausch wies die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eine Konzentration von 1,9 mM auf. Die Zeitspanne zwischen den Aufnahmen der Bilder (A) und (B) beträgt dabei 109 Minuten. Jeweils kurz vor der Aufnahme der Bilder (C) und (D) wurde erneut 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und 1 ml der 4 mM CaCO_3 -Lösung eingespült. Damit lässt sich die Konzentration der CaCO_3 -Lösung bei den Bildern (C) zu 2,6 mM und bei den Bildern (D) bis (J) zu 3,1 mM berechnen. Zwischen den Bildern (B) und (C) bzw. (C) und (D) verging ein Zeitraum von 63 Minuten bzw. von 80 Minuten. Ab den Bildern (D) wurde die Zeitspanne zwischen den gezeigten Bildern (D) bis (H) für die

Darstellung deutlich kürzer gewählt und liegt jeweils im Bereich von 23 Minuten bis 26 Minuten (Details siehe Abb. 67). Die Aufnahmen der Bilder (D) bis (H) erfolgten somit über einen Zeitraum von 96 Minuten.

Konzentration der CaCO_3 -Lösung	Gesamtzeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
0,9 mM	253 Minuten	(A)
1,9 mM	61 Minuten	(B)
2,6 mM	90 Minuten	(C)
3,1 mM	135 Minuten	(D) bis (J)
3,4 mM	115 Minuten	(K) bis (P)

Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung während des ersten Wachstumsexperiments auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche (siehe Abb. 65 und 66). Dort zeigen die Bilder (A) bis (P) die Probenoberfläche über einen Zeitraum von 464 Minuten. Die Probe befand sich vor dem ersten Austausch bereits 253 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.

Bei Betrachtung der Abbildung 65 ist erkennbar, dass auf der Probenoberfläche bis zur Aufnahme der Bilder (H) nur Wachstum von wenigen Calciumcarbonatkristallen stattfand. Die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betrug zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits 3,1 mM. Die weißen Pfeile in den Bildern (G) und (H) markieren beispielhaft zwei solche neu gewachsenen Calciumcarbonatkristalle, deren Höhen im Verlauf der Bilder (G) bis (H) jedoch nur wenig zunahmten. Zum Vergleich kennzeichnen die weißen Pfeile in den Bildern (E) und (F) die Bereiche auf der Probenoberfläche, wo das Wachstum der zwei Kristalle später, zwischen den Aufnahmen der Bilder (F) und (H), erfolgte. Diese Beobachtungen erlaubten schon während der Durchführung des AFM-Experiments die Annahme, dass das Wachstum des Calciumcarbonats insbesondere in dem Bereich auf der Probenoberfläche, in dem zu Beginn des Wachstumsexperiments (Bilder (A)) nur wenige der bereits sehr hohen, nadelförmigen Kristalle vorhanden waren, stattfindet. Daher wurde dieser Probenbereich bei der weiteren direkten Beobachtung des Kristallwachstums nun vergrößert untersucht. Die Abbildung 66 zeigt daher weitere ausgewählte Bilder aus der AFM-Bildsequenz mit der Scanfläche von jeweils $1,76 \mu\text{m} \cdot 1,76 \mu\text{m}$. Dabei stellen die Bilder (I) bis (P) denselben Probenbereich über einen Zeitraum von weiteren 110 Minuten dar. Die Aufnahme der Bilder (I) erfolgte nur sechs Minuten nach der Aufnahme der Bilder (H). Zwischen den gezeigten Bildern (I) bis (P) liegt jeweils eine Zeitspanne im Bereich von 12 Minuten bis 23 Minuten.

Vor der Aufnahme der Bilder (K) wurde erneut ein Lösungsaustausch vorgenommen, sodass die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale 3,4 mM betrug. Zwischen

den einzelnen Lösungsaustauschen vergingen somit 61 Minuten, 90 Minuten und 135 Minuten. Damit wurden die folgenden Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale verwendet: 0,9 mM bei den Bildern (A), 1,9 mM bei den Bildern (B), 2,6 mM bei den Bildern (C), 3,1 mM bei den Bildern (D) bis (J) und 3,4 mM bei den Bildern (K) bis (P). Nach der Aufnahme der Bilder (P) erfolgte zunächst das Entfernen der Petrischale mit fixierter Probe aus dem AFM. Anschließend wurde die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale mit Hilfe einer Pipette entnommen, die Probe mit Reinstwasser mehrmals sorgfältig abgespült und die restliche in der Petrischale vorhandene Flüssigkeit mit einem fusselfreien Tuch²³² entfernt [4]. Bis zum Abspülen befand sich die Probe damit über eine Zeitspanne von 115 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung. Das Abbilden der Probenoberfläche bei dieser AFM-Untersuchung erfolgte somit über 61 Minuten in der 1,9 mM CaCO_3 -Lösung, über 90 Minuten in der 2,6 mM CaCO_3 -Lösung und über 135 Minuten in der 3,1 mM CaCO_3 -Lösung sowie über einen Zeitraum von 85 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung. Nach dem letzten Lösungsaustausch (schwarzes Dreieck in der Abb. 66) sind auf der Probenoberfläche viele Calciumcarbonatkristalle gewachsen. Zum besseren Vergleich markieren die roten, blauen und grünen Pfeile beispielhaft ab den Bildern (K) bzw. (L) jeweils in jedem zweiten darauffolgenden Bild einen Calciumcarbonatkristall, dessen Höhe während des Wachstumsexperiments deutlich zunahm. Das Wachstum der Kristalle fand vor allem auf der linken und rechten Seite des abgebildeten Probenbereichs statt. Die berechnete Konzentration der CaCO_3 -Lösung betrug bereits 3,4 mM. Allerdings nehmen die tatsächlichen Konzentrationen der Calciumionen und der Carbonationen während des Wachstums der Calciumcarbonatkristalle bzw. des Aragonits ab, wodurch die in der Petrischale während des Wachstumsexperiments verbliebene Konzentration der CaCO_3 -Lösung kleiner war [4]. Wie schon bei den in Abschnitt 5.2 beschriebenen Wachstumsexperimenten auf „flat pearl“-Oberflächen beobachtet, erfolgte auch hier, auf der Perlmutterpaltfläche, das Kristallwachstum erst ab einer verwendeten Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale von 3,1 mM²³³. Vermutlich benötigt die Diffusion der in der CaCO_3 -Lösung vorhandenen Calcium- und Carbonationen bis zu den entsprechenden Nukleations- bzw. Kristallisationsstellen tatsächlich einige Zeit [4].

5.4.1.3 Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder

Zusätzlich sind in der **Abbildung 68** die dreidimensionalen Rekonstruktionen jedes zweiten in Abbildung 66 dargestellten Höhensignals (Bilder mit Index 1 und der Scanfläche

²³²VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

²³³Beim zweiten auf einer „flat pearl“-Oberfläche durchgeführten Wachstumsexperiment in Abschnitt 5.2.2 war das Wachstum auf dem untersuchten Probenbereich auch erst ab einer Konzentration von 3,2 mM deutlich beobachtbar.

von jeweils $1,76\ \mu\text{m} \cdot 1,76\ \mu\text{m}$) gezeigt. Die Zeiträume zwischen den gezeigten dreidimensionalen Rekonstruktionen (I) und (K), (K) und (M) sowie (M) und (O) betragen demnach 36 Minuten, 29 Minuten und 28 Minuten. Bei allen 3D-Rekonstruktionen wurde die Höhe genauso skaliert wie bei den Höhenbildern der Abbildung 66.

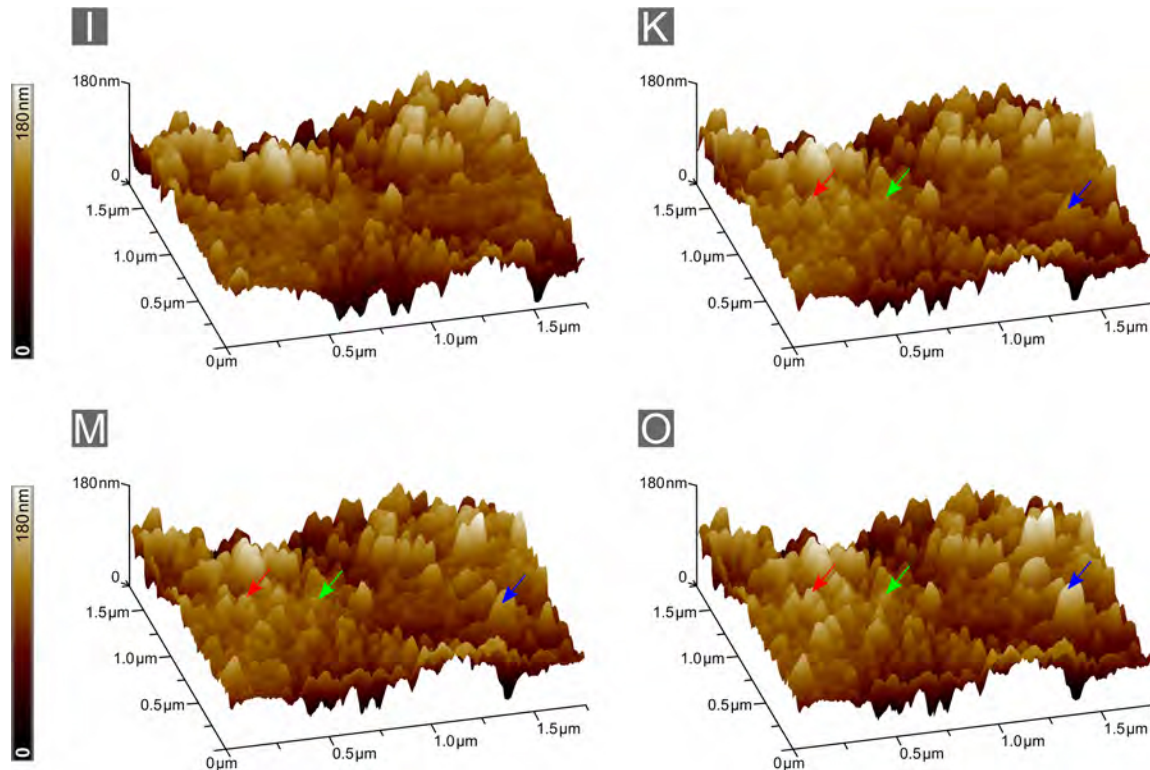


Abbildung 68: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 66 dargestellten Höhenprofile (Bilder mit Index 1 und Scanfläche von jeweils $1,76\ \mu\text{m} \cdot 1,76\ \mu\text{m}$). Beginnend mit der 3D-Rekonstruktion des Höhenbildes (I1) wurden die 3D-Rekonstruktionen jedes zweiten Höhenbildes dargestellt. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Als Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale wurden verwendet: (I) bis (J) $3,1\ \text{mM}$ und (K) bis (P) $3,4\ \text{mM}$. Auf der Probenoberfläche fand das Wachstum vieler CaCO_3 -Kristalle statt. Die roten, blauen und grünen Pfeile kennzeichnen dieselben CaCO_3 -Kristalle wie in Abb. 66, deren Höhen während des AFM-Wachstumsexperiments deutlich zunahm. Weitere Erklärungen finden sich im Text.

Das Wachstum der Calciumcarbonatkristalle während dieses AFM-Experiments fand vor allem in dem Bereich statt, in dem wenige der während des natürlichen Schalenwachstums entstandenen und bereits zu Beginn (Bilder (A)) beim Abbilden in der $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung vorhandenen hohen, nadelförmigen Aragonitkristalle existierten. Bis zur Aufnahme des Bildes (I), bei der die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale schon $3,1\ \text{mM}$ betrug, sind in diesem Bereich kaum Kristalle gewachsen. Erst nach dem

letzten bei diesem Wachstumsexperiment vorgenommenen Lösungsaustausch (hier ab dem Bild (K)) erfolgte das Wachstum vieler Kristalle auf der Probenoberfläche. Zu diesem Zeitpunkt wies die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eine etwas höhere Konzentration von 3,4 mM auf. Bei Betrachtung der Bilder (I) bis (O) fällt auf, dass viele kleinere, etwa 20 nm bis 50 nm hohe, Calciumcarbonatkristalle (z.B. grüner und roter Pfeil) insbesondere auf der linken Seite des gezeigten Probenbereichs und nur wenige, über 70 nm hohe, Kristalle (z.B. blauer Pfeil) vor allem auf der rechten Seite gewachsen sind. Demnach hat sich die Höhe des z.B. mit blauem Pfeil markierten Kristalls im gleichen betrachteten Zeitraum deutlich mehr geändert als die Höhen der mit roten und grünen Pfeilen gekennzeichneten Kristalle. Somit wuchsen die verschiedenen Calciumcarbonatkristalle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Das Wachstum der kleineren Kristalle auf der linken Seite erfolgte dabei dicht nebeneinander im Gegensatz zu den höheren, eher vereinzelt entstandenen Kristallen. Zum besseren Vergleich kennzeichnen der grüne, rote und blaue Pfeil dieselben Kristalle wie in der Abbildung 66. Alle während des Wachstumsexperiments entstandenen Kristalle sind ebenfalls nadelförmig gewachsen wie die natürlich entstandenen und vor dem mehrfachen Einspülen der übersättigten 4 mM CaCO_3 -Lösung vorhandenen Aragonitkristalle. Daher bestehen die durch induziertes Wachstum gebildeten Kristalle vermutlich auch aus Aragonit. Die Geschwindigkeiten, mit denen die Höhenänderungen der Calciumcarbonatkristalle erfolgten, werden im nächsten Abschnitt näher untersucht.

5.4.1.4 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten

Von mehreren der in Abbildungen 65 und 66 auf der Probenoberfläche gewachsenen Calciumcarbonatkristalle erfolgte nun die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten. Dafür werden jeweils die Höhenänderung des zu vermessenden Calciumcarbonatkristalls und der Zeitraum, in dem diese Höhenänderung stattfand, benötigt. Die Ermittlung aller Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte entsprechend dem in Abschnitt 5.2.2.3 detailliert beschriebenen Verfahren. Dazu wurde zunächst jeweils in zwei zu unterschiedlichen Zeiten aufgenommenen Höhenbildern (z.B. Bilder (K) und (P)) ein horizontal und an derselben Stelle durch den zu vermessenden Calciumcarbonatkristall verlaufendes Höhenprofil mit der AFM-Software ermittelt. Anschließend wurden aus den zwei Höhenprofilen die Höhendifferenzen $\Delta h_1 = h_{1a} - h_{1b}$ und $\Delta h_2 = h_{2a} - h_{2b}$ jeweils zwischen dem Höhenwert an der höchsten Stelle des Calciumcarbonatkristalls (h_{1a} bzw. h_{2a}) und dem Höhenwert des gewählten Referenzpunktes (h_{1b} bzw. h_{2b}) berechnet. Aus den beiden Höhendifferenzen erfolgte danach die Ermittlung der Höhenänderung $\Delta h = \Delta h_2 - \Delta h_1$ des Kristalls. Die Wachstumsgeschwindigkeit v des Calciumcarbonatkristalls wurde nun aus der berechneten Höhenänderung Δh und dem zwischen den Aufnahmen beider betrachteten Höhenbilder

vergangenen Zeitraum Δt gemäß der Formel $v = \frac{\Delta h}{\Delta t}$ ermittelt. Die Fehlerberechnung erfolgte ebenfalls wie bereits in Abschnitt 5.2.2.3 detailliert beschrieben. Da sich die Höhen der Calciumcarbonatkristalle hier teilweise nur gering ändern, wurde stets versucht, einen Referenzpunkt bei einer Höhe von Null Nanometern zur Bestimmung der Höhendifferenzen zu verwenden. Damit gelang es, den Fehler der ermittelten Höhendifferenzen und somit auch den Fehler der berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten zu minimieren. Somit ergaben sich z. B. Höhendifferenzen von $\Delta h_1 = (24 \pm 2)$ nm und $\Delta h_2 = (72 \pm 2)$ nm aus den Höhenbildern (K1) und (P1) für den in Abbildung 69 mit (20) nummerierten Calciumcarbonatkristall. Die einzelnen Höhendifferenzen Δh_1 und Δh_2 konnten dabei jeweils mit einer Genauigkeit von ± 2 nm aus den Höhenprofilen abgelesen werden. Da anschließend eine Differenzbildung aus diesen zwei ermittelten Höhendifferenzen erfolgte, ergab sich für die Höhenänderung Δh ein Fehler von ± 4 nm. Damit wurde die Höhenänderung des Calciumcarbonatkristalls zwischen den Aufnahmen der Bilder (K) und (P) zu $\Delta h = (48 \pm 4)$ nm bestimmt. Der Fehler der Höhenänderung entspricht hier einem relativen Fehler von etwa 8 %. Für die Zeitspanne Δt zwischen den Aufnahmen der Höhenbilder wurde wieder ein Fehler von ± 2 min bzw. von ± 120 s angenommen, da die Angabe der Zeitpunkte der Bildaufnahmen jeweils mit einer Genauigkeit von ± 1 min erfolgte. So beträgt z. B. der Zeitraum zwischen den Aufnahmen der Höhenbilder (K) und (P) $\Delta t = (74 \pm 2)$ min = (4440 ± 120) s. Der Fehler der Zeitdifferenz entspricht hier einem relativen Fehler von etwa 3 %. Da die Wachstumsgeschwindigkeit gemäß der Formel $v = \frac{\Delta h}{\Delta t}$ berechnet wurde, ergab sich deren relativer Fehler durch Addition der relativen Fehler der Höhenänderung und der Zeitdifferenz. Somit erhielt man für den in Abbildung 69 mit (20) gekennzeichneten Kristall im betrachteten Zeitraum zwischen den Aufnahmen der Bilder (K1) und (P1) eine Wachstumsgeschwindigkeit von $v = (0,65 \pm 0,07) \frac{\text{nm}}{\text{min}}$ bzw. von $v = (1,08 \pm 0,12) \cdot 10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$.

Insgesamt erfolgte die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten von 20 verschiedenen Calciumcarbonatkristallen aus den Höhenbildern (K1, 550. Minute) bis (P1, 624. Minute). In den Bildern (A1, 160. Minute) bis (J1, 527. Minute) ist zwar das Wachstum einiger Calciumcarbonatkristalle auf der Probenoberfläche sichtbar, jedoch ändern sich die Höhen der Kristalle dort nur um wenige Nanometer. Bei solchen sehr kleinen Höhenänderungen ergaben sich hier relative Fehler von über 90 % für die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten. Daher wurden diese Wachstumsgeschwindigkeiten nicht weiter betrachtet und die Wachstumsgeschwindigkeiten der ausgewählten Calciumcarbonatkristalle erst ab dem Höhenbild (K1) für die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale von 3,4 mM ermittelt. Dabei erfolgte die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle vom Bild (K1) bis zum Bild (M1, 579. Minute) über die ersten 29 Minuten nach

dem vierten Lösungsaustausch und vom Bild (K1) bis zum Bild (P1) über einen Zeitraum von 74 Minuten. In der **Abbildung 69** sind die betrachteten Calciumcarbonatkristalle mit verschiedenfarbigen Pfeilen und fortlaufend mit (1) bis (20) gekennzeichnet. Die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle in der Einheit $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ finden sich in der Tabelle 8. Die Tabelle 20 im Anhang in Abschnitt 10.5 zeigt die ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten aus der Tabelle 8 zusätzlich in der Einheit $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$. Zur besseren Übersicht sind die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten dort in den gleichen Farben wie die zur Kennzeichnung der Calciumcarbonatkristalle genutzten Pfeile in der Abbildung 69 dargestellt.

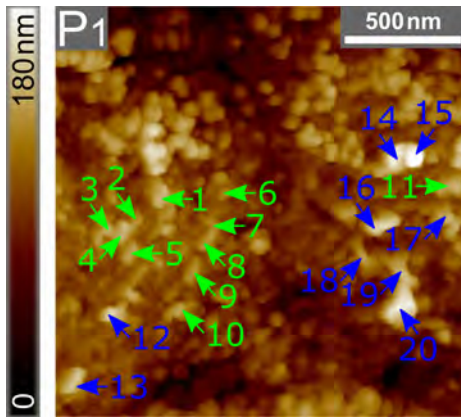


Abbildung 69: Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten ausgewählte CaCO_3 -Kristalle. Dargestellt ist das AFM-Höhenbild (P1) aus Abb. 66. Die einzelnen zu vermessenden CaCO_3 -Kristalle sind mit grünen und blauen Pfeilen gekennzeichnet und mit (1) bis (20) nummeriert. Die zu den Kristallen ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten finden sich in Tabelle 8.

Wie bereits bei der Betrachtung der Abbildungen 65 bis 68 beobachtet, sind die insbesondere auf der linken Seite des abgebildeten Probenbereichs vorhandenen und in der Abbildung 69 mit grünen Pfeilen markierten Calciumcarbonatkristalle langsamer gewachsen als die mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Calciumcarbonatkristalle. Dabei stimmen die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten der mit grünen Pfeilen bzw. blauen Pfeilen markierten Kristalle im Rahmen der ermittelten Fehler gut überein. Die Wachstumsgeschwindigkeiten der mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Calciumcarbonatkristalle sind dabei etwa 1,5-fach bis 2-fach höher als die Wachstumsgeschwindigkeiten der mit grünen Pfeilen markierten Kristalle. Im AFM-Experiment sind die Kristalle nach dem letzten Lösungsaustausch von den Bildern (K) bis (M) über eine Zeitspanne von 29 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung und von den Bildern (K) bis (P) über einen Zeitraum von 74 Minuten ebenfalls in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung anscheinend mit den gleichen Geschwindigkeiten gewachsen. Allerdings sind die relativen Fehler der ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten in den ersten 29 Minuten nach dem Lösungsaustausch aufgrund der sehr kleinen Höhenänderungen sehr groß und betragen bis zu 76 %. Das unterschiedlich starke Höhenwachstum erklärt sich eventuell dadurch, dass auf der linken Seite sehr viele kleine Kristalle entstanden sind und auf der rechten Probenseite nur wenige.

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$	
		bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 29 min (Bilder (K1) bis (M1))	bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 74 min (Bilder (K1) bis (P1))
Calciumcarbonatkristall	(1)	$0,4 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$
	(2)	$0,4 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$
	(3)	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$
	(4)	$0,3 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
	(5)	—————	$0,3 \pm 0,1$
	(6)	$0,4 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$
	(7)	—————	$0,4 \pm 0,1$
	(8)	—————	$0,3 \pm 0,1$
	(9)	$0,4 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
	(10)	—————	$0,5 \pm 0,1$
	(11)	$0,3 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
	(12)	$0,6 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$
	(13)	$0,8 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$
	(14)	$0,8 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$
	(15)	—————	$0,8 \pm 0,1$
	(16)	$1,0 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$
	(17)	$0,7 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$
	(18)	$0,7 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$
	(19)	—————	$1,0 \pm 0,1$
	(20)	$1,1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,1$

Tabelle 8: Aus den AFM-Höhenbildern der Abb. 65 und 66 berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ von 20 verschiedenen CaCO_3 -Kristallen in der verwendeten Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale von 3,4 mM. Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte erst ab dem Bild (K1), da von den Bildern (A1) bis (J1) kein Wachstum der ausgewählten CaCO_3 -Kristalle beobachtet werden konnte oder die Höhen der CaCO_3 -Kristalle nur um wenige Nanometer zunahm, womit die relativen Fehler der berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten über 90 % betragen.

5.4.1.5 Ergänzende Charakterisierung der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM

Nach dem Ausbau der Petrischale mit festgeklebter Probe aus dem AFM wurde die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale mittels Pipette entfernt, die Probe mehrfach mit Reinstwasser abgespült und danach die restliche Flüssigkeit mit Hilfe fussel freier Tücher²³⁴ aus der Petrischale entfernt [4]. Anschließend erfolgte die Trocknung des Probestücks für drei Tage im Kühlraum bei 6 °C [4]. Nach der Trocknung wurde das Probestück für die

²³⁴VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

REM-Untersuchung gemäß des in Abschnitt 4.5 beschriebenen Präparationsverfahrens vorbereitet, in dem zunächst der Rand der Petrischale mit der entwickelten Apparatur abgesägt und anschließend der Petrischalenboden mit aufgeklebter Probe mit einem elektrisch leitfähigen Haftaufkleber²³⁵ auf einem runden Probensteller²³⁶ aus Aluminium fixiert sowie zusätzlich mit leitfähigem, kupferbeschichtetem Klebeband²³⁷ kontaktiert wurde. Für die REM-Untersuchung erfolgte hier ebenfalls keine leitfähige Beschichtung der Probenoberfläche [4].

Die **Abbildungen 70 und 71** zeigen REM-Aufnahmen ausgewählter Bereiche dieser ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, die zuvor bereits beim Wachstumsexperiment über einen Zeitraum von 464 Minuten mit dem AFM abgebildet wurde (siehe Abb. 65 und 66). In der **Abbildung 70** sind verschiedene Bereiche der Probenoberfläche dieser Perlmutterpaltfläche mit unterschiedlichen Scanflächen von $37\ \mu\text{m} \cdot 49\ \mu\text{m}$ beim Bild (A), von $20\ \mu\text{m} \cdot 27\ \mu\text{m}$ beim Bild (B), von $11\ \mu\text{m} \cdot 15\ \mu\text{m}$ beim Bild (C) und von $7\ \mu\text{m} \cdot 9\ \mu\text{m}$ beim Bild (D) dargestellt. Die Untersuchung der Probe mittels REM erfolgte mit dem SE2-Detektor²³⁸, wobei eine Beschleunigungsspannung von 1 kV, ein Aperturbündeldurchmesser von $30\ \mu\text{m}$ und ein Neigungswinkel des Probenstisches von 0° verwendet wurden [4].

Das Bild (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme der Probenoberfläche, in der mehrere rhomboedrische Calcitkristalle erkennbar sind. Dort kennzeichnen die roten Pfeile beispielhaft zwei solche eher vereinzelt vorhandene Calcitkristalle und die grünen Pfeile mehrere dicht nebeneinander auftretende Calcitkristalle. Alle diese Calcitkristalle sind vermutlich direkt aus den höher übersättigten CaCO_3 -Lösungen, die während des Wachstumsexperiments Verwendung fanden, präzipitiert und nur auf die Probenoberfläche gefallen [4]. Das Bild (B) zeigt den grün hervorgehobenen Bereich aus dem Bild (A) entsprechend vergrößert. Dort ist bei genauem Betrachten bereits gut erkennbar, dass sich auf der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche viele kleine Calciumcarbonatkristalle befinden. Dabei treten diese Kristalle mit unterschiedlichen Oberflächendichten auf. Die weißen Pfeile markieren Bereiche, in denen die Calciumcarbonatkristalle deutlich dichter gewachsen sind als in den mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Bereichen. Das Bild (C) zeigt eine weiter vergrößerte Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Bild (B). Bei noch weiterer Vergrößerung, d. h. bei noch kleineren Scanflächen, im Bild (D) ist besser sichtbar, dass diese Calciumcarbonatkristalle nadelartige Formen aufweisen. Im Bild (D) sind mehrere solche nadelartigen Kristalle mit gelben Pfeilen gekennzeichnet. Zudem sind die Calciumcarbonatkristalle in dem ausgewählten Probenbereich mit sehr hoher Oberflächendichte

²³⁵25 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²³⁶32 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²³⁷6,4 mm Breite, einseitig klebend; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²³⁸siehe Abschnitt 3.2

auf der Probenoberfläche vorhanden, sodass die darunterliegenden Aragonitplättchen bzw. das darunter befindliche Mineral nicht mehr erkennbar sind. In diesen REM-Aufnahmen ist eine Unterscheidung zwischen den Kristallen, deren Entstehung bereits während des natürlichen Schalenwachstums erfolgte, und den Kristallen, deren Wachstum während des AFM-Experiments stattfand, nicht möglich [4].

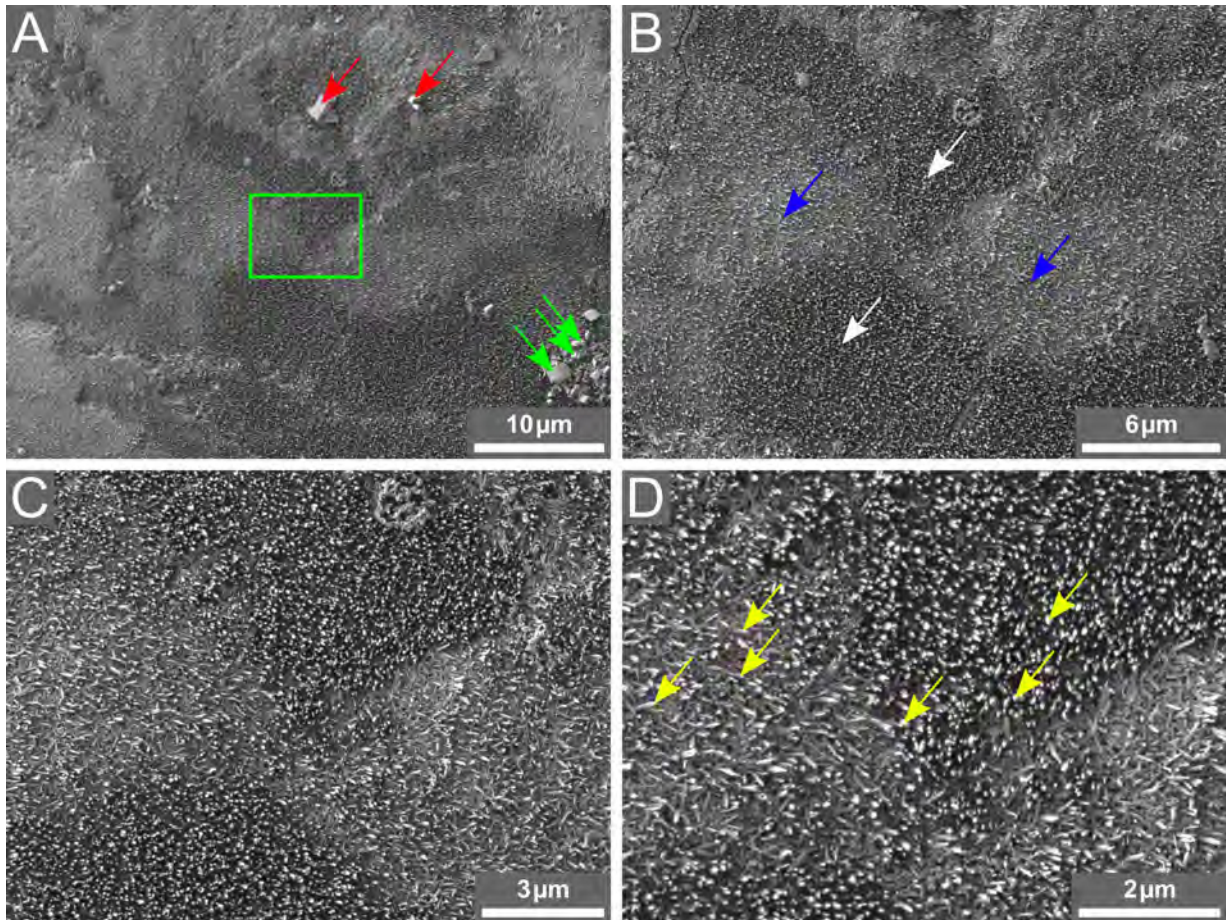


Abbildung 70: REM-Aufnahmen ausgewählter Oberflächenbereiche der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche nach dem Wachstumsexperiment (siehe Abb. 65 und 66). Scanflächen: (A) $37\ \mu\text{m} \cdot 49\ \mu\text{m}$, (B) $20\ \mu\text{m} \cdot 27\ \mu\text{m}$, (C) $11\ \mu\text{m} \cdot 15\ \mu\text{m}$ und (D) $7\ \mu\text{m} \cdot 9\ \mu\text{m}$. Der grün hervorgehobene Bereich aus (A) ist in (D) vergrößert dargestellt. Auf der Probenoberfläche befinden sich einerseits einzelne rhomboedrische Calcitkristalle (rote und grüne Pfeile in (A)), die direkt aus den übersättigten CaCO_3 -Lösungen präzipitiert sind, und andererseits viele nadelförmige CaCO_3 -Kristalle [4]. Diese nadelförmigen Kristalle treten mit unterschiedlichen Oberflächendichten auf der Probenoberfläche auf (blaue und weiße Pfeile in (B)). Dabei sind die Kristalle z. B. in den mit weißen Pfeilen gekennzeichneten Bereichen dichter gewachsen als in den mit blauen Pfeilen markierten Bereichen. Die gelben Pfeile in (D) kennzeichnen beispielhaft einzelne nadelartige CaCO_3 -Kristalle. Hier ist allerdings nicht entscheidbar, welche Kristalle bereits vor der Initiierung des Kristallwachstums vorhanden waren und welche Kristalle während des AFM-Wachstumsexperiments gewachsen sind.

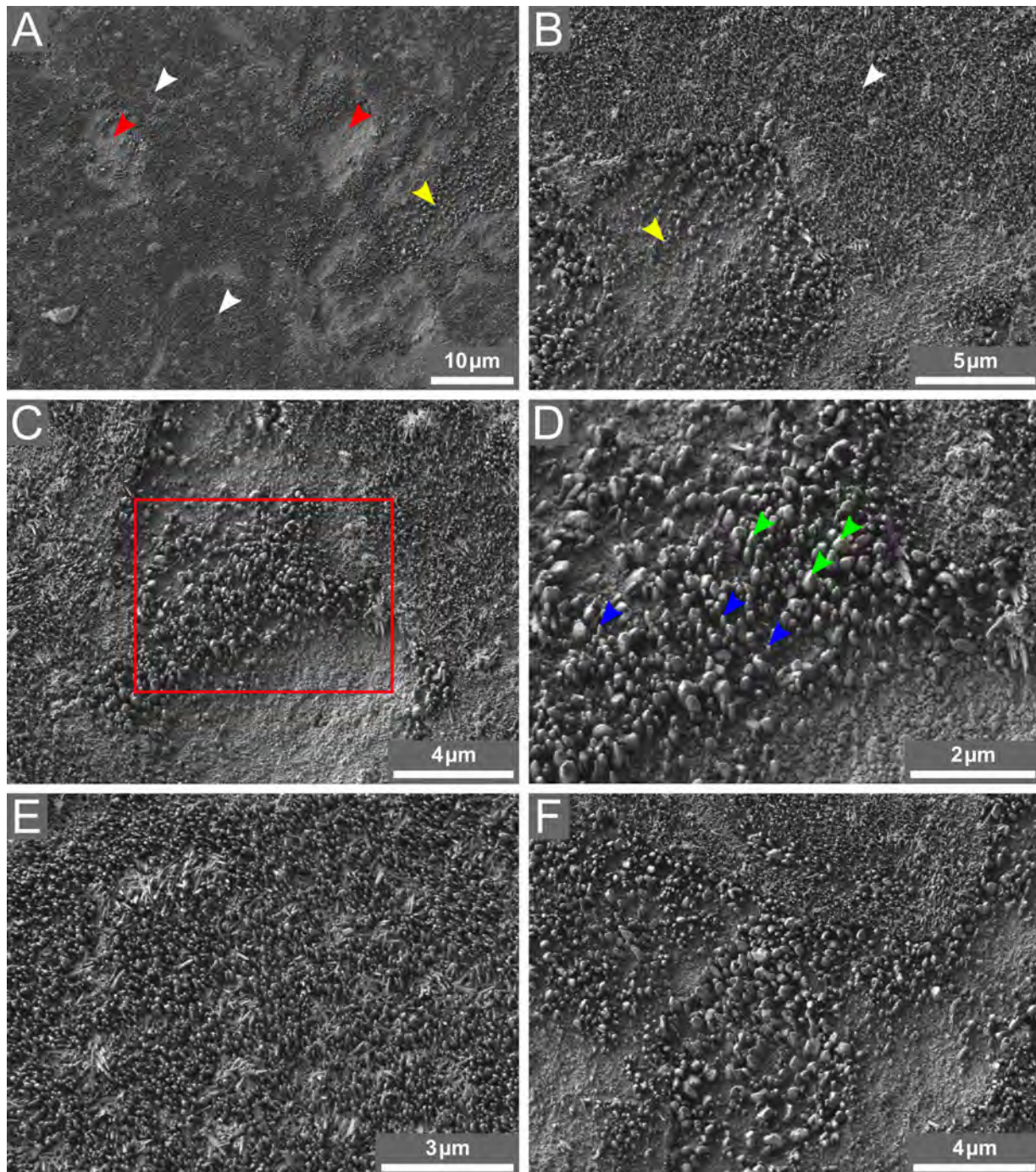


Abbildung 71: Weitere REM-Aufnahmen der bereits in Abb. 70 gezeigten Perlmutterpaltfläche unter einem Neigungswinkel des Probenstisches von $19,4^\circ$ bzw. $17,9^\circ$ ((A) bis (E) bzw. (F)) zur besseren Beobachtung der Form der gewachsenen CaCO_3 -Kristalle. Scanflächen: (A) $48\ \mu\text{m} \cdot 64\ \mu\text{m}$, (B) $16\ \mu\text{m} \cdot 22\ \mu\text{m}$, (C) $13\ \mu\text{m} \cdot 17\ \mu\text{m}$, (D) $6\ \mu\text{m} \cdot 9\ \mu\text{m}$, (E) $9\ \mu\text{m} \cdot 12\ \mu\text{m}$ und (F) $13\ \mu\text{m} \cdot 17\ \mu\text{m}$. Auf der Probenoberfläche existieren einerseits Bereiche, in denen sehr viele dünne und dicht nebeneinander gewachsene CaCO_3 -Kristalle vorhanden sind (weiße Dreiecke in (A) und (B)) und andererseits Bereiche, in denen weniger CaCO_3 -Kristalle auftreten (rote Dreiecke in (A) und gelbe Dreiecke in (A) und (B)). (D) zeigt den in (C) rot hervorgehobenen Bereich vergrößert. In (C) bis (F) ist nun sehr gut erkennbar, dass die verschiedenen CaCO_3 -Kristalle nadelartige Formen aufweisen (verschiedenfarbige Dreiecke in (D)). (E) und (F) zeigen weitere Bereiche der Probenoberfläche.

In der **Abbildung 71** sind REM-Aufnahmen weiterer unterschiedlicher Bereiche der bereits in Abbildung 70 gezeigten ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche dargestellt, wobei der Probenisch hier zusätzlich um einem Winkel von $19,4^\circ$ geneigt wurde, um die Form der auf der Probenoberfläche vorhandenen Calciumcarbonatkristalle besser zu charakterisieren. Die Bilder zeigen dabei verschiedene Scanflächen von $48\ \mu\text{m} \cdot 64\ \mu\text{m}$ beim Bild (A), von $16\ \mu\text{m} \cdot 22\ \mu\text{m}$ beim Bild (B), von $13\ \mu\text{m} \cdot 17\ \mu\text{m}$ beim Bild (C), von $6\ \mu\text{m} \cdot 9\ \mu\text{m}$ beim Bild (D), von $9\ \mu\text{m} \cdot 12\ \mu\text{m}$ beim Bild (E) und von $13\ \mu\text{m} \cdot 17\ \mu\text{m}$ beim Bild (F). Die Aufnahmen dieser REM-Bilder erfolgten auch mit dem SE2-Detektor²³⁹, wobei eine Beschleunigungsspannung von 1 kV und eine Aperturblende mit Durchmesser von $30\ \mu\text{m}$ verwendet wurden [4].

In den Bildern (A) bis (F) sind verschiedene Bereiche auf der Perlmutterpaltfläche zu erkennen. So markieren z. B. die weißen Dreiecke dort jeweils einen Bereich, in dem sehr viele, dicht nebeneinander auftretende, Calciumcarbonatkristalle auf der Probenoberfläche existieren. Vermutlich waren in diesem Probenbereich vor dem AFM-Wachstumsexperiment, d. h. vor Einspülen der übersättigten CaCO_3 -Lösungen, bereits viele nadelförmige Calciumcarbonat- bzw. Aragonitkristalle vorhanden. Im Gegensatz dazu kennzeichnen die gelben und roten Dreiecke Bereiche, in denen weniger nadelförmige Kristalle mit geringeren Oberflächendichten auftreten. In den Bildern (C) bis (F) sind die nadelförmigen Calciumcarbonatkristalle noch viel besser zu erkennen. Dabei besitzen diese Calciumcarbonatkristalle recht unterschiedliche laterale Ausdehnungen bzw. Durchmesser, d. h. einerseits sind viele kleinere, dünnere Kristalle und andererseits auch mehrere größere, dickere Kristalle auf der Probenoberfläche sichtbar. Das Bild (D) zeigt den im Bild (C) rot hervorgehobenen Bereich entsprechend vergrößert. Zur Verdeutlichung kennzeichnen die verschiedenfarbigen Dreiecke dort mehrere einzelne nadelförmige Kristalle. Dabei weisen die mit grünen Dreiecken markierten Kristalle größere laterale Ausdehnungen auf als die mit blauen Dreiecken gekennzeichneten Calciumcarbonatkristalle. Die Bilder (E) und (F) zeigen weitere Oberflächenbereiche der Perlmutterpaltfläche, in denen ebenfalls viele nadelförmige Kristalle beobachtbar sind.

Im Bild (D) mit einem Oberflächenbereich von $6\ \mu\text{m} \cdot 9\ \mu\text{m}$ zählt man etwa 650 ± 50 nadelförmige Calciumcarbonatkristalle [4]. Der Fehler beim Abzählen der Kristallanzahl ergibt sich aus mehreren Gründen: (1) Auch hier ist in den REM-Aufnahmen der Wachstumsfront bei mehreren Kristallen nur schwer entscheidbar, ob einzelne Kristalle direkt nebeneinander existieren oder ob es sich bereits um einen größeren, zusammengewachsenen Kristall handelt, (2) befinden sich auf der Probenoberfläche auch abgebrochene bzw. „abgeknickte“ Kristalle und (3) weisen die verschiedenen Kristalle deutlich unterschied-

²³⁹siehe Abschnitt 3.2

liche Durchmesser bzw. laterale Ausdehnungen auf [4]. Aus der ermittelten Kristallanzahl wurde hier eine Oberflächendichte der Calciumcarbonatnadeln von $(12,0 \pm 0,9) \mu\text{m}^{-2}$ berechnet. Allerdings ist im Bild (D) erkennbar, dass die Kristalle nicht homogen verteilt, also nicht im gleichen Abstand zueinander, auf der Probenoberfläche gewachsen sind. Aus den REM-Aufnahmen mit größeren Scanflächen, die einen größeren Probenbereich zeigen, konnten die Oberflächendichten nicht ermittelt werden, da die Auflösung dort für eine Auszählung der einzelnen auftretenden nadelförmigen Calciumcarbonatkristalle nicht ausreichte.

In diesem Wachstumsexperiment gelang die direkte Beobachtung des induzierten Wachstums von Calciumcarbonatkristallen auf der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche mit dem AFM (siehe Abb. 65 und 66). Zusätzlich konnten nach dem AFM-Wachstumsexperiment die Wachstumsgeschwindigkeiten der Calciumcarbonatkristalle untersucht werden (siehe Tab. 8) sowie die gewachsenen Kristalle mit dem REM beobachtet, ihre nadelförmige Struktur aufgeklärt und in einem homogen bewachsenen Bereich die Oberflächendichte der Kristallnadeln ermittelt werden (siehe Abb. 70 und 71). Da bei dieser Perlmutterpaltfläche sowohl in den AFM-Bildern als auch in den REM-Bildern jedoch keine klaren Umrisse bzw. Kanten der einzelnen Aragonitplättchen und die einzelnen Aragonitplättchen selbst nicht beobachtbar sind, kann hier allerdings noch keine Aussage darüber getroffen werden, an welchen Stellen auf der Aragonitplättchenoberfläche vorzugsweise die Nukleation des Calciumcarbonats einsetzt und das weitere Wachstum der Calciumcarbonat- bzw. Aragonitkristalle erfolgt.

5.4.2 Zweites Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche

5.4.2.1 Aufnahme der AFM-Bildsequenz

Ein weiteres Wachstumsexperiment fand auf einer der bereits voruntersuchten frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, die in der Abbildung 57 in Abschnitt 5.3.1 gezeigt wurde, statt. Das verwendete Probestück wies dabei eine Größe von etwa $4 \text{ mm} \cdot 4 \text{ mm}$ auf. Für die Strukturuntersuchung wurde die Perlmutterpaltfläche durch Hammerschläge aus der Schale einer Meeresschnecke erzeugt, mit einer $0,9 \text{ mM CaCO}_3$ -Lösung benetzt und mittels Zweikomponentenkleber in einer Petrischale fixiert sowie nach dem Aufkleben erneut mit der $0,9 \text{ mM CaCO}_3$ -Lösung befeuchtet [4]. Nach Abbinden des Zweikomponentenklebers erfolgte das Hinzufügen von 3 ml derselben $0,9 \text{ mM CaCO}_3$ -Lösung in die Petrischale. Da die $0,9 \text{ mM CaCO}_3$ -Lösung einer gesättigten Lösung entspricht und in dieser gesättigten Lösung weder Wachstum noch Abbau des Calciumcarbonats zu erwarten sind, wurde diese Konzentration der CaCO_3 -Lösung für die Präparationsprozedur sowie für

das Abbilden der Probenoberfläche während der Strukturuntersuchung und zu Beginn des Wachstumsexperiments verwendet [4]. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte mit einer ScanAsyst-Air AFM-Sonde, deren vor Probeneinbau durchgeführte Kalibrierung eine Federkonstante von $0,48 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine Deflektionssensitivität von $(25,9 \pm 1,4) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ lieferte. Diese Kalibrierung wurde in einer weiteren Petrischale, in der sich keine Probe, sondern nur 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung befanden, durchgeführt.

Die Untersuchung der Probenoberfläche mit dem AFM (Voruntersuchung und Beobachtung des induzierten Kristallwachstums) erfolgte insgesamt über 600 Minuten. Nach der Untersuchung zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche wurden die Auflösung und die Abtastrate so gewählt, dass während des Wachstumsexperiments eine Bildaufnahme wieder etwa sechs Minuten dauerte. Die direkte Beobachtung des Wachstums von Calciumcarbonatkristallen erfolgte auf dem bereits im Bild (B1) bzw. (B2) in der Abbildung 57 dargestellten Probenbereich. Dieser Probenbereich wurde während des Wachstumsexperiments über einen Zeitraum von 384 Minuten mit dem AFM abgebildet, wobei die Aufnahmen aller aufeinanderfolgenden Bilder in einem Zeitabstand von jeweils sechs Minuten stattfanden.

Die **Abbildung 72** zeigt ausgewählte Bilder aus dieser AFM-Bildsequenz. Die Bilder (A) bis (H) stellen dabei denselben Oberflächenbereich mit der Scanfläche von $3,2 \mu\text{m} \cdot 3,2 \mu\text{m}$ über einen Zeitraum von 263 Minuten dar. Jeweils oben (Bilder mit Index 1) sind die Höhengsignale und jeweils unten (Bilder mit Index 2) die entsprechenden Fehlersignale gezeigt. Die einzelnen Bilder wurden dabei mit einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von 0,795 Hz und einer abbildenden Kraft von 600 pN aufgenommen.

Zu Beginn (Bilder (A)) befand sich das Probestück in 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Das Bild (A1) bzw. (A2) zeigt die Teilerflächen von drei aneinandergrenzenden Aragonitplättchen, die sich in dem betrachteten Probenbereich in der oberen Schicht befinden (siehe zum Vergleich Abb. 57). Dort sind deutlich die Oberflächenstrukturen der einzelnen Plättchen erkennbar. Auf den Plättchenoberflächen existieren viele, einige Nanometer bis zu wenigen zehn Nanometern hohe, natürlich gewachsene kristalline Strukturen, bei denen es sich vermutlich um „nanoasperities“ und/oder kleine, nadelförmige Aragonitkristalle handelt [4, 77]. Besonders deutlich beobachtbar sind auch die Ränder bzw. Kanten der nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen. In der Oberfläche des linken Plättchens tritt eine Vertiefung bzw. ein Loch auf, in der sich bereits im unteren, rechten Bereich ein Kristall befindet. Dieser Kristall ist vermutlich ein präparationsbedingtes Bruchstück einer Mineralbrücke oder bereits ein Ansatz für eine neue Mineralbrücke. Außerdem ist am unteren Bildrand auf diesem Aragonitplättchen ein etwa 60 nm hoher, höchstwahrscheinlich aus Aragonit bestehender, Kristall sichtbar [4].

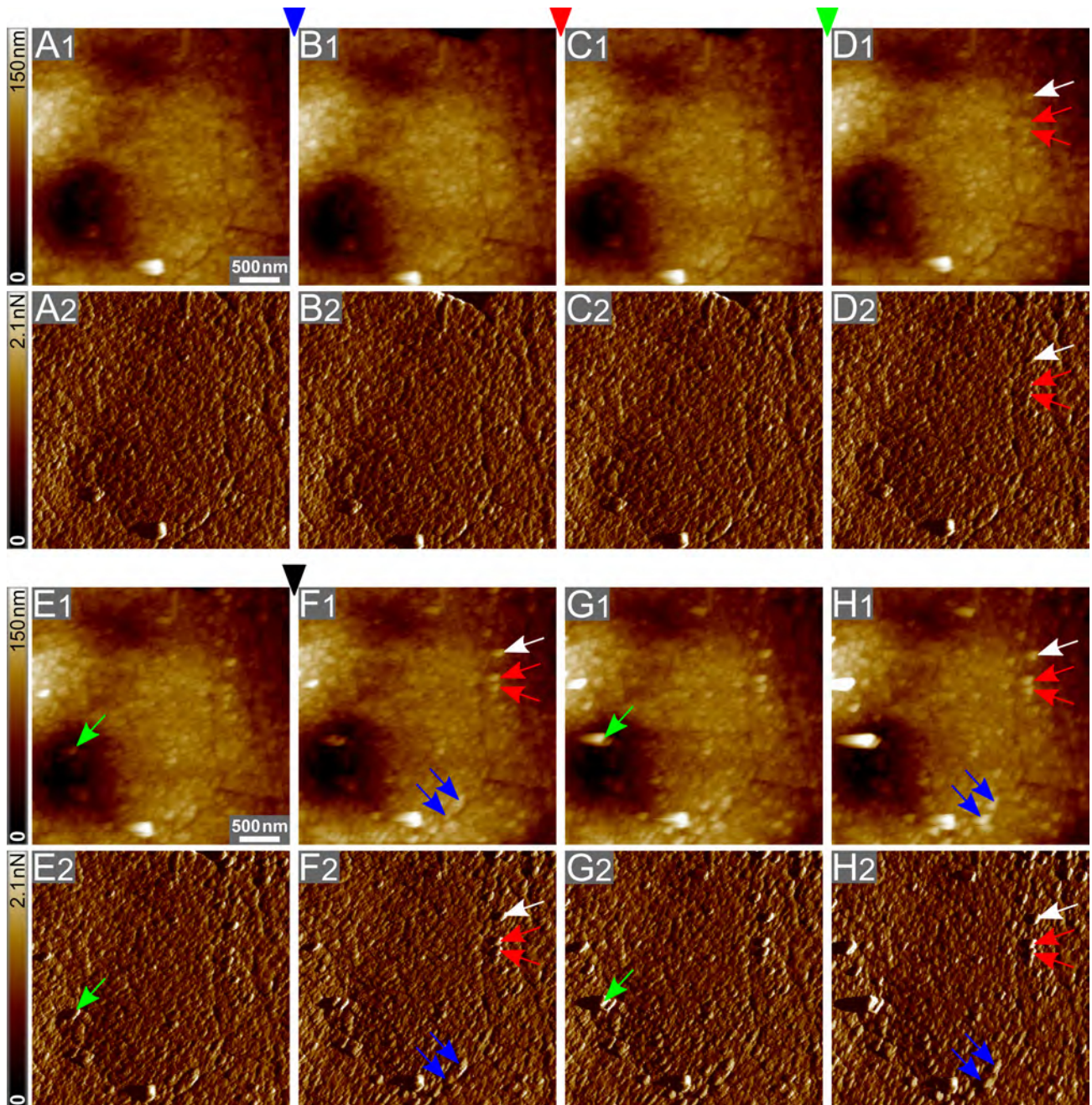


Abbildung 72: Zweites Wachstumsexperiment: AFM-Beobachtung des induzierten Kristallwachstums auf der frisch präparierten Perlmutterpaltfläche aus Abb. 57. Dargestellt sind ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz mit der Scanfläche von jeweils $3,2\ \mu\text{m} \cdot 3,2\ \mu\text{m}$ über einen Zeitraum von 263 Minuten. Bilder mit Index 1 (jeweils oben) zeigen die Höhsignale und Bilder mit Index 2 (jeweils unten) die Fehlersignale. Bei (A) befand sich die Probe in 3 ml einer $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung. Die verschiedenfarbigen Dreiecke (blaues, rotes, grünes und schwarzes Dreieck) kennzeichnen die Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Dabei wurde immer 1 ml der CaCO_3 -Lösung entfernt und gegen 1 ml einer übersättigten $4\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung ausgetauscht. Damit ergaben sich folgende Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) $2,6\ \text{mM}$, (D) bis (E) $3,1\ \text{mM}$ und (F) bis (H) $3,4\ \text{mM}$. Die Zeiträume zwischen den Bildern betragen: (A) bis (B) 70 min, (B) bis (C) 60 min und (C) bis (H) jeweils 20 min bis 37 min (siehe Abb. 73). Die weißen, roten, grünen und blauen Pfeile markieren beispielhaft CaCO_3 -Kristalle, deren Höhen im Verlauf der Bilder deutlich zunehmen.

Konzentration der CaCO_3 -Lösung	Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
0,9 mM	367 Minuten	(A)
1,9 mM	67 Minuten	(B)
2,6 mM	66 Minuten	(C)
3,1 mM	70 Minuten	(D) bis (E)
3,4 mM	83 Minuten	(F) bis (H)

Tabelle 9: Verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Verweilzeitraum des Probestücks in der jeweiligen Lösung während des zweiten in Abb. 72 gezeigten Wachstumsexperiments auf der frisch gespaltenen und voruntersuchten Perlmutteroberfläche aus Abb. 57. Die Bilder (A) bis (H) in Abb. 72 zeigen die Probenoberfläche über einen Zeitraum von 263 Minuten. Das Probestück befand sich vor dem ersten Austausch bereits 367 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.

Bis zur Aufnahme der Bilder (A) befand sich die Probe bereits etwa 360 Minuten in den 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Während dieser Zeitspanne fand hauptsächlich die Untersuchung der Oberflächenstruktur der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche statt. Nachdem das Abbilden des für das Wachstumsexperiment ausgewählten Probenbereichs stabil über einen Zeitraum von 30 Minuten gelang, erfolgte das Ansetzen der übersättigten 4 mM CaCO_3 -Lösung. Nach dem Ansetzen wurde diese 4 mM CaCO_3 -Lösung für 30 Minuten neben das AFM gestellt, um eine Anpassung der Temperaturen beider Lösungen²⁴⁰ zu ermöglichen. Erst nach diesem Zeitraum konnte der erste Austausch der CaCO_3 -Lösungen stattfinden. Während des Wachstumsexperiments wurde die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale nun insgesamt viermal ausgetauscht, wobei jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entnommen und 1 ml der 4 mM CaCO_3 -Lösung in die Petrischale eingespült wurde. Der erste Lösungsaustausch erfolgte nur sieben Minuten nach der Aufnahme der Bilder (A). Die drei weiteren Austausche fanden dann immer nach einem Zeitraum von etwa 66 Minuten bis 70 Minuten statt. Das blaue, rote, grüne und schwarze Dreieck in der Abbildung 72 kennzeichnen jeweils die Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Damit wurden die folgenden Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale verwendet: 0,9 mM bei den Bildern (A), 1,9 mM bei den Bildern (B), 2,6 mM bei den Bildern (C), 3,1 mM bei den Bildern (D) bis (E) und 3,4 mM bei den Bildern (F) bis (H). Die zwischen den gezeigten Bildern (A) und (B) bzw. (B) und (C) vergangene Zeitspanne beträgt 70 Minuten bzw. 60 Minuten. Zwischen den Aufnahmen der ausgewählten Bilder (C) bis (H) ist jeweils ein Zeitraum im Bereich von 20 Minuten bis 37 Minuten verstrichen. Die Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die während des Wachstumsexperiments verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und die Zeiträume des Probestücks

²⁴⁰4 mM CaCO_3 -Lösung und CaCO_3 -Lösung in der Petrischale

in der jeweiligen CaCO_3 -Lösung. Zusätzlich zeigt die **Abbildung 73** einen Zeitstrahl, der die detaillierte zeitliche Abfolge beim zweiten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterspaltfläche aus der Abbildung 72 darstellt. Dort sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der vier Austausche der CaCO_3 -Lösungen sowie die Gesamtlaufzeit des Wachstumsexperiments angegeben. Zusätzlich erfolgt auch die Nennung der zwischen den Aufnahmen der einzelnen Bilder (A) bis (H) liegenden Zeitabstände.

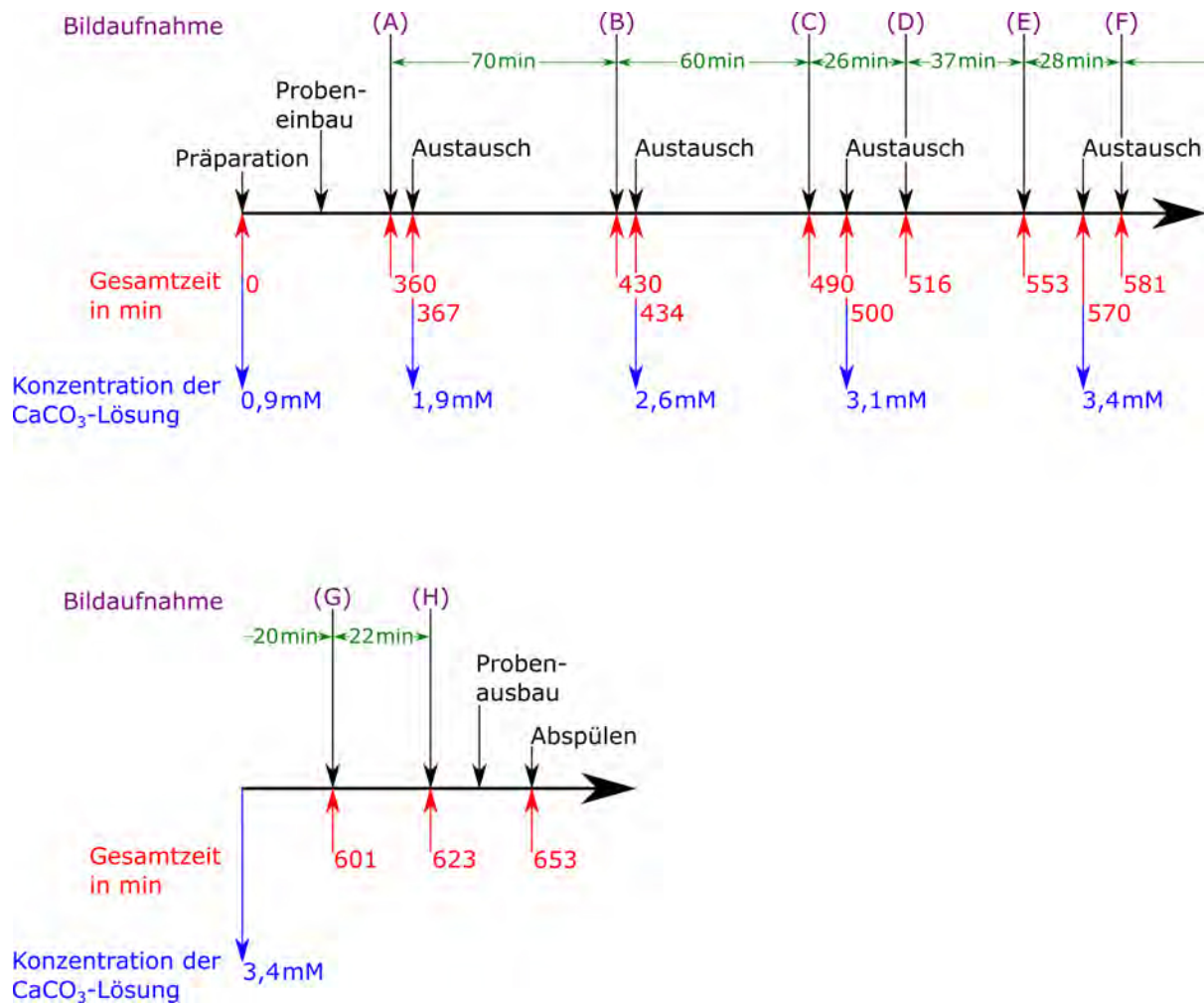


Abbildung 73: Zeitstrahl, der den genauen Ablauf des zweiten in Abb. 72 dargestellten Wachstumsexperiments auf einer frisch präparierten Perlmutterspaltfläche zeigt. Hier sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die zwischen den gezeigten Bildern vergangenen Zeiträume, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO_3 -Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben.

Bei Betrachtung der Bilder (A) bis (H) in der Abbildung 72 ist sehr gut beobachtbar, dass auf der Probenoberfläche eindeutig das Wachstum mehrerer Calciumcarbonatkristalle stattfand. Dabei sind die Kristalle an verschiedenen Stellen auf den Plättchenoberflächen gewachsen. Die verschiedenfarbigen Pfeile markieren beispielhaft einige im Weiteren näher zu betrachtende Kristalle. Von den Bildern (A) bis (D) haben sich die Höhen dieser Kristalle nur wenig geändert. Ab den Bildern (E), bei denen die Konzentration der CaCO_3 -Lösung bereits 3,1 mM betrug, ist das Wachstum der Kristalle deutlichst erkennbar. Der mit grünen Pfeilen gekennzeichnete Calciumcarbonatkristall ist dabei in der Vertiefung (bzw. dem Loch), die in der Oberfläche des linken Aragonitplättchens existierte, entstanden. Die anderen gekennzeichneten Kristalle (weiße, rote und blaue Pfeile) sind verstärkt im Bereich um die Ränder bzw. Kanten der drei aneinandergrenzenden Aragonitplättchen gewachsen. Auch auf den übrigen sichtbaren Teilen der Aragonitplättchenoberflächen fand das Wachstum von einigen Kristallen statt.

Bei diesem Wachstumsexperiment konnte das induzierte Wachstum von Calciumcarbonatkristallen auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche direkt mit dem AFM beobachtet werden. Für mehrere dieser Kristalle erfolgte die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten, d. h. die Geschwindigkeiten, mit denen die Höhenänderungen der Kristalle in den verschiedenen verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung stattfanden. Die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten sind in Abschnitt 5.4.2.3 zu finden.

5.4.2.2 Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder

Zur noch besseren Sichtbarkeit und Veranschaulichung des Kristallwachstums sind in der **Abbildung 74** die dreidimensionalen Rekonstruktionen jedes zweiten in Abbildung 72 dargestellten Höhensignals (Bilder mit Index 1 und der Scanfläche von jeweils $2,9 \mu\text{m} \cdot 2,9 \mu\text{m}$) gezeigt. Die Zeitspannen zwischen den Bildern (A) und (C), (C) und (E) sowie (E) und (G) betragen damit 130 Minuten, 63 Minuten und 48 Minuten. Bei allen 3D-Rekonstruktionen wurde die gleiche Höhenskala wie bei den Höhenbildern verwendet.

In der Abbildung 74 ist deutlich die zuvor detailliert beschriebene Struktur der Aragonitplättchen beobachtbar (siehe Abschnitt 5.3.1). Der eine, etwa 60 nm hohe, natürlich gewachsene Aragonitkristall (grüne Dreiecke), der bereits zu Beginn des Wachstumsexperiments auf einer der Plättchenoberflächen existierte, weist eine nadelartige Form auf. Dieser Kristall ist dabei in den AFM-Aufnahmen verbreitert dargestellt [181, 182]. Die weißen, roten, blauen und grünen Pfeile markieren hier dieselben, auf den Plättchenoberflächen gewachsenen, Calciumcarbonatkristalle wie in der Abbildung 72. Hier ist deutlich beobachtbar, dass die Höhen dieser Kristalle zwischen den Aufnahmen der Bilder (A) und (G) zunahm. Der mit grünen Pfeilen markierte Kristall ist eindeutig aus dem Loch, das sich

in der linken Aragonitplättchenoberfläche befand, nach oben gewachsen. Wahrscheinlich fand die Nukleation des Calciumcarbonats zunächst auf dem darunterliegenden Aragonitplättchen statt und der neu entstandene Kristall ist anschließend von diesem Plättchen aus nach oben weitergewachsen und ist damit ein weiterer Nachweis der Existenz von Mineralbrücken, die die Kristallorientierung während des Aragonitwachstums weitergeben [5, 14]. Wie bereits oben erwähnt, erfolgte das Wachstum der mit weißen, roten und blauen Pfeilen markierten Kristalle nah an den Rändern bzw. Kanten der Aragonitplättchen. Entlang der gut sichtbaren Plättchenränder sind auch zahlreiche weitere Calciumcarbonatkristalle, besonders neben den mit blauen Pfeilen markierten Kristallen, gewachsen.

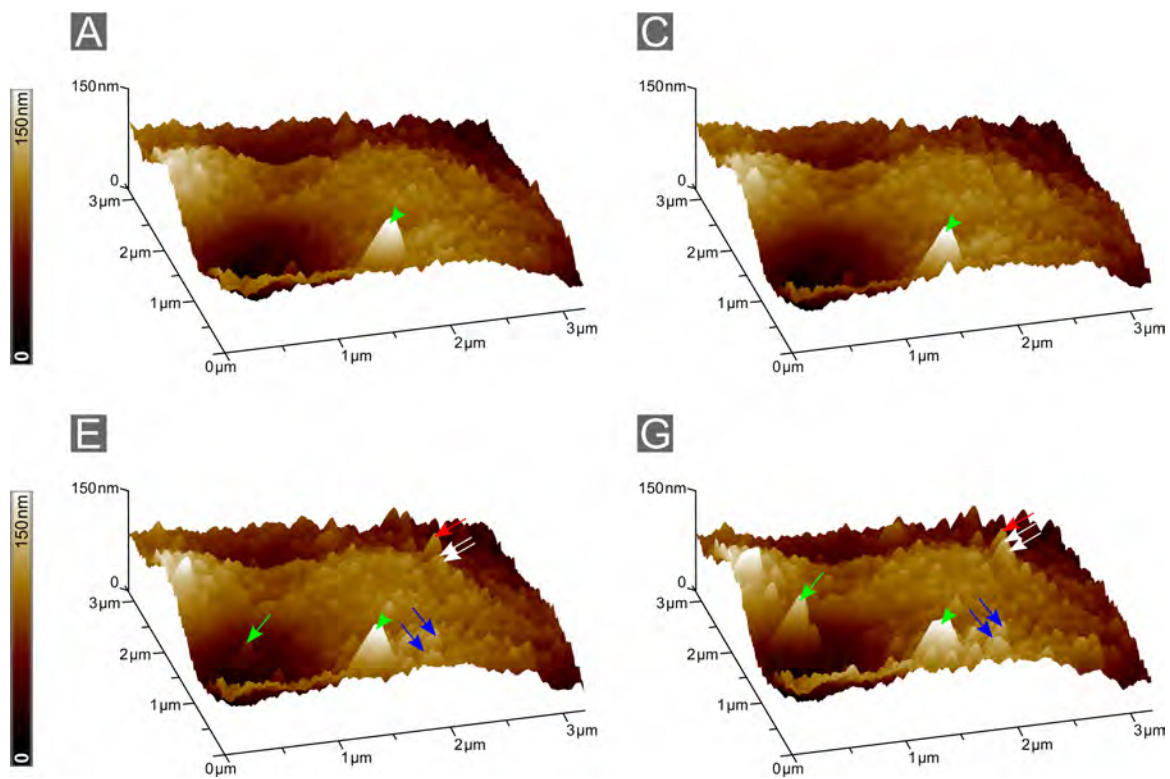


Abbildung 74: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 72 dargestellten Höhenprofile (Bilder mit Index 1 und Scanfläche von jeweils $3,2\ \mu\text{m} \cdot 3,2\ \mu\text{m}$). Beginnend mit der 3D-Rekonstruktion des Höhenprofils (A1) wurden die 3D-Rekonstruktionen jedes zweiten Höhenbildes dargestellt. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenprofilen um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) $2,6\ \text{mM}$, (D) bis (E) $3,1\ \text{mM}$ und (F) bis (H) $3,4\ \text{mM}$. Die verschiedenfarbigen Pfeile markieren dieselben CaCO_3 -Kristalle wie in Abb. 72. Die Kristalle sind vor allem an den Rändern bzw. Kanten der drei aneinandergrenzenden Aragonitplättchen (rote, weiße und blaue Pfeile) und in dem Loch bzw. der Vertiefung in der einen Plättchenoberfläche (grüner Pfeil) gewachsen. Vor Initiierung des Kristallwachstums (Bilder A) befand sich bereits ein natürlich gewachsener, etwa $60\ \text{nm}$ hoher, Aragonitkristall auf der linken Plättchenoberfläche (grünes Dreieck).

Die direkte Beobachtung des Kristallwachstums auf dieser ursprünglich frisch präparierten Perlmutterpaltfläche erlaubt die Annahme, dass die Calciumcarbonatkristalle besonders in der Nähe der Ränder bzw. Kanten einzelner Aragonitplättchen und im Bereich von Vertiefungen bzw. Löchern in den Plättchenoberflächen, in denen sich vermutlich vor der Probenpräparation Mineralbrücken befanden, wachsen [4]. Diese Annahme wird unterstützt durch die in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen und bereits zu Beginn des Abschnitts 5.4 erwähnten Untersuchungen von Bezares et al. in [6], bei denen der Nachweis von Carboxyl- und Sulfatgruppen sowie aragonitnukleierenden Proteinen sowohl in einem zentralen, ringförmigen Bereich der interlamellaren organischen Matrix (ILM), die die einzelnen Aragonitplättchen bedeckt, als auch im Bereich der intertabularen organischen Matrix (ITM), die die einzelnen Aragonitplättchen in vertikaler Richtung umgibt und voneinander trennt, gelang. Dabei wurde jedoch die organische Matrix von Meeresschnecken der Art *Haliotis rufescens* untersucht. Es wird angenommen, dass die aragonitnukleierenden Proteine und die Carboxyl- und Sulfatgruppen die Entstehung der Aragonitkristalle während der Perlmutterbildung begünstigen [14, 5]. Da das Wachstum der Calciumcarbonatkristalle während dieses AFM-Experiments verstärkt im Loch bzw. in der Vertiefung in der Plättchenmitte und an den Plättchenrändern erfolgte, waren die betrachteten Aragonitplättchen in dem mit dem AFM untersuchten Probenbereich vermutlich mit organischer Matrix bedeckt.

5.4.2.3 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten

Im Folgenden wurden die Geschwindigkeiten, mit denen sich die Höhen der verschiedenen auf den Plättchenoberflächen induziert gewachsenen Calciumcarbonatkristalle geändert haben, ermittelt. Für 14 Kristalle erfolgte die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten separat für die zwei letzten im AFM-Wachstumsexperiment verwendeten Konzentrationen von 3,1 mM und 3,4 mM. Dabei wurden die Wachstumsgeschwindigkeiten erstens über einen Zeitraum von 59 Minuten in der 3,1 mM CaCO_3 -Lösung betrachtet, wobei Höhenbilder, deren Aufnahmen kurz nach dem dritten Lösungsaustausch (500. Minute) und kurz vor dem vierten Lösungsaustausch (570. Minute) erfolgten, Verwendung fanden. Zweitens erfolgte die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten über einen Zeitraum von 48 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung. Dafür wurden ein kurz nach dem vierten Lösungsaustausch (570. Minute) aufgenommenes Höhenbild und das Höhenbild (H1, 623. Minute) verwendet. Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten konnte erst ab dem dritten Lösungsaustausch (500. Minute) erfolgen, da davor von den Bildern (A1) bis (C1) noch kein Wachstum auf der Probenoberfläche beobachtbar ist.

Wie bereits in Abschnitt 5.4.1.4 beschrieben, wurden dazu jeweils horizontal und möglichst durch die Mitte²⁴¹ der zu vermessenden Calciumcarbonatkristalle verlaufende Höhenprofile aus zwei nach unterschiedlichen Zeiträumen aufgenommenen Höhenbildern mit der AFM-Software ermittelt und aus den zwei Höhenprofilen die Höhendifferenzen $\Delta h_1 = h_{1a} - h_{1b}$ und $\Delta h_2 = h_{2a} - h_{2b}$ immer zwischen dem Höhenwert an der höchsten Stelle des Calciumcarbonatkristalls (h_{1a} bzw. h_{2a}) und dem Höhenwert des gewählten Referenzpunktes (h_{1b} bzw. h_{2b}) berechnet sowie aus den beiden Höhendifferenzen die Höhenänderung $\Delta h = \Delta h_2 - \Delta h_1$ des Kristalls ermittelt. Mit dem zwischen den Aufnahmen der Höhenbilder vergangenen Zeitraum Δt erfolgte anschließend jeweils die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit v des Calciumcarbonatkristalls gemäß der Formel $v = \frac{\Delta h}{\Delta t}$. Die Fehler der ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten wurden ebenfalls entsprechend dem in Abschnitt 5.4.1.4 beschriebenen Verfahren berechnet. Dabei ergaben sich die relativen Fehler der Wachstumsgeschwindigkeiten jeweils aus Addition der relativen Fehler der Höhenänderung Δh und der Zeitspanne Δt . Die einzelnen Höhendifferenzen Δh_1 und Δh_2 konnten jeweils mit einer Genauigkeit von ± 2 nm aus den Höhenprofilen abgelesen werden, womit sich aufgrund der anschließenden Differenzbildung ein Fehler von ± 4 nm für die Höhenänderungen ergab. Für die Zeitspanne Δt zwischen den Aufnahmen der Höhenbilder wurde wieder ein Fehler von ± 2 min bzw. von ± 120 s angenommen, da die Angabe der Zeitpunkte der Bildaufnahmen immer mit einer Genauigkeit von ± 1 min erfolgte.

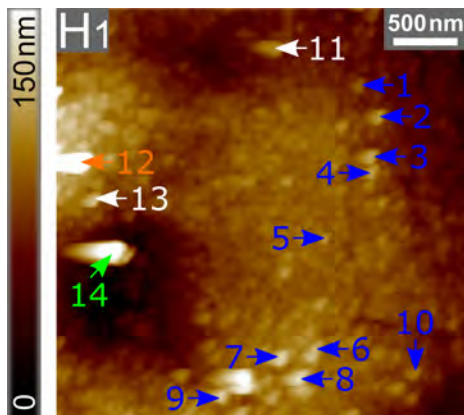


Abbildung 75: Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten ausgewählte CaCO_3 -Kristalle. Dargestellt ist das AFM-Höhenbild (H1) aus Abb. 72. Die zu vermessenden Kristalle sind mit verschiedenfarbigen Pfeilen und mit (1) bis (14) gekennzeichnet. Die zu den Kristallen ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten finden sich in Tabelle 10.

Die blauen und weißen Pfeile sowie der grüne Pfeil in der **Abbildung 75** kennzeichnen die zur Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten ausgewählten Calciumcarbonatkristalle. Zusätzlich wurden diese Kristalle dort fortlaufend mit (1) bis (14) markiert. Das Wachstum der mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Kristalle fand dabei in unmittelbarer Nähe der Kanten bzw. Ränder der Aragonitplättchen statt. Im Gegensatz dazu sind die

²⁴¹Die Höhenprofile müssen in den betrachteten Höhenbildern immer an derselben Stelle durch den zu vermessenden Calciumcarbonatkristall verlaufen.

mit weißen Pfeilen markierten Kristalle weiter entfernt von den Plättchenkanten auf der Oberfläche eines der Aragonitplättchen und der mit grünem Pfeil markierte Kristall genau in der Vertiefung bzw. dem Loch, das in dieser Plättchenoberfläche auftrat, gewachsen. Die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten der betrachteten Kristalle in der Einheit $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ finden sich in der Tabelle 10. Die Tabelle 21 im Anhang in Abschnitt 10.5 zeigt die ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten zusätzlich in der Einheit $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$. Zur besseren Übersicht sind die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten in den gleichen Farben wie die zur Kennzeichnung der Kristalle verwendeten Pfeile in der Abbildung 75 markiert.

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$	
		bei der Konzentration von 3,1 mM über den Zeitraum von 59 min (kurz nach dem dritten Austausch bis kurz vor dem vierten Austausch)	bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 48 min (kurz nach dem vierten Austausch bis zum Bild (H1))
Calciumcarbonatkristall	(1)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	(2)	0,5 ± 0,1	—
	(3)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2
	(4)	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	(5)	—	0,3 ± 0,1
	(6)	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2
	(7)	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	(8)	—	0,9 ± 0,2
	(9)	—	0,8 ± 0,2
	(10)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	(11)	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2
	(12)	0,4 ± 0,1	1,9 ± 0,2
	(13)	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2
	(14)	0,9 ± 0,1	3,1 ± 0,3

Tabelle 10: Aus den AFM-Höhenbildern der Abb. 72 berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ von 14 verschiedenen CaCO_3 -Kristallen in zwei der verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale (3,1 mM und 3,4 mM). Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte erst ab dem Bild (D1), da ab diesem Zeitpunkt das Kristallwachstum auf der Probenoberfläche sichtbar ist.

Die meisten der nah an den Plättchenkanten entstandenen Calciumcarbonatkristalle (1) bis (10) sind sowohl in der 3,1 mM CaCO_3 -Lösung als auch in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung etwa mit den gleichen Geschwindigkeiten gewachsen. Dabei stimmen die Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Kristalle im Rahmen der berechneten Fehler sehr gut überein. Da sich die Höhe des Kristalls (2) in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung nur noch

um wenige Nanometer geändert hat, erfolgte hier aufgrund des hohen Fehlers keine Angabe der Wachstumsgeschwindigkeit. Nur das Wachstum der Kristalle (8) und (9) fand in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung schneller statt als das Wachstum der anderen mit blauen Pfeilen markierten Kristalle. Die Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle (8) und (9) konnten in der verwendeten Konzentration von 3,1 mM nicht ermittelt werden, da dort noch kein deutlich sichtbares Wachstum dieser Kristalle erfolgte. Die weiter entfernt von den Kanten auf der Plättchenoberfläche entstandenen Kristalle (11) und (13) sind in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung mit etwas höheren Geschwindigkeiten gewachsen als in der 3,1 mM CaCO_3 -Lösung. Im Vergleich zu allen anderen Kristallen haben die Höhen der Calciumcarbonatkristalle (12) und (14) über den Zeitraum von 48 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung deutlich mehr zugenommen als in der 3,1 mM CaCO_3 -Lösung. Somit sind die Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle (12) und (14) in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung von allen betrachteten Kristallen am höchsten und etwa 3-fach bis 4-fach größer als bei der Konzentration von 3,1 mM. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Kristalls (14), dessen Wachstum im Loch bzw. in der Vertiefung in der Plättchenoberfläche erfolgte, ist auch in der 3,1 mM CaCO_3 -Lösung von allen betrachteten Kristallen am höchsten.

Wie aus den berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten ersichtlich und auch in den Abbildungen 72 und 74 deutlich erkennbar ist, erfolgte das Wachstum des Kristalls (14) in dem in der Plättchenoberfläche vorhandenen Loch bei den zwei betrachteten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung (3,1 mM und 3,4 mM) wesentlich schneller als das Wachstum der anderen Kristalle, die in der Nähe der Plättchenkanten und auf der restlichen Oberfläche des Aragonitplättchens entstanden sind.

5.4.2.4 Ergänzende Charakterisierung der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM

Nach Durchführung des AFM-Wachstumsexperiments erfolgte die Vorbereitung der Perlmutterpaltfläche für die anschließende REM-Untersuchung wieder entsprechend der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Prozedur. Dazu wurde die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt, die Probe mit Reinstwasser abgespült, die restliche Flüssigkeit in der Petrischale mit Hilfe fusselfreier Tücher²⁴² getrocknet und nach zehntägiger Trocknung der Probe im Kühlraum bei 6 °C der Petrischalenrand entfernt [4]. Anschließend wurde der Petrischalenboden, auf dem die Probe festgeklebt war, mittels elektrisch leitfähigem Haftaufkleber²⁴³ auf einem runden Probensteller²⁴⁴ fixiert und zusätzlich mit leitfähigem, kupferbeschichte-

²⁴²VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

²⁴³25 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁴⁴32 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

tem Klebeband²⁴⁵ kontaktiert. Für diese REM-Untersuchung erfolgte wieder keine leitfähige Beschichtung der Probe [4].

Die **Abbildungen 76 und 79** zeigen die mit dem REM aufgenommene Probenoberfläche der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, auf der zuvor bereits das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen über einen Zeitraum von 263 Minuten direkt mit dem AFM beobachtet wurde (siehe Abb. 72, Bilder (A) bis (H)). Die **Abbildung 76** zeigt mehrere ausgewählte Oberflächenbereiche mit unterschiedlichen Scanflächen von $52\ \mu\text{m} \cdot 69\ \mu\text{m}$ beim Bild (A), von $38\ \mu\text{m} \cdot 51\ \mu\text{m}$ beim Bild (B), von $24\ \mu\text{m} \cdot 31\ \mu\text{m}$ beim Bild (C), von $13\ \mu\text{m} \cdot 17\ \mu\text{m}$ beim Bild (D), von $10\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$ beim Bild (E) und von $8\ \mu\text{m} \cdot 11\ \mu\text{m}$ beim Bild (F). Für die Untersuchung der Probenoberfläche mit dem SE2-Detektor²⁴⁶ wurden eine Aperturblende mit Durchmesser von $30\ \mu\text{m}$ und zunächst ein Neigungswinkel des Probenstisches von 0° sowie eine Beschleunigungsspannung von $1,5\ \text{kV}$ (Bilder (A) bis (C)) bzw. $1\ \text{kV}$ (Bilder (D) bis (F)) verwendet [4].

Mehrere horizontal verlaufende und in vertikaler Richtung übereinander angeordnete Schichten, die jeweils aus vielen einzelnen dicht aneinandergrenzenden und polygonal geformten Aragonitplättchen bestehen, sind im Bild (A) deutlich erkennbar [4, 5]. Die intertabulare organische Matrix trennt dabei die in einer Schicht vorhandenen Aragonitplättchen in horizontaler Richtung voneinander [1]. Zwischen den vertikal übereinanderliegenden Schichten befindet sich immer eine etwa $30\ \text{nm}$ bis $50\ \text{nm}$ dünne Schicht der interlamellaren organischen Matrix [1, 5]. Allerdings ist die organische Matrix hier in den REM-Aufnahmen nicht sichtbar, da die Probe für die REM-Untersuchung nicht leitfähig beschichtet wurde [4]. Die verschiedenfarbigen (weißen, gelben und roten) Pfeile kennzeichnen drei verschiedene dieser etwa $500\ \text{nm}$ hohen Aragonitschichten. Dabei markiert der weiße Pfeil die oberste sichtbare Schicht aus Aragonitplättchen [4]. Auf der Probenoberfläche sind zusätzlich einige Artefakte, wie z. B. Löcher in der Aragonitschicht oder übriggebliebene Bruchstücke anderer Aragonitplättchen, beobachtbar. Die blauen Pfeile in den Bildern (A) und (B) markieren beispielhaft derartige Artefakte. Das Bild (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines größeren Ausschnitts aus dem Bild (A). Da die Perlmutterpaltfläche durch Zerschlagen mit einem Hammer aus den Schnecken Schalen erzeugt wurde, sind diese Artefakte höchstwahrscheinlich durch die Probenpräparation entstanden [4]. Betrachtet man die einzelnen Aragonitplättchen in den REM-Aufnahmen, so lassen sich deren laterale Ausdehnungen bzw. Durchmesser gut ausmessen. Die lateralen Ausdehnungen der einzelnen Plättchen im untersuchten Probenbereich dieser ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche liegen im Bereich von etwa $4\ \mu\text{m}$ bis $9\ \mu\text{m}$.

²⁴⁵6,4 mm Breite, einseitig klebend; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁴⁶siehe Abschnitt 3.2

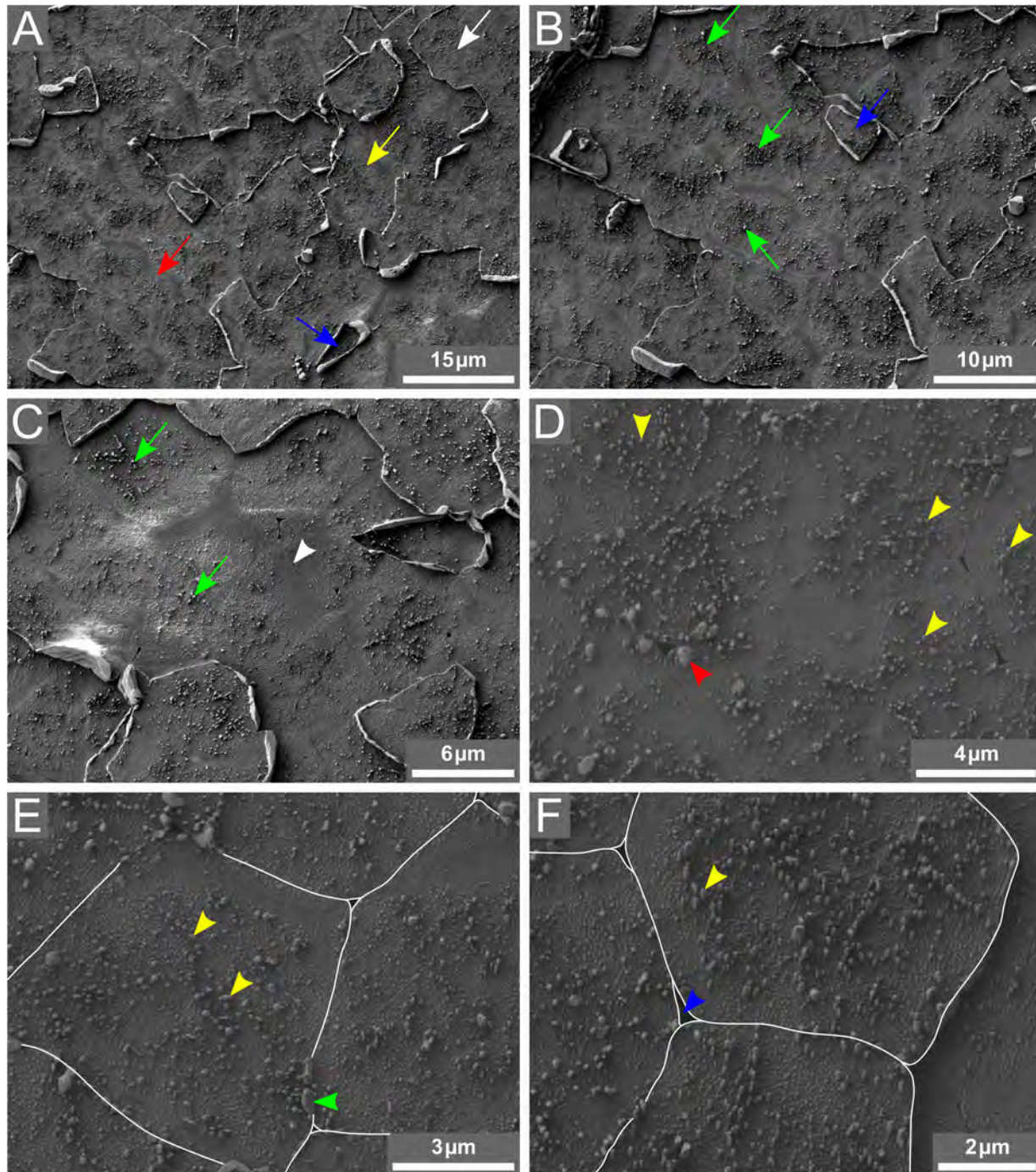


Abbildung 76: REM-Aufnahmen unterschiedlicher, ausgewählter Bereiche der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment (siehe Abb. 72). Scanflächen: (A) $52\ \mu\text{m} \cdot 69\ \mu\text{m}$, (B) $38\ \mu\text{m} \cdot 51\ \mu\text{m}$, (C) $24\ \mu\text{m} \cdot 31\ \mu\text{m}$, (D) $13\ \mu\text{m} \cdot 17\ \mu\text{m}$, (E) $10\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$ und (F) $8\ \mu\text{m} \cdot 11\ \mu\text{m}$; Neigungswinkel des Probenstückes: 0° . In (A) bis (C) sind die übereinander verlaufenden aus einzelnen Aragonitplättchen bestehenden Schichten gut erkennbar. Der weiße, gelbe und rote Pfeil in (A) markiert jeweils eine solche Aragonitschicht. Durch die Präparation sind Artefakte auf der Probenoberfläche (blaue Pfeile in (A) und (B)) entstanden. Auf den Plättchenoberflächen sind CaCO_3 -Kristalle, die unterschiedliche laterale Ausdehnungen aufweisen, gewachsen (grüne Pfeile, gelbe und rote Dreiecke). Zur besseren Sichtbarkeit sind die Ränder einzelner Aragonitplättchen in (E) und (F) weiß hervorgehoben. An den Plättchenkanten und in den Spalten zwischen den Plättchen fand ebenfalls das Wachstum von CaCO_3 -Kristallen statt (grünes Dreieck in (E)).

Die Bilder (C) bis (F) zeigen weitere unterschiedliche Bereiche dieser Perlmutterpaltfläche. Bereits in den Bildern (B) und (C) ist gut erkennbar, dass auf den Oberflächen der einzelnen Aragonitplättchen viele kristalline Strukturen, vermutlich während des AFM-Experiments gewachsene Kristalle, vorhanden sind. Die grünen Pfeile kennzeichnen dort mehrere Bereiche, in denen viele dieser Calciumcarbonatkristalle auf den Plättchenoberflächen existieren. Jedoch gibt es auch Bereiche, in denen keine oder nur sehr wenige solcher Kristalle auftreten (z. B. weißes Dreieck im Bild (C)). Diese während des AFM-Wachstumsexperiments auf den Aragonitplättchenoberflächen gewachsenen Calciumcarbonatkristalle, die offensichtlich sehr unterschiedliche laterale Ausdehnungen bzw. Durchmesser aufweisen, sind in den Bildern (D) bis (F) besser zu erkennen. Verteilt über den überwiegenden Teil der Oberfläche einzelner Aragonitplättchen treten hauptsächlich eher dünnere Kristalle, d. h. solche mit geringen lateralen Ausdehnungen, auf. Die gelben Dreiecke in den Bildern (D) bis (F) kennzeichnen einige dieser dünnen Calciumcarbonatkristalle. Zusätzlich sind auch Kristallstrukturen mit deutlich größeren Durchmessern (z. B. rotes Dreieck im Bild (D)) auf der Probenoberfläche zu beobachten. So besitzt der im Bild (D) mit rotem Dreieck markierte Calciumcarbonatkristall bereits eine laterale Ausdehnung von etwa $650 \text{ nm} \cdot 650 \text{ nm}$.

Da die Ränder bzw. Kanten der einzelnen Aragonitplättchen für das ungeübte Auge teilweise nur schwer erkennbar sind, wurden die gut sichtbaren Plättchenränder zur besseren Sichtbarkeit in den Bildern (E) und (F) weiß hervorgehoben. Wie bereits von mir in [4] beschrieben, treten zwischen den Aragonitplättchen oftmals größere Lücken bzw. Löcher dort auf, wo mehrere aneinanderstoßen (siehe z. B. Bilder (E) und (F)). Das blaue Dreieck im Bild (F) markiert beispielhaft eine solche größere Lücke. Wie besonders gut im Bild (E) zu erkennen ist, existieren häufig auch Calciumcarbonatkristalle an den Rändern der Aragonitplättchen und in den Spalten zwischen den verschiedenen Plättchen (z. B. grünes Dreieck), die vermutlich während des AFM-Wachstumsexperiments dort entstanden sind. Aus den hier gezeigten zweidimensionalen REM-Aufnahmen der Aragonitplättchenoberflächen, deren Aufnahmen bei einem Neigungswinkel des Probenstisches von 0° erfolgten, können keine Informationen über die Höhen der gewachsenen Calciumcarbonatkristalle erhalten werden. Allerdings lassen sich aus den REM-Aufnahmen sehr gut die Oberflächendichten der auf den Aragonitplättchen gewachsenen Kristalle ermitteln.

Betrachtet man nun im Bild (F) das rechte, obere Aragonitplättchen, das deutlich erkennbar eine polygonale Form aufweist, so sind dort viele dünnere Calciumcarbonatkristalle fast über die gesamte im Bild sichtbare Plättchenoberfläche gewachsen. Allerdings befinden sich im näheren Bereich um den Rand bzw. die Kanten des Aragonitplättchens nur wenige Kristalle. Auf diesem Aragonitplättchen sind insgesamt 265 ± 15 Calcium-

carbonatkristalle abzählbar. Diese Kristalle sind aufgrund des offenbar leicht schrägen Winkels der Probenoberfläche recht gut erkennbar. Jedoch ist bei einigen dieser Kristalle nicht eindeutig entscheidbar, ob es sich bei diesen jeweils um mehrere kleinere, dicht nebeneinander gewachsene Kristalle oder um einen aus kleinen Kristalliten bereits zusammengewachsenen Kristall handelt [4]. Auch eine Unterscheidung zwischen den tatsächlich induziert gewachsenen Kristallen und den, vor dem Wachstumsexperiment mit dem AFM beobachteten, auf den Plättchenoberflächen vorhandenen, natürlich gewachsenen, kristallinen Strukturen („nanoasperities“ und/oder kleine Aragonitkristalle) ist nicht gut möglich [4]. Diese Unterscheidung fällt insbesondere bei noch sehr kleinen Kristallen bzw. Kristallen mit einer sehr geringen Höhe schwer.

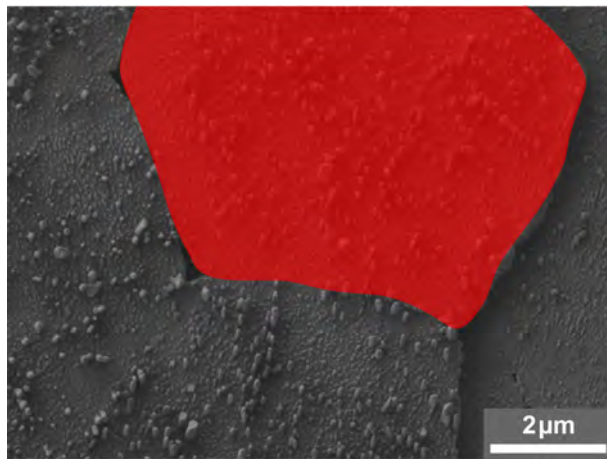


Abbildung 77: Eine der bereits in Abb. 76 gezeigten REM-Aufnahmen zur Bestimmung der sichtbaren Teilfläche eines Aragonitplättchens. Die manuell ausgewählte Fläche des Aragonitplättchens, deren Berechnung mit dem Programm ImageJ erfolgte, ist hier rot markiert.

Die Ermittlung der im REM-Bild sichtbaren Fläche²⁴⁷ des betrachteten Aragonitplättchens erfolgte mit dem Programm ImageJ²⁴⁸. Dafür wurde der Umriss des Aragonitplättchens im aufgenommenen Bild (F) der Abbildung 76 manuell nachgezeichnet und anschließend mit dem gespeicherten Maßstab die Fläche des Aragonitplättchens automatisch berechnet. Die Aufnahme des Maßstabs fand zeitgleich mit der Aufnahme des REM-Bildes statt. In der **Abbildung 77** ist die manuell ausgewählte Fläche des Aragonitplättchens rot hervorgehoben, wobei das Plättchen hier am oberen Bildrand nicht vollständig abgebildet ist. Für die ermittelte Oberfläche des Aragonitplättchens wurde ein Größtfehler von $\pm 0,05 \mu\text{m}^2$ angenommen. Dieser Fehler ergibt sich aus zwei Gründen: (1) der Umriss des Aragonitplättchens musste per Hand festgelegt werden und (2) die Kanten bzw. der Rand des Plättchens sind nicht überall scharf abgebildet [4]. Damit erhielt man für die betrachtete Teilfläche des Aragonitplättchens nun eine Oberfläche von $(34,04 \pm 0,05) \mu\text{m}^2$.

²⁴⁷Fläche der großen (001)-Oberfläche des Aragonitplättchens

²⁴⁸ImageJ 1.53a; Wayne Rasband, National Institutes of Health; USA

Aus der Anzahl der auf dem betrachteten Plättchen vorhandenen Calciumcarbonatkristalle und der berechneten Oberfläche des Aragonitplättchens konnte nun die Oberflächendichte der Kristalle ermittelt werden. Für das betrachtete Aragonitplättchen ergab sich eine Oberflächendichte von etwa $(7,8 \pm 0,5)$ Calciumcarbonatkristallen pro μm^2 . Allerdings fand das Wachstum der nadelförmigen Kristalle nicht homogen auf der gesamten Oberfläche des Aragonitplättchens statt. Daher ist die Dichte der gewachsenen Calciumcarbonatkristalle im näheren Bereich des Randes bzw. der Kanten deutlich kleiner als im mittleren Bereich des Aragonitplättchens. Der Fehler der ermittelten Oberflächendichte wurde wie folgt berechnet. Der Fehler der abgezählten Kristalle von ± 15 entspricht hier einem relativen Fehler von 5,7% und der Fehler der berechneten Plättchenfläche von $\pm 0,05 \mu\text{m}^2$ entspricht einem relativen Fehler von 0,15%. Da sich die Oberflächendichte als Quotient aus der Anzahl der Kristalle und der Fläche des Aragonitplättchens ergab, erhielt man einen relativen Fehler von etwa 5,9% für die ermittelte Oberflächendichte.

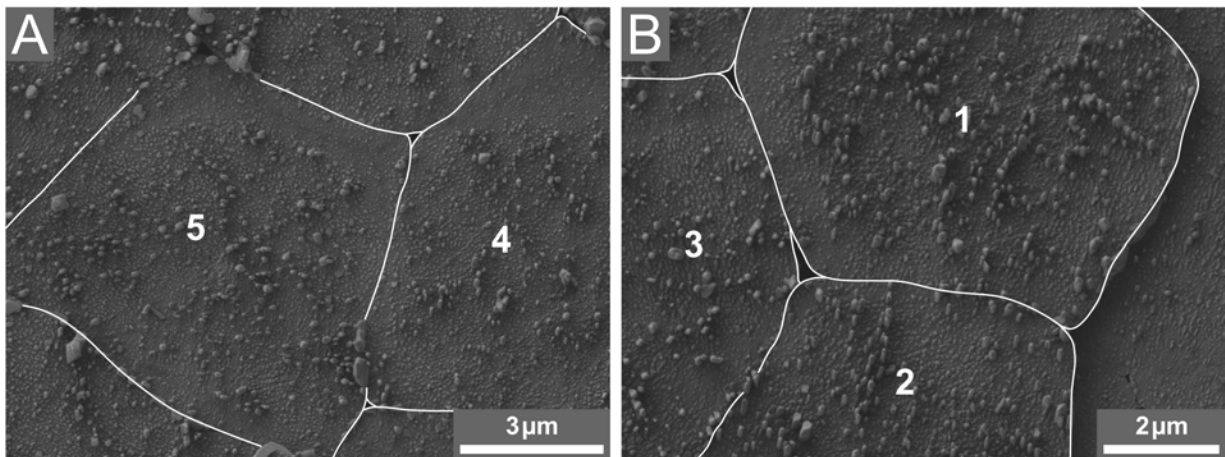


Abbildung 78: Zwei der bereits in Abb. 76 gezeigten REM-Aufnahmen zur Ermittlung der Oberflächendichten der auf den verschiedenen Aragonitplättchen vorhandenen CaCO_3 -Kristalle. Die ausgewählten Aragonitplättchen sind mit (1) bis (5) gekennzeichnet. Die ermittelten Oberflächendichten finden sich in Tabelle 11.

Aus den Bildern (E) und (F) der Abbildung 76 erfolgte auch die Ermittlung der Oberflächendichten der auf den anderen gut sichtbaren Aragonitplättchen existierenden Calciumcarbonatkristalle. In der **Abbildung 78** sind die einzelnen ausgewählten Aragonitplättchen mit (1) bis (5) markiert, wobei nur das im Bild (A) mit (5) gekennzeichnete Plättchen fast vollständig zu sehen ist. Das Auszählen der einzelnen Kristalle konnte nicht in REM-Aufnahmen mit größeren Scanflächen erfolgen, da dafür eine hohe Auflösung der Oberflächenstruktur notwendig war. Die Tabelle 11 zeigt die Anzahl der Calciumcarbonatkristalle, die Oberfläche des jeweiligen Aragonitplättchens und die daraus ermit-

telten Oberflächendichten. Die Berechnung aller in den Bildern sichtbaren Oberflächen der Aragonitplättchen erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Programms ImageJ. Dabei wurde für den Größtfehler der ermittelten Oberflächen jeweils wieder $\pm 0,05 \mu\text{m}^2$ angenommen. Die Calciumcarbonatkristalle auf den im Bild (B) mit (2) und (3) markierten Aragonitplättchen sind wieder aufgrund des leicht schrägen Winkels der Probenoberfläche recht gut erkennbar. Dort ist nur, wie oben beschrieben, manchmal schwer entscheidbar, ob es sich (1) um einzeln gewachsene Kristalle oder einen einzelnen, größeren Kristall und (2) um induziert gewachsene Kristalle oder die bereits vorher vorhandenen, natürlich gewachsenen, kristallinen Strukturen handelt [4]. Daher wurde dort wieder ein Fehler von ± 15 Kristallen angenommen. Bei den Calciumcarbonatkristallen auf den mit (4) und (5) gekennzeichneten Aragonitplättchen fiel die Unterscheidung schwerer, da die Kristalle nur direkt von oben zu sehen sind. Daher wurde dort beim Abzählen ein Fehler von ± 30 Kristallen angenommen.

Aragonitplättchen	Oberfläche in μm^2	Anzahl der Calciumcarbonatkristalle	Oberflächendichte der Kristalle pro μm^2
(1)	$34,04 \pm 0,05$	265 ± 15	$7,8 \pm 0,5$
(2)	$16,03 \pm 0,05$	130 ± 15	$8,1 \pm 1,0$
(3)	$15,93 \pm 0,05$	110 ± 15	$6,9 \pm 1,0$
(4)	$31,98 \pm 0,05$	160 ± 30	$5,0 \pm 0,9$
(5)	$46,67 \pm 0,05$	240 ± 30	$5,1 \pm 0,6$

Tabelle 11: Die aus der Anzahl der auf der Teiloberfläche des jeweiligen Aragonitplättchens vorhandenen CaCO_3 -Kristalle und der Plättchenfläche ermittelte Oberflächendichte für die fünf verschiedenen in Abb. 78 gekennzeichneten Aragonitplättchen.

Die ermittelten Oberflächendichten der Calciumcarbonatkristalle, die auf den mit (1), (2) und (3) markierten Aragonitplättchen vorhanden sind, stimmen im Rahmen der berechneten Fehler gut überein. Diese Aragonitplättchen liegen dabei direkt nebeneinander. Die mit (4) und (5) gekennzeichneten Aragonitplättchen befanden sich in einem anderen Probenbereich der untersuchten, ursprünglich frisch gespaltenen, Perlmutteroberfläche. Dort wurde eine etwas kleinere Oberflächendichte der Calciumcarbonatkristalle ermittelt, da auf diesen Aragonitplättchen bezogen auf die betrachtete Plättchenoberfläche auch weniger Kristalle gewachsen sind. Allerdings konnten die Oberflächendichten der auf den Plättchenoberflächen entstandenen Kristalle in den unterschiedlichen Probenbereichen nur bei wenigen Aragonitplättchen ermittelt werden. Der Mittelwert der Oberflächendichte aus allen Berechnungen beträgt $(6,6 \pm 0,7) \mu\text{m}^{-2}$.

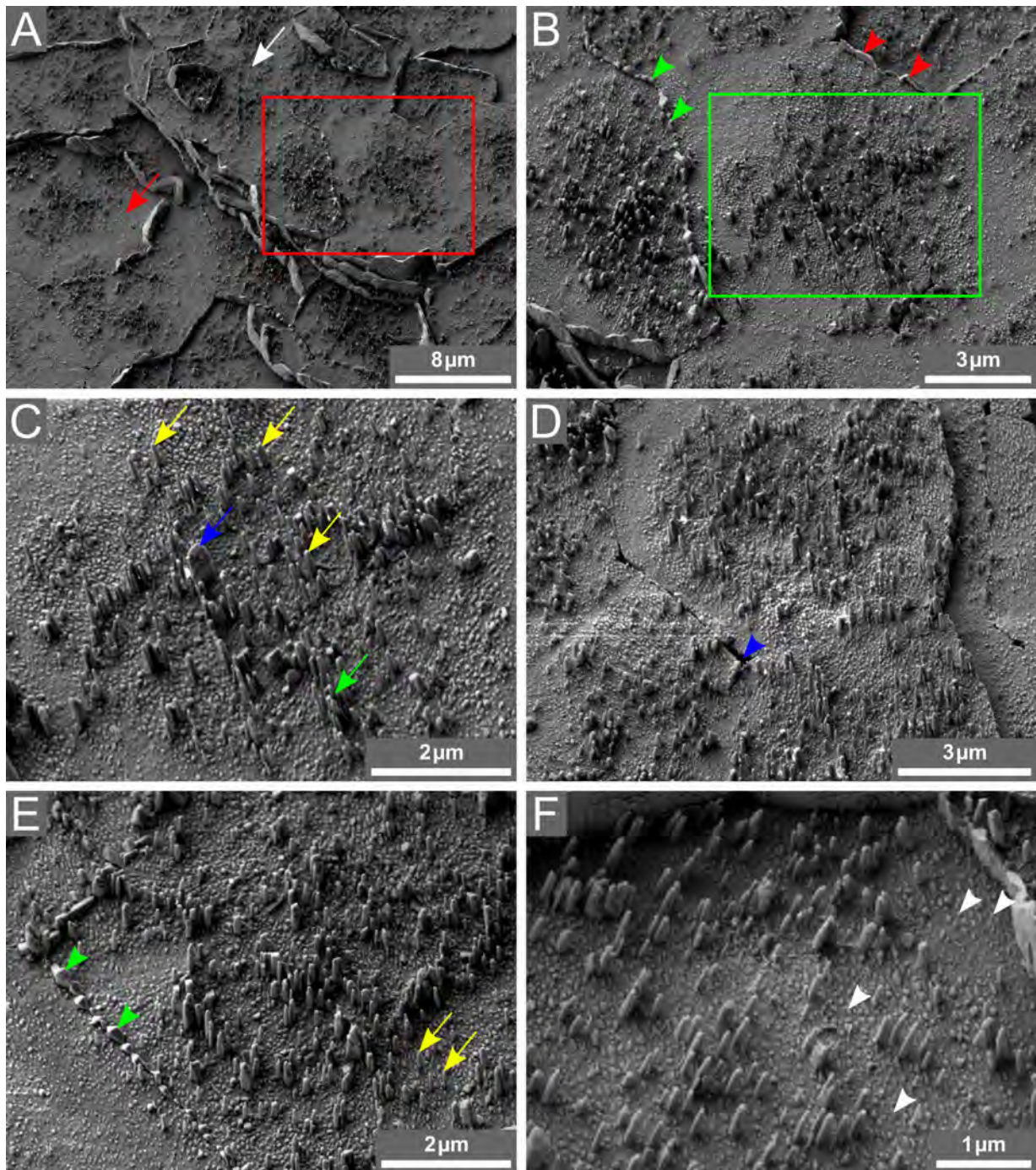


Abbildung 79: REM-Aufnahmen der bereits in Abb. 76 untersuchten Perlmutterpaltfläche hier unter einem Neigungswinkel des Probenstisches von $22,3^\circ$ zur Beobachtung der Form der gewachsenen CaCO_3 -Kristalle. Scanflächen: (A) $28\ \mu\text{m} \cdot 37\ \mu\text{m}$, (B) $11\ \mu\text{m} \cdot 15\ \mu\text{m}$, (C) $6\ \mu\text{m} \cdot 8\ \mu\text{m}$, (D) $9\ \mu\text{m} \cdot 12\ \mu\text{m}$, (E) $6\ \mu\text{m} \cdot 8\ \mu\text{m}$ und (F) $4\ \mu\text{m} \cdot 6\ \mu\text{m}$. (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des in (A) rot hervorgehobenen Bereichs und (C) zeigt den in (B) grün gekennzeichneten Bereich vergrößert. Auf den Oberflächen der einzelnen Aragonitplättchen sind viele nadelförmige CaCO_3 -Kristalle (blauer und grüner Pfeil sowie gelbe Pfeile in (C) und (E)) zu erkennen, die während des Wachstumsexperiments dort entstanden sind. Ebenso befinden sich an den Plättchenkanten und in den Spalten zwischen den Aragonitplättchen viele CaCO_3 -Kristalle (rote und grüne Dreiecke in (B) und (E)). Zusätzlich sind auf den Plättchenoberflächen zahlreiche kleinere kristalline Strukturen – vermutlich „nanoasperities“ und/oder Nukleationskeime – zu beobachten (weiße Dreiecke in (F)).

Um diese auf den Oberflächen der Aragonitplättchen gewachsenen Calciumcarbonatkristalle morphologisch besser charakterisieren zu können, wurde der Probenstisch mit dem darauf befestigten Probenhalter, auf dem sich der runde Probensteller²⁴⁹ mit dem Probestück befand, nun um einen Winkel von $22,3^\circ$ geneigt. Die **Abbildung 79** zeigt weitere, verschiedene Bereiche der bereits in Abbildung 76 dargestellten ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, auf der während des AFM-Experiments das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen stattfand, in den Scanflächen von $28\ \mu\text{m} \cdot 37\ \mu\text{m}$ beim Bild (A), von $11\ \mu\text{m} \cdot 15\ \mu\text{m}$ beim Bild (B), von $6\ \mu\text{m} \cdot 8\ \mu\text{m}$ beim Bild (C), von $9\ \mu\text{m} \cdot 12\ \mu\text{m}$ beim Bild (D), von $6\ \mu\text{m} \cdot 8\ \mu\text{m}$ beim Bild (E) und von $4\ \mu\text{m} \cdot 6\ \mu\text{m}$ beim Bild (F). Dabei wurde eine Beschleunigungsspannung von $1,5\ \text{kV}$ und eine Aperturblende mit Durchmesser von $30\ \mu\text{m}$ verwendet [4].

Im Bild (A) sind wieder deutlich mehrere übereinanderliegende Schichten, die aus einzelnen Aragonitplättchen bestehen, beobachtbar [4]. Dabei kennzeichnet der weiße Pfeil hier die oberste Aragonitschicht und der rote Pfeil eine weiter untenliegende Schicht. Das Bild (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des im Bild (A) rot markierten Bereichs. Dort ist bereits sehr deutlich erkennbar, dass die auf den Oberflächen der Aragonitplättchen vorhandenen Calciumcarbonatkristalle nadelartige Formen aufweisen. Dabei befinden sich diese nadelförmig gewachsenen Kristalle hauptsächlich im mittleren Bereich der verschiedenen Aragonitplättchen, aber auch im Bereich um die Plättchenkanten. Zusätzlich sind auch Calciumcarbonatkristalle in den Spalten zwischen den nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen (grüne Dreiecke) und an den freien Rändern bzw. Kanten der Plättchen (rote Dreiecke) beobachtbar. Das Bild (C) zeigt wiederum den grün gekennzeichneten Bereich aus dem Bild (B) entsprechend vergrößert. Das Bild (C) stellt dabei insbesondere den mittleren Bereich eines der Aragonitplättchen aus dem Bild (B) dar. Die einzelnen nadelförmigen Calciumcarbonatkristalle auf dieser Plättchenoberfläche weisen verschiedene Höhen und Durchmesser bzw. laterale Ausdehnungen auf. Die gelben Pfeile markieren beispielhaft einige kleinere, dünnere Kristalle. Das Wachstum dieser Kristalle fand dort eher vereinzelt statt. Im Gegensatz dazu kennzeichnet der grüne Pfeil mehrere eng nebeneinander entstandene Calciumcarbonatkristalle, die bei Fortführung des Wachstumsexperiments vermutlich einen größeren, einzelnen Kristall bilden würden. Zusätzlich befindet sich etwa in der Mitte des im Bild (C) gezeigten Aragonitplättchens ein größerer, ebenfalls nadelförmiger Kristall, der mit einem blauen Pfeil markiert ist. Dieser Kristall kann entweder durch das Zusammenwachsen von mehreren kleineren, nadelartigen Kristallen entstanden sein oder er ist dort gewachsen, wo sich ursprünglich eine Mineralbrücke, d. h. eine kristalline Verbindung in vertikaler Richtung, zwischen den übereinanderliegenden

²⁴⁹32 mm Durchmesser; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

Aragonitplättchen befand [4, 14]. Da hier die Aufnahmen der REM-Bilder unter einem schrägen²⁵⁰ Winkel zwischen Proben Tisch und SE2-Detektor erfolgten und dadurch die Höhen sowie die Durchmesser der einzelnen Kristalle aus den REM-Aufnahmen nur sehr ungenau bestimmt werden können, sind auch hier keine Aussagen über das Aspektverhältnis der Kristallnadeln möglich.

Das Bild (D) zeigt denselben Probenbereich wie das Bild (F) aus der Abbildung 76. Hier sind die verschiedenen Aragonitplättchen und deren Plättchenkanten sowie die auf den Plättchenoberflächen gewachsenen Calciumcarbonatkristalle noch viel deutlicher sichtbar. An der Stelle, wo drei der Aragonitplättchen aufeinandertreffen, existiert eine größere Lücke (blaues Dreieck) [4]. Betrachtet man hier das obere, rechte Aragonitplättchen, so kann man gut erkennen, dass die Calciumcarbonatkristalle fast homogen über einen Großteil der Plättchenoberfläche verteilt sind. Ebenso ist sichtbar, dass an den Plättchenkanten wie erwartet auch viele Kristalle gewachsen sind, aber auf der linken Seite zwischen dem Rand und der recht homogen bewachsenen Fläche ein Bereich mit wenig induziert gewachsenen Kristallen existiert. Auf diesem Aragonitplättchen sind etwa 245 ± 15 Calciumcarbonatkristalle abzählbar. Die hier ermittelte Anzahl der Kristallnadeln stimmt sehr gut mit der zuvor bei einem Neigungswinkel des Proben tisches von 0° aus dem Bild (F) der Abbildung 76 ermittelten Anzahl auf diesem Aragonitplättchen überein.

Die Bilder (E) und (F) der Abbildung 79 zeigen weitere Oberflächenbereiche der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment. Auf dem im Bild (E) dargestellten Probenbereich fand das Wachstum der Calciumcarbonatkristalle auch verstärkt in den Spalten zwischen den Aragonitplättchen (z. B. grüne Dreiecke) statt. Das Bild (F), das die höchste Auflösung besitzt, zeigt eine Nahaufnahme eines kleinen Teils eines einzelnen Aragonitplättchens. Dort befinden sich zwischen den markanten nadelartigen Calciumcarbonatkristallen zusätzlich eher flach wirkende kristalline Strukturen, von denen einige mit weißen Dreiecken markiert sind. Bei diesen flachen kristallinen Strukturen handelt es sich höchstwahrscheinlich um „nanoasperities“, d. h. Unebenheiten im Nanometerbereich auf den großen, horizontalen Oberflächen der Aragonitplättchen, die bei natürlichem Wachstum entstanden sind [8, 77]. Zählt man nun im Bild (F) mit einer Scanfläche von $4 \mu\text{m} \cdot 6 \mu\text{m}$ die Kristallnadeln, so erhält man etwa 170 ± 15 Calciumcarbonatkristalle. Daraus ergab sich eine Oberflächendichte von $(7,1 \pm 0,6)$ Calciumcarbonatnadeln pro μm^2 [4]. Diese Oberflächendichte stimmt im Rahmen der Fehler gut überein mit den ermittelten Oberflächendichten der Kristallnadeln auf den mit (1), (2) und (3) gekennzeichneten Aragonitplättchen aus der Abbildung 78. Da hier zwischen den markanten nadelartigen

²⁵⁰Die REM-Untersuchung erfolgte bei einem Neigungswinkel des Proben tisches von 0° , jedoch ist der SE2-Detektor seitlich in schrägem Winkel zum Proben Tisch angebracht (siehe Abschnitt 3.2) [148].

Kristallen auf der Plättchenoberfläche recht viel Platz vorhanden ist und sehr viele eher flach wirkende kristalline Strukturen existieren, wird bei weiterem induzierten Wachstum an diesen „nanoasperities“ als Nukleationskeime eine höhere Oberflächendichte entstehen.

In diesem Wachstumsexperiment konnte induziertes Wachstum von mehreren nadel-förmigen Calciumcarbonatkristallen auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche direkt mit dem AFM beobachtet werden (siehe Abb. 72). Nach dem Wachstumsexperiment gelang es, die Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle (siehe Tab. 10) zu ermitteln. Das Wachstum erfolgte vor allem im Bereich der Ränder bzw. Kanten der Aragonitplättchen und in dem in der einen Plättchenoberfläche vorhandenen Loch, das sich wahrscheinlich in der Plättchenmitte befand. In diesem Loch bzw. der Vertiefung war vermutlich vor Probenpräparation eine Mineralbrücke vorhanden [4]. Der im Loch entstandene Kristall ist in den betrachteten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung mit deutlich höheren Geschwindigkeiten gewachsen als die auf der restlichen Plättchenoberfläche entstandenen Calciumcarbonatkristalle. Dieser Kristall könnte bereits ein Ansatz für eine neue Mineralbrücke sein. Diese Beobachtung unterstützt somit das Modell des Aragonitwachstums über Mineralbrücken [4, 5]. Zusätzlich konnten nach dem AFM-Wachstumsexperiment die gewachsenen Calciumcarbonatkristalle auch mit dem REM beobachtet und ihre markante nadelartige Struktur nachgewiesen werden (siehe Abb. 76 bis 79). Ebenfalls gut in den REM-Aufnahmen erkennbar ist, dass wie bereits beim AFM-Wachstumsexperiment beobachtet sehr viele nadelförmige Calciumcarbonatkristalle insbesondere im mittleren Bereich der jeweiligen Plättchenoberflächen und an den Plättchenkanten sowie in den Spalten zwischen den Aragonitplättchen gewachsen sind. Da die auf den Plättchenoberflächen vorhandenen nadelförmigen Kristalle offenbar eine charakteristische Wachstumsgeometrie der Aragonitkristalle zeigen, bestehen diese während des AFM-Wachstumsexperiments entstandenen Kristalle auch aus dem Polymorph Aragonit. Darüber hinaus erfolgten beispielhafte Ermittlungen der Oberflächendichten, mit denen das Wachstum der Kristalle auf den Plättchenoberflächen in verschiedenen Probenbereichen stattfand.

Die Calciumcarbonat- bzw. Aragonitkristalle sind tatsächlich an den bereits vor Durchführung der Wachstumsexperimente vermuteten Stellen auf den Aragonitplättchen (an den Plättchenkanten und in der unmittelbaren Nähe der Plättchenkanten sowie im Bereich der Plättchenmitte) gewachsen. Da das Wachstum der Kristalle vor allem in diesen Bereichen stattfindet, müssen in der organischen Matrix, die die einzelnen Aragonitplättchen bedeckt, Makromoleküle existieren, die dort die Entstehung der Kristalle fördern [5]. Vermutlich begünstigen Carboxyl- und Sulfatgruppen sowie aragonitnukleierenden Proteine, die in einem ringförmigen Bereich in der Plättchenmitte und im Bereich der intertabularen Matrix (ITM) vorkommen, das Wachstum der Calciumcarbonat- bzw. Aragonitkristalle

[5, 6]. Die in [6] von Bezares et al. durchgeführte Untersuchung ergab die genaue Verteilung der verschiedenen Makromoleküle in der organischen Matrix, die jedoch aus Meeresschnecken der Art *Haliotis rufescens* präpariert wurde. Auch Nudelman et al. gelangen in [82] der Nachweis einer vergleichbaren Verteilung der Makromoleküle in der organischen Matrix des Cephalopoden *Nautilus pompilius*, der ebenfalls wie die Meeresschnecken (Gastropoda) zum Stamm der Weichtiere (Mollusca) zählt. Da die hier zur Erzeugung der Perlmutterpaltflächen verwendeten Schneckenschalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis tuberculata* stammen, ist wahrscheinlich eine ähnliche Verteilung der Makromoleküle in der organischen Matrix zu erwarten [5]. Allerdings müssen dazu noch detaillierte Untersuchungen erfolgen.

5.4.3 Drittes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche

5.4.3.1 Aufnahme der AFM-Bildsequenz

Zur Überprüfung der beim vorangegangenen Wachstumsexperiment aufgestellten Behauptung, dass das Wachstum der Calciumcarbonatkristalle vorzugsweise in der Nähe der Ränder bzw. Kanten einzelner Aragonitplättchen und im Bereich der Vertiefungen bzw. Löcher in den Plättchenoberflächen stattfindet, erfolgte die Durchführung von weiteren Wachstumsexperimenten auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen.

In diesem Abschnitt findet sich die Beschreibung eines weiteren Wachstumsexperiments, das auf der zweiten in Abschnitt 5.3.1 voruntersuchten und charakterisierten frisch präparierten Perlmutterpaltfläche aus der Abbildung 59 durchgeführt wurde. Das für die Strukturuntersuchung und das Wachstumsexperiment verwendete Probestück wies eine Größe von etwa $2\text{ mm} \cdot 3\text{ mm}$ auf. Wie bereits in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, wurde die Perlmutterpaltfläche aus der Schale einer Meeresschnecke gewonnen, während der Präparationsprozedur mit einer $0,9\text{ mM CaCO}_3$ -Lösung befeuchtet, mittels Zweikomponentenkleber in einer Petrischale mit Durchmesser von 35 mm fixiert und nach dem Aufkleben erneut mit der $0,9\text{ mM CaCO}_3$ -Lösung benetzt [4]. Nach Abbinden des Zweikomponentenklebers wurden 3 ml derselben $0,9\text{ mM CaCO}_3$ -Lösung in die Petrischale pipettiert. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte mit einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde. Die „touch“-Kalibrierung²⁵¹ dieser AFM-Sonde lieferte eine Federkonstante von $0,22\frac{\text{N}}{\text{m}}$ und eine Deflektionssensitivität von $(11,5 \pm 1,8)\frac{\text{nm}}{\text{V}}$.

Die Untersuchung des Probestücks mit dem AFM (Strukturuntersuchung und Wachstumsexperiment - siehe Abb. 59, 60 und 81) fand hier insgesamt über einen Zeitraum von 451 Minuten statt. Nach der Untersuchung der Oberflächenstruktur wurden auch hier die

²⁵¹Diese Kalibrierung erfolgte auf dem Boden einer weiteren Petrischale mit nur 3 ml der $0,9\text{ mM CaCO}_3$ -Lösung.

Auflösung und die Abtastrate so eingestellt, dass die Bildaufnahme etwa sechs Minuten dauerte. Damit konnte das Abbilden des ausgewählten Probenbereichs nun während der direkten Beobachtung des Kristallwachstums über einen Zeitraum von 310 Minuten erfolgen, wobei die Aufnahmen der aufeinanderfolgenden Bilder in einem Zeitabstand von jeweils sechs Minuten stattfanden. Dabei erfolgte die Beobachtung des Kristallwachstums auf dem im Bild (A1) bzw. (A2) der Abbildung 59 dargestellten Probenbereich. Alle Bilder wurden bei Verwendung einer abbildenden Kraft von 200 pN, einer Abtastrate von 0,697 Hz und einer Auflösung von 256 x 256 Pixel aufgenommen.

In der **Abbildung 81** sind nun ausgewählte Bilder aus der mit dem AFM aufgenommenen Bildsequenz desselben Probenbereichs dargestellt. Dabei zeigen die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $2,90\ \mu\text{m} \cdot 2,90\ \mu\text{m}$ den Probenbereich über 310 Minuten. Jeweils oben (Bilder mit Index 1) sind die Höhsignale und jeweils unten (Bilder mit Index 2) die Fehlersignale dargestellt.

Zu Beginn des Wachstumsexperiments (Bilder (A)) wurde die Perlmutterspaltfläche ebenfalls in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung abgebildet. Das Bild (A1) bzw. (A2) zeigt die Oberfläche eines einzelnen Aragonitplättchens mit den vorher beschriebenen kleinen, natürlich gewachsenen, kristallinen Strukturen. Zudem sind eine Vertiefung bzw. ein Loch und ein Teil einer Plättchenkante sehr gut erkennbar. Vermutlich bedeckt die organische Matrix einen Großteil dieses Aragonitplättchens. Auf der Plättchenoberfläche existieren nämlich mehrere Bereiche, in denen offensichtlich noch organische Matrix vorhanden ist. Die Abbildung 59 in Abschnitt 5.3.1 zeigte dieses Aragonitplättchen mit einer höheren Auflösung. Dort waren teilweise dünne, längere filamentähnliche Strukturen beobachtbar. Da zunächst die Oberflächenstruktur des Aragonitplättchens untersucht wurde, befand sich die Probe bis zur Aufnahme der Bilder (A) bereits etwa 240 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Die Initiierung des Wachstums von Calciumcarbonatkristallen auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche während dieses Wachstumsexperiments erfolgte durch das Einspülen definierter Volumina einer übersättigten 4 mM CaCO_3 -Lösung.

Vor dem ersten Austausch wurde die 4 mM CaCO_3 -Lösung, wie bei allen zuvor beschriebenen Wachstumsexperimenten, ebenfalls für 30 Minuten zum Temperieren neben das AFM gestellt. Während der gesamten über den Zeitraum von 310 Minuten aufgenommenen Bildsequenz fanden nun vier Austausche der CaCO_3 -Lösungen statt. Dabei wurde jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entnommen und 1 ml der 4 mM CaCO_3 -Lösung eingespült. Eine detaillierte Auflistung von Zeiträumen und Konzentrationen findet sich in der Tabelle 12. Die Lösungsaustausche erfolgten direkt während des Abbildens der Probenoberfläche. Der erste Austausch (blaues Dreieck in der Abb. 81) fand nur fünf Minuten nach der Aufnahme der Bilder (A) statt. Daher befand sich das

Probestück über etwa 245 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betrug nach dem Austausch 1,9 mM.

Nach jeweils einer Zeitspanne von etwa 70 Minuten wurden die drei weiteren Lösungsaustausche durchgeführt (rotes, grünes und schwarzes Dreieck in der Abb. 81). Damit wurden die folgenden Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale verwendet: 0,9 mM bei den Bildern (A), 1,9 mM bei den Bildern (B), 2,6 mM bei den Bildern (C), 3,1 mM bei den Bildern (D) und 3,4 mM bei den Bildern (E) bis (H). Die Zeitspannen zwischen den Bildern (A) bis (D) betragen jeweils 67 Minuten bis 73 Minuten. Die einzelnen zwischen den Aufnahmen der gezeigten Bilder (E) bis (H) vergangenen Zeiträume wurden für die Darstellung deutlich kürzer gewählt, da die Konzentration der CaCO_3 -Lösung bereits 3,4 mM betrug und somit die Höhen der Kristalle wesentlich schneller zunahmten als bei den Bildern (A) bis (D), und liegen im Bereich von 19 Minuten bis 28 Minuten. Die Probenoberfläche wurde somit über 70 Minuten in der 1,9 mM CaCO_3 -Lösung, über 73 Minuten in der 2,6 mM CaCO_3 -Lösung und über 70 Minuten in der 3,1 mM CaCO_3 -Lösung abgebildet.

Konzentration der CaCO_3 -Lösung	Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
0,9 mM	245 Minuten	(A)
1,9 mM	70 Minuten	(B)
2,6 mM	73 Minuten	(C)
3,1 mM	70 Minuten	(D)
3,4 mM	122 Minuten	(E) bis (H)

Tabelle 12: Verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung während des dritten in Abb. 81 dargestellten Wachstumsexperiments auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. Dort zeigen die Bilder (A) bis (H) die Probenoberfläche über einen Zeitraum von 310 Minuten. Das Probestück befand sich vor dem ersten Austausch bereits 245 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.

Nach der Aufnahme der Bilder (H) wurde die Petrischale mit fixierter Probe aus dem AFM ausgebaut, die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entnommen, die Probe mit Reinstwasser abgespült, restliche in der Petrischale vorhandene Flüssigkeit entfernt und die Probe 14 Tage im Kühlraum bei 6 °C getrocknet [4]. Bis zum Abspülen befand sich die Probe damit über eine Zeitspanne von 122 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung. Das Abbilden der Probenoberfläche in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung erfolgte somit über 92 Minuten. Zum besseren Vergleich der verschiedenen durchgeführten Wachstumsexperimente zeigt die **Abbildung 80** wieder einen Zeitstrahl, der den genauen Verlauf des Wachstumsexperiments darstellt. Dort sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in

der Petrischale, die Zeitpunkte der Lösungsaustausche, die Zeitpunkte der Aufnahmen der einzelnen ausgewählten Bilder und die zwischen diesen Bildaufnahmen verstrichenen Zeitspannen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben.

Bei diesem Wachstumsexperiment gelang es, denselben Probenbereich ohne merkliche Verschiebung stabil über die gesamten 310 Minuten abzubilden. Wie schon beim zweiten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche beobachtet, fand das Wachstum hier ebenfalls vor allem im näheren Bereich um die Kante des Aragonitplättchens (rote Pfeile in der Abb. 81) und um das in der Plättchenoberfläche ursprünglich vorhandene Loch (grüne Pfeile in der Abb. 81) statt. Darüber hinaus erfolgte Kristallwachstum auch auf der Plättchenoberfläche zwischen Loch und Plättchenkante (weiße Pfeile in der Abb. 81).

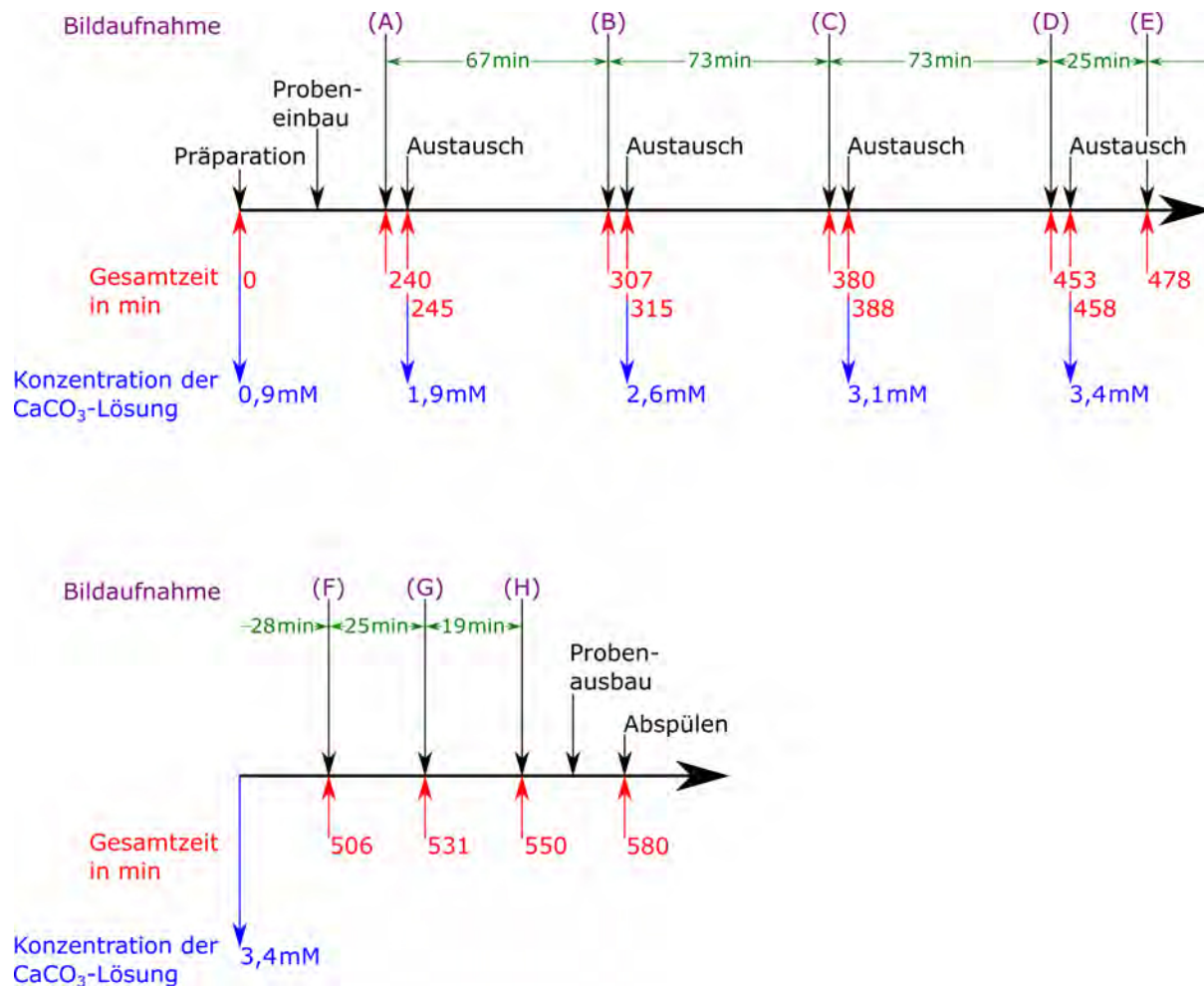


Abbildung 80: Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim dritten in Abb. 81 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer frisch präparierten Perlmutterpaltfläche. Angegeben sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die Zeiträume zwischen den Bildaufnahmen, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Lösungsaustausche sowie die Gesamtlaufzeit des Wachstumsexperiments.

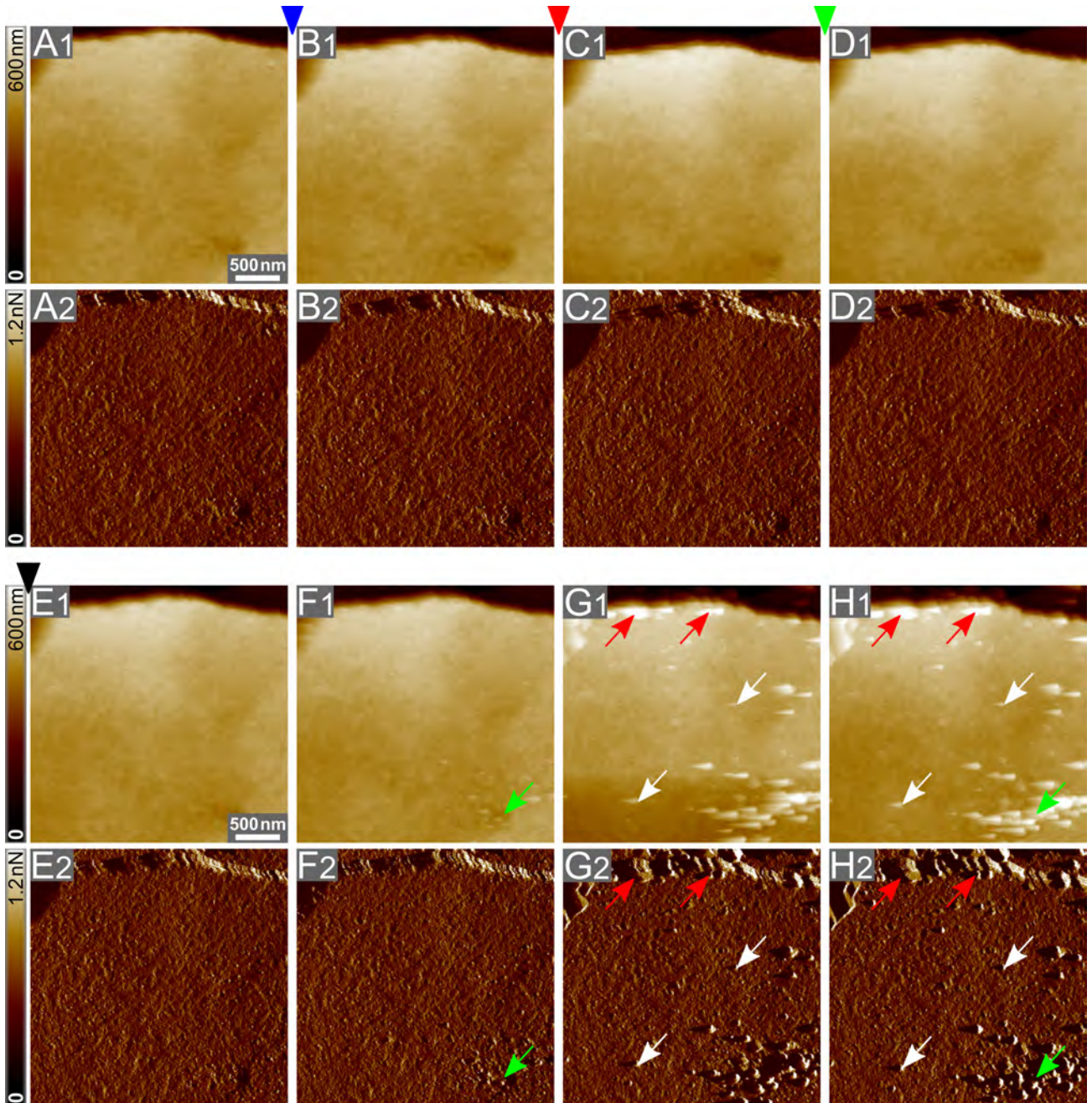


Abbildung 81: Drittes Wachstumsexperiment: AFM-Beobachtung des induzierten Kristallwachstums auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, deren Oberflächenstruktur in Abb. 59 charakterisiert wurde. Die ausgewählten Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $2,9\ \mu\text{m} \cdot 2,9\ \mu\text{m}$ stellen denselben Probenbereich über 310 Minuten dar. Bilder mit Index 1 (jeweils oben) zeigen die Höhsensignale und Bilder mit Index 2 (jeweils unten) die Fehlersignale. Bei (A) befand sich die Probe in 3 ml einer $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung. Die verschiedenfarbigen Dreiecke kennzeichnen die Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Dabei wurden jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und 1 ml einer übersättigten $4\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung eingespült. Damit ergaben sich folgende Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) $2,6\ \text{mM}$, (D) $3,1\ \text{mM}$ und (E) bis (H) $3,4\ \text{mM}$. Die Zeiträume zwischen den Bildern betragen: (A) bis (D) jeweils 67 min bis 73 min und (D) bis (H) jeweils 19 min bis 28 min (siehe Abb. 80). Die Pfeile markieren beispielhaft CaCO_3 -Kristalle, die an verschiedenen Stellen auf der Plättchenoberfläche (Kante, Vertiefung bzw. Loch, Bereich zwischen Kante und Loch) gewachsen sind.

5.4.3.2 Dreidimensionale Rekonstruktionen der Höhenbilder

Die **Abbildung 82** zeigt die dreidimensionalen Rekonstruktionen der in **Abbildung 81** dargestellten Höhengsignale (Bilder mit Index 1 und der Scanfläche von jeweils $2,9\ \mu\text{m} \cdot 2,9\ \mu\text{m}$). Da erst ab dem Bild (F1) das Wachstum von Kristallen auf der Probenoberfläche deutlich sichtbar ist, wurden hier nun die 3D-Rekonstruktionen der Höhenbilder (E1) bis (H1) dargestellt. Die Zeiträume zwischen den gezeigten dreidimensionalen Rekonstruktionen (E) bis (F), (F) bis (G) und (G) bis (H) betragen demnach 28 Minuten, 25 Minuten und 19 Minuten. Die Höhe wurde bei allen 3D-Rekonstruktionen jeweils genauso skaliert wie in den Höhenbildern der **Abbildung 81**.

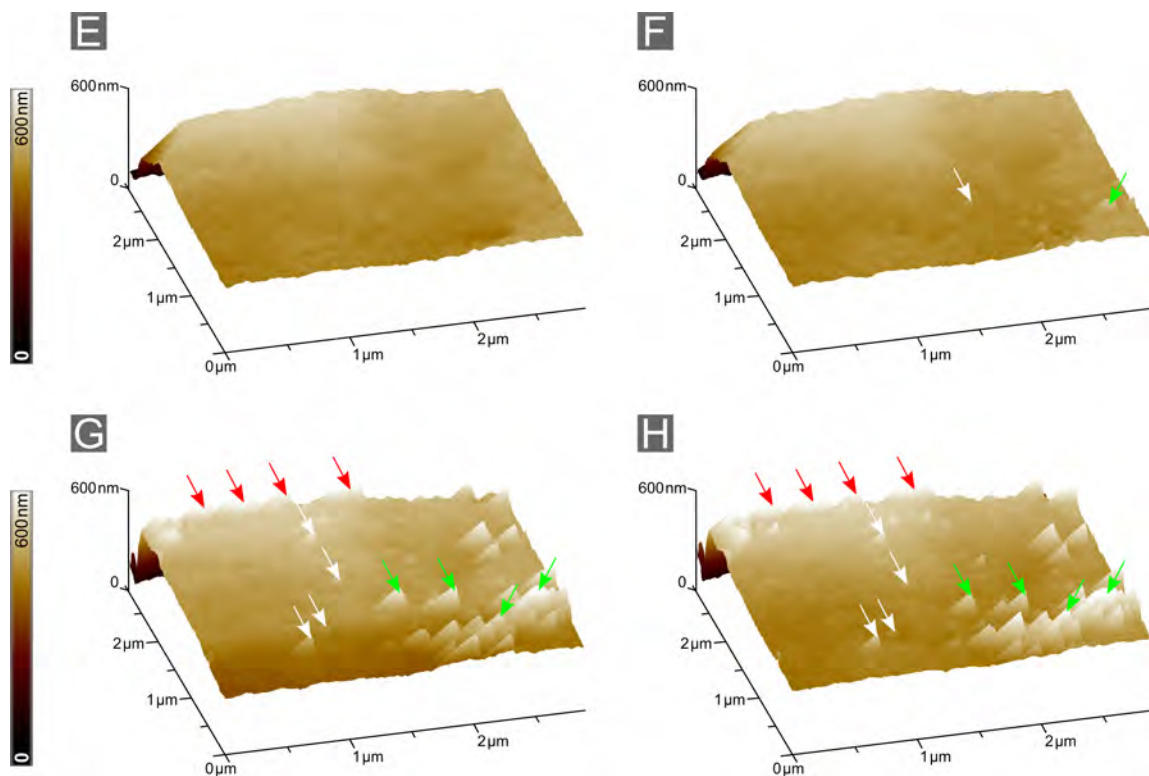


Abbildung 82: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in **Abb. 81** dargestellten Höhengsignale (Bilder mit Index 1 und Scanfläche von jeweils $2,9\ \mu\text{m} \cdot 2,9\ \mu\text{m}$). Dabei wurden die 3D-Rekonstruktionen der Höhenbilder (E1) bis (H1) dargestellt. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betrug von (E) bis (H) $3,4\ \text{mM}$. Auf der Probenoberfläche fand das Wachstum vieler CaCO_3 -Kristalle statt. Dabei sind diese Kristalle an verschiedenen Stellen auf dem Aragonitplättchen, insbesondere an der Plättchenkante (rote Pfeile) und im Bereich um das Loch bzw. die Vertiefung in der Plättchenoberfläche (grüne Pfeile), gewachsen. Auch im Bereich zwischen der Plättchenoberfläche und dem Loch erfolgte das Wachstum einiger Kristalle (weiße Pfeile). Die verschiedenfarbigen Pfeile markieren beispielhaft Kristalle, deren Höhen im Verlauf der Bilder (E) bis (H) deutlich zunahmten.

In den dreidimensionalen Rekonstruktionen ist noch viel besser erkennbar, dass auf der Oberfläche des betrachteten Aragonitplättchens das Wachstum von mehreren Calciumcarbonatkristallen erfolgte. Bei Betrachtung der Bilder (E) bis (H) fällt auf, dass ab dem Bild (F) zunächst einige kleinere Calciumcarbonatkristalle im Bereich um das in der Plättchenoberfläche auftretende Loch gewachsen sind. Der grüne Pfeil markiert dort beispielhaft einen solchen Kristall. Als die Aufnahme des Bildes (F) erfolgte, befand sich die Perlmutterpaltfläche schon 48 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung. Im weiteren Verlauf des Wachstumsexperiments in den Bildern (G) und (H) sind in diesem Bereich sehr viele weitere Kristalle gewachsen. Ab dem Bild (G) fand auch an der Kante des Aragonitplättchens das Wachstum mehrerer Calciumcarbonatkristalle statt (rote Pfeile).

Das Wachstum der Kristalle, die an der Plättchenkante und um das Loch bzw. die Vertiefung herum entstanden sind, erfolgte anscheinend mit etwa den gleichen Geschwindigkeiten, da die Höhenänderungen dieser Kristalle in demselben Zeitraum etwa gleich groß sind. Die auf der Plättchenoberfläche zwischen Randbereich und Loch gewachsenen Kristalle (weiße Pfeile) weisen im Gegensatz dazu am Ende des Wachstumsexperiments (Bild (H)) geringere Höhen auf. Somit sollten die im nachfolgenden Abschnitt berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten dieser Kristalle geringer sein als die Wachstumsgeschwindigkeiten der an der Plättchenkante und im Bereich um das Loch entstandenen Kristalle.

5.4.3.3 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten

Wie bereits bei dem zweiten Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche und den zwei zuvor beschriebenen Wachstumsexperimenten auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen erfolgte auch hier die Berechnung der Geschwindigkeiten, mit der die Höhen der verschiedenen auf der Plättchenoberfläche entstandenen Calciumcarbonatkristalle in definierten Zeitspannen zunahm. Die Wachstumsgeschwindigkeiten wurden für 20 Kristalle in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung über einen Zeitraum von 85 Minuten ermittelt. Dafür fanden ein Höhenbild, dessen Aufnahme nur sieben Minuten nach dem vierten Lösungsaustausch (458. Minute) erfolgte, und das Höhenbild (H1, 550. Minute) aus der Abbildung 81 Verwendung. In den anderen Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale (1,9 mM, 2,6 mM und 3,1 mM) konnte kein Kristallwachstum auf der Oberfläche des mit dem AFM abgebildeten Aragonitplättchens beobachtet werden. Die verschiedenfarbigen Pfeile in der **Abbildung 83** markieren die zu vermessenden Kristalle, die dort zusätzlich fortlaufend mit (1) bis (20) nummeriert wurden. Dabei kennzeichnen die roten Pfeile an der Plättchenkante gewachsene Kristalle und die grünen Pfeile im Bereich um das in der Plättchenoberfläche ursprünglich vorhandene Loch entstandene Kristalle. Die weißen Pfeile markieren Kristalle, deren Wachstum auf der Oberfläche des Aragonitplättchens zwischen

Plättchenkante und Loch bzw. Vertiefung stattfand.

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte, wie zuvor in den Abschnitten 5.2.2.3 und 5.4.1.4 genau beschrieben, zunächst jeweils die Ermittlung der Höhenänderung $\Delta h = \Delta h_2 - \Delta h_1$ eines Calciumcarbonatkristalls in einem definierten Zeitraum Δt mit Hilfe von zwei Höhenprofilen. Die Höhenprofile wurden dabei aus zwei, im Zeitabstand von Δt aufgenommenen, Höhenbildern ermittelt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten v der Kristalle gemäß der Formel $v = \frac{\Delta h}{\Delta t}$. Die Fehler der ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten wurden ebenfalls entsprechend der in Abschnitten 5.2.2.3 und 5.4.1.4 detailliert beschriebenen Methode berechnet. Dabei ergaben sich die relativen Fehler der Wachstumsgeschwindigkeiten jeweils aus Addition der relativen Fehler der Höhenänderung Δh und der Zeitspanne Δt . Die einzelnen Höhendifferenzen Δh_1 und Δh_2 konnten hier jeweils nur mit einer Genauigkeit von ± 10 nm aus den Höhenprofilen abgelesen werden, da es schwer war, genau dieselben Stellen auf der Probenoberfläche in den nach unterschiedlichen Zeiträumen aufgezeichneten Höhenbildern wiederzufinden. Aufgrund der anschließenden Differenzbildung ergab sich für die Höhenänderungen ein Fehler von ± 20 nm. Für die Zeitdifferenz Δt zwischen den Bildaufnahmen wurde wieder ein Fehler von ± 2 min bzw. von ± 120 s angenommen.

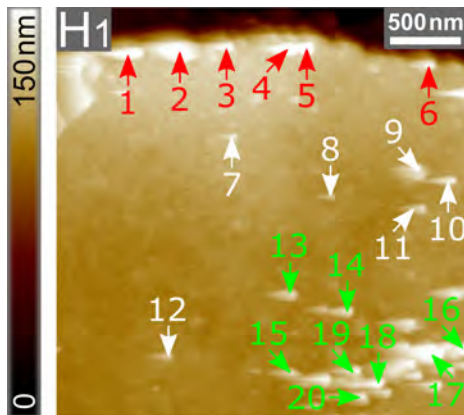


Abbildung 83: Zur Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten ausgewählte CaCO_3 -Kristalle. Gezeigt ist das AFM-Höhenbild (H1) aus Abb. 81. Die einzelnen, zu vermessenden Kristalle sind mit verschiedenfarbigen Pfeilen gekennzeichnet und mit (1) bis (20) nummeriert. Die zu den Kristallen ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten finden sich in Tabelle 13.

Die berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten der betrachteten Calciumcarbonatkristalle in der Einheit $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ finden sich in der Tabelle 13. Die Tabelle 22 im Anhang in Abschnitt 10.5 zeigt die ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten zusätzlich in der Einheit $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$. Die Wachstumsgeschwindigkeiten sind dort in den gleichen Farben, mit denen die Kennzeichnung der Kristalle in der Abbildung 83 erfolgte, hervorgehoben. Wie aus der Tabelle 13 ersichtlich und in der Abbildung 81 beobachtbar ist, erfolgte das Wachstum von den meisten der nah an der Plättchenkante entstandenen Kristalle (rote Pfeile) und von vielen der im Bereich um das in der Plättchenoberfläche ursprünglich vorhandene Loch entstandenen Kristalle (grüne Pfeile) im betrachteten Zeitraum von 85 Minuten zwischen

dem vierten Lösungsaustausch bis zum Höhenbild (H1) schneller als das Wachstum der Kristalle auf der restlichen in den Bildern sichtbaren Plättchenoberfläche. Dabei sind im Bereich um das Loch bzw. die Vertiefung in der Plättchenoberfläche auch wesentlich mehr Kristalle gewachsen als auf der Plättchenoberfläche zwischen Randbereich und Loch.

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 85 min (kurz nach dem vierten Austausch bis zum Bild (H1))
Calciumcar- bonatkristall	(1)	2,6 ± 0,3
	(2)	2,7 ± 0,3
	(3)	1,8 ± 0,2
	(4)	2,5 ± 0,3
	(5)	2,5 ± 0,3
	(6)	2,5 ± 0,3
	(7)	1,0 ± 0,2
	(8)	1,0 ± 0,2
	(9)	1,8 ± 0,2
	(10)	1,9 ± 0,2
	(11)	1,5 ± 0,2
	(12)	1,5 ± 0,2
	(13)	2,0 ± 0,2
	(14)	2,1 ± 0,3
	(15)	2,1 ± 0,3
	(16)	2,8 ± 0,3
	(17)	3,7 ± 0,3
	(18)	2,8 ± 0,3
	(19)	2,4 ± 0,3
	(20)	2,6 ± 0,3

Tabelle 13: Aus den AFM-Höhenbildern der Abb. 81 berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten in $10^{-2} \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ von 20 verschiedenen CaCO_3 -Kristallen in der verwendeten Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale von 3,4 mM. Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte erst ab dem Bild (E1), da von den Bildern (A1) bis (D1) kein Kristallwachstum auf der Probenoberfläche beobachtbar ist.

5.4.3.4 Ergänzende Charakterisierung der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment mittels REM

Die Vorbereitung der Perlmutterpaltfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment für die anschließende REM-Untersuchung fand ebenfalls gemäß der in Abschnitt 4.5 geschilderten Prozedur statt. Nach dem AFM-Wachstumsexperiment wurde die Petrischale mit Probe

aus dem AFM ausgebaut, die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt, die Probe mit Reinstwasser abgespült, restliche in der Petrischale vorhandene Flüssigkeit entfernt und die Probe 14 Tage im Kühlraum bei 6°C getrocknet [4]. Nach der Trocknung der Probe erfolgte das Entfernen des Petrischalenrandes und anschließend die Fixierung des übriggebliebenen Petrischalenbodens mit aufgeklebter Probe auf einem Probensteller²⁵² mit Hilfe eines Haftaufklebers²⁵³. Der Petrischalenboden wurde danach zusätzlich mit leitfähigem, kupferbeschichtetem Klebeband²⁵⁴ kontaktiert. Für diese REM-Untersuchung wurde die Probe ebenfalls nicht leitfähig beschichtet [4].

Die **Abbildung 84** zeigt REM-Aufnahmen der Perlmutterpaltfläche, die zuvor bereits über einen Zeitraum von insgesamt 451 Minuten mit dem AFM (Strukturuntersuchung und Wachstumsexperiment) abgebildet wurde. Hier sind mehrere ausgewählte Oberflächenbereiche mit unterschiedlichen Scanflächen von $28\ \mu\text{m} \cdot 38\ \mu\text{m}$ beim Bild (A), von $12\ \mu\text{m} \cdot 16\ \mu\text{m}$ beim Bild (B), von $6\ \mu\text{m} \cdot 7\ \mu\text{m}$ beim Bild (C), von $15\ \mu\text{m} \cdot 20\ \mu\text{m}$ beim Bild (D), von $6\ \mu\text{m} \cdot 8\ \mu\text{m}$ beim Bild (E) und von $16\ \mu\text{m} \cdot 21\ \mu\text{m}$ beim Bild (F) gezeigt. Alle Bilder wurden mit dem SE2-Detektor²⁵⁵ aufgenommen, wobei eine Beschleunigungsspannung von $1,25\ \text{kV}$, ein Aperturbblendendurchmesser von $30\ \mu\text{m}$ sowie Neigungswinkel des Probenstisches von $26,5^\circ$ beim Bild (A) und von $28,7^\circ$ bei den Bildern (B) bis (F) Verwendung fanden [4].

In allen Bildern sind deutlichst die einzelnen polygonal geformten Aragonitplättchen, welche die übereinanderliegenden Schichten mit jeweils einer Höhe von etwa $500\ \text{nm}$ bilden, sowie deren versetzte Anordnung („brick and mortar“-Struktur) zu erkennen [4, 5]. Das Bild (A) zeigt viele dieser übereinander angeordneten Aragonitschichten. Bereits im Bild (B) ist beobachtbar, dass insbesondere jeweils in der Mitte der einzelnen Aragonitplättchen viele Calciumcarbonatkristalle mit einer hohen Oberflächendichte auftreten. Das Bild (C) zeigt den im Bild (B) grün markierten Bereich in einer höheren Vergrößerung. Dort ist noch besser zu sehen, dass die Kristalle, wie in den entsprechenden AFM-Aufnahmen bereits beobachtet, verstärkt in den Plättchenmitten und an den Rändern bzw. Kanten der einzelnen Aragonitplättchen sowie in den Spalten zwischen den Plättchen gewachsen sind. Zur Veranschaulichung markieren die roten Pfeile im Bild (C) einige an den Kanten nebeneinanderliegender Aragonitplättchen gewachsene Kristalle und der blaue Pfeil die in der Mitte auf einem der Aragonitplättchen entstandene Kristalle. Zur besseren Sichtbarkeit sind zusätzlich die Plättchenkanten der nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen in der unteren Schicht gelb nachgezeichnet. Dort sind jeweils zwischen dem Randbereich eines Aragonitplättchens und der Plättchenmitte nur wenige Kristalle vorhanden. Die Bilder (D)

²⁵²32 mm Durchmesser, rund; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁵³25 mm Durchmesser, elektrisch leitfähig; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁵⁴6,4 mm Breite, einseitig klebend; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁵⁵siehe Abschnitt 3.2

bis (F) zeigen weitere unterschiedliche Probenbereiche dieser Perlmutterpaltfläche. Dabei ist der im Bild (D) rot hervorgehobene Bereich im Bild (E) vergrößert dargestellt. In den Bildern (D) bis (F) sind ebenfalls viele Kristalle jeweils mit einer hohen Oberflächendichte in der Mitte der Aragonitplättchen gewachsen (blaue Pfeile). Die Oberflächendichten der Calciumcarbonatkristalle in den Plättchenmitten konnten hier allerdings nicht ermittelt werden, da die Auflösung der REM-Aufnahmen für eine Auszählung der einzelnen Kristalle nicht ausreichte.

Die Calciumcarbonatkristalle sind hier wieder, wie bereits beim zweiten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche (siehe Abb. 72 bis 79) beobachtet, hauptsächlich an den zuvor vermuteten Stellen – Kanten bzw. Ränder und Mitten – auf den Aragonitplättchen gewachsen.

In diesem Wachstumsexperiment konnte ebenfalls das induzierte Wachstum von nadel-förmigen Calciumcarbonatkristallen auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche direkt mit dem AFM beobachtet werden (siehe Abb. 81). Ebenso gelang es, die Wachstumsgeschwindigkeiten dieser Calciumcarbonatkristalle (siehe Tab. 13) zu ermitteln und die auf den Aragonitplättchen induziert gewachsenen Kristalle nach dem AFM-Wachstumsexperiment mit dem REM (siehe Abb. 84) zu charakterisieren. Wie bereits beim zweiten, auf einer Perlmutterpaltfläche durchgeführten Wachstumsexperiment beobachtet, erfolgte das Wachstum der Calciumcarbonatkristalle hier wieder insbesondere in den Plättchenmitten und an bzw. in der Nähe der Plättchenkanten sowie nur vereinzelt zwischen Plättchenmitte und Randbereich der Aragonitplättchen. Dabei sind die Kristalle in der Mitte und am Rand des betrachteten Aragonitplättchens während des AFM-Wachstumsexperiments mit höheren Geschwindigkeiten gewachsen als die anderen Kristalle.

Wie bereits beim zweiten Wachstumsexperiment diskutiert, sind vermutlich verschiedene Makromoleküle – Carboxyl- und Sulfatgruppen sowie aragonitnukleierende Proteine – in der organischen Matrix für das verstärkte Wachstum der Calciumcarbonatkristalle in den Plättchenmitten und an den bzw. in der Nähe der Plättchenkanten verantwortlich [5, 6]. Die Beobachtung, dass viele Calciumcarbonatkristalle in der Mitte der Aragonitplättchen, vermutlich durch die dort vorhandenen Löcher, gewachsen sind, unterstützt auch das Modell des Aragonitwachstums über Mineralbrücken. Mineralbrücken sind kristalline Verbindungen mit einem Durchmesser von etwa 30 nm und einer Höhe²⁵⁶ von etwa 30 nm bis 50 nm, die sich in vertikaler Richtung zwischen zwei übereinanderliegenden Aragonitplättchen ausbilden können [14, 18]. Diese Mineralbrücken geben beim Wachstum des Aragonits die Kristallorientierung an das neu entstehende, darüberliegende Aragonitplättchen weiter [5, 14].

²⁵⁶Die Höhe der Mineralbrücken entspricht der Schichtdicke der interlamellaren Matrix [1, 18].

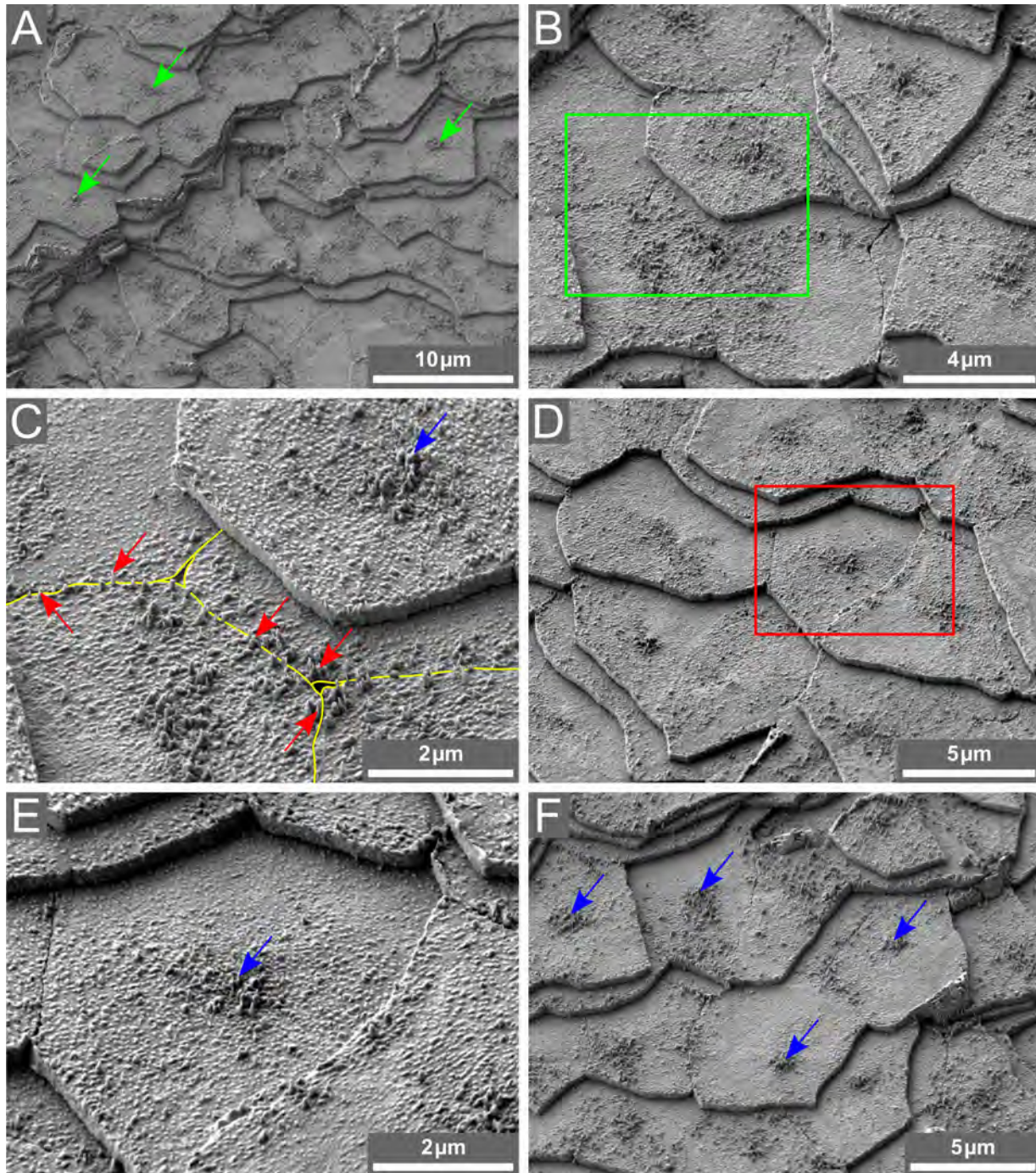


Abbildung 84: REM-Aufnahmen unterschiedlicher, ausgewählter Bereiche der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment (siehe Abb. 81). Scanflächen: (A) $28\ \mu\text{m} \cdot 38\ \mu\text{m}$, (B) $12\ \mu\text{m} \cdot 16\ \mu\text{m}$, (C) $6\ \mu\text{m} \cdot 7\ \mu\text{m}$, (D) $15\ \mu\text{m} \cdot 20\ \mu\text{m}$, (E) $6\ \mu\text{m} \cdot 8\ \mu\text{m}$ und (F) $16\ \mu\text{m} \cdot 21\ \mu\text{m}$; Neigungswinkel des Probenstisches: (A) $26,5^\circ$ und (B) bis (F) $28,7^\circ$. Der grün markierte Bereich aus (B) ist in (C) und der rot hervorgehobene Bereich aus (D) ist in (E) entsprechend vergrößert dargestellt. Auf den Oberflächen der einzelnen Aragonitplättchen sind die nadelförmigen CaCO_3 -Kristalle jeweils verstärkt in der Mitte (grüne Pfeile in (A) und blaue Pfeile in (C), (E) und (F)) und in der Nähe des Randes bzw. der Kante (rote Pfeile in (C)) gewachsen. Die gut sichtbaren Ränder bzw. Kanten einiger Aragonitplättchen sind in (C) zusätzlich gelb hervorgehoben.

5.4.4 Weitere Wachstumsexperimente auf Perlmutterpaltflächen

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse drei weiterer Wachstumsexperimente auf verschiedenen frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen zusammengefasst. Die Präparationen der Probestücke fanden ebenfalls gemäß der in Abschnitt 4.2.3 detailliert beschriebenen Präparationsprozedur statt. Dazu wurde jeweils die Perlmutterpaltfläche durch Hammerschläge aus einer Schneckenschale erzeugt, während der Präparationsprozedur mit einem Tröpfchen einer 0,9 mM oder 1 mM CaCO_3 -Lösung befeuchtet, mittels Zweikomponentenkleber in einer Petrischale mit Durchmesser von 35 mm fixiert und nach dem Aufkleben erneut mit der 0,9 mM bzw. 1 mM CaCO_3 -Lösung benetzt sowie nach Abbinden des Zweikomponentenklebers ein Volumen von 3 ml der für die Befeuchtung der Probenoberfläche verwendeten CaCO_3 -Lösung in die Petrischale hinzugefügt [4]. Die Größe der für diese AFM-Wachstumsexperimente genutzten Probestücke betrug jeweils etwa $3 \text{ mm} \cdot 3 \text{ mm}$. Vor dem Probeneinbau erfolgte, wie bei allen zuvor beschriebenen AFM-Untersuchungen (Strukturuntersuchungen und Wachstumsexperimente), immer die Kalibrierung der AFM-Sonde. Während der AFM-Experimente wurde das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen auf den jeweiligen Probenoberflächen wieder durch das Einspülen höher übersättigter CaCO_3 -Lösungen verschiedener Konzentrationen initiiert.

Viertes Wachstumsexperiment - Wachstum an den Plättchenkanten und in den Spalten zwischen den Aragonitplättchen

Die **Abbildungen 85 und 86** zeigen zum Vergleich AFM-Aufnahmen desselben Probenbereichs einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche vor und nach der Initiierung des Kristallwachstums durch mehrfaches Einspülen einer höher übersättigten CaCO_3 -Lösung. Während des gesamten Wachstumsexperiments erfolgte die kontinuierliche Aufnahme von Kraftkarten²⁵⁷ des untersuchten Probenbereichs, um Informationen über die Bedeckung der Aragonitplättchen mit organischer Matrix zu erhalten. Zeitgleich mit der Aufnahme einer Kraftkarte wurde hier nur das Höhenbild des Probenbereichs mit der niedrigen Auflösung von 64×64 Pixel aufgezeichnet. Die Aufnahmen der Höhenbilder und der Kraftkarten erfolgten mit einer PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonde über einen Gesamtzeitraum von 346 Minuten. Aus den Kraftkarten konnten allerdings kaum aussagekräftigen Daten bzw. Informationen gewonnen werden. Somit gelang die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften dieser Perlmutterpaltfläche nicht. Auch in weiteren AFM-Untersuchungen stellte sich heraus, dass die PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden nicht für die Aufnahmen von Kraftkarten auf den Perlmutterpaltflächen geeignet sind. Die Abbildungen 85 und 86

²⁵⁷englisch: force maps; Erklärung siehe Abschnitt 3.1

zeigen daher jeweils nur die aufgenommenen Höhensignale des untersuchten Probenbereichs mit der Auflösung von 64×64 Pixel vor und nach dem Kristallwachstum. Alle Bilder wurden mit einer abbildenden Kraft von 200 pN und einer Abtastrate von $0,697 \text{ Hz}$ aufgenommen.

Während der gesamten Präparationsprozedur der Perlmutterpaltfläche und zum Abbilden der Probenoberfläche am Anfang des Wachstumsexperiments wurde eine 1 mM CaCO_3 -Lösung verwendet. Die vor Probeneinbau durchgeführte „touch“-Kalibrierung der AFM-Sonde ergab eine Deflektionssensitivität von $(11,6 \pm 1,1) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und eine Federkonstante von $0,14 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Diese Kalibrierung erfolgte wieder auf dem Boden einer weiteren Petrischale, in der sich nur 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung und keine Probe befanden.

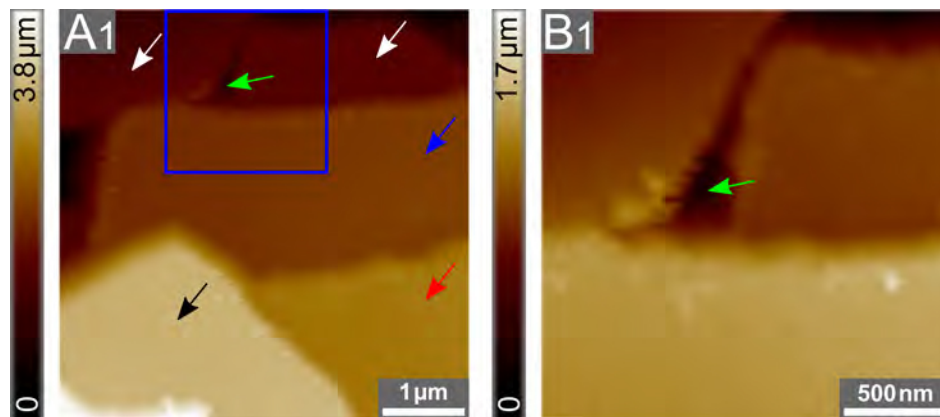


Abbildung 85: AFM-Aufnahmen der Oberfläche einer frisch präparierten Perlmutterpaltfläche in 3 ml einer 1 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ und (B) $2,0 \mu\text{m} \cdot 2,0 \mu\text{m}$. Hier sind nur die Höhensignale (Bilder mit Index 1) dargestellt. Die Aufnahmen dieser Höhenbilder erfolgten nur mit der geringen Auflösung von 64×64 Pixel. In (A) sind deutlich einzelne Aragonitplättchen (schwarzer, roter und blauer Pfeil sowie weiße Pfeile) sichtbar, die sich in vier übereinander angeordneten Schichten befinden. Zwischen den nebeneinanderliegenden, bereits teilweise zusammenstoßenden Aragonitplättchen (weiße Pfeile) in der untersten Schicht ist eine größere Lücke bzw. ein Spalt (grüner Pfeil) beobachtbar. (B) zeigt den in (A) blau markierten Bereich entsprechend vergrößert. Dort sind die Kanten der zwei unteren, mit weißen Pfeilen gekennzeichneten Aragonitplättchen und des darüberliegenden, mit blauem Pfeil markierten Plättchens sowie der Spalt (grüner Pfeil) zwischen den zwei unteren Aragonitplättchen deutlicher erkennbar. Der in (B) dargestellte Bereich der Probenoberfläche wurde für die Beobachtung des Kristallwachstums ausgewählt.

Die AFM-Aufnahmen in der **Abbildung 85** mit den zwei Scanflächen von $5,0 \mu\text{m} \cdot 5,0 \mu\text{m}$ beim Bild (A1) und von $2,0 \mu\text{m} \cdot 2,0 \mu\text{m}$ beim Bild (B1) zeigen nun die Oberfläche der frisch präparierten Perlmutterpaltfläche zu Beginn des Wachstumsexperiments in der 1 mM CaCO_3 -Lösung. Im Bild (A1) sind deutlich vier der typischen übereinan-

derliegenden Schichten erkennbar, die jeweils aus vielen einzelnen polygonalen und in horizontaler Richtung durch die intertabulare Matrix (ITM) voneinander getrennten Aragonitplättchen bestehen [4, 5]. Der schwarze, rote und blaue Pfeil sowie die weißen Pfeile markieren Aragonitplättchen, die in mehreren verschiedenen Schichten liegen. In der hier dargestellten untersten Schicht sind zwei Aragonitplättchen, die bereits teilweise zusammenstoßen, sichtbar (weiße Pfeile). Zwischen diesen beiden direkt nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen existiert jedoch auch eine größere Lücke bzw. ein Spalt (grüner Pfeil). Das Bild (B1) zeigt den im Bild (A1) blau hervorgehobenen Bereich, in dem sich der schon beobachtete Spalt befindet, entsprechend vergrößert. Dieser Probenbereich wurde für das Wachstumsexperiment ausgewählt, da dort sowohl die Kanten der zwei unteren Plättchen und des darüber angeordneten Aragonitplättchens als auch der Spalt zwischen den nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen in der unteren Schicht gut erkennbar sind. Zusätzlich sind die dreidimensionalen Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen) der hier dargestellten Höhengsignale (A1) und (B1) in der **Abbildung 106** im Anhang in Abschnitt 10.5 zu finden.

Das Abbilden des ausgewählten Probenbereichs erfolgte während des Wachstumsexperiments (Bilder (A) bis (C), siehe Abb. 85 und 86) über einen Zeitraum von 134 Minuten. Während dieser Zeitspanne wurden zweimal jeweils 1 ml einer übersättigten CaCO_3 -Lösung, die eine Konzentration von 4 mM aufwies, gegen 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale ausgetauscht. Vor dem ersten Lösungsaustausch befand sich das Probestück bereits 262 Minuten in 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung.

Konzentration der CaCO_3 -Lösung	Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
1,0 mM	262 Minuten	(A) bis (B)
2,0 mM	36 Minuten	-
2,7 mM	152 Minuten	(C)

Tabelle 14: Verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung während des in Abb. 85 und 86 gezeigten Wachstumsexperiments auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. Das Bild (B) zeigt den ausgewählten Probenbereich vor dem zweifachen Einspülen der 4 mM CaCO_3 -Lösung und das Bild (C) denselben Probenbereich nach Initiierung des Kristallwachstums. Die Probe befand sich vor dem ersten Austausch bereits 262 Minuten in der 1 mM CaCO_3 -Lösung.

Zum besseren Vergleich mit allen bereits durchgeführten Wachstumsexperimenten sind die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und die Zeiträume, in der sich die Probe in der jeweiligen Lösung befand, in der Tabelle 14 aufgelistet. Zusätzlich zeigt die **Abbildung 107** im Anhang in Abschnitt 10.5 wieder einen Zeitstrahl, der den de-

taillierten Ablauf dieses Wachstumsexperiments darstellt. Dort sind die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Lösungsaustausche, die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments sowie die Zeitabstände zwischen den Aufnahmen der gezeigten Bilder angegeben.

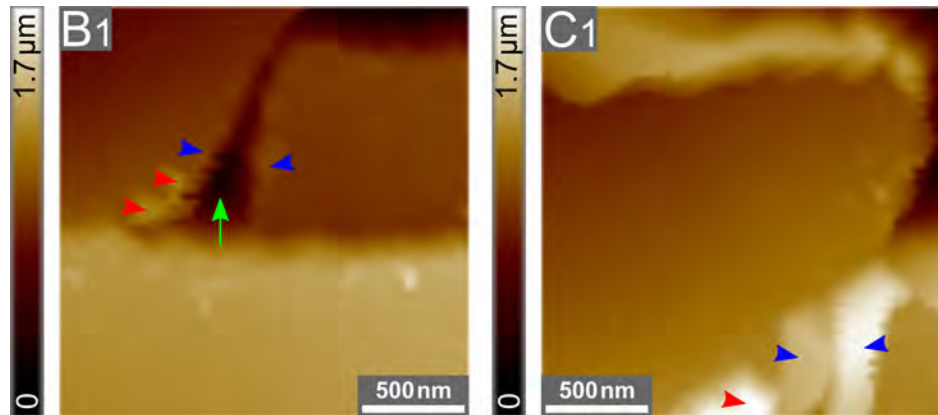


Abbildung 86: AFM-Aufnahmen des bereits im Bild (B1) der Abb. 85 gezeigten Probenbereichs der untersuchten Perlmutterpaltfläche vor und nach Initiierung des Kristallwachstums. Scanflächen: (B) $2,0\ \mu\text{m} \cdot 2,0\ \mu\text{m}$ und (C) $2,0\ \mu\text{m} \cdot 2,0\ \mu\text{m}$. Hier sind wieder nur die Höhsignale (Bilder mit Index 1) mit der Auflösung von 64×64 Pixel dargestellt. (B) und (C) zeigen nahezu denselben Probenbereich zu verschiedenen Zeitpunkten. (B) stellt die Probenoberfläche in 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung vor Initiierung des Kristallwachstums dar. Dort sind die Kanten der zwei unteren Plättchen und des darüberliegenden Plättchens sowie die Lücke bzw. der Spalt (grüner Pfeil) zwischen den in der unteren Schicht nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen deutlich erkennbar. (C) zeigt diesen Oberflächenbereich nach einem Zeitraum von 127 Minuten. Während dieser Zeitspanne wurden zweimal jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale gegen 1 ml einer höher übersättigten 4 mM CaCO_3 -Lösung ausgetauscht (Details siehe Abb. 107). Bis zur Aufnahme des Bildes (C) hat sich der abgebildete Probenbereich etwas verschoben. Das Calciumcarbonat ist insbesondere im Bereich des vor dem induzierten Kristallwachstum vorhandenen Spalts zwischen den unteren beiden Aragonitplättchen und an den Kanten der einzelnen Aragonitplättchen gewachsen (blaue und rote Dreiecke).

Die **Abbildung 86** zeigt nun den im Bild (B1) der Abbildung 85 dargestellten Probenbereich mit der Scanfläche von $2,0\ \mu\text{m} \cdot 2,0\ \mu\text{m}$ auf der linken Seite (Bild (B1)) nochmal in 3 ml der 1 mM CaCO_3 -Lösung und auf der rechten Seite (Bild (C1)) nach dem zweifachen Einspülen der übersättigten 4 mM CaCO_3 -Lösung. Um den Probenbereich vor und nach dem Kristallwachstum miteinander vergleichen zu können, wurde die Höhe bei beiden Bildern gleich skaliert. Bis zur Aufnahme des Bildes (C1) hat sich der abgebildete Probenbereich etwas verschoben, sodass dort nur noch die zwei in der unteren Schicht vorhandenen und direkt nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen erkennbar sind. Die

dreidimensionalen Rekonstruktionen der in Abbildung 86 dargestellten Höhengsignale sind zusätzlich in der **Abbildung 108** im Anhang in Abschnitt 10.5 gezeigt. Darüber hinaus wurde derselbe Probenbereich der Perlmutterpaltfläche nach der Aufnahme des Bildes (C1) nochmal mit der deutlich höheren Auflösung von 256 x 256 Pixel untersucht. **Die Abbildung 109**, die ebenfalls im Anhang in Abschnitt 10.5 zu finden ist, zeigt die AFM-Aufnahmen des untersuchten Probenbereichs mit der höheren Auflösung.

Das Wachstum des Calciumcarbonats erfolgte hier vor allem an den Plättchenkanten und in dem vor Einspülen der übersättigten CaCO_3 -Lösung vorhandenen Spalt zwischen den unteren beiden nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen. Vermutlich sind ebenfalls mehrere Calciumcarbonatkristalle auf den einzelnen Plättchenoberflächen gewachsen, jedoch reicht die Auflösung der aufgenommenen Bilder hier nicht aus, um diese Kristalle genauer zu erkennen.

Fünftes Wachstumsexperiment - Entstehung der Calciumcarbonatkristalle auf den Aragonitplättchen in gleicher lateraler Richtung

Die Durchführung eines weiteren Wachstumsexperiments erfolgte auf dem in den Bildern (A) der **Abbildung 87** gezeigten Probenbereich einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. Dort sind die Oberflächen von zwei Aragonitplättchen erkennbar, die – wie vom Perlmutteraufbau her zu erwarten – zueinander versetzt in zwei übereinanderliegenden Schichten angeordnet sind. Das Abbilden dieses Probenbereichs (Bilder (A)) erfolgte zunächst noch in den 3 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung, die nach der Probenpräparation in die Petrischale pipettiert wurden. Vor der Aufnahme der Bilder (A) wurde die Oberflächenstruktur der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche genauer untersucht. Für die Strukturuntersuchung und das Wachstumsexperiment wurde eine ScanAsyst-Air AFM-Sonde verwendet, deren vor Probeneinbau durchgeführte „touch“-Kalibrierung eine Deflektions sensitivität von $(35,0 \pm 2,6) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und eine Federkonstante von $0,30 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ lieferte.

Nachdem das Abbilden des in den Bildern (A) gezeigten Probenbereichs stabil über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten gelang, wurde die Auflösung und die Abtastrate so eingestellt, dass die Aufnahme des ausgewählten Probenbereichs etwa sechs Minuten dauerte. Somit konnten während dieses Wachstumsexperiments die aufeinanderfolgenden Bilder in einem Zeitabstand von jeweils sechs Minuten aufgenommen werden. Das Abbilden der Probenoberfläche erfolgte bei Verwendung einer Kraft von 700 pN, einer Abtastrate von 0,901 Hz und einer Auflösung von 256 x 256 Pixel. Die Untersuchung des Probestücks mit dem AFM (Strukturuntersuchung und Wachstumsexperiment) fand hier insgesamt über einen Zeitraum von 462 Minuten statt.

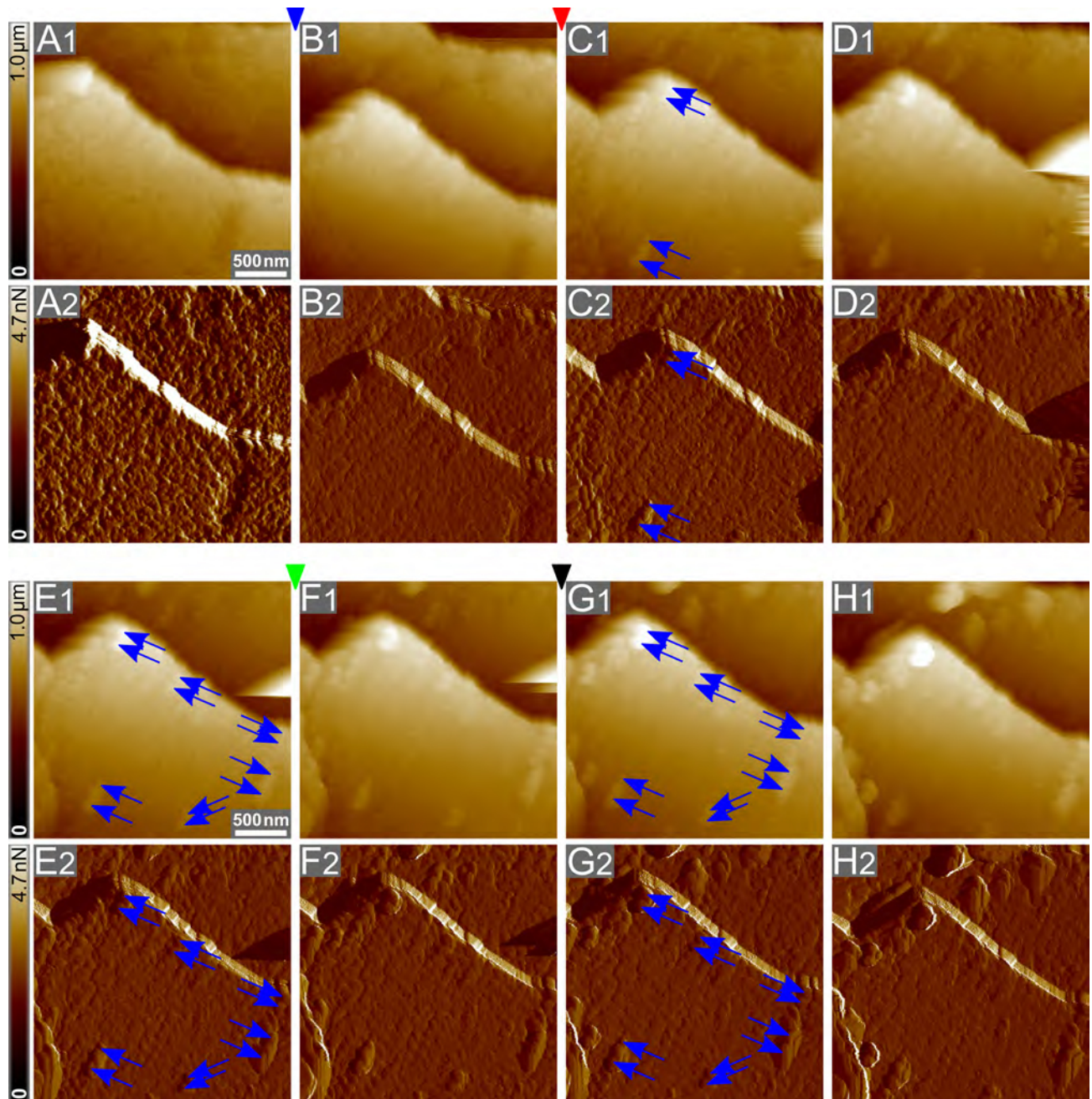


Abbildung 87: Fünftes Wachstumsexperiment: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz desselben Probenbereichs einer weiteren frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche mit der Scanfläche von jeweils $2,5\ \mu\text{m} \cdot 2,5\ \mu\text{m}$. Die Bilder (A) bis (H) stellen diesen Probenbereich über einen Zeitraum von 361 Minuten dar. Bilder mit Index 1 (jeweils oben) zeigen die Höhensignale und Bilder mit Index 2 (jeweils unten) die Fehlersignale. Bei (A) befand sich die Probe noch in 3 ml einer $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung. Die verschiedenfarbigen Dreiecke kennzeichnen die vier Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Dabei wurden 1 ml (blaues und rotes Dreieck) oder 0,5 ml (grünes und schwarzes Dreieck) der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und immer gegen das gleiche Volumen einer übersättigten $4\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung ausgetauscht. Damit ergaben sich folgende Konzentrationen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) bis (E) $2,6\ \text{mM}$, (F) $2,8\ \text{mM}$ und (G) bis (H) $3,0\ \text{mM}$. Die Zeiträume zwischen den Bildern betragen: (A) bis (C) jeweils 59 min bis 67 min und (C) bis (H) jeweils 41 min bis 51 min (siehe Abb. 111). Die blauen Pfeile markieren mehrere auf der Oberfläche des oberen Aragonitplättchens gewachsene CaCO_3 -Kristalle.

Die Abbildung 87 zeigt ausgewählte Bilder aus der mit dem AFM aufgenommenen Bildsequenz des untersuchten Probenbereichs. Jeweils oben (Bilder mit Index 1) sind die Höhengsignale und jeweils unten (Bilder mit Index 2) die Fehlersignale dargestellt. Die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von $2,5\ \mu\text{m} \cdot 2,5\ \mu\text{m}$ zeigen den Probenbereich über einen Gesamtzeitraum von 361 Minuten. Die Höhenskala wurde so gewählt, dass sowohl die Oberfläche des Aragonitplättchens in der oberen Schicht als auch das darunterliegende Aragonitplättchen gut sichtbar sind. Nach der Aufnahme der Bilder (A) wurden 1 ml der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entnommen und 1 ml der 4 mM CaCO_3 -Lösung eingespült. Nach einem Zeitraum von 67 Minuten wurde erneut 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale gegen 1 ml der 4 mM CaCO_3 -Lösung ausgetauscht. Während des weiteren Wachstumsexperiments wurden noch zwei weitere Lösungsaustausche nach unterschiedlichen Zeiträumen vorgenommen, bei denen jeweils die Entnahme von 0,5 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale und das Einspülen des gleichen Volumens der 4 mM CaCO_3 -Lösung erfolgten. Das blaue, rote, grüne und schwarze Dreieck kennzeichnen die vier Austausche der CaCO_3 -Lösungen. Die dreidimensionalen Rekonstruktionen der hier dargestellten Höhengsignale sind in der **Abbildung 110** im Anhang in Abschnitt 10.5 gezeigt.

Konzentration der CaCO_3 -Lösung	Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
0,9 mM	152 Minuten	(A)
1,9 mM	67 Minuten	(B)
2,6 mM	126 Minuten	(C) bis (E)
2,8 mM	69 Minuten	(F)
3,0 mM	87 Minuten	(G) bis (H)

Tabelle 15: Verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum des Probestücks in der jeweiligen Lösung während des in Abb. 87 gezeigten Wachstumsexperiments auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. Die Bilder (A) bis (H) zeigen denselben Probenbereich über einen Zeitraum von 361 Minuten. Die Probe befand sich vor dem ersten Austausch schon 152 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.

Der zeitliche Ablauf dieses Wachstumsexperiments ist in der **Abbildung 111** im Anhang in Abschnitt 10.5 dargestellt. Dieser Zeitstrahl zeigt, wie auch bei allen zuvor beschriebenen Wachstumsexperimenten, sowohl die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO_3 -Lösungen als auch die Gesamtlaufzeit des Wachstumsexperiments. Zusätzlich sind auch die zwischen den gezeigten Bildern vergangenen Zeiträume und die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale angegeben. Zur besseren Übersicht des hier gezeigten Wachstumsexperiments sind in der Tabelle 15 die Konzen-

trationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und auch die Zeitspannen, in der sich die Probe in der jeweiligen Lösung befand, zusammengefasst.

Auf den Oberflächen der Aragonitplättchen in der unteren und der oberen Schicht ist eindeutig das Wachstum von Calciumcarbonatkristallen erkennbar. Die blauen Pfeile markieren beispielhaft mehrere auf der Oberfläche des oberen Aragonitplättchens entstandene Kristalle. Auf diesem Aragonitplättchen sind mehrere Gruppen aus wenigen, lateral sehr dicht nebeneinander gewachsenen Calciumcarbonatkristallen beobachtbar. Jeweils zwei blaue Pfeile kennzeichnen eine solche Gruppe von Kristallen. Auffällig ist dabei auch, dass die einzelnen Kristalle jeweils „linienförmig“ in dieselbe laterale Richtung auf der Plättchenoberfläche orientiert sind. Auch auf dem unteren Aragonitplättchen erfolgte das Wachstum von Kristallen in direkter Nähe zueinander.

Sechstes Wachstumsexperiment - Beobachtung des Kristallwachstums bei Verwendung einer sehr kleinen Scanfläche von $1,0 \mu\text{m} \cdot 1,0 \mu\text{m}$

In dem nachfolgend beschriebenen Wachstumsexperiment erfolgte die Beobachtung des Kristallwachstums auf einem Probenbereich einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche, der im Gegensatz zu allen bereits gezeigten AFM-Experimenten nur eine Scanfläche von $1,0 \mu\text{m} \cdot 1,0 \mu\text{m}$ aufwies. Die frisch gespaltene Perlmutteroberfläche wurde für die AFM-Untersuchung (Strukturuntersuchung und Wachstumsexperiment) ebenfalls wie oben beschrieben präpariert und hatte, wie die anderen hier untersuchten Perlmutterspaltflächen, eine Größe von etwa $3 \text{ mm} \cdot 3 \text{ mm}$.

Bei der Präparationsprozedur zur Benetzung der Probenoberfläche und zum Abbilden am Anfang der AFM-Untersuchung fand eine $0,9 \text{ mM}$ CaCO_3 -Lösung Verwendung. Das Abbilden der Probenoberfläche während der AFM-Untersuchung erfolgte mit einer ScanAsyst-Air AFM-Sonde. Die „touch“-Kalibrierung dieser AFM-Sonde vor Probeneinbau auf dem Boden einer Petrischale mit nur 3 ml der $0,9 \text{ mM}$ CaCO_3 -Lösung ergab eine Deflektionssensitivität von $(26,3 \pm 3,5) \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ und eine Federkonstante von $0,43 \frac{\text{N}}{\text{m}}$.

Zuerst wurde die Oberflächenstruktur des Probenbereichs, auf dem die Beobachtung des Kristallwachstums erfolgen sollte, mit dem AFM untersucht. Die **Abbildung 88** zeigt die mit dem AFM aufgenommene Oberfläche des ausgewählten Probenbereichs der Perlmutterspaltfläche in sehr hoher Vergrößerung. Die Probenoberfläche ist dabei in den zwei Scanflächen von $2,0 \mu\text{m} \cdot 2,0 \mu\text{m}$ bei den Bildern (A) und von $1,0 \mu\text{m} \cdot 1,0 \mu\text{m}$ bei den Bildern (B) dargestellt. Das Abbilden erfolgte hier noch in der $0,9 \text{ mM}$ CaCO_3 -Lösung. Die Bilder mit dem Index 1 (links) zeigen wieder die Höhsignale und die Bilder mit dem Index 2 (rechts) die dazugehörigen Fehlersignale. Die Bilder (A) wurden mit einer Auflösung von 256×256 Pixel, einer Abtastrate von $0,401 \text{ Hz}$ und einer abbildenden Kraft

von 500 pN aufgezeichnet. Die Aufnahme der Bilder (B) erfolgte ebenfalls mit der Auflösung von 256 x 256 Pixel, jedoch mit einer etwas höheren Abtastrate von 0,598 Hz und einer kleineren abbildenden Kraft von 200 pN.

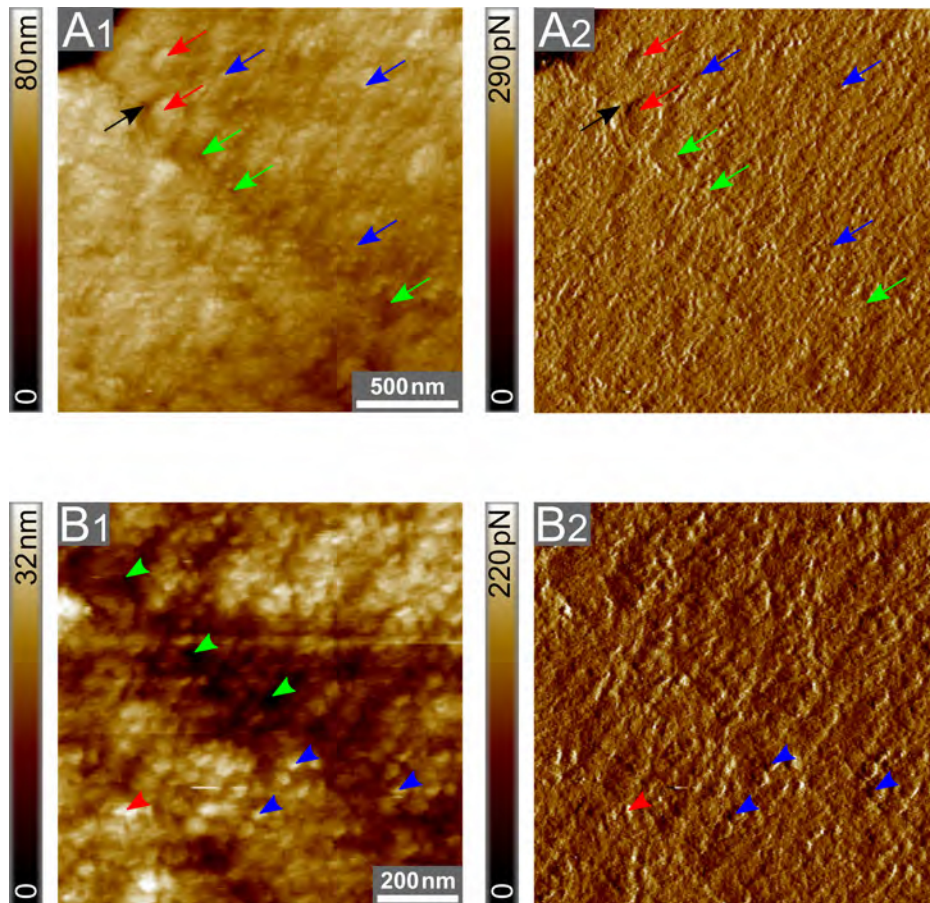


Abbildung 88: AFM-Aufnahmen der Oberfläche einer weiteren frisch präparierten Perlmutterpaltfläche in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Scanflächen: (A) $2,0 \mu\text{m} \cdot 2,0 \mu\text{m}$ und (B) $1,0 \mu\text{m} \cdot 1,0 \mu\text{m}$. Bilder mit Index 1 (jeweils links) zeigen die Höhensignale und Bilder mit Index 2 (jeweils rechts) die Fehlersignale. In (A) ist die Oberfläche eines einzelnen Aragonitplättchens detailliert beobachtbar. Auf der Plättchenoberfläche existieren bereits viele natürlich entstandene Strukturen unterschiedlicher Größen (rote und blaue Pfeile) - vermutlich „nanoasperities“ und/oder kleine nadelförmige Aragonitkristalle - sowie Poren bzw. Löcher unterschiedlichen Durchmessers (grüne und schwarze Pfeile) [4]. (B) zeigt einen kleinen Teil dieser Plättchenoberfläche in sehr hoher Vergrößerung. Dort sind die Poren bzw. Löcher (grüne Dreiecke) und die verschiedenen großen Strukturen (rote und blaue Dreiecke) noch viel besser sichtbar. Bei diesen auf der Plättchenoberfläche vorhandenen Strukturen könnte es sich auch um Proteinmoleküle handeln, die an den Chitinfilamenten der organischen Matrix angelagert sind [1, 2]. Auf dem in (B) gezeigten Probenbereich sollte das Wachstum von CaCO_3 -Kristallen direkt beobachtet werden.

Die Bilder (A) zeigen einen kleinen Bereich der Oberfläche eines einzelnen Aragonitplättchens. Dort sind die typischen, bei vielen der zuvor gezeigten AFM-Untersuchungen der Perlmutterpaltflächen schon gut beobachtbaren, Strukturen auf der Plättchenoberfläche ebenfalls deutlich sichtbar. Auf der Plättchenoberfläche existieren sowohl bereits höhere Strukturen (rote Pfeile) und viele kleinere Strukturen (blaue Pfeile) als auch Poren bzw. Löcher unterschiedlichen Durchmessers (schwarze und grüne Pfeile). Dort markieren die grünen Pfeile beispielhaft mehrere kleinere Poren und die schwarzen Pfeile eine größere Pore. Vermutlich sind die unterschiedlich großen auf der Plättchenoberfläche deutlich erkennbaren Strukturen sowohl verschiedene Proteinmoleküle, die an den Chitinfilamenten bzw. -fasern der organischen Matrix gebunden sind, als auch kristalline Strukturen („nanoasperities“ und/oder kleine nadelförmige Aragonitkristalle), die unter natürlichen Bedingungen in der Schneckenschale gewachsen sind [1, 4]. Auch ein kleiner Teil der Plättchenkante ist im linken, oberen Bildbereich erkennbar. Die Bilder (B) zeigen die Oberfläche des Aragonitplättchens in höherer Vergrößerung. Dort sind die verschieden großen Strukturen (rote und blaue Dreiecke) und die zwischen diesen Strukturen auftretenden Löcher bzw. Poren viel besser beobachtbar. Die grünen Dreiecke kennzeichnen exemplarisch drei gut erkennbare Poren auf der Probenoberfläche.

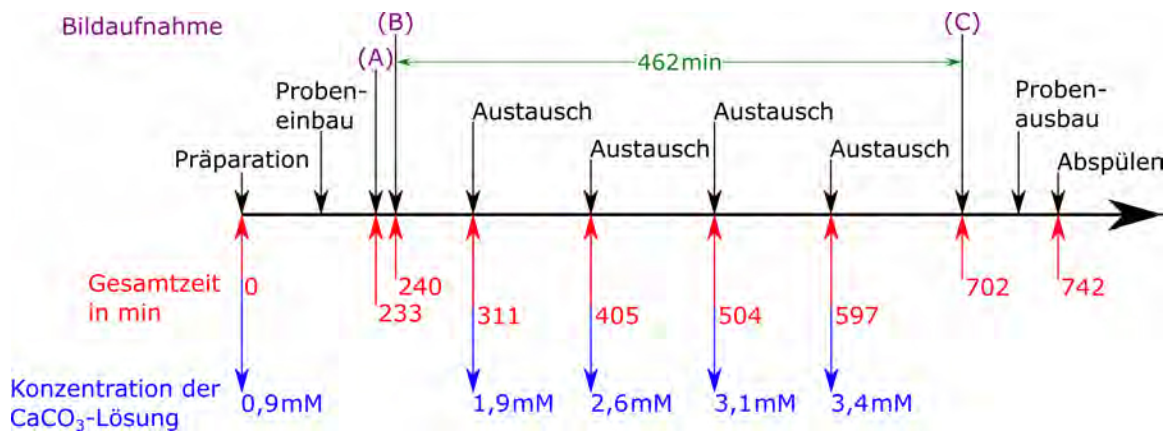


Abbildung 89: Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim sechsten in Abb. 90 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer frisch präparierten Perlmutterpaltfläche. Angegeben sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die zwischen den gezeigten Bildern verstrichenen Zeitspannen, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO_3 -Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments.

Um bessere Erkenntnisse über die Stellen auf der Plättchenoberfläche zu erhalten, an denen vorzugsweise das Wachstum der Calciumcarbonatkristalle einsetzt, wurde der in den Bildern (B) dargestellte Probenbereich mit der Scanfläche von $1,0\ \mu\text{m} \cdot 1,0\ \mu\text{m}$ für das Wachstumsexperiment ausgewählt. Während des Kristallwachstums wurden nun Kraft-

karten²⁵⁸ dieses Probenbereichs aufgenommen. Die Kraftkarten sollten, wie bereits zuvor erwähnt, Informationen über die Bedeckung des Aragonitplättchens mit organischer Matrix sowie über die Nukleation und das Wachstum des Calciumcarbonats liefern. Allerdings konnten auch hier kaum aussagekräftigen Daten aus den Kraftkarten gewonnen werden. Diese AFM-Untersuchung und weitere durchgeführte AFM-Untersuchungen auf ebenfalls frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen zeigten, dass die ScanAsyst-Air AFM-Sonden auch nicht für die Analyse der mechanischen Eigenschaften von Perlmutterpaltflächen, d. h. für die Aufnahmen von Kraftkarten bzw. Kraftkurven auf den Perlmutterpaltflächen, geeignet sind. Die weiteren Abbildungen mit AFM-Aufnahmen zeigen daher jeweils nur die aufgenommenen Höhen- und Fehlersignale des untersuchten Probenbereichs vor und nach der Initiierung des Kristallwachstums.

Konzentration der CaCO ₃ -Lösung	Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung	Bilder
0,9 mM	311 Minuten	(A) bis (B)
1,9 mM	94 Minuten	-
2,6 mM	99 Minuten	-
3,1 mM	93 Minuten	-
3,4 mM	145 Minuten	(C)

Tabelle 16: Verwendete Konzentrationen der CaCO₃-Lösung in der Petrischale und Zeitraum des Probestücks in der jeweiligen Lösung während des in Abb. 89 und 90 gezeigten Wachstumsexperiments auf einer weiteren frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. Die Bilder (A) und (B) zeigen die Plättchenoberfläche vor Initiierung des Kristallwachstums. Das Bild (C) stellt denselben Probenbereich nach vierfachem Austausch von jeweils 1 ml der CaCO₃-Lösungen dar. Zur Initiierung des Wachstums wurde eine 4 mM CaCO₃-Lösung verwendet. Das Probestück befand sich vor dem ersten Austausch 311 Minuten in der 0,9 mM CaCO₃-Lösung.

In der **Abbildung 89** ist der Zeitstrahl dieses Wachstumsexperiments dargestellt. Dort erfolgt die Angabe der Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO₃-Lösungen, der Gesamtlaufzeit des Wachstumsexperiments, der Zeitspannen zwischen den Aufnahmen der gezeigten Bilder und der Konzentrationen der CaCO₃-Lösung in der Petrischale. Das Wachstumsexperiment und die davor durchgeführte Untersuchung zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur fanden über einen Gesamtzeitraum von 742 Minuten statt. Während des Wachstumsexperiments (Bilder (A) bis (C)) wurde viermal der Austausch der CaCO₃-Lösungen vorgenommen, wobei jedes Mal die Entnahme von 1 ml der CaCO₃-Lösung aus der Petrischale und anschließend das Einspülen von 1 ml einer übersättigten 4 mM CaCO₃-Lösung erfolgten.

²⁵⁸Erklärung siehe Abschnitt 3.1

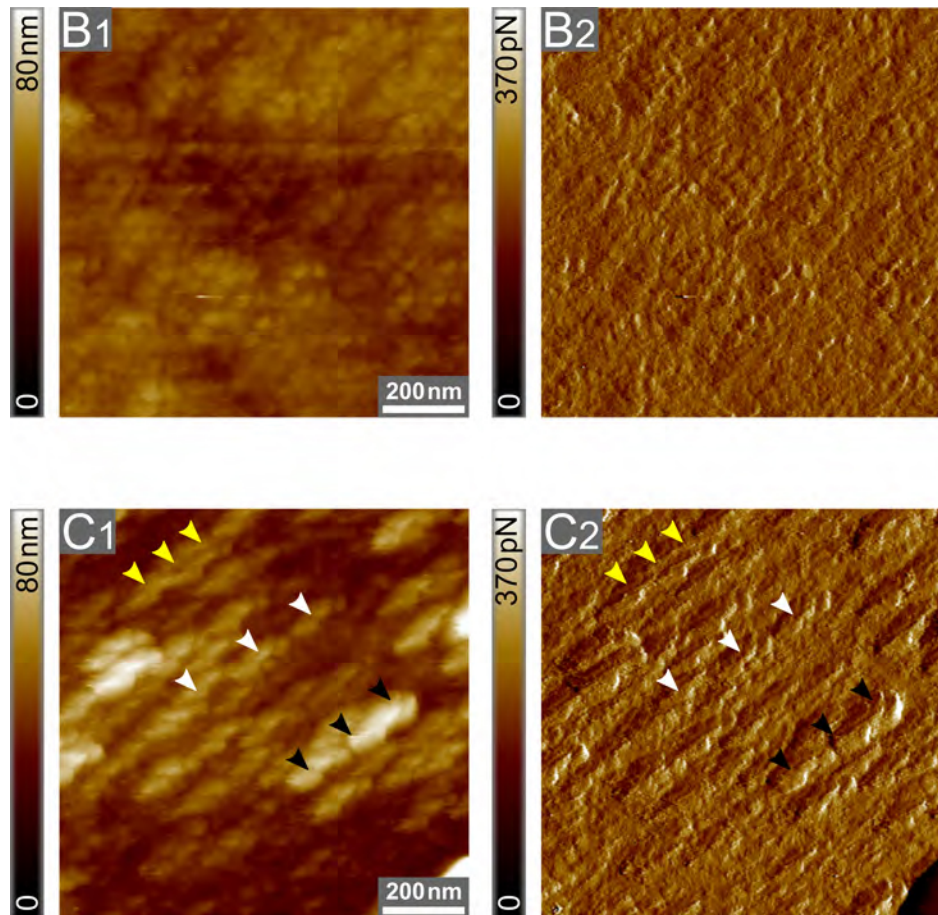


Abbildung 90: AFM-Aufnahmen des bereits in Abb. 88 gezeigten Probenbereichs der Perlmutterpaltfläche vor und nach dem Kristallwachstum. Scanflächen: (B) $1,0\ \mu\text{m} \cdot 1,0\ \mu\text{m}$ und (C) $1,0\ \mu\text{m} \cdot 1,0\ \mu\text{m}$. In (B) sind nochmals die Bilder (B) aus Abb. 88 gezeigt, jedoch mit anderen Skalierungen. (B) und (C) stellen denselben Bereich der Plättchenoberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten dar. Bilder mit Index 1 (jeweils links) zeigen die Höhensignale und Bilder mit Index 2 (jeweils rechts) die Fehlersignale. Um (B) und (C) miteinander vergleichen zu können, wurden die gleichen Skalen bei den Höhen- und Fehlersignalbildern verwendet. (B) zeigt die Plättchenoberfläche in 3 ml einer $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung vor Initiierung des Kristallwachstums. (C) stellt diesen Probenbereich nach einem Zeitraum von 462 Minuten dar, während dessen viermal jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entfernt und 1 ml einer höher übersättigten $4\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung eingespült wurden (Details siehe Abb. 89).

Auf dem hier untersuchten Teilbereich der Plättchenoberfläche sind viele CaCO_3 -Kristalle mit einer hohen Oberflächendichte gewachsen (verschiedenfarbige Dreiecke). Die gelben, weißen und schwarzen Dreiecke kennzeichnen beispielhaft jeweils mehrere sehr dicht nebeneinander entstandene CaCO_3 -Kristalle. Alle Kristalle sind hier, wie auch bereits beim fünften Wachstumsexperiment in Abb. 87 beobachtet, auf der Oberfläche des Aragonitplättchens lateral in dieselbe Richtung orientiert.

Vor dem ersten Austausch befand sich das Probestück 311 Minuten in der 0,9 mM CaCO_3 -Lösung. Da die 0,9 mM CaCO_3 -Lösung einer gesättigten Lösung entspricht, dürfte bis zu diesem Zeitpunkt noch kein induziertes Wachstum von Kristallen auf der Probenoberfläche stattgefunden haben [4]. Somit sollten alle in den Bildern (A) und (B) der Abbildung 88 beobachtbaren unterschiedlich großen Strukturen auf der Plättchenoberfläche unter natürlichen Bedingungen in der Schneckenschale gewachsen bzw. entstanden sein. Nach dem letzten Lösungsaustausch wies die CaCO_3 -Lösung in der Petrischale eine Konzentration von 3,4 mM auf. Bis zum Abspülen befand sich die Probe 145 Minuten in der 3,4 mM CaCO_3 -Lösung. In der Tabelle 16 sind die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und die Zeitspannen der Probe in der jeweiligen Lösung zusammengefasst.

In der **Abbildung 90** sind nun AFM-Aufnahmen des untersuchten Probenbereichs der Perlmutterpaltfläche vor der Initiierung des Kristallwachstums zu Beginn des Wachstumsexperiments (Bilder (B)) und nach dem letzten Austausch der CaCO_3 -Lösungen (Bilder (C)) dargestellt. Die Bilder (B) zeigen nochmal den in den Bildern (B) der Abbildung 88 gezeigten Probenbereich mit der Scanfläche von $1,0 \mu\text{m} \cdot 1,0 \mu\text{m}$, jedoch mit anderer Skalierung des Höhen- bzw. Fehlersignals. In den Bildern (C) ist dieser Probenbereich nach allen vier durchgeführten Lösungsaustauschen, also nach dem Wachstum von Calciumcarbonatkristallen, gezeigt. Dabei sind wieder links die Höhengsignale (Bilder mit Index 1) und rechts die Fehlersignale (Bilder mit Index 2) zu sehen. Um die Bilder (B) und (C) miteinander vergleichen zu können, wurden bei diesen jeweils die gleichen Skalen für die Höhen- und Fehlersignale verwendet. Die Aufnahme der Bilder (C) erfolgte ebenfalls mit einer abbildenden Kraft von 200 pN, einer Abtastrate von 0,598 Hz und einer Auflösung von 256×256 Pixel. Die **Abbildung 91** zeigt zusätzlich, zur Veranschaulichung der gewachsenen Kristalle, die dreidimensionalen Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen) der in Abbildung 90 dargestellten Höhengsignale.

In allen AFM-Bildern ist eindeutig erkennbar, dass auf dem betrachteten Teilbereich des Aragonitplättchens viele Calciumcarbonatkristalle entstanden sind. Dabei haben sich diese Kristalle lateral sehr dicht nebeneinander gebildet. Die meisten dieser Kristalle sind, wie auch schon beim fünften Wachstumsexperiment in der Abbildung 87 beobachtet, auf der Plättchenoberfläche in gleicher lateraler Richtung parallel gewachsen. Wahrscheinlich sind – wie im dritten Wachstumsexperiment gezeigt – schnell induziert entstandene Kristallnadeln bereits seitlich zusammengewachsen und haben diese Strukturen gebildet. Die Ursache für diese Vorzugsrichtung ist bisher nicht bekannt. Die gelben und schwarzen Pfeile in den Höhen- und Fehlersignalsbildern sowie in den 3D-Rekonstruktionen kennzeichnen jeweils mehrere solche „linienartig“ in gleicher lateraler Richtung orientierte und dicht ne-

beneinander gewachsene Calciumcarbonatkristalle. Die weißen Pfeile markieren ebenfalls Kristalle, die sich lateral in einer „Linie“ auf dem Aragonitplättchen gebildet haben. Zum besseren Vergleich kennzeichnen die Pfeile in allen AFM-Bildern dieselben Kristalle.

Alle in diesem Abschnitt 5.4.4 gezeigten Probenoberflächen wurden nach den AFM-Wachstumsexperimenten auch mit dem REM untersucht. Die Vorbereitungen der Probestücke für die REM-Untersuchungen erfolgten gemäß der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Prozedur. Dazu wurde nach den Wachstumsexperimenten jeweils die CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale entnommen, die Probe mit Reinstwasser abgespült, die restliche Flüssigkeit mittels fusselfreier Tücher²⁵⁹ aus der Petrischale entfernt, die Probe im Kühlraum bei 6°C getrocknet und der Petrischalenrand abgesägt [4]. Anschließend wurde der übriggebliebene Petrischalenboden mit Probe mittels elektrisch leitfähigem Haftaufkleber²⁶⁰ auf einem Probesteller²⁶¹ fixiert und mit leitfähigem kupferbeschichtetem Klebeband²⁶² kontaktiert. Obwohl REM-Untersuchungen aller Probestücke erfolgten, sind im Weiteren nur REM-Aufnahmen der in diesem Wachstumsexperiment untersuchten Probe gezeigt. Für diese REM-Untersuchung erfolgte auch keine leitfähige Beschichtung der Probenoberfläche [4].

In der **Abbildung 92** sind nun REM-Aufnahmen verschiedener Oberflächenbereiche der bereits in Abbildungen 88, 90 und 91 dargestellten Perlmutterplattfläche zu sehen. Die Bilder zeigen die Probenoberfläche mit unterschiedlichen Scanflächen von $119\ \mu\text{m} \cdot 159\ \mu\text{m}$ beim Bild (A), von $82\ \mu\text{m} \cdot 109\ \mu\text{m}$ beim Bild (B), von $19\ \mu\text{m} \cdot 26\ \mu\text{m}$ beim Bild (C), von $11\ \mu\text{m} \cdot 15\ \mu\text{m}$ beim Bild (D), von $5\ \mu\text{m} \cdot 6\ \mu\text{m}$ beim Bild (E) und von $2\ \mu\text{m} \cdot 3\ \mu\text{m}$ beim Bild (F). Alle Bilder wurden bei Verwendung einer Beschleunigungsspannung von $1,0\ \text{kV}$ aufgenommen. Dabei wurden ein Neigungswinkel des Probestisches von $22,9^\circ$ und ein Aperturbündeldurchmesser von $30\ \mu\text{m}$ genutzt [4].

Die Bilder (A) und (B) zeigen Übersichtsaufnahmen, in denen sehr viele der jeweils etwa $500\ \text{nm}$ hohen, in vertikaler Richtung durch die interlamellare Matrix getrennten und übereinanderliegenden Aragonitschichten sichtbar sind [4, 5]. Bei sehr genauem Betrachten sind auf den Oberflächen der einzelnen polygonal geformten Aragonitplättchen bereits induziert gewachsene Calciumcarbonatkristalle beobachtbar. Zur besseren Sichtbarkeit markieren die grünen Pfeile beispielhaft die in den Mitten einiger Aragonitplättchen vorhandenen Kristalle. Das Bild (C) zeigt den im Bild (B) rot markierten Bereich in höherer Vergrößerung. Dort sind die gewachsenen Kristalle viel besser erkennbar (gelbe Pfeile). Hier fällt bereits auf, dass diese Kristalle nadelartige Formen aufweisen und das Kristallwachstum vor allem in den Plättchenmitten erfolgte. In den Bildern (D) bis

²⁵⁹VWR® Light-Duty Tissue Wipers; VWR International, LLC; Radnor, PA, USA

²⁶⁰25 mm Durchmesser, rund; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁶¹32 mm Durchmesser, rund; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

²⁶²6,4 mm Breite, einseitig klebend; Plano GmbH; Wetzlar, Deutschland

(F) sind deutlichst die auf den Aragonitplättchen gewachsenen nadelförmigen Calciumcarbonatkristalle sichtbar. Der im Bild (D) blau hervorgehobene Bereich ist im Bild (E) entsprechend vergrößert dargestellt. Das Bild (F) zeigt wiederum eine Nahaufnahme des obersten Aragonitplättchens aus dem Bild (E). Die einzelnen Kristallnadeln sind dort in der Plättchenmitte sehr dicht nebeneinander gewachsen (blauer Pfeil und grüne Dreiecke). Diese Kristalle sind vermutlich durch das dort ursprünglich vorhandene, bei vielen AFM-Untersuchungen anderer Perlmutterpaltflächen schon oft beobachtete, Loch nach oben gewachsen. Bei Fortführung des Kristallwachstums könnte aus diesen Kristallnadeln ein einzelner größerer, zusammengewachsener Kristall entstehen, der möglicherweise dann eine Mineralbrücke bilden würde. Auf diesem Aragonitplättchen sind zwischen dem Randbereich und der Plättchenmitte sonst nur vereinzelt weitere Kristallnadeln entstanden (rote Pfeile und gelbe Dreiecke). Neben den nadelförmigen Kristallen (blauer Pfeil, rote Pfeile, grüne und gelbe Dreiecke) existieren auf der Plättchenoberfläche viele kleinere kristalline Strukturen (blaue Dreiecke), vermutlich „nanoasperities“ und/oder Nukleationskeime.

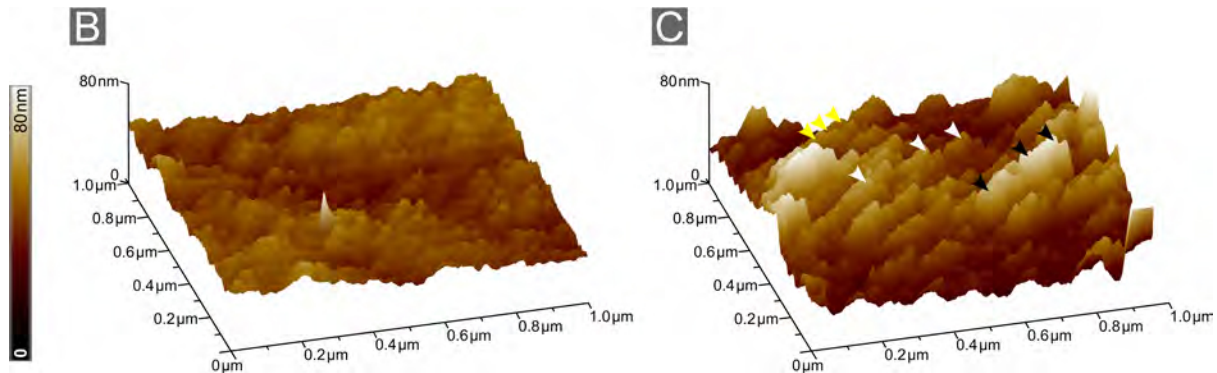


Abbildung 91: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 90 dargestellten Höhenprofile. Scanflächen: (B) $1,0\ \mu\text{m} \cdot 1,0\ \mu\text{m}$ und (C) $1,0\ \mu\text{m} \cdot 1,0\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. (C) stellt den in (B) gezeigten Probenbereich nach erfolgtem Kristallwachstum dar. Hier ist noch besser erkennbar, dass auf dem betrachteten Oberflächenbereich des Aragonitplättchens viele CaCO_3 -Kristalle in unmittelbarer Nähe zueinander gewachsen sind und vorzugsweise „linienartig“ in dieselbe laterale Richtung orientiert sind. Die gelben, weißen und schwarzen Pfeile kennzeichnen beispielhaft jeweils mehrere dicht nebeneinander entstandene und in gleicher lateraler Richtung orientierte Kristalle. Die Pfeile markieren dabei dieselben CaCO_3 -Kristalle wie in Abb. 90.

Weitere REM-Aufnahmen ausgewählter Probenbereiche dieser Perlmutterpaltfläche finden sich in den **Abbildungen 112 und 113** im Anhang in Abschnitt 10.5. Die **Abbildung 112** zeigt einen Bereich der Probe, in dem die typischen Aragonitplättchen nicht erkennbar sind. Dort existieren, wie bereits beim ersten Wachstumsexperiment auf einer

Perlmutterpaltfläche (siehe Abb. 65 bis 71) beobachtet, einerseits Bereiche, in denen sehr viele dünne und dicht nebeneinander entstandene Kristalle vorhanden sind und andererseits Bereiche, in denen weniger Kristalle auftreten. In der **Abbildung 113** sind wieder die typischen Aragonitplättchen und viele auf den Plättchenoberflächen gewachsene Kristallnadeln sichtbar.

Der Vergleich zwischen den AFM-Aufnahmen dieser Perlmutterpaltfläche (siehe Abb. 88, 90 und 91) und den REM-Aufnahmen derselben Probenoberfläche (siehe Abb. 92, 112 und 113) legt die Vermutung nahe, dass die Aragonitplättchen hier jeweils größtenteils von organischer Matrix bedeckt waren und das Kristallwachstum vorzugsweise in den Plättchenmitten durch die dort vorhandenen Löcher erfolgte. Das Wachstum wurde hier offenbar durch die in der organischen Matrix an diesen Stellen vorhandenen Carboxyl- und Sulfatgruppen sowie aragonitnukleierenden Proteine begünstigt [5, 6].

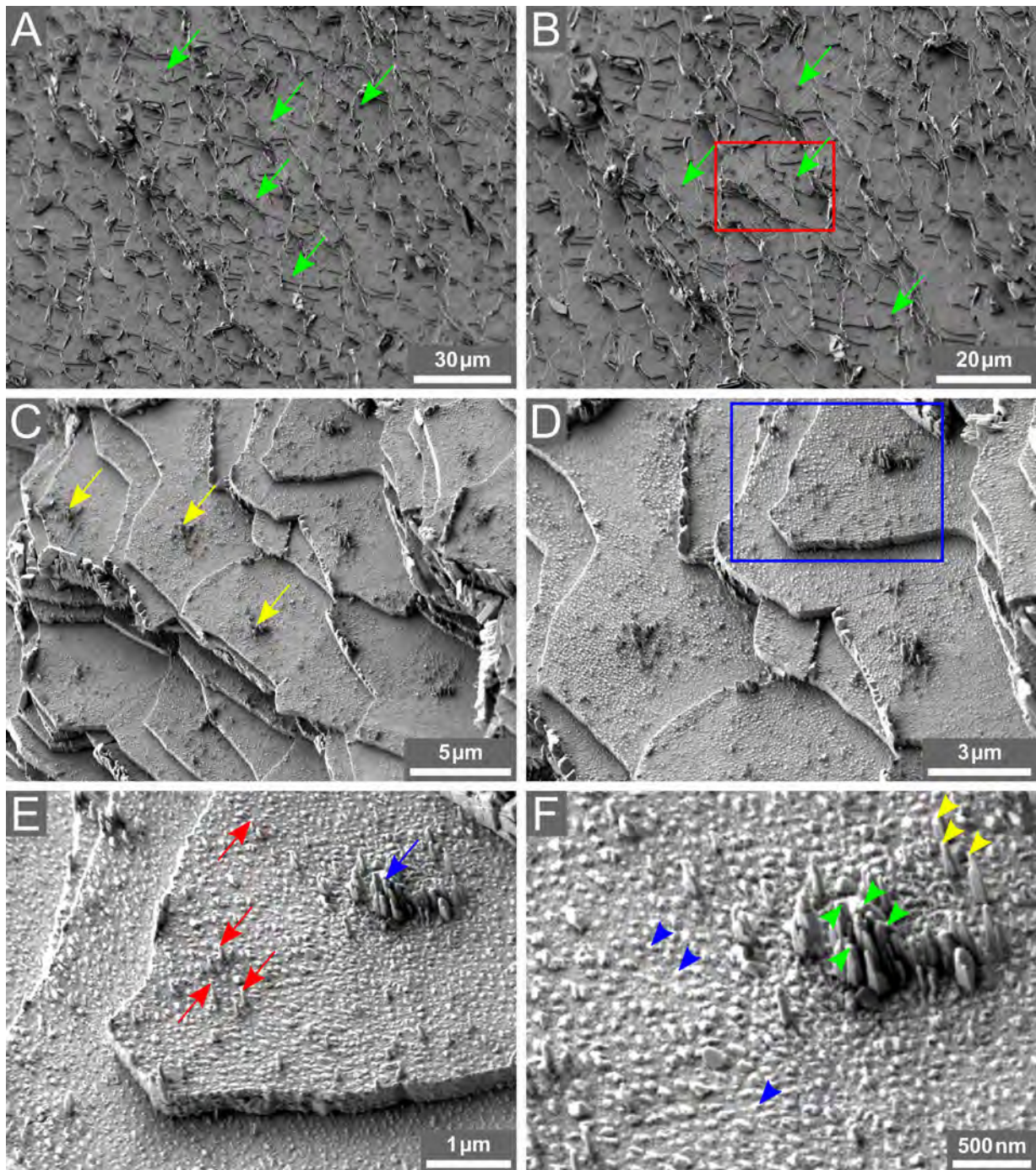


Abbildung 92: REM-Aufnahmen unterschiedlicher Bereiche der Perlmutterpaltfläche nach dem Wachstumsexperiment (siehe Abb. 89 und 90). Scanflächen: (A) $119\ \mu\text{m} \cdot 159\ \mu\text{m}$, (B) $82\ \mu\text{m} \cdot 109\ \mu\text{m}$, (C) $19\ \mu\text{m} \cdot 26\ \mu\text{m}$, (D) $11\ \mu\text{m} \cdot 15\ \mu\text{m}$, (E) $5\ \mu\text{m} \cdot 6\ \mu\text{m}$ und (F) $2\ \mu\text{m} \cdot 3\ \mu\text{m}$; Neigungswinkel des Probestisches: $22,9^\circ$. (C) bzw. (E) zeigt den in (B) bzw. (D) farblich markierten Bereich vergrößert. Die nadelförmigen CaCO_3 -Kristalle sind besonders in den Plättchenmitten dicht nebeneinander gewachsen (grüne Pfeile in (A) und (B), gelbe Pfeile in (C) und blauer Pfeil in (E)). Jeweils zwischen Plättchenkante und Plättchenmitte fand nur vereinzelt das Wachstum von CaCO_3 -Kristallen statt (rote Pfeile in (E)). (F) zeigt eine Nahaufnahme des oberen Aragonitplättchens aus (E). Dort sind die Kristalle in der Plättchenmitte sehr gut erkennbar (grüne Dreiecke). Neben den nadelförmigen Kristallen (grüne und gelbe Dreiecke) existieren auf der Plättchenoberfläche viele kleinere kristalline Strukturen (blaue Dreiecke), vermutlich „nanoasperities“ und/oder Nukleationskeime.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Perlmutter ist ein biologischer Verbundwerkstoff bestehend aus vielen über- und nebeneinander angeordneten etwa 500 nm dicken und nur wenige Mikrometer großen, kristallinen Aragonitplättchen (eine der drei wasserfreien Calciumcarbonatkristallisationsarten), die innerhalb einer organischen Matrix wie Ziegelsteine in einer Mauer eingebettet sind [1, 5]. Dadurch ergibt sich im Vergleich zu reinem Calciumcarbonat eine wesentlich höhere Stabilität und Elastizität und somit eine bessere Bruch- und Dehnungsfestigkeit und sogar die Möglichkeit einer Selbstreparatur durch neues „Zusammenknüpfen“ der Fasern in der organischen Matrix nach einer eventuellen Überlastung des Materials [5, 8]. Die Untersuchungen und Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit liefern detaillierte Beiträge zur Charakterisierung des Materialaufbaus und erste Hinweise zur Initiierung einer künstlichen Kristallisation von Calciumcarbonat in einer organischen Matrix, also für den Weg hin zu einer späteren, effektiven künstlichen Erzeugung dieses biologisch gut verträglichen Verbundmaterials.

Für die Materialcharakterisierung und für die direkte Beobachtung des Wachstums von Calciumcarbonat bzw. Aragonit auf und in der organischen Matrix wurden zwei verschiedene Arten von Proben genutzt: So wurden insbesondere (1) sogenannte „flat pearls“ mit Hilfe lebender Meeresschnecken gewachsen. Dazu erfolgte das Einbringen von Deckgläsern über unterschiedlich lange, definierte Zeiträume (7 Tage bis 6 Wochen) zwischen Schaleninnenseite und Mantelepithel in lebende Meeresschnecken [3, 4]. Auf den Deckgläsern entstehen dann sogenannte Wachstumsfronten mit „stacks of coins“, das sind münzstapelähnliche Anordnungen von wenigen, tannenbaumartig übereinanderliegenden Aragonitplättchen noch recht geringer Größe, von denen das weitere Aragonitwachstum ausgeht [2, 5]. Zum Vergleich wurden (2) Perlmutterspaltflächen – also bereits fertig gewachsene Proben – aus Schneckenschalen verstorbener Tiere präpariert und untersucht.

Die Strukturcharakterisierungen und die Wachstumsexperimente wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (AFM) vorgenommen, wobei sich die Proben stets in einer mit gesättigter oder übersättigter CaCO_3 -Lösung gefüllten Petrischale befanden. Der definierte Austausch der CaCO_3 -Lösungen während der AFM-Wachstumsexperimente erfolgte mittels Pipette und Silikonschlauch, sodass sich die Proben stets in zunehmend übersättigter CaCO_3 -Lösung befanden und so Kristallwachstum auf den Probenoberflächen initiiert wurde. Ergänzende Strukturuntersuchungen an den nach den AFM-Wachstumsexperimenten getrockneten Probestücken erfolgten mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM).

Die Charakterisierungen der Wachstumsfronten von „flat pearls“ mit dem AFM ergab, dass die beobachteten Aragonitplättchen der „stacks of coins“ eine polygonale Form

aufwiesen und oftmals mit organischer Matrix, gut erkennbar an deren Filamentstruktur, überzogen waren. Dabei bedeckte die organische Matrix die unteren Plättchen meistens vollständig, die obersten Plättchen jedoch nicht oder nur teilweise [4]. Die nähere Untersuchung der organischen Matrix sowohl auf den Aragonitplättchen als auch zwischen den verschiedenen „stacks of coins“ zeigte, dass diese aus relativ geradlinig verlaufenden Filamenten unterschiedlichen Durchmessers besteht, die jedoch netzwerkartig verflochten sind und dadurch verschieden große Poren und Löcher erzeugen [1, 4]. Aus den AFM-Höhenbildern bzw. aus daraus ermittelten Höhenprofilen konnte die durchschnittliche Dicke verschiedener Aragonitplättchen der „stacks of coins“ zu etwa 500 nm bestätigt werden [5].

Die Oberfläche der auf einem nur 10 Tage lang inkubierten Deckgläschen natürlich gewachsenen „flat pearl“ wurde bei äußerst geringer Abtastkraft von 800 pN bis 150 pN mittels AFM bis hin zu einer Auflösung von $2\ \mu\text{m} \cdot 2\ \mu\text{m}$ abgebildet. Diese „flat pearl“-Oberfläche war von organischer Matrix dominiert, sodass das darunterliegende Mineral noch nicht sichtbar war. So konnte die Filamentstruktur der organischen Matrix sehr detailliert untersucht und die Durchmesser von 60 einzelnen Filamenten vermessen sowie eine Größenverteilung der Filamentdurchmesser mit einem Maximum im Bereich zwischen 6 nm und 10 nm ermittelt werden. Die gemessene Verteilung unterstützt so die Annahme, dass sich Nanofilamente ausbilden, die sich wiederum mit weiteren Chitinfasern zu größeren Faseraggregaten zusammenlagern können, an denen zudem verschiedene Proteinmoleküle angelagert sind [190, 191]. Weitere Untersuchungen in [81, 91, 194] legen die Vermutung nahe, dass diese Filamente aus β -Chitin bestehen.

Vergleichende AFM-Untersuchungen zeigten, dass insbesondere die Netzwerkstruktur der weichen organischen Matrix mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden viel besser aufgelöst abgebildet werden konnte als mit den ScanAsyst-Air AFM-Sonden.

Ein erstes Wachstumsexperiment wurde auf einer nach 14-tägiger Inkubation entstandenen natürlich gewachsenen „flat pearl“-Probe über einen Zeitraum von insgesamt 491 Minuten bei ständiger AFM-Beobachtung durchgeführt. In der Petrischale befand sich zu Beginn gering übersättigte 1 mM CaCO_3 -Lösung, von der im weiteren Verlauf dreimal ein Teilvolumen gegen eine höher übersättigte 2 mM CaCO_3 -Lösung definiert ausgetauscht wurde, um Kristallwachstum auf der Wachstumsfront zu initiieren. Während des Wachstumsexperiments wurden nacheinander, jeweils etwa 5 Minuten dauernde AFM-Scans mit einer Scanfläche von $5\ \mu\text{m} \cdot 5\ \mu\text{m}$ desselben Oberflächenbereichs durchgeführt. Lediglich an zwei Stellen wurde hier induziertes Kristallwachstum unterhalb der organischen Matrix in Form kleiner Erhebungen (jeweils etwa $0,5\ \mu\text{m} \cdot 0,5\ \mu\text{m}$ groß) beobachtet. In zusätzlichen, abschließenden $2,3\ \mu\text{m} \cdot 2,3\ \mu\text{m}$ -Scans konnten die Poren in der organischen Matrix zwi-

schen den verflochtenen Filamenten genauer und extrem gut aufgelöst nachgewiesen werden, die offenbar sowohl für die Diffusion der organischen Bestandteile und Ionen (Calcium- und Carbonationen) für das Aragonitwachstum durch die Matrix als auch später für die Mineralbrückenbildung verantwortlich sind [1, 5].

Bei den nach anschließender Trocknung der Probe mittels REM durchgeführten Untersuchungen mehrerer Oberflächenbereiche dieses „flat pearl“-Probestücks bei unterschiedlichen Auflösungen wurden die einzelnen Aragonitplättchen der „stacks of coins“ und die verschiedenen „stacks of coins“ sowie deren Strukturen, Größen und Abstände untereinander deutlich beobachtet. Zusätzlich gelang es auch die zwischen den „stacks of coins“ vorhandene organische Matrix und deren Struktur zu untersuchen. Es wurde zudem nachgewiesen, dass die weiter untenliegenden Aragonitplättchen einiger „stacks of coins“ in horizontaler Richtung bereits aneinanderstießen und somit ihre größtmögliche, auch durch die intertabulare organische Matrix (ITM) festgelegte, laterale Ausdehnung erreicht hatten.

Als erste Hinweise auf ein experimentell induziertes Kristallwachstum sind sowohl (1) die jeweils oben auf den „stacks of coins“ bereits neu gewachsenen, teilweise dicht nebeneinanderliegenden, aber deutlich kleineren Aragonitplättchen als auch (2) die vielen zusätzlichen sehr kleinen Kristallite, die oben auf vielen, oftmals auch mit organischer Matrix bedeckten Aragonitplättchen der „stacks of coins“ entstanden sind, zu werten. Offenbar beginnt kristallines Wachstum vorzugsweise unter der organischen Matrix und setzt sich durch deren Poren fort.

Ein erfolgreicherer Wachstumsexperiment an einer nach 10-tägiger Inkubation natürlich gewachsenen „flat pearl“-Probe wurde unter AFM-Beobachtung über insgesamt 311 Minuten und bei Verwendung einer Scanfläche von $5\ \mu\text{m} \cdot 5\ \mu\text{m}$ durchgeführt. Dabei wurde im Abstand von 7 Minuten, das ist die notwendige Zeit für die Aufnahme eines Bildes, stets derselbe Oberflächenbereich abgerastert und die anfänglich gesättigte $0,9\ \text{mM}$ CaCO_3 -Lösung mehrfach so ausgetauscht, dass sich das Probestück in zunehmend übersättigter CaCO_3 -Lösung befand. Hier konnte erstmals eindeutig induziertes Kristallwachstum auf einer „flat pearl“-Probe direkt beobachtet werden, und zwar (1) an den bereits durch natürliches Wachstum erhabenen und gut erkennbaren Stellen, die auf der die Oberfläche bedeckenden organischen Matrix vorhanden waren, und (2) an Kristallen, die durch die Poren der organischen Matrix gewachsen sind. Die dreidimensionalen Rekonstruktionen der AFM-Höhenbilder bestätigten eindeutig (1) das nadelförmige Wachstum der Kristalle auf der organischen Matrix, (2) das Durchstoßen der Matrix durch wachsende Kristallite, (3) das Mineralbrückenwachstum und (4) das sich nach dem anfänglichen Höhenwachstum anschließende Breitenwachstum der Aragonitkristalle. Die

nach dem zweiten Wachstumsexperiment durchgeführten REM-Untersuchungen der „flat pearl“-Probe zeigten eindeutig viele Bereiche mit induziert gewachsenen, nadelförmigen Kristallen.

Es gelang, das Wachstum von 20 ausgewählten Kristallen ab der 380. Minute nach Beginn des Wachstumsexperiments zu verfolgen und deren Höhenwachstumsgeschwindigkeiten mit Hilfe von ermittelten Höhenprofilen aus der Sequenz von AFM-Höhenbildern zu bestimmen. Die Wachstumsgeschwindigkeiten nehmen hier zunächst mit steigender Konzentration, also direkt nach dem Wechsel der CaCO_3 -Lösungen, zu und danach jedoch wieder ab. Dafür gibt es drei Gründe: (1) Calcium- und Carbonationen werden für das Wachstum verbraucht, (2) ein Gleichgewicht stellt sich zwischen Wachstum und Abbau ein und (3) das Wachstum erfolgt zuerst nadelartig entlang der \vec{c} -Achse in die Höhe und danach vermehrt in die Breite [4, 5].

Zum Vergleich wurden außerdem bereits natürlich fertig gewachsene Proben – frisch gespaltene Perlmutteroberflächen (auch Perlmutterspaltflächen genannt) – aus Schalen gestorbener Meeresschnecken präpariert, mit dem AFM charakterisiert und auf einigen von ihnen Experimente zum Wachstum von Calciumcarbonat durchgeführt. Dabei konnten die Strukturen der Probenoberflächen mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden besonders gut aufgelöst untersucht werden. In der Mitte der einzelnen polygonal geformten Aragonitplättchen wurde oft ein Loch bzw. eine Vertiefung, als Hinweis auf ursprünglich dort existierende Mineralbrücken, beobachtet. Darüber hinaus fanden sich jeweils sehr kleine, nanometergroße Strukturen (sogenannte „nanoasperities“) nahezu homogen verteilt auf der gesamten Plättchenoberfläche. Vor allem an Rändern und Kanten waren einige natürlich gewachsene, nadelförmige Kristallite zu beobachten. Zusätzlich waren auf einigen Plättchenoberflächen Reste der intertabularen organischen Matrix (ITM) nachweisbar.

Für die Zielstellung, induziertes Kristallwachstum auf den Perlmutterspaltflächen zu erzeugen und dieses dabei direkt mit dem AFM zu beobachten, wurden gut voruntersuchte Spaltflächen über mehrere Stunden (vier bis neun Stunden) jeweils im Abstand von etwa sechs Minuten mit dem AFM abgerastert. Dabei befand sich die Probe ebenfalls zu Beginn stets in gesättigter (0,9 mM) oder gering übersättigter (1 mM) CaCO_3 -Lösung und im weiteren Verlauf der Wachstumsexperimente in zunehmend übersättigter CaCO_3 -Lösung, die mehrmals definiert ausgetauscht wurde.

In den mit dem AFM aufgenommenen Bildsequenzen des zweiten und dritten Wachstumsexperiments erkennt man (1) deutlich die einzelnen Aragonitplättchen, (2) induziertes Kristallwachstum in übersättigter CaCO_3 -Lösung oberhalb einer Konzentration von 3,1 mM bzw. 3,4 mM und (3) entstehende vorwiegend nadelförmige Kristalle. Als typische Kristallkeime wurden induziert gewachsene, nadelförmige Kristallite vorwiegend an

den Rändern des zentralen Lochs bzw. der Vertiefung und im Bereich um dieses Loch sowie an den Plättchenkanten erzeugt. Das bestätigt die Vermutung, dass Carboxyl- und Sulfatgruppen sowie aragonitnukleierende Proteine, die vorzugsweise an diesen Stellen in der organischen Matrix vorhanden sind, als Nukleationskeime wirken und so das Kristallwachstum fördern können [5, 6]. Auch die Wachstumsgeschwindigkeiten ausgewählter Kristallite, die aus den AFM-Höhenbildern mit Hilfe von Höhenprofilen bestimmt wurden, unterstützen diese Annahme.

In – nach diesen Wachstumsexperimenten – durchgeführten REM-Untersuchungen wurden die lateralen Ausdehnungen mehrerer Aragonitplättchen vermessen und zusätzlich Form, Abstand und Oberflächendichte der induziert gewachsenen Kristallite bestimmt. Die Aragonitplättchen zeigen hier ihre polygonale Form mit lateralen Ausmaßen von 4 μm bis 9 μm in den verschiedenen Richtungen. Die induziert gewachsenen Kristalle haben eine markante nadelförmige Struktur, die insbesondere bei Beobachtung unter einem kleinen Kippwinkel des REM-Probentisches sehr gut sichtbar wurde. Auszählungen der Kristallite und Flächenbestimmungen ergaben eine Kristallitdichte von $(6,6 \pm 0,7)$ pro μm^2 . Einige sehr eng benachbarte Kristallnadeln waren bereits im unteren Bereich zusammengewachsen. Die Kristallite wachsen offenbar zuerst in die Höhe, dann nimmt ihre Anzahl und damit ihre Oberflächendichte zu, sodass ein seitliches Zusammenwachsen, welches im unteren Bereich beginnt, möglich wird.

Die „flat pearl“-Untersuchungen (ihre Erzeugung, AFM-Strukturuntersuchungen und AFM-Wachstumsexperimente sowie anschließende REM-Untersuchungen) lieferten gute Einblicke und wesentliche neue Informationen zum natürlichen und künstlichen Wachstumsprozess von Aragonit in der organischen Matrix sowie Erkenntnisse zur Geometrie und Flächendichte der Kristallnadeln und zur Dickenverteilung der Filamente. Es gelang künstliches Kristallwachstum auf den Wachstumsfronten zu initiieren und mit dem AFM unter nativen Bedingungen über jeweils längere Zeiträume detailliert zu untersuchen.

Nach Voruntersuchungen und Optimierungen konnte darüber hinaus insbesondere auf den Perlmutterpaltflächen das induzierte Wachstum von vorzugsweise nadelförmigen Kristallen bestens mit dem AFM beobachtet werden. Dadurch konnten die Wachstumsgeschwindigkeiten der neu gewachsenen Kristallite an verschiedenen Orten quantitativ ermittelt werden. So gelang der Nachweis, dass an solchen Orten auf den mit organischer Matrix bedeckten Aragonitplättchen, wo vermutlich Carboxyl- und Sulfatgruppen vorhanden und aragonitnukleierende Proteine vorzugsweise an die Filamente angelagert sind (z. B. Plättchenränder und Bereich um das zentrale Loch bzw. die Vertiefung in der Plättchenoberfläche herum), das Kristallwachstum beginnt, schneller und stärker ist [6, 82]. Weitere Wachstumsexperimente mit zusätzlichen Proteinen, die z. B. aus der löslichen or-

ganischen Matrix gewonnen werden können und in die übersättigte CaCO_3 -Lösung zur Förderung oder Hemmung des Kristallwachstums eingebracht werden, sind nach obigen Ergebnissen ein vielversprechender Ansatz, um Perlmutter als biologisch gut verträgliches Verbundmaterial künstlich herzustellen.

7 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich hier bei meiner Betreuerin, der Professorin Dr. Monika Fritz, die mir in ihrer Arbeitsgruppe dieses sehr aktuelle und spannende Thema zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt hat. Frau Prof. Dr. Monika Fritz war immer am Fortgang meiner Arbeit interessiert, gab viele Anregungen und stand stets für Diskussionen zur Verfügung. Gern denke ich auch an gemeinsam verbrachte Stunden am AFM zurück. Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Manfred Radmacher für seine Unterstützung bei den Experimenten mit dem Rasterkraftmikroskop und für viele nützliche fachliche Diskussionen und Hinweise. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Bornholdt für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen bedanken. Danken möchte ich auch Frau Eva-Maria Meyer aus dem IMSAS für ihre technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop. Darüber hinaus gilt mein Dank auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihr stetes Interesse an den Ergebnissen meiner Arbeit und den hilfreichen Diskussionen in den Arbeitsgruppenbesprechungen. Hervorzuheben sind Holger Doschke für seine technische Unterstützung sowie Meike Gummich für ihre Unterstützung bei den Konzentrationsbestimmungen mit dem Bradford-Assay und bei den Proteinpräparationen.

8 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] M. Launspach, K. Rückmann, M. Gummich, H. Rademaker, H. Doschke, M. Radmacher, M. Fritz. Immobilisation and characterisation of the demineralised, fully hydrated organic matrix of nacre - an atomic force microscopy study. *Micron*, 43(12):1351–1363, 2012.
- [2] K. Rückmann. Immobilisierung und Charakterisierung der demineralisierten, vollständig hydrierten organischen Matrix aus dem biogenen Polymer-Mineral Verbundmaterial Perlmutter. Bachelorarbeit, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2012.
- [3] M. Launspach, K. I. Gries, F. Heinemann, A. Hübner, M. Fritz, M. Radmacher. Mapping nanomechanical properties of freshly grown, native, interlamellar organic sheets on flat pearl nacre. *Acta Biomaterialia*, 10(9):3986–3996, 2014.
- [4] K. Rückmann. Erarbeitung und Optimierung von Präparationsmethoden für frisch gewachsene „flat pearls“ und für frisch gespaltene Perlmutteroberflächen zur Beobachtung von Aragonit-Kristallisation und -Wachstum. Masterarbeit, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2019.
- [5] F. Heinemann, M. Launspach, K. Gries, M. Fritz. Gastropod nacre: structure, properties and growth - biological, chemical and physical basics. *Biophysical Chemistry*, 153(2-3):126–153, 2011.
- [6] J. Bezares, R. J. Asaro, M. Hawley. Macromolecular structure of the organic framework of nacre in *Haliotis rufescens*: implications for growth and mechanical behavior. *Journal of Structural Biology*, 163(1):61–75, 2008.
- [7] B. Aichmayer, P. Fratzl. Vielseitige Biominerale - Wie aus brüchigen Mineralen hochwertige Verbundmaterialien entstehen. *Physik Journal*, 9(4):33–38, 2010.
- [8] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, Y. Seki. Biological materials: structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*, 53(1):1–206, 2008.
- [9] M. Fritz, A. M. Belcher, M. Radmacher, D. A. Walters, P. K. Hansma, G. D. Stucky, D. E. Morse, S. Mann. Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates. *Nature*, 371(6492):49–51, 1994.

- [10] C. Behrens. Direkte Beobachtung von Kristallisation und Wachstum von Aragonitkristallen auf frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen - eine Rasterkraftmikroskopie-Studie. Bachelorarbeit, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2017.
- [11] <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/3667.pdf> Version: August 2022, Abruf: 19.08.2022.
- [12] A. von Gleich, S. Gößling-Reisemann (Hrsg). *Industrial Ecology: Erfolgreiche Wege zu nachhaltigen industriellen Systemen*. Vieweg + Teubner Verlag, 2008.
- [13] H. Du, E. Amstad. Wasser: Wie beeinflusst es die CaCO_3 -Bildung? *Angewandte Chemie*, 131:2–22, 2019.
- [14] K. Gries. Untersuchungen der Bildungsprozesse und der Struktur des Perlmutts von Abalonen. Dissertation, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2011.
- [15] M. Reuß. Beeinflussung der feinstkristallinen Ausscheidung von Calciumcarbonat (CaCO_3) durch Verfahrensparameter und die Dotierung mit ausgewählten Chloriden der Seltenen Erden. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Köln, 2003.
- [16] M. Okrusch, S. Matthes. *Mineralogie: Eine Einführung in die spezielle Mineralogie, Petrologie und Lagerstättenkunde*. 9. Auflage, Springer Spektrum, Springer-Verlag, 2014.
- [17] C. Horn. Das Kristallisationsverhalten übersättigter Calciumcarbonat-Lösungen an Aragonitkristall-Oberflächen, die nicht die (001)-Ebenen sind. Bachelorarbeit, Institut für Biophysik, Institut für Festkörperphysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2009.
- [18] K. Gries, R. Kröger, C. Kübel, M. Schowalter, M. Fritz, A. Rosenauer. Correlation of the orientation of stacked aragonite platelets in nacre and their connection via mineral bridges. *Ultramicroscopy*, 109(3):230–236, 2009.
- [19] M. Neumann. *Synthese und Charakterisierung von Calciumcarbonat-Phasen und Calciumphosphat-basierter Knochenersatzmaterialien*. Dissertation, Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, 2008.
- [20] H. Pauly. "Ikaite", a new mineral from Greenland. *Arctic*, 16(4):263–264, 1963.

- [21] N. Sánchez-Pastor, M. Oehlerich, J. M. Astilleros, M. Kaliwoda, C. C. Mayr, L. Fernández-Díaz, W. W. Schmahl. Crystallization of ikaite and its pseudomorphic transformation into calcite: Raman spectroscopy evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 175:271–281, 2016.
- [22] E. Tollefsen, T. Balic-Zunic, C.-M. Mörth, V. Brüchert, C. C. Lee, A. Skelton. Ikaite nucleation at 35°C challenges the use of glendonite as a paleotemperature indicator. *Scientific Reports*, 10(1):8141, 2020.
- [23] G. S. Dieckmann, G. Nehrke, S. Papadimitriou, J. Göttlicher, R. Steininger, H. Kennedy, D. Wolf-Gladrow, D. N. Thomas. Calcium carbonate as ikaite crystals in Antarctic sea ice. *Geophysical Research Letters*, 35(8):L08501, 2008.
- [24] G. S. Dieckmann, G. Nehrke, C. Uhlig, J. Göttlicher, S. Gerland, M. A. Granskog, D. N. Thomas. Brief Communication: ikaite ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) discovered in Arctic sea ice. *The Cryosphere*, 4(2):227–230, 2010.
- [25] M. Oehlerich, C. Mayr, E. Griesshaber, A. Lücke, O. M. Oeckler, C. Ohlendorf, W. W. Schmahl, B. Zolitschka. Ikaite precipitation in a lacustrine environment - implications for palaeoclimatic studies using carbonates from Laguna Potrok Aike (Patagonia, Argentina). *Quaternary Science Reviews*, 71:46–53, 2013.
- [26] A. Mallick, S. Saha, P. Pachfule, S. Roy, R. Banerjee. Selective CO_2 and H_2 adsorption in a chiral magnesium-based metal organic framework (Mg-MOF) with open metal sites. *Journal of Materials Chemistry*, 20(41):9073–9080, 2010.
- [27] L. Zhao, D. Sui, Y. Wang. Luminescent properties of N-salicylidene-3-aminopyridine and selective sensing behavior to Ba^{2+} . *Journal of Luminescence*, 162:81–86, 2015.
- [28] M. De La Pierre, C. Carteret, L. Maschio, E. André, R. Orlando, R. Dovesi. The Raman spectrum of CaCO_3 polymorphs calcite and aragonite: a combined experimental and computational study. *The Journal of Chemical Physics*, 140(16):164509, 2014.
- [29] S. Schultheiß. Pseudomorphe Mineralumwandlung von Calcit, Dolomit, Magnesit und Witherit. Dissertation, Fachbereich 11 - Material- und Geowissenschaften, Technische Universität Darmstadt, 2013.
- [30] F. H. Pough. *A Field Guide to Rocks and Minerals*. 5. Auflage, Houghton Mifflin Company, 1996.

- [31] T. McCann, M. V. Manhego. *Geologie im Gelände: Das Outdoor-Handbuch*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
- [32] J. Grotzinger, T. Jordan. *Press/Siever: Allgemeine Geologie*. 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016.
- [33] F. Neukirchen, G. Ries. *Die Welt der Rohstoffe: Lagerstätten, Förderung und wirtschaftliche Aspekte*. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016.
- [34] A. Rodriguez-Navarro, C. Jimenez-Lopez, A. Hernandez-Hernandez, A. Checa, J. M. García-Ruiz. Nanocrystalline structures in calcium carbonate biominerals. *Journal of Nanophotonics*, 2(1):021935, 2008.
- [35] S. Mann. *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, 2001.
- [36] F. Ragazzola, L. C. Foster, C. J. Jones, T. B. Scott, J. Fietzke, M. R. Kilburn, D. N. Schmidt. Impact of high CO₂ on the geochemistry of the coralline algae *Lithothamnion glaciale*. *Scientific Reports*, 6(20572), 2016.
- [37] H. Nebel. Kontrollierte Fällung von CaCO₃ in einem modular aufgebauten Kristallisationsreaktor. Dissertation, Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, 2008.
- [38] J. Aizenberg, A. Tkachenko, S. Weiner, L. Addadi, G. Hendler. Calcitic microlenses as part of the photoreceptor system in brittlestars. *Nature*, 412(6849):819–822, 2001.
- [39] E. Hoffmann. *Evolution der Erde und des Lebens: Von der Urzelle zum Homo Sapiens*. Deutschland - Books on Demand, 2015.
- [40] K. Zilles, B. N. Tillmann. *Anatomie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- [41] T. Schlotterbach. Präzipitiertes Calciumcarbonat mit aragonitischer Morphologie aus dem Rekaustifizierungsprozess. Diplomarbeit, Institut für Papier-, Zellstoff- und Fasertechnik, Technische Universität Graz, 2011.
- [42] T. J. Goreau, W. Hilbertz. Chapter 4: Reef restoration using seawater electrolysis in Jamaica (pp. 35-46). In T. J. Goreau & R. K. Trench (Eds.), *Innovative methods of marine ecosystem restoration*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2013.

- [43] T. J. Goreau, W. Hilbertz, A. Azeez, A. Hakeem, J. Allen. Shore protection, beach formation, and production of building materials and energy using seawater electrolysis technology. *Oceans 2003. Celebrating the Past ... Teaming Toward the Future, IEEE*, 5:2366, 2003.
- [44] P. D. Kaempfe. Kristallisation, Modifikation und Adsorptionseigenschaften von Calciumcarbonat sowie Untersuchung eines oszillierenden Kristallisationssystems. Dissertation, Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, 2011.
- [45] M. Gienger. *Lexikon der Heilsteine: von Achat bis Zoisit*. Neue Erde GmbH, 2016.
- [46] M. J. Packard, G. C. Packard. Structure of the shell and tertiary membranes of eggs of softshell turtles (*Trionyx spiniferus*). *Journal of Morphology*, 159(1):131–143, 1979.
- [47] S. E. Solomon, T. Baird. Studies on the egg shell (oviducal and oviposited) of *Chelonia mydas* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 22(2):145–160, 1976.
- [48] I. J. Domart-Coulon, D. C. Elbert, E. P. Scully, P. S. Calimlim, G. K. Ostrander. Aragonite crystallization in primary cell cultures of multicellular isolates from a hard coral, *Pocillopora damicornis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21):11885–11890, 2001.
- [49] M. Ibsch, R. H. Anken, H. Rahmann. Calcium gradients in the fish inner ear sensory epithelium and otolithic membrane visualized by energy filtering transmission electron microscopy (EFTEM). *Advances in Space Research*, 33(8):1395–1400, 2004.
- [50] H. Shindo, M. Kwak. Stabilities of crystal faces of aragonite (CaCO_3) compared by atomic force microscopic observation of facet formation processes in aqueous acetic acid. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7(4):691–696, 2005.
- [51] C. J. Stephens, Y.-Y. Kim, S. D. Evans, F. C. Meldrum, H. K. Christenson. Early stages of crystallization of calcium carbonate revealed in picoliter droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 133(14):5210–5213, 2011.
- [52] M. Balz. Investigations of cooperative interactions in template induced crystallization processes and kinetic studies of nucleation and growth by small-angle neutron scattering. Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2004.

- [53] M. L. Whittaker, P. M. Dove, D. Joester. Nucleation on surfaces and in confinement. *MRS Bulletin*, 41(5):388–392, 2016.
- [54] M. Zeng, Y.-Y. Kim, C. Anduix-Canto, C. Frontera, D. Laundry, N. Kapur, H. K. Christenson, F. C. Meldrum. Confinement generates single-crystal aragonite rods at room temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(30):7670–7675, 2018.
- [55] S. R. Kamhi. On the structure of vaterite CaCO_3 . *Acta Crystallographica*, 16(8):770–772, 1963.
- [56] S. J. Day, S. P. Thompson, J. E. Parker, A. Evans. Non-aqueous formation of the calcium carbonate polymorph vaterite: astrophysical implications. *Astronomy & Astrophysics*, 553(A68):1–10, 2013.
- [57] D. L. G. Rowlands, R. K. Webster. Precipitation of vaterite in lake water. *Nature Physical Science*, 229(5):158, 1971.
- [58] H. A. Lowenstam, D. P. Abbott. Vaterite: a mineralization product of the hard tissues of a marine organism (Ascidacea). *Science*, 188(4186):363–365, 1975.
- [59] R. W. Gauldie. Vaterite otoliths from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20(2):209–217, 1986.
- [60] R. W. Gauldie. Polymorphic crystalline structure of fish otoliths. *Journal of Morphology*, 218(1):1–28, 1993.
- [61] D. J. Sutor, S. E. Wooley. Gallstone of unusual composition: calcite, aragonite, and vaterite. *Science*, 159(3819):1113–1114, 1968.
- [62] W. Kleber, H.-J. Bautsch, J. Bohm; bearbeitet von J. Bohm, D. Klimm. *Einführung in die Kristallographie*. 19. Auflage, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2010.
- [63] W. Ostwald. Studien über die Bildung und Umwandlung fester Körper. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 22U(1):289–330, 1897.
- [64] A. L. Goodwin, F. M. Michel, B. L. Phillips, D. A. Keen, M. T. Dove, R. J. Reeder. Nanoporous structure and medium-range order in synthetic amorphous calcium carbonate. *Chemistry of Materials*, 22(10):3197–3205, 2010.
- [65] M. H. Nielsen, S. Aloni, J. J. De Yoreo. In situ TEM imaging of CaCO_3 nucleation reveals coexistence of direct and indirect pathways. *Science*, 345(6201):1158–1162, 2014.

- [66] M. Albéric, L. Bertinetti, Z. Zou, P. Fratzl, W. Habraken, Y. Politi. The crystallization of amorphous calcium carbonate is kinetically governed by ion impurities and water. *Advanced Science*, 5(5):1701000, 2018.
- [67] Z. Zou, L. Bertinetti, Y. Politi, A. C. S. Jensen, S. Weiner, L. Addadi, P. Fratzl, W. J. E. M. Habraken. Opposite particle size effect on amorphous calcium carbonate crystallization in water and during heating in air. *Chemistry of Materials*, 27(12):4237–4246, 2015.
- [68] X. Xu, J. T. Han, D. H. Kim, K. Cho. Two modes of transformation of amorphous calcium carbonate films in air. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(6):2764–2770, 2006.
- [69] F. C. Meldrum. Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry. *International Materials Reviews*, 48(3):187–224, 2003.
- [70] G. Montanari, J. D. Rodriguez-Blanco, N. Bovet, S. L. S. Stipp, D. J. Tobler. Impact of citrate ions on the nucleation and growth of anhydrous CaCO_3 . *Crystal Growth & Design*, 17(10):5269–5275, 2017.
- [71] P. J. M. Smeets, K. R. Cho, R. G. E. Kempen, N. A. J. M. Sommerdijk, J. J. De Yoreo. Calcium carbonate nucleation driven by ion binding in a biomimetic matrix revealed by in situ electron microscopy. *Nature Materials*, 14:394–399, 2015.
- [72] X. Li, Z.-H. Xu, R. Wang. In situ observation of nanograin rotation and deformation in nacre. *Nano Letters*, 6(10):2301–2304, 2006.
- [73] I. M. Weiss, C. Renner, M. G. Strigl, M. Fritz. A simple and reliable method for the determination and localization of chitin in abalone nacre. *Chemistry of Materials*, 14(8):3252–3259, 2002.
- [74] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry - A European Journal*, 12(4):980–987, 2006.
- [75] F. Bouville. Strong and tough nacre-like aluminas: process-structure-performance relationships and position within the nacre-inspired composite landscape. *Journal of Materials Research*, 35:1076–1094, 2020.
- [76] B. J. F. Bruet, H. J. Qi, M. C. Boyce, R. Panas, K. Tai, L. Frick, C. Ortiz. Nanoscale morphology and indentation of individual nacre tablets from the gastropod mollusc *Trochus niloticus*. *Journal of Materials Research*, 20:2400–2419, 2005.

- [77] N. Yao, A. K. Epstein, W. W. Liu, F. Sauer, N. Yang. Organic-inorganic interfaces and spiral growth in nacre. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(33):367–376, 2009.
- [78] S. Alghamdi, T. Tan, C. Hale-Sills, F. Vilmont, T. Xia, J. Yang, D. Huston, M. Dewoolkar. Catastrophic failure of nacre under pure shear stresses of torsion. *Scientific Reports*, 7(1):1–7, 2017.
- [79] G. Falini, S. Fermani, A. Ripamonti. Crystallization of calcium carbonate salts into beta-chitin scaffold. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(3):475–480, 2002.
- [80] S. Weiner, W. Traub. X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 111(2):311–316, 1980.
- [81] S. Weiner, Y. Talmon, W. Traub. Electron diffraction of mollusc shell organic matrices and their relationship to the mineral phase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5(6):325–328, 1983.
- [82] F. Nudelman, B. A. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *Journal of Structural Biology*, 153(2):176–187, 2006.
- [83] [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001206\(03\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001206(03).pdf). Version: Januar 2022, Abruf: 11.01.2022.
- [84] M. Gummich. Charakterisierung biomineralisierender Proteine aus dem Proteom der Meeresschnecke *Haliothis laevigata*. Dissertation, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2013.
- [85] K. Mann, F. Siedler, L. Treccani, F. Heinemann, M. Fritz. Perlinhibin, a cysteine-, histidine-, and arginine-rich miniprotein from abalone (*Haliothis laevigata*) nacre, inhibits in vitro calcium carbonate crystallization. *Biophysical Journal*, 93(4):1246–1254, 2007.
- [86] G. Fu, S. Valiyaveetil, B. Wopenka, D. E. Morse. CaCO₃ biomineralization: acidic 8-kDa proteins isolated from aragonitic abalone shell nacre can specifically modify calcite crystal morphology. *Biomacromolecules*, 6(3):1289–1298, 2005.
- [87] F. Heinemann, M. Gummich, M. Radmacher, M. Fritz. Modification of CaCO₃ precipitation rates by water-soluble nacre proteins. *Materials Science and Engineering: C*, 31(2):99–105, 2011.

- [88] F. Heinemann, L. Treccani, M. Fritz. Abalone nacre insoluble matrix induces growth of flat and oriented aragonite crystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1):45–49, 2006.
- [89] K. Gries, F. Heinemann, M. Gummich, A. Ziegler, A. Rosenauer, M. Fritz. Influence of the insoluble and soluble matrix of abalone nacre on the growth of calcium carbonate crystals. *Crystal Growth & Design*, 11(3):729–734, 2011.
- [90] H. Rademaker, M. Launspach. Detection of interaction between biomineralising proteins and calcium carbonate microcrystals. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2:222–227, 2011.
- [91] I. M. Weiss, S. Kaufmann, K. Mann, M. Fritz. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267(1):17–21, 2000.
- [92] K. Mann, I. M. Weiss, S. André, H.-J. Gabius, M. Fritz. The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin. *European Journal of Biochemistry*, 267(16):5257–5264, 2000.
- [93] T. Dodenhof, F. Dietz, S. Franken, I. Grunwald, S. Kelm. Splice variants of Perlucin from *Haliotis laevigata* modulate the crystallisation of CaCO_3 . *PLoS One*, 9(5):e97126, 2014.
- [94] K. Dörr. Regulation von Kalziumsignalen im Immunsystem. Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes, 2015.
- [95] M. T. Hincke, C. P. W. Tsang, M. Courtney, V. Hill, R. Narbaitz. Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). *Calcified Tissue International*, 56(6):578–583, 1995.
- [96] J. A. Bertrand, D. Pignol, J.-P. Bernard, J.-M. Verdier, J.-C. Dagorn, J. C. Fontecilla-Camps. Crystal structure of human lithostathine, the pancreatic inhibitor of stone formation. *The EMBO Journal*, 15(11):2678–2684, 1996.
- [97] S. Blank, M. Arnoldi, S. Khoshnavaz, L. Treccani, M. Kuntz, K. Mann, G. Grathwohl, M. Fritz. The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *Journal of Microscopy*, 212(3):280–291, 2003.

- [98] I. M. Weiss, W. Göhring, M. Fritz, K. Mann. Perlustrin, a *Haliotis laevis* (abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2):244–249, 2001.
- [99] L. Treccani, K. Mann, F. Heinemann, M. Fritz. Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophysical Journal*, 91(7):2601–2608, 2006.
- [100] X. Shen, A. M. Belcher, P. K. Hansma, G. D. Stucky, D. E. Morse. Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51):32472–32481, 1997.
- [101] G. Fu, S. R. Qiu, C. A. Orme, D. E. Morse, J. J. De Yoreo. Acceleration of calcite kinetics by abalone nacre proteins. *Advanced Materials*, 17(22):2678–2683, 2005.
- [102] M. Michenfelder, G. Fu, C. Lawrence, J. C. Weaver, B. A. Wustman, L. Taranto, J. S. Evans, D. E. Morse. Characterization of two molluscan crystal-modulating biomineralization proteins and identification of putative mineral binding domains. *Biopolymers*, 70(4):522–533, 2003.
- [103] M. Suzuki, K. Saruwatari, T. Kogure, Y. Yamamoto, T. Nishimura, T. Kato, H. Nagasawa. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science*, 325(5946):1388–1390, 2009.
- [104] H. Miyamoto, T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, A. Matsushiro. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18):9657–9660, 1996.
- [105] H. Miyamoto, F. Miyoshi, J. Kohno. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zoological Science*, 22(3):311–315, 2005.
- [106] M. A. Crenshaw. The inorganic composition of molluscan extrapallial fluid. *The Biological Bulletin*, 143(3):506–512, 1972.
- [107] H. K. Erben, N. Watabe. Crystal formation and growth in bivalve nacre. *Nature*, 248(5444):128–130, 1974.

- [108] I. Bertini, H. B. Gray, E. I. Stiefel, J. S. Valentine (Hrsg.). *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*. University Science Books, 2007.
- [109] S. Weiner. Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcified Tissue International*, 29(2):163–167, 1979.
- [110] S. Weiner, L. Hood. Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. *Science*, 190(4218):987–989, 1975.
- [111] T. E. Schäffer, C. Ionescu-Zanetti, R. Proksch, M. Fritz, D. A. Walters, N. Almqvist, C. M. Zaremba, A. M. Belcher, B. L. Smith, G. D. Stucky, D. E. Morse, P. K. Hansma. Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges? *Chemistry of Materials*, 9(8):1731–1740, 1997.
- [112] E. M. Greenfield, D. C. Wilson, M. A. Crenshaw. Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix. *American Zoologist*, 24(4):925–932, 1984.
- [113] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner. Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Advanced Materials*, 15(12):959–970, 2003.
- [114] A. H. Pfund. The colors of mother-of-pearl. *Journal of the Franklin Institute*, 183(4):453–464, 1917.
- [115] S. Kinoshita, S. Yoshioka, J. Miyazaki. Physics of structural colors. *Reports on Progress in Physics*, 71(7):1–30, 2008.
- [116] W. L. Bragg. The refractive indices of calcite and aragonite. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 105(732):370–386, 1924.
- [117] M. R. Snow, A. Pring. The mineralogical microstructure of shells: part 2. The iridescence colors of abalone shells. *American Mineralogist*, 90(11-12):1705–1711, 2005.
- [118] M. R. Snow, A. Pring, P. Self, D. Losic, J. Shapter. The origin of the color of pearls in iridescence from nano-composite structures of the nacre. *American Mineralogist*, 89(10):1353–1358, 2004.
- [119] L. Treccani. Protein-Mineral Interaction of Purified Nacre Proteins with Calcium Carbonate Crystals. Dissertation, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2006.

- [120] G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986.
- [121] K. Lämmle. *Rasterkraftmikroskopie und -spektroskopie am magnetischen Molekül Co-Salen*. Cuvillier Verlag Göttingen, 2011.
- [122] <https://www.brukerafmprobes.com/p-3954-peakforce-hirs-f-a.aspx>, Version: Februar 2022, Abruf: 20.02.2022.
- [123] <https://www.brukerafmprobes.com/p-3726-scanasyst-air.aspx>, Version: Februar 2022, Abruf: 20.02.2022.
- [124] H. Xie, J. Vitard, D. S. Haliyo, S. Régnier. Enhanced accuracy of force application for AFM nanomanipulation using nonlinear calibration of optical levers. *IEEE Sensors Journal*, 8(8):1478–1485, 2008.
- [125] T. Fauster, L. Hammer, K. Heinz, M. A. Schneider. *Oberflächenphysik: Grundlagen und Methoden*. 2. Auflage, De Gruyter Studium, 2019.
- [126] A. Kwaśniewska, M. Świetlicki, A. Prószyński, G. Gladyszewski. The quantitative nanomechanical mapping of starch/kaolin film surfaces by Peak Force AFM. *Polymers*, 13(2):244–254, 2021.
- [127] <https://www.bruker.com/de/meta/forms/bns-form-pages/brochures/afmi/bioscope-resolve.html> Version: Oktober 2022, Abruf: 21.10.2022.
- [128] R. W. Kelsall, I. W. Hamley, M. Geoghegan (Eds.). *Nanoscale science and technology*. John Wiley & Sons Ltd., 2005.
- [129] K. Bender. *Entwicklung und Charakterisierung verschiedener biomimetischer Lipidmembransysteme zur Untersuchung von Membranproteinen*. Cuvillier Verlag Göttingen, 2005.
- [130] M. Lohrmann. *Adhäsionskräfte in interaktiven Mischungen für Pulverinhalatoren*. Cuvillier Verlag Göttingen, 2005.
- [131] M. Blab. Ladungstransportmessungen an Si(111)-Oberflächen mit einem Multi-spitzen-Rastertunnelmikroskop. Dissertation, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. *Schriften des Forschungszentrums Jülich: Reihe Schlüsseltechnologien*, 93, 2014.

- [132] T. Herzog. *Untersuchungen zum Verhalten selbstorganisierter metallischer Nanoteilchen*. Herbert Utz Verlag, 2000.
- [133] K. Xu, W. Sun, Y. Shao, F. Wei, X. Zhang, W. Wang, P. Li. Recent development of PeakForce Tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience. *Nanotechnology Reviews*, 7(6):605–621, 2018.
- [134] S. N. Nahar, A. J. M. Schmets, G. Schitter, A. Scarpas. Quantitative nanomechanical property mapping of bitumen micro-phases by peak-force atomic force microscopy. *Asphalt Pavements - Proceedings of the International Conference on Asphalt Pavements ISAP 2014*, 2, 2014.
- [135] <https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/PeakForceQNM/Operation/OperatingPrinciples.htm> Version: Oktober 2022, Abruf: 22.10.2022.
- [136] <https://www.brukerafmprobes.com/c-284-peakforce-qnm.aspx> Version: Oktober 2022, Abruf: 22.10.2022.
- [137] <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microscopes/materials-afm/afm-modes/peakforce-tapping.html>, Version: Oktober 2022, Abruf: 22.10.2022.
- [138] <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3011> Version: Oktober 2022, Abruf: 22.10.2022.
- [139] A. H. Ostadrahimi. Untersuchungen mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) an Oberflächen von amorphen und kristallinen Festkörpern. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2002. <https://d-nb.info/967083427/34>, Abruf: 22.10.2022.
- [140] T. Henze. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an dünnen epitaktisch kristallisierten Filmen des Polyethylens. Dissertation, Institut für Physik, Naturwissenschaftliche Fakultät II - Chemie, Physik und Mathematik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2010. <https://d-nb.info/1025230531/34>, 2010, Abruf: 22.10.2022.
- [141] <https://mmrc.caltech.edu/AFM%20Dimension%20Icon/Bruker%20Training/004-1036-000%20PEAKFORCE%20QNM%20USERS%20GUIDE-F.pdf> Version: Oktober 2022, Abruf: 21.10.2022.
- [142] M. Mulisch, U. Welsch (Hrsg.). *Romeis - Mikroskopische Technik*. 18. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Springer Spektrum, 2010.

- [143] M. Mulisch, U. Welsch (Hrsg.). *Romeis - Mikroskopische Technik*. 19. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Springer Spektrum, 2015.
- [144] M. Rost. *Vakuumelektronik: Zwischen Elektronenröhre und Ionentriebwerk*. De Gruyter Oldenbourg, 2019.
- [145] http://positron.physik.uni-halle.de/F-Praktikum/PDF/V17_Reimer_Schmidt.pdf, Version: August 2022, Abruf: 19.08.2022.
- [146] A. Linnemann, S. Kühl (Hrsg.). *Grundlagen der Licht- und Elektronenmikroskopie*. UTB GmbH, 2017.
- [147] L. Reimer, G. Pfefferkorn. *Raster-Elektronenmikroskopie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1973.
- [148] Carl Zeiss NTS GmbH. *AURIGA[®] series - Modular CrossBeam[®] workstation, Instruction Manual*, 2010.
- [149] S. Hasse. *Gefüge der Gusseisenlegierungen*. Schiele & Schön, 2007.
- [150] http://www.rochester.edu/urnano/assets/pdf/sem_fib_zeiss_auriga_manual.pdf, Version: August 2022, Abruf: 19.08.2022.
- [151] G. H. Michler. *Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie: Techniken, Stand, Anwendungen, Perspektiven*. Springer Fachmedien Wiesbaden, 2019.
- [152] L. Reimer. *Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1985.
- [153] D. J. Stokes. *Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM)*. John Wiley & Sons Ltd, 2008.
- [154] https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527319735_c01.pdf, Version: August 2022, Abruf: 18.08.2022.
- [155] H. Biermann, L. Krüger (Hrsg.). *Moderne Methoden der Werkstoffprüfung*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015.
- [156] J. Costard. Einfluss von Mikrostruktur und Materialparametern auf die Leistungsfähigkeit poröser Elektroden für Lithium-Ionen Batterien. Dissertation, Institut für Angewandte Materialien - Werkstoffe der Elektrotechnik (IAM-WET), Karlsruher Institut für Technologie, 2018.

- [157] B. G. Yacobi, D. B. Holt, L. L. Kazmerski (Hrsg.). *Microanalysis of solids*. Springer Science + Business Media LLC, 1994.
- [158] A. Ul-Hamid. *A beginners' guide to scanning electron microscopy*. Springer Nature Switzerland AG, 2018.
- [159] <https://d-nb.info/1078649677/34>, Version: August 2022, Abruf: 27.08.2022.
- [160] https://www.ruhr-uni-bochum.de/pc1/mam/content/publikation/bachelor/bachelor_jusufagic.pdf, Version: August 2022, Abruf: 21.08.2022.
- [161] F. Gyger. *Mikroemulsionen mit flüssigem Ammoniak und ihre Verwendung zur Synthese von Nanomaterialien*. Cuvillier Verlag Göttingen, 2013.
- [162] <https://www.osim.uni-jena.de/osimmedia/osim/downloads-studium/praktikum/werkstoffwissenschaft/gw6-rasterelektronenmikroskopie-va-2020.pdf>, Version: August 2022, Abruf: 20.08.2022.
- [163] S. Gilles. Nanoimprint-Lithographie als Methode zur chemischen Oberflächenstrukturierung für Anwendungen in der Bioelektronik. Dissertation, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. *Schriften des Forschungszentrums Jülich: Reihe Schlüsseltechnologien*, 19, 2010.
- [164] <https://www.tf.uni-kiel.de/servicezentrum/neutral/praktika/anleitungen/b504.pdf>, Version: August 2022, Abruf: 19.08.2022.
- [165] S. G. Maas. *Optimierung trägerbasierter Pulverinhalate durch Modifikation der Trägeroberfläche mittels Sprühtrocknung*. Cuvillier Verlag Göttingen, 2009.
- [166] J. Auerswald, P. Portmann. *Grundlagen der Funktionswerkstoffe für Studium und Praxis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2021.
- [167] M. D. McCluskey, E. E. Haller. *Dopants and defects in semiconductors*. CRC Press Taylor & Francis Group, 2018.
- [168] Z. Klußmann. Untersuchungen zur Fehlerquellenidentifikation an Stahlproben durch Nutzung des SILENOS-Prüfsystems. Masterarbeit, Lehrstuhl für Eisen- und Stahlmetallurgie, Montanuniversität Leoben, 2016.
- [169] http://www.iitk.ac.in/meesa/SEM/SEM_manual.pdf, Version: August 2022, Abruf: 19.08.2022.

- [170] http://www.tssmicroscopy.com/wp-content/uploads/2017/06/ULTRA_Brochure.pdf, Version: August 2022, Abruf: 19.08.2022.
- [171] M. Launspach. Unveröffentlicht, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen.
- [172] C. Behrens. Unveröffentlicht, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen.
- [173] M. Gummich. Protokoll für die Präparation der Proteine der löslichen organischen Matrix, Version 23.11.2016. Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen.
- [174] Carl Roth GmbH + Co. KG. *CoomassieTM Brilliant Blau - Mechanismus von Proteinfärbung und Bradford-Assay*, <https://www.carlroth.com/medias/Infobroschuere-CoomassieGelfaerbungUndBradford-DE.pdf?context=bWFzdGVyfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50c3wyMzY1NTZ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50cy9oZTQvaGYzLzkwMzQ4NDcwMjcyMzAucGRmfGMvMTEeYzUxYTY2MjZkNzIwNmUyNjU0MTc4MDViZmQxNjMyZjk2NzczMDgwM2U3OTRkMzBhNmVlMmNhYTk2ODg>, Version: Juni 2022, Abruf: 03.06.2022.
- [175] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976.
- [176] G. Richter. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*. Georg Thieme Verlag, 2003.
- [177] T. Albusat. *Synthese und Anwendungen funktionalisierter Polyrotaxane in biologischen Systemen*. Dissertation, Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III (Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften), Universität des Saarlandes, 2013.
- [178] https://kipdf.com/bioscope-resolve-the-most-advanced-afm-for-life-science-research-andrea-slade-ph_5b0f2d477f8b9acd088b4611.html, Version: Januar 2022, Abruf: 06.01.2022.
- [179] M. Görlich. Rasterkraftmikroskopie an weichen Materialien. Dissertation, Fachbereich Physik, Universität Osnabrück, 2003.

- [180] M. Fritz, D. E. Morse. The formation of highly organized biogenic polymer/ceramic composite materials: the high-performance microaluminate of molluscan nacre. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3(1):55–62, 1998.
- [181] M. Raposo, Q. Ferreira, P. A. Ribeiro. A guide for atomic force microscopy analysis of soft condensed matter. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 1, 2007.
- [182] E. E. Flater, G. E. Zacharakis-Jutz, B. G. Dumba, I. A. White, C. A. Clifford. Towards easy and reliable AFM tip shape determination using blind tip reconstruction. *Ultramicroscopy*, 146:130–143, 2014.
- [183] V. V. Tsukruk, S. Singamaneni. *Scanning probe microscopy of soft matter: fundamentals and practices*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [184] A. M. Baró, R. G. Reifenberger (Hrsg.). *Atomic force microscopy in liquid: biological applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [185] P. C. Braga, D. Ricci (Hrsg.). *Atomic force microscopy: biomedical methods and applications*. Methods in molecular biology (part: 242). Humana Press Inc., 2004.
- [186] S. Peter, N. Lyczko, D. Gopakumar, H. J. Maria, A. Nzihou, S. Thomas. Chitin and chitosan based composites for energy and environmental applications: a review. *Waste and Biomass Valorization*, 12:4777–4804, 2021.
- [187] W. Lindenthal, M. Schlaak, E. Siefert. Bestimmung des Acetylierungsgrades (DA) von Chitin bzw. Chitosan - Entwicklung eines einfachen Verfahrens für Reihenuntersuchungen. GIT Labor-Fachzeitschrift, 03/2009, https://helmuth-focken-biotechnik.de/wp-content/uploads/Lindenthal_GIT0309.pdf, Abruf: 08.01.2022.
- [188] H. Sashiwa, H. Izawa (Hrsg.). *Marine Chitin 2019*. MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020.
- [189] R. Marks, G. C. Thielmann, E. Bastisch, I. Bornkampf, A. Siol, D. Soevejarto, I. Eilks, W. Gräber. Chitin und Chitosan - Fachliche Grundlagen, Experimente und die Kooperation mit außerschulischen Partnern und Lernorten (Teil 1). *Der Mathematische und Naturwissenschaftliche Unterricht*, 63(6):359–366, 2010.
- [190] S. Nikolov, H. Fabritius, M. Petrov, M. Friák, L. Lymperakis, C. Sachs, D. Raabe, J. Neugebauer. Robustness and optimal use of design principles of arthropod

- exoskeletons studied by ab initio-based multiscale simulations. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(2):129–145, 2011.
- [191] N. S. Gupta (Hrsg.). *Chitin: formation and diagenesis*. Springer Dordrecht, 2011.
- [192] M.-M. Giraud-Guille, H. Chanzy, R. Vuong. Chitin crystals in arthropod cuticles revealed by diffraction contrast transmission electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 103(3):232–240, 1990.
- [193] P. J. Barón, M. E. Ré. Morphometry of the northern Patagonian sympatric populations of *Loligo sanpaulensis* and *Loligo gahi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82(2):269–278, 2002.
- [194] S. Weiner, W. Traub. Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 304(1121):425–434, 1984.
- [195] M. Gummich. Protokoll für die Durchführung der SDS-PAGE, Version 23.11.2016. Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen.

9 Publikationen und Vorträge

1. Malte Launspach, Klaudia Rückmann, Meike Gummich, Hanna Rademaker, Holger Doschke, Manfred Radmacher, Monika Fritz. Immobilisation and characterisation of the demineralised, fully hydrated organic matrix of nacre - an atomic force microscopy study. *Micron*, 43(12):1351-1363, 2012, DOI: 10.1016/j.micron.2012.03.014.

2. Klaudia Rückmann. Immobilisierung und Charakterisierung der demineralisierten, vollständig hydrierten organischen Matrix aus dem biogenen Polymer-Mineral Verbundmaterial Perlmutter. Bachelorarbeit, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2012.

3. Klaudia Rückmann, Malte Launspach, Meike Gummich, Manfred Radmacher, Monika Fritz. Topographical and mechanical characteristics of the fully hydrated organic matrix from demineralised and flat pearl nacre studied by atomic force microscopy. Vortrag, 12th International Symposium on Biomineralization (BIOMIN 12), Freiberg, Deutschland, 2013.

4. Klaudia Rückmann, Christoph Behrens, Eva-Maria Meyer, Manfred Radmacher, Monika Fritz. Structure and growth processes of freshly grown flat pearl nacre and freshly cleaved nacre surfaces of the gastropod *Haliotis tuberculata* studied by atomic force microscopy. Poster, Dies Academicus, Universität Bremen, Deutschland, 2017.

5. Meike Gummich, Klaudia Rückmann, Wilhelm Hagen, Monika Fritz. Vergleichende Untersuchung von Exoskeletten verschiedener Copepodenarten. Poster, Dies Academicus, Universität Bremen, Deutschland, 2017.

6. Klaudia Rückmann, Erarbeitung und Optimierung von Präparationsmethoden für frisch gewachsene „flat pearls“ und für frisch gespaltene Perlmutteroberflächen zur Beobachtung von Aragonit-Kristallisation und -Wachstum. Masterarbeit, Institut für Biophysik, Fachbereich 1 - Physik und Elektrotechnik, Universität Bremen, 2019.

7. Klaudia Rückmann, Julia Körner. Calcium carbonate and smart hydrogels - a potential combination?. Vortrag, Scientific Colloquium, Dresden, Deutschland, 2020.

8. Klaudia Rückmann, Guannan Mu, Hsuan-Yu Leu, Jules Magda, Florian Solzbacher, Christopher F. Reiche, Julia Körner. Real-time measurement of smart hydrogel swelling dynamics based on direct optical detection of cross-sectional area changes. Poster, European Biosensors Symposium (EBS), Wildau (virtuell), Deutschland, 2021.
9. Klaudia Rückmann, Guannan Mu, Jules Magda, Florian Solzbacher, Christopher F. Reiche, Julia Körner. An optical characterization method for determination of dynamic properties of smart hydrogels. Vortrag, TechConnect Europe, Malmö, Schweden, 2021.
10. Klaudia Rückmann, Raoul G. C. Middendorff, Julia Körner. Herstellung und Charakterisierung von smarten thermosensitiven Hydrogelen mit eingebetteten Gold- und Silber-Nanopartikeln. Vortrag, 15. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden (virtuell), Deutschland, 2021, DOI: 10.5162/15dss2021/6.2.
11. Guannan Mu, Klaudia Rückmann, Julia Körner. Charakterisierung der Quelldynamiken von smarten Hydrogelen mittels direkter optischer Erfassung. Poster, 15. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden (virtuell), Deutschland, 2021, DOI: 10.5162/15dss2021/P9.1.
12. Klaudia Rückmann, Guannan Mu, Jules J. Magda, Florian Solzbacher, Christopher F. Reiche, Julia Körner. A reliable and easy-to-implement optical characterization method for dynamic and static properties of smart hydrogels. *Polymer*, 246:124713, 2022, DOI: 10.1016/j.polymer.2022.124713.
13. Klaudia Rückmann, Julia Körner. Modification of thermo-responsive smart hydrogels by embedding prefabricated gold and silver nanoparticles. Vortrag, Materials Research Society[®] (MRS[®]) Spring Meeting, Honolulu, Hawaii, 2022.
14. Guannan Mu, Klaudia Rückmann, Julia Körner. A simple optical characterization method for 3D analysis of dynamic swelling properties of stimuli-responsive hydrogels. Poster, MNE Euroensors, Leuven, Belgien, 2022.
15. Klaudia Rückmann, Raoul G. C. Middendorff, Zahra Salehimoghaddam, Julia Körner. Property modification of thermo-sensitive smart PNIPAAm hydrogels by embedding of prefabricated metallic nanoparticles. Poster, MNE Euroensors, Leuven, Belgien, 2022.

10 Anhang

10.1 Spezifikationen der verwendeten AFM-Sonden

Für die AFM-Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop BioScope Resolve™ der Firma Bruker²⁶³ wurden zwei verschiedene AFM-Sonden genutzt: (1) PeakForce-HiRs-F-A und (2) ScanAsyst-Air. Die Spezifikationen dieser AFM-Sonden sind im Folgenden detailliert beschrieben.

PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden

Der Cantilever, auf dessen Rückseite sich eine Schicht aus reflektierendem Gold befindet, besteht aus Siliziumnitrid (Si_3N_4). Die genauen Spezifikationen des Cantilevers und der Spitze der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden sind in der Tabelle 17 aufgelistet.

(A) Cantilever			
	nominal	minimal	maximal
Resonanzfrequenz an Luft in kHz	165	130	200
Federkonstante in $\frac{\text{N}}{\text{m}}$	0,35	0,15	0,60
Länge in μm	36	34	38
Breite in μm	16,0	14,5	17,5
Dicke in μm	0,310	0,303	0,317

(B) Spitze	
Höhe in μm	3 – 8
Front Angle (FA) in $^\circ$	15
Back Angle (BA) in $^\circ$	25
Radius in nm	nominal: 1 maximal: 2

Tabelle 17: Detaillierte Spezifikationen **(A)** des Cantilevers und **(B)** der Spitze der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden aus [122].

ScanAsyst-Air AFM-Sonden

Der Cantilever besteht ebenfalls aus Siliziumnitrid (Si_3N_4) und ist auf der Rückseite mit reflektierendem Aluminium beschichtet. Die Spezifikationen des Cantilevers und der Spitze der ScanAsyst-Air AFM-Sonden sind in der Tabelle 18 zusammengefasst.

²⁶³Billerica, MA, USA

(A) Cantilever			
	nominal	minimal	maximal
Resonanzfrequenz an Luft in kHz	70	45	95
Federkonstante in $\frac{\text{N}}{\text{m}}$	0,40	0,20	0,80
Länge in μm	115	100	130
Breite in μm	25	20	30
Dicke in μm	0,65	0,60	0,70

(B) Spitze	
Höhe in μm	2,5 – 8,0
Front Angle (FA) in $^\circ$	$15,0 \pm 2,5$
Back Angle (BA) in $^\circ$	$25,0 \pm 2,5$
Side Angle (SA) in $^\circ$	$17,5 \pm 2,5$
Radius in nm	nominal: 2 maximal: 12

Tabelle 18: Genaue Spezifikationen **(A)** des Cantilevers und **(B)** der Spitze der ScanAsyst-Air AFM-Sonden aus [123].

10.2 Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.1 „Charakterisierung der Wachstumsfronten von „flat pearls“ mittels AFM“

In diesem Abschnitt finden sich ergänzende Informationen und weitere AFM-Aufnahmen zur Untersuchung und Charakterisierung der Oberflächenstruktur der Wachstumsfronten, die aus „flat pearls“ stammen. Die Strukturuntersuchungen der Wachstumsfronten und die daraus erhaltenen Erkenntnisse wurden in Abschnitt 5.1 beschrieben.

Ergänzungen zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur (Abschnitt 5.1.1)

Im Folgenden sind die dreidimensionalen Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen) der bereits in Abschnitt 5.1.1 dargestellten AFM-Höhensignale gezeigt. Die Aufnahmen der Höhenbilder erfolgten mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden.

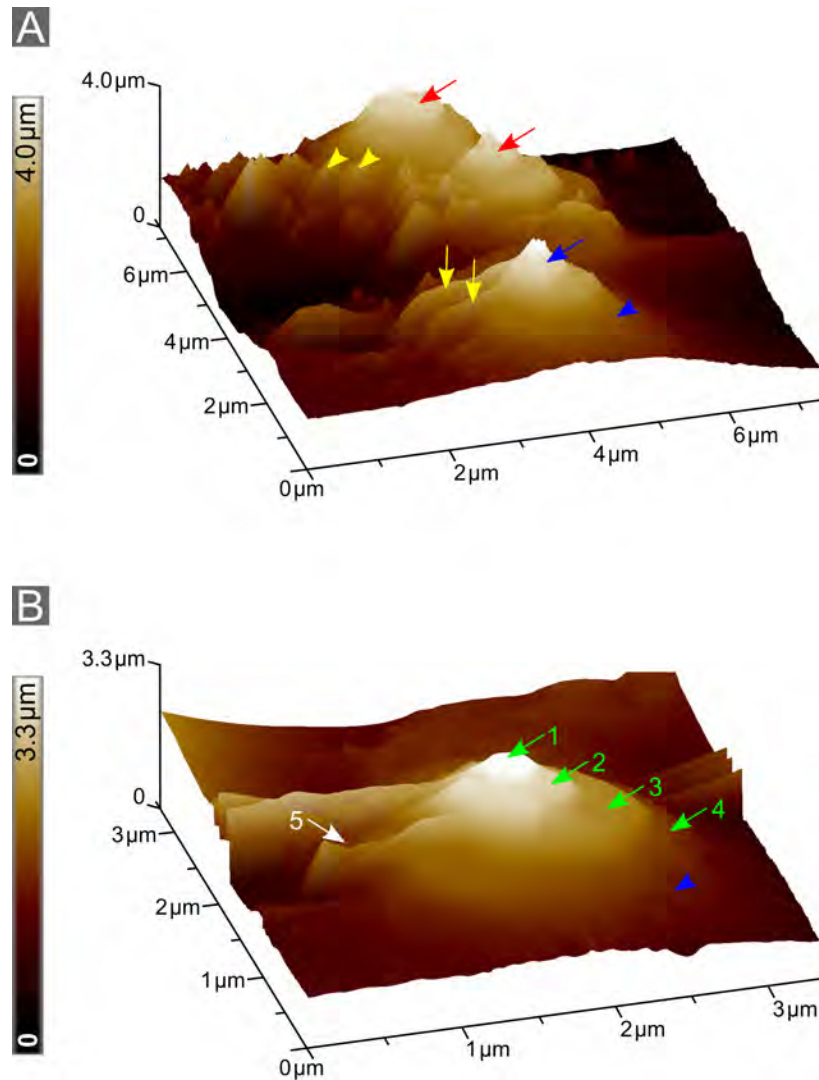


Abbildung 93: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 34 gezeigten Höhengsignale. Scanflächen: (A) $7,3 \mu\text{m} \cdot 7,3 \mu\text{m}$ und (B) $3,4 \mu\text{m} \cdot 3,4 \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 16° nach rechts gedreht. In (A) sind die drei „stacks of coins“ (rote Pfeile und blauer Pfeil) und auch die einzelnen Aragonitplättchen sichtbar. Die gelben Pfeile und Dreiecke markieren beispielhaft durch das Abrastern der Probenoberfläche hervorgerufene Bildartefakte. (B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des in (A) mit blauem Pfeil gekennzeichneten „stack of coins“. Dort sind die Aragonitplättchen (grüne Pfeile und weißer Pfeil) noch besser beobachtbar. Das mit weißem Pfeil markierte Aragonitplättchen (5) ist nur schwer erkennbar. Die übereinanderliegenden Aragonitplättchen weisen unterschiedliche laterale Ausdehnungen auf, wobei der Durchmesser des jeweils oberen Plättchens kleiner ist als der Durchmesser des darunterliegenden Aragonitplättchens (z. B. Plättchen (1) und (2)) [4]. Die Beobachtung der Netzwerkstruktur der organischen Matrix, die die Aragonitplättchen bedeckt, ist hier bereits möglich (blaue Dreiecke in (A) und (B)) [1, 2].

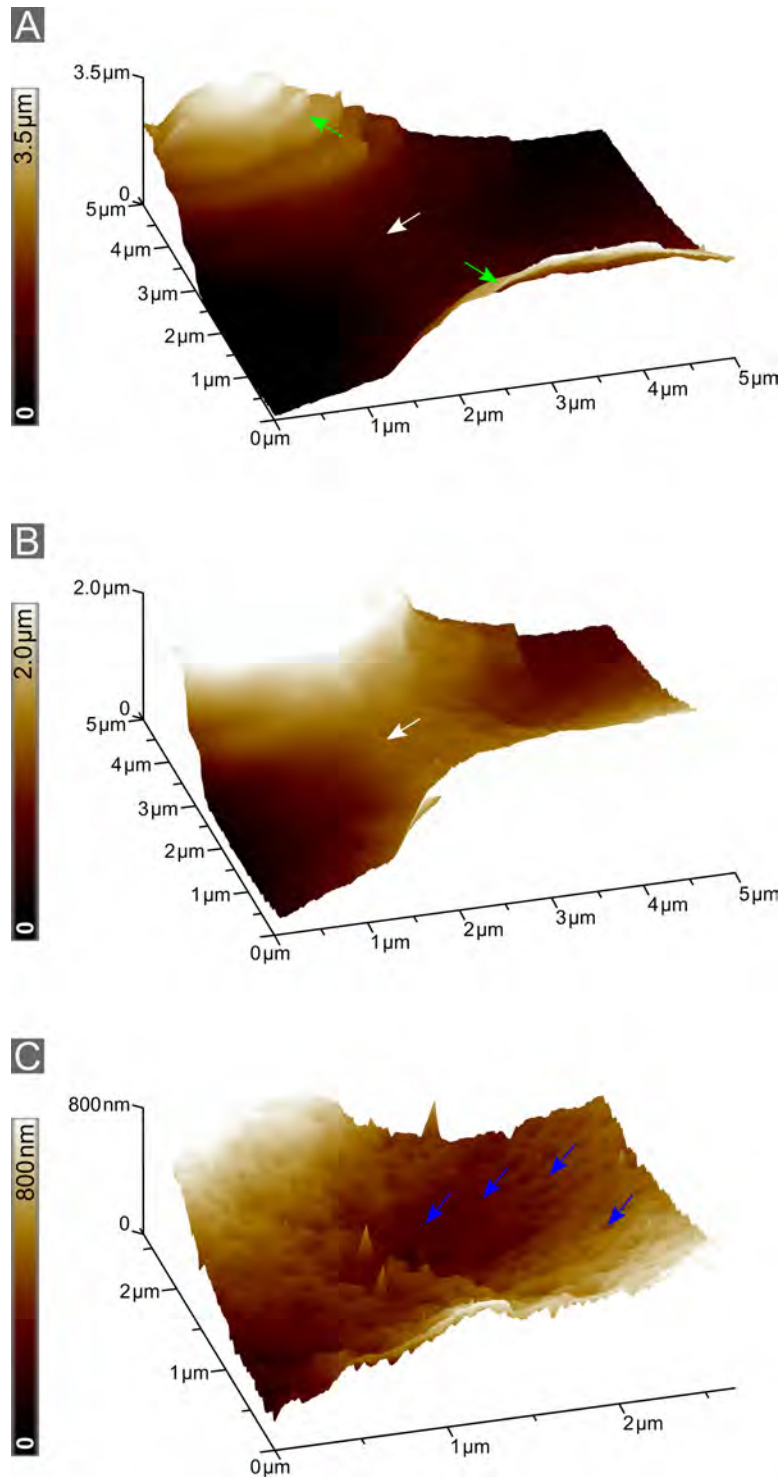


Abbildung 94: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 36 dargestellten Höhen-signale. Scanflächen: (A) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$, (B) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ und (C) $2,7\ \mu\text{m} \cdot 2,7\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 16° nach rechts gedreht. Die Bilder zeigen insbesondere die Struktur der organischen Matrix (weiße Pfeile in (A) und (B)) zwischen zwei „stacks of coins“ (grüne Pfeile in (A)). (A) und (B) stellen denselben Oberflächenbereich dar, jedoch wurde bei (B) die Höhe so skaliert, dass dort vor allem die organische Matrix zwischen den „stacks of coins“ sichtbar ist. (C) zeigt eine vergrößerte Aufnahme dieses Bereichs der organischen Matrix. Dort sind die Poren bzw. Löcher (blaue Pfeile) zwischen den miteinander verwobenen Filamenten deutlich beobachtbar [1, 2].

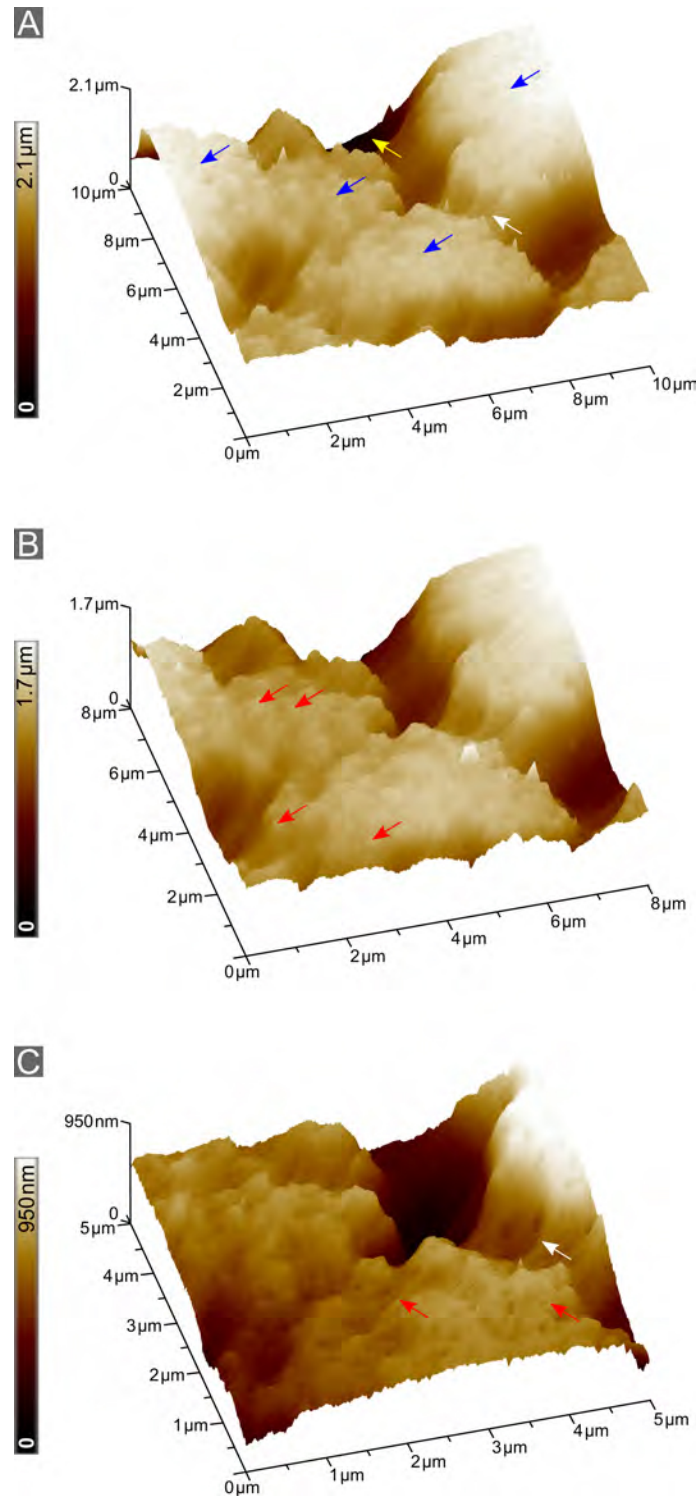


Abbildung 95: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 37 dargestellten Höhen-signale. Scanflächen: (A) $10,0\ \mu\text{m} \cdot 10,0\ \mu\text{m}$, (B) $8,1\ \mu\text{m} \cdot 8,1\ \mu\text{m}$ und (C) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 16° nach rechts gedreht. Die inselförmigen Anordnungen (blaue Pfeile in (A)), die vermutlich bereits aus natürlich gewachsenem Mineral und organischer Matrix bestehen, sind zum Teil durch größere Zwischenräume voneinander getrennt (gelber Pfeil in (A)). In diesen Zwischenräumen befindet sich teilweise organische Matrix (weiße Pfeile in (A) und (C)). An, unter und zwischen den gut erkennbaren Filamenten sind viele weitere natürlich gewachsene Strukturen (rote Pfeile in (B) und (C)) zu beobachten.

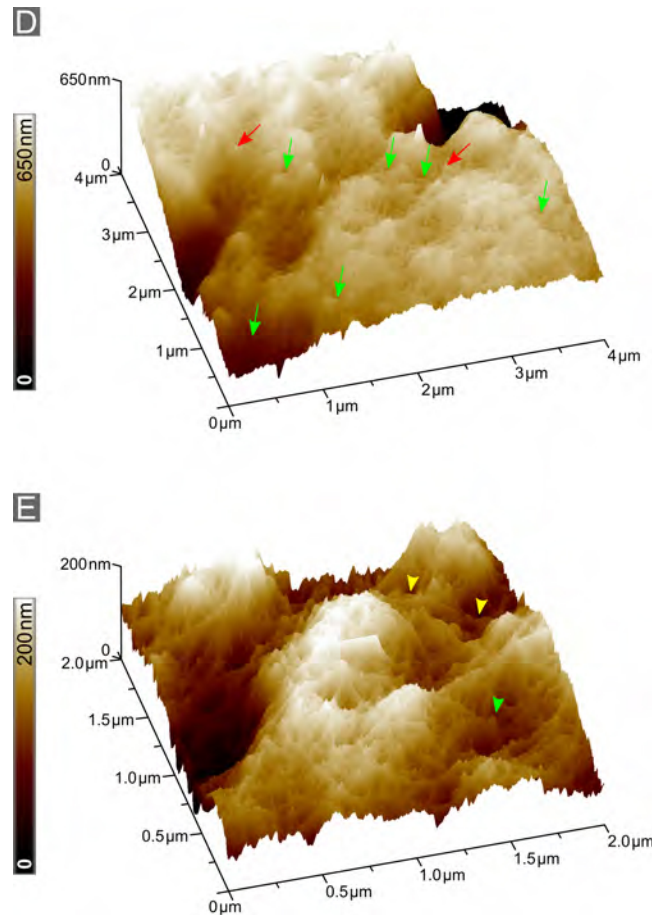


Abbildung 96: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 38 gezeigten Höhengsignale. Scanflächen: (D) $4,0\ \mu\text{m} \cdot 4,0\ \mu\text{m}$ und (E) $2,0\ \mu\text{m} \cdot 2,0\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 16° nach rechts gedreht. Zwischen den netzwerkartig angeordneten Filamenten befinden sich verschieden große Poren bzw. Löcher (grüne Pfeile in (A)). Die Poren sind in (B) noch besser erkennbar. Dort markieren die gelben Dreiecke zwei größere Poren und das grüne Dreieck eine kleinere Pore. Die einzelnen Filamente sind besser in den Höhenbildern (siehe Abb. 38) sichtbar. Die roten Pfeile in (A) markieren die bereits in Abb. 95 beobachteten natürlich entstandenen Strukturen, die vermutlich als Nukleationskeime für das induzierte Wachstum dienen können [1, 2].

Ergänzungen zur Vergleichsuntersuchung beider AFM-Sondenarten (Abschnitt 5.1.3)

Die Strukturuntersuchungen der Wachstumsfronten erfolgten sowohl mit den PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden als auch mit den ScanAsyst-Air AFM-Sonden. Im Folgenden finden sich die dreidimensionalen Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktionen) der in Abschnitt 5.1.3 gezeigten AFM-Höhenbilder. Diese Höhenbilder wurden hier jedoch mit den ScanAsyst-Air AFM-Sonden aufgenommen.

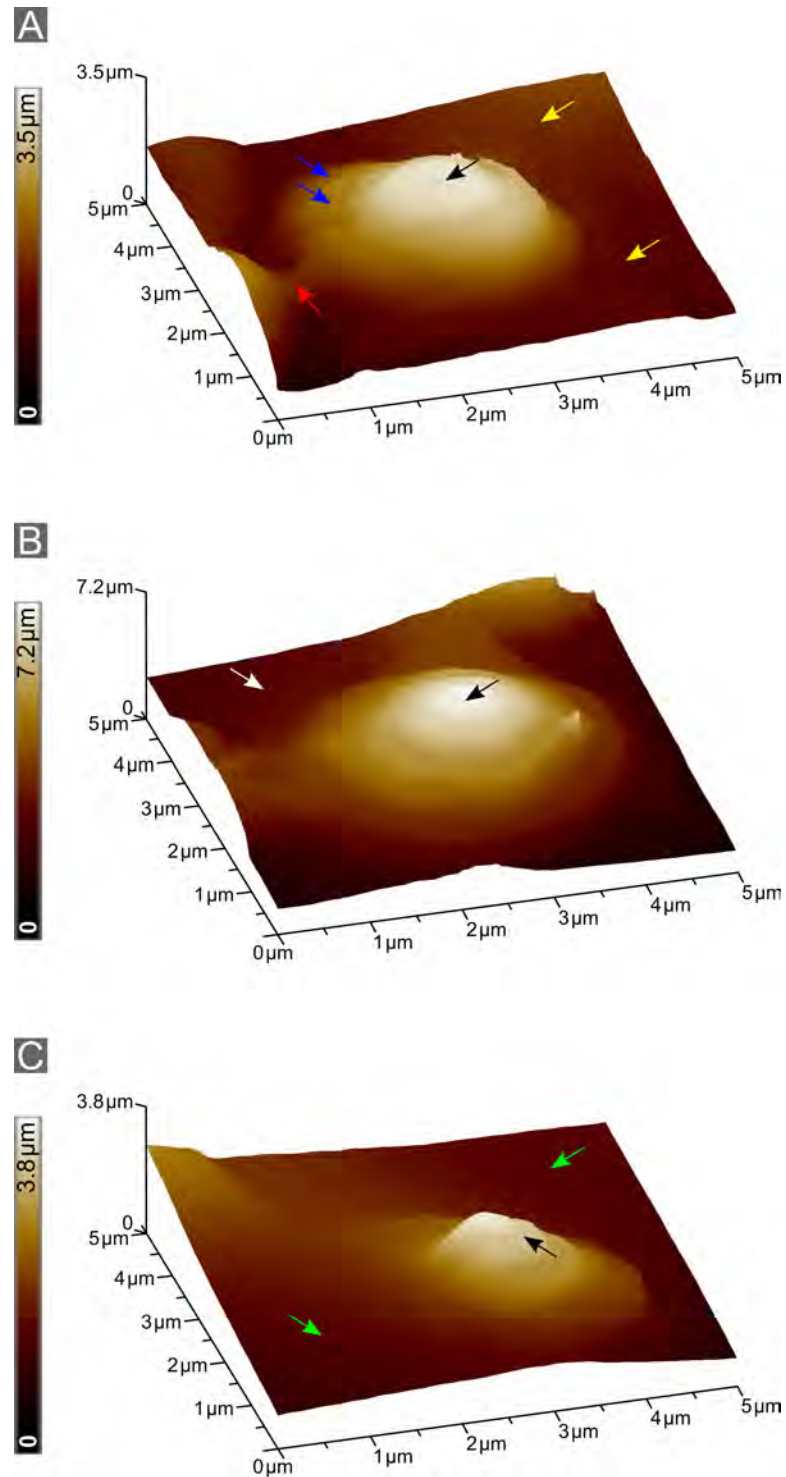


Abbildung 97: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 42 dargestellten Höhen-signale. Scanflächen: (A) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$, (B) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ und (C) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 16° nach rechts gedreht. Jeweils ein „stack of coins“ (schwarze Pfeile) und die einzelnen Aragonitplättchen sind sichtbar. Die netzwerkartige Struktur der organischen Matrix auf den Aragonitplättchen (blaue Pfeile in (A)) und zwischen den „stacks of coins“ (gelbe und grüne Pfeile sowie roter und weißer Pfeil) ist nicht erkennbar.

10.3 Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.2 „Beobachtung des induzierten Wachstums auf „flat pearl“-Oberflächen“

In diesem Abschnitt sind ergänzende Informationen und weitere AFM-Aufnahmen zur direkten Beobachtung des Wachstums von Calciumcarbonatkristallen auf den Wachstumsfronten gezeigt. Die Darstellung und die Erklärung der Wachstumsexperimente auf den „flat pearl“-Oberflächen erfolgten in Abschnitt 5.2.

Ergänzungen zum zweiten Wachstumsexperiment (Abschnitt 5.2.2)

Im Folgenden finden sich die Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$ und die 3D-Rekonstruktionen aller dargestellten Höhensignale zum zweiten Wachstumsexperiment.

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$		
		bei der Konzentration von 3,2 mM über den Zeitraum von 49 min (Bild (D1) bis kurz vor dem Austausch)	bei der Konzentration von 3,8 mM über den Zeitraum von 29 min (Bilder (F1) bis (G1))	bei der Konzentration von 3,8 mM über den Zeitraum von 163 min (Bilder (F1) bis (P1))
Calcium-carbonat-kristall	(1)	$1,3 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,2$
	(2)	$0,9 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,2$
	(3)	—————	$4,0 \pm 1,0$	$2,3 \pm 0,2$
	(4)	$1,0 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,2$
	(5)	$1,6 \pm 0,5$	$3,7 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,2$
	(6)	$0,9 \pm 0,5$	$4,0 \pm 1,0$	$1,3 \pm 0,2$
	(7)	—————	$2,6 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,2$
	(8)	—————	$2,4 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,2$
	(9)	—————	$1,7 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,2$
	(10)	—————	$1,9 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,2$
	(11)	—————	$2,0 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,1$
	(12)	—————	$3,4 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,1$
	(13)	$1,0 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,1$
	(14)	—————	$3,7 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,2$
	(15)	—————	$2,5 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,2$
	(16)	—————	$1,7 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,2$
	(17)	$1,0 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,1$
	(18)	—————	$3,1 \pm 0,9$	$2,1 \pm 0,2$
	(19)	—————	$1,9 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,2$
	(20)	$1,0 \pm 0,5$	$3,5 \pm 1,0$	—————

Tabelle 19: Zweites Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche: aus den Höhenbildern der Abb. 48 und 49 ermittelte Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle (siehe Tabelle 6) in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$.

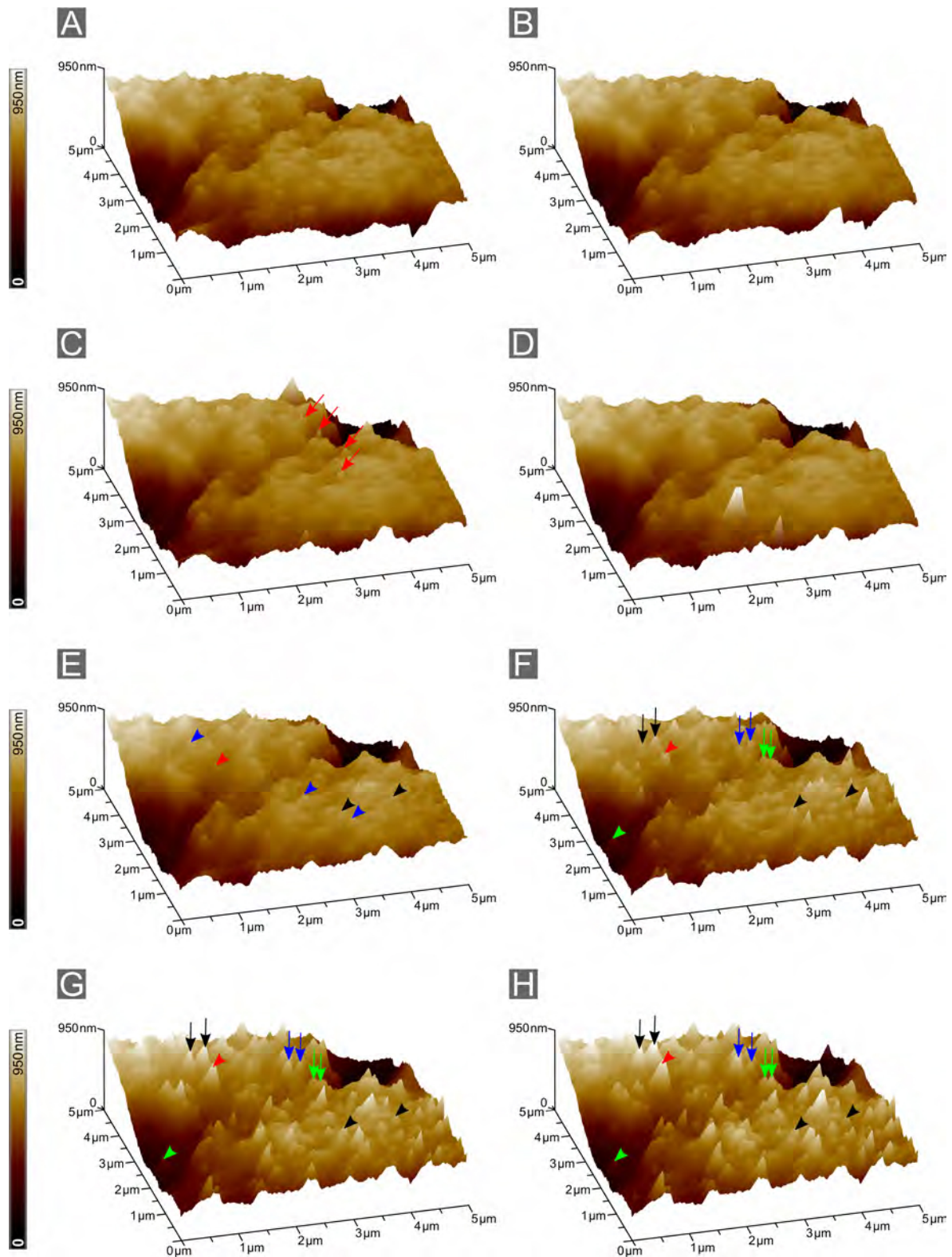


Abbildung 98: Dreidimensionale Rekonstruktionen aller in Abb. 48 dargestellten Höhen-signale. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ zeigen denselben Probenbereich über 191 Minuten. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) bis (C) $2,3\ \text{mM}$, (D) bis (E) $3,2\ \text{mM}$ und (F) bis (H) $3,8\ \text{mM}$. Mehrere auf der Probenoberfläche gewachsene CaCO_3 -Kristalle sind mit verschiedenfarbigen Pfeilen und Dreiecken markiert.

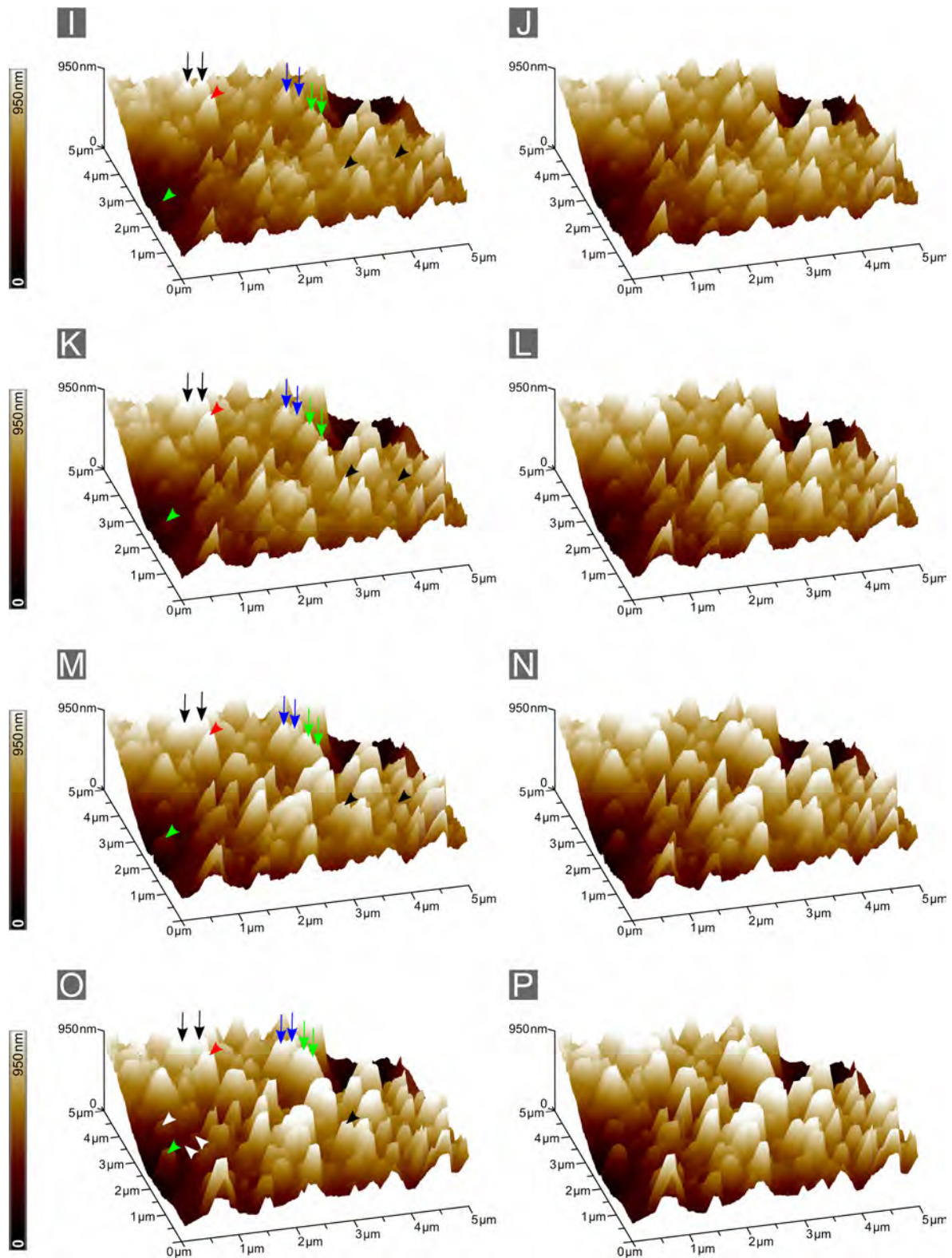


Abbildung 99: Dreidimensionale Rekonstruktionen aller in Abb. 49 gezeigten Höhengsignale. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Bilder (I) bis (P) mit der Scanfläche von jeweils $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ zeigen denselben Probenbereich wie in Abb. 98 über weitere 106 Minuten. Die Konzentration der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betrug von (I) bis (P) $3,8\ \text{mM}$. Die verschiedenfarbigen Dreiecke und Pfeile markieren dieselben CaCO_3 -Kristalle wie in Abb. 98. Die Beschreibung dieses Wachstumsexperiments findet sich in Abschnitt 5.2.2.

10.4 Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.3 „Charakterisierung der Perlmutterpaltflächen mittels AFM“

In diesem Abschnitt finden sich ergänzende Informationen und weitere AFM-Aufnahmen zur Untersuchung und Charakterisierung der Oberflächenstruktur von frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen (Perlmutterpaltflächen), deren Gewinnung aus Schalen von Meeresschnecken der Art *Haliotis tuberculata* erfolgte. Die Strukturuntersuchungen der Perlmutterpaltflächen und die daraus erhaltenen Erkenntnisse wurden in Abschnitt 5.3 beschrieben.

Ergänzungen zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur (Abschnitt 5.3.1)

Im Folgenden ist eine weitere dreidimensionale Rekonstruktion (3D-Rekonstruktion) eines bereits in Abschnitt 5.3.1 dargestellten AFM-Höhensignals gezeigt. Die Aufnahme des Höhenbildes erfolgte mit einer ScanAsyst-Air AFM-Sonde. Zusätzlich sind weitere Bilder, die beispielhaft die Ermittlung der Höhen einzelner Aragonitplättchen bei den frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen zeigen, zu sehen.

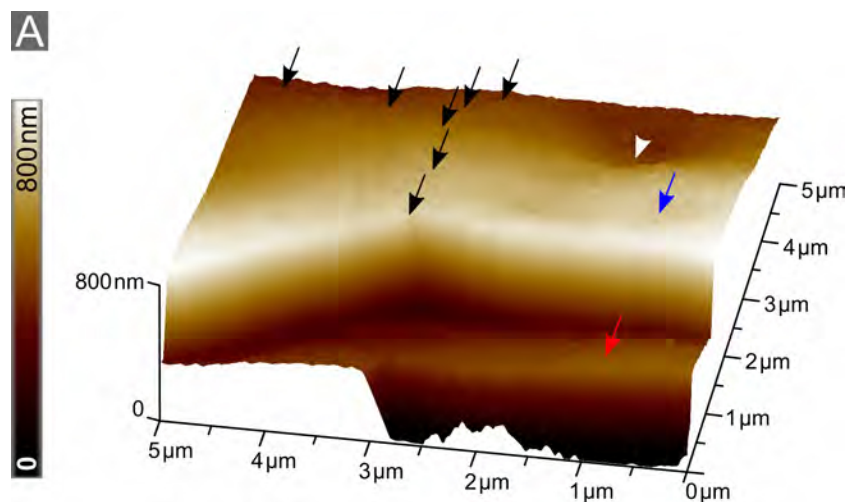


Abbildung 100: Dreidimensionale Rekonstruktion des in Abb. 57 dargestellten Höhengesignals (A1). Scanfläche: (A) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktion ist im Vergleich zum Höhenbild um einen Winkel von 170° nach rechts gedreht. Zwei direkt übereinander angeordnete Aragonitschichten sind beobachtbar, wobei der rote Pfeil die untere Schicht und der blaue Pfeil die obere Schicht markiert. Jede dieser Aragonitschichten besteht dabei aus polygonal geformten Aragonitplättchen [4]. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen den Verlauf der Kanten von den aneinandergrenzenden, in der oberen Schicht befindlichen Plättchen. In der Oberfläche eines der oberen Aragonitplättchen ist eine Vertiefung bzw. ein Loch (weißes Dreieck) sichtbar.

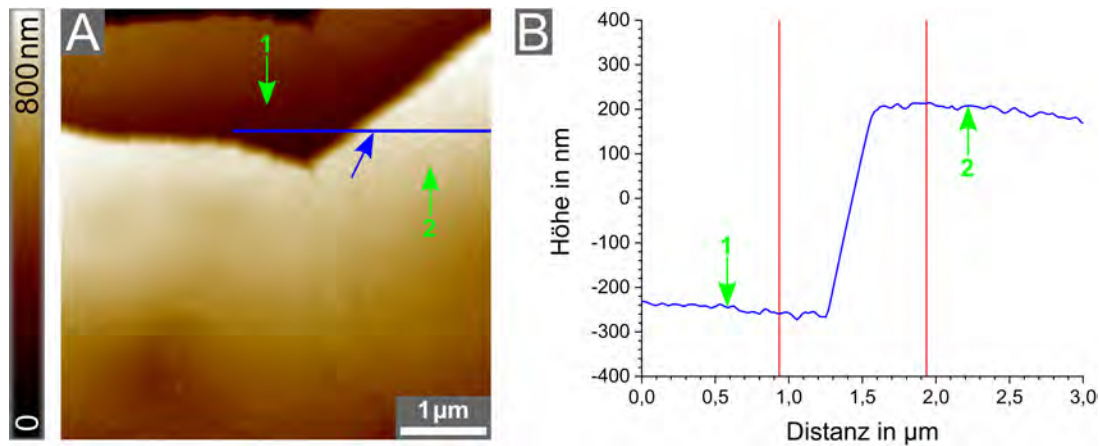


Abbildung 101: Beispielhafte Vermessung der Höhe eines einzelnen Aragonitplättchens bei einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. In (A) ist ein AFM-Höhenbild aus Abb. 57 dargestellt. (B) zeigt das Höhenprofil, das entlang der in (A) eingezeichneten blauen Linie verläuft. Diese blaue Linie ist zusätzlich mit einem blauen Pfeil hervorgehoben. Die zwei roten, vertikalen Linien in (B) kennzeichnen exemplarisch die zwei Markerpositionen zur Bestimmung der Höhendifferenz zwischen den mit (1) und (2) markierten Aragonitplättchen. Die Höhendifferenz wurde 16-mal an mehreren verschiedenen Stellen entlang dieses Höhenprofils ermittelt. Anschließend erfolgte die Ausmessung der Höhe des Aragonitplättchens (2) jeweils wiederum 16-mal an verschiedenen Stellen entlang drei weiterer ausgewählter Höhenprofile, die hier nicht gezeigt sind. Aus allen erhaltenen Höhendifferenzen wurde danach der Mittelwert berechnet.

10.5 Ergänzende Informationen zum Abschnitt 5.4 „Beobachtung des induzierten Wachstums auf Perlmutterpaltflächen“

In diesem Abschnitt finden sich weitere AFM-Aufnahmen zur direkten Beobachtung des Wachstums von Calciumcarbonat auf den frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen. Die Darstellung und die Erklärung der Wachstumsexperimente auf den Perlmutterpaltflächen erfolgten in Abschnitt 5.4.

Ergänzungen zum ersten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche (Abschnitt 5.4.1)

Im Folgenden finden sich weitere Angaben (Wachstumsgeschwindigkeiten in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$) und weitere Bilder (dreidimensionale Rekonstruktionen der gezeigten Höhensignale) zum ersten Wachstumsexperiment. Bei diesem Wachstumsexperiment konnte das induzierte Wachstum von Calciumcarbonatkristallen auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche direkt mit dem AFM beobachtet werden.

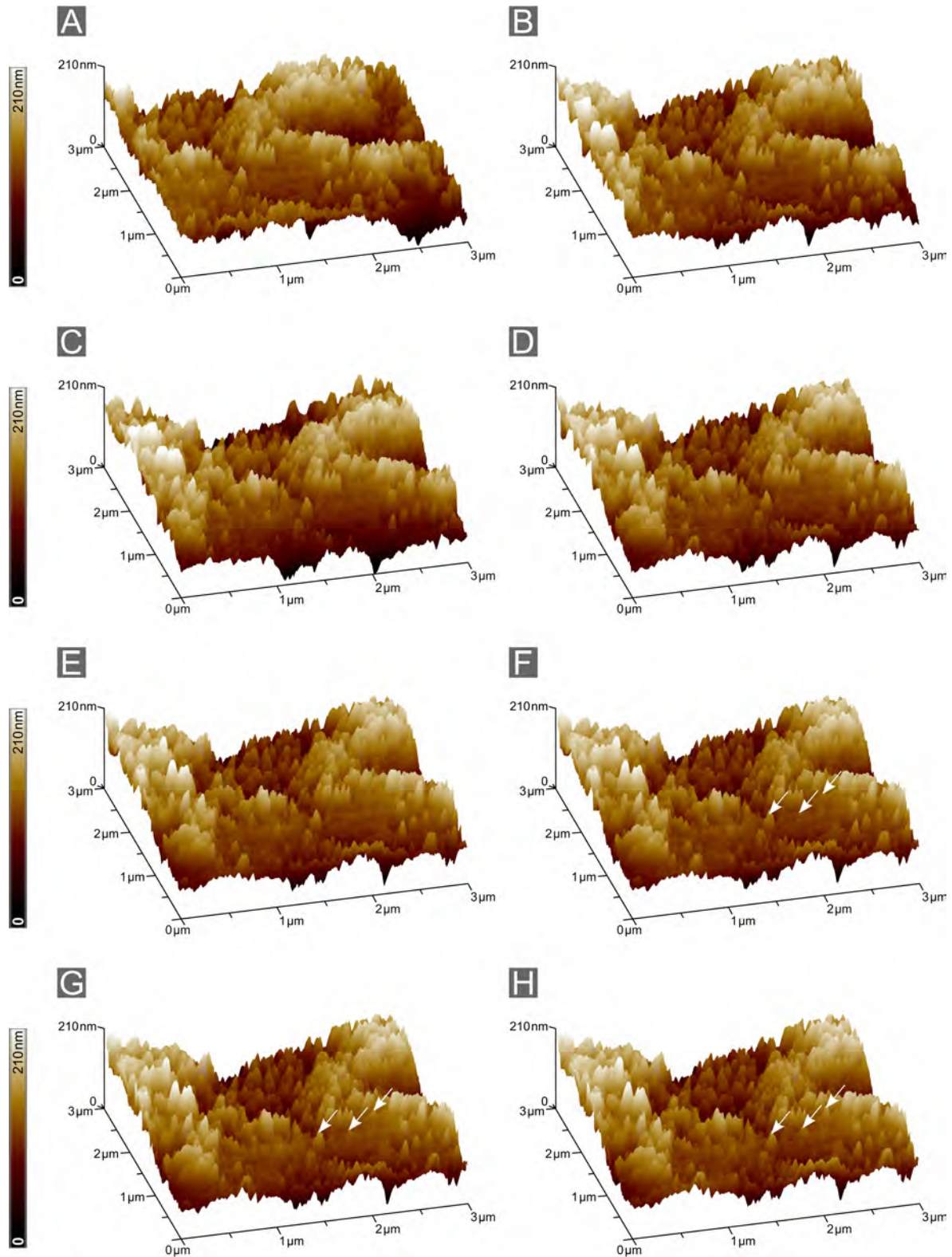


Abbildung 102: Dreidimensionale Rekonstruktionen aller in Abb. 65 gezeigten Höhenprofile. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $3,0\ \mu\text{m} \cdot 3,0\ \mu\text{m}$ zeigen denselben Probenbereich über 348 Minuten. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) $2,6\ \text{mM}$ und (D) bis (H) $3,1\ \text{mM}$. Die weißen Pfeile kennzeichnen drei CaCO_3 -Kristalle, die im unteren Teil des abgebildeten Probenbereichs gewachsen sind.

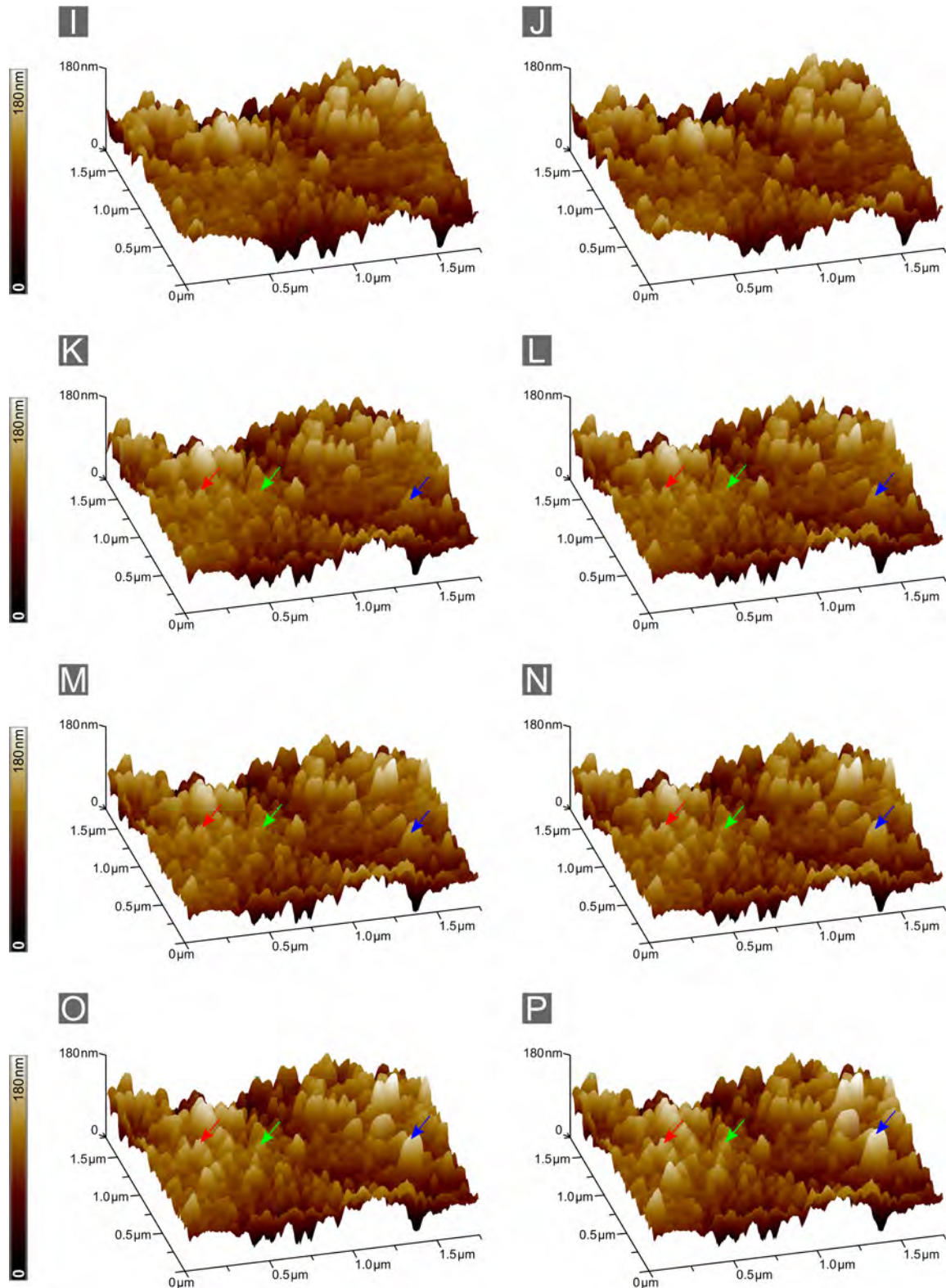


Abbildung 103: Dreidimensionale Rekonstruktionen aller in Abb. 66 gezeigten Höhen-signale. Nach der Aufnahme des Bildes (H) wurde der untere Bereich der in Abb. 102 dargestellten Probenoberfläche vergrößert untersucht. Die Bilder (I) bis (P) mit der Scanfläche von jeweils $1,76 \mu\text{m} \cdot 1,76 \mu\text{m}$ zeigen diesen Probenbereich über einen Zeitraum von weiteren 110 Minuten. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (I) bis (J) $3,1 \text{ mM}$ und (K) bis (P) $3,4 \text{ mM}$. Die roten, grünen und blauen Pfeile kennzeichnen dieselben CaCO_3 -Kristalle wie in Abb. 66 (Details siehe Abschnitt 5.4.1).

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$	
		bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 29 min (Bilder (K1) bis (M1))	bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 74 min (Bilder (K1) bis (P1))
Calciumcarbonatkristall	(1)	0,24 ± 0,18	0,30 ± 0,06
	(2)	0,24 ± 0,18	0,24 ± 0,06
	(3)	0,18 ± 0,12	0,18 ± 0,12
	(4)	0,18 ± 0,12	0,24 ± 0,06
	(5)	—————	0,18 ± 0,06
	(6)	0,24 ± 0,18	0,24 ± 0,06
	(7)	—————	0,24 ± 0,06
	(8)	—————	0,18 ± 0,06
	(9)	0,24 ± 0,12	0,18 ± 0,06
	(10)	—————	0,30 ± 0,06
	(11)	0,18 ± 0,12	0,24 ± 0,06
	(12)	0,36 ± 0,18	0,60 ± 0,06
	(13)	0,48 ± 0,18	0,54 ± 0,06
	(14)	0,48 ± 0,18	0,60 ± 0,06
	(15)	—————	0,48 ± 0,06
	(16)	0,60 ± 0,18	0,60 ± 0,06
	(17)	0,42 ± 0,18	0,42 ± 0,06
	(18)	0,42 ± 0,18	0,54 ± 0,06
	(19)	—————	0,60 ± 0,06
	(20)	0,66 ± 0,18	0,66 ± 0,06

Tabelle 20: Erstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle (siehe Tabelle 8) in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$. Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten erfolgte aus den Höhenbildern in Abb. 65 und 66.

Ergänzung zum zweiten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche (Abschnitt 5.4.2)

Im Folgenden finden sich weitere Angaben (Wachstumsgeschwindigkeiten in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$) und weitere Bilder (dreidimensionale Rekonstruktionen der gezeigten Höhengsignale) zum zweiten Wachstumsexperiment, bei dem ebenfalls die direkte Beobachtung des induzierten Wachstums von Calciumcarbonat auf der frisch präparierten Perlmutterpaltfläche mit dem AFM gelang.

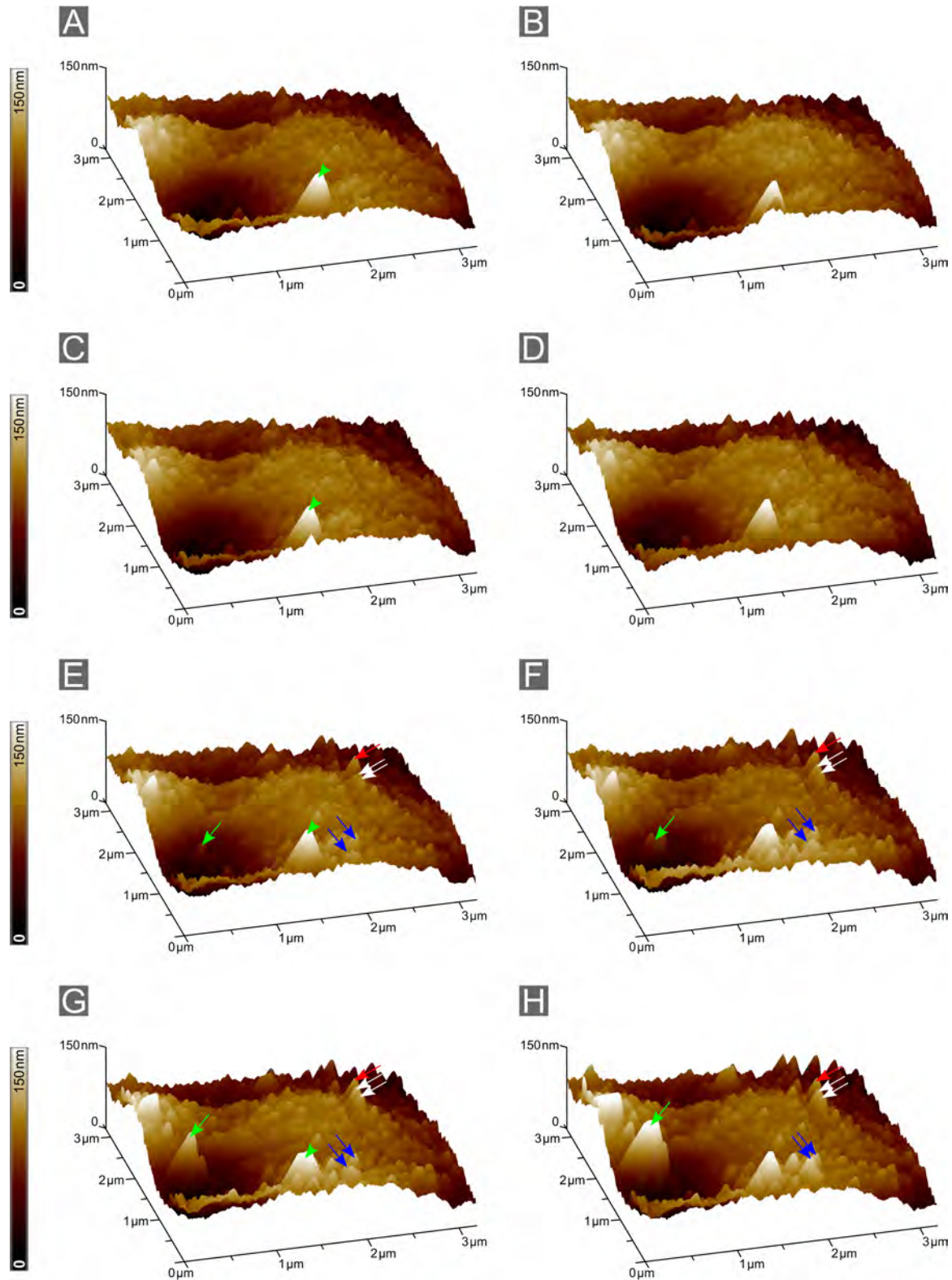


Abbildung 104: Dreidimensionale Rekonstruktionen aller in Abb. 72 gezeigten Höhen-signale. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $3,2\ \mu\text{m} \cdot 3,2\ \mu\text{m}$ zeigen denselben Probenbereich über einen Zeitraum von 263 Minuten. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) $2,6\ \text{mM}$, (D) bis (E) $3,1\ \text{mM}$ und (F) bis (H) $3,4\ \text{mM}$. Die verschiedenfarbigen Pfeile markieren auf der Probenoberfläche gewachsene CaCO_3 -Kristalle.

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$	
		bei der Konzentration von 3,1 mM über den Zeitraum von 59 min (kurz nach dem dritten Austausch bis kurz vor dem vierten Austausch)	bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 42 min (Bilder (F1) bis (H1))
Calciumcarbonatkristall	(1)	$0,12 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,06$
	(2)	$0,30 \pm 0,06$	—————
	(3)	$0,24 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,12$
	(4)	$0,24 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,06$
	(5)	—————	$0,18 \pm 0,06$
	(6)	$0,18 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,12$
	(7)	$0,12 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,06$
	(8)	—————	$0,54 \pm 0,12$
	(9)	—————	$0,48 \pm 0,12$
	(10)	$0,12 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,06$
	(11)	$0,18 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,12$
	(12)	$0,24 \pm 0,06$	$1,14 \pm 0,12$
	(13)	$0,12 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,12$
	(14)	$0,54 \pm 0,06$	$1,86 \pm 0,18$

Tabelle 21: Zweites Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: aus den Höhenbildern der Abb. 72 ermittelte Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle (siehe Tabelle 10) in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$.

Ergänzungen zum dritten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche (Abschnitt 5.4.3)

Im Folgenden finden sich weitere Informationen (Wachstumsgeschwindigkeiten in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$ und dreidimensionale Rekonstruktionen aller gezeigten Höhengsignale) zum dritten Wachstumsexperiment. Dabei gelang auch die Beobachtung des induzierten Wachstums von Calciumcarbonat auf der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche mit dem AFM.

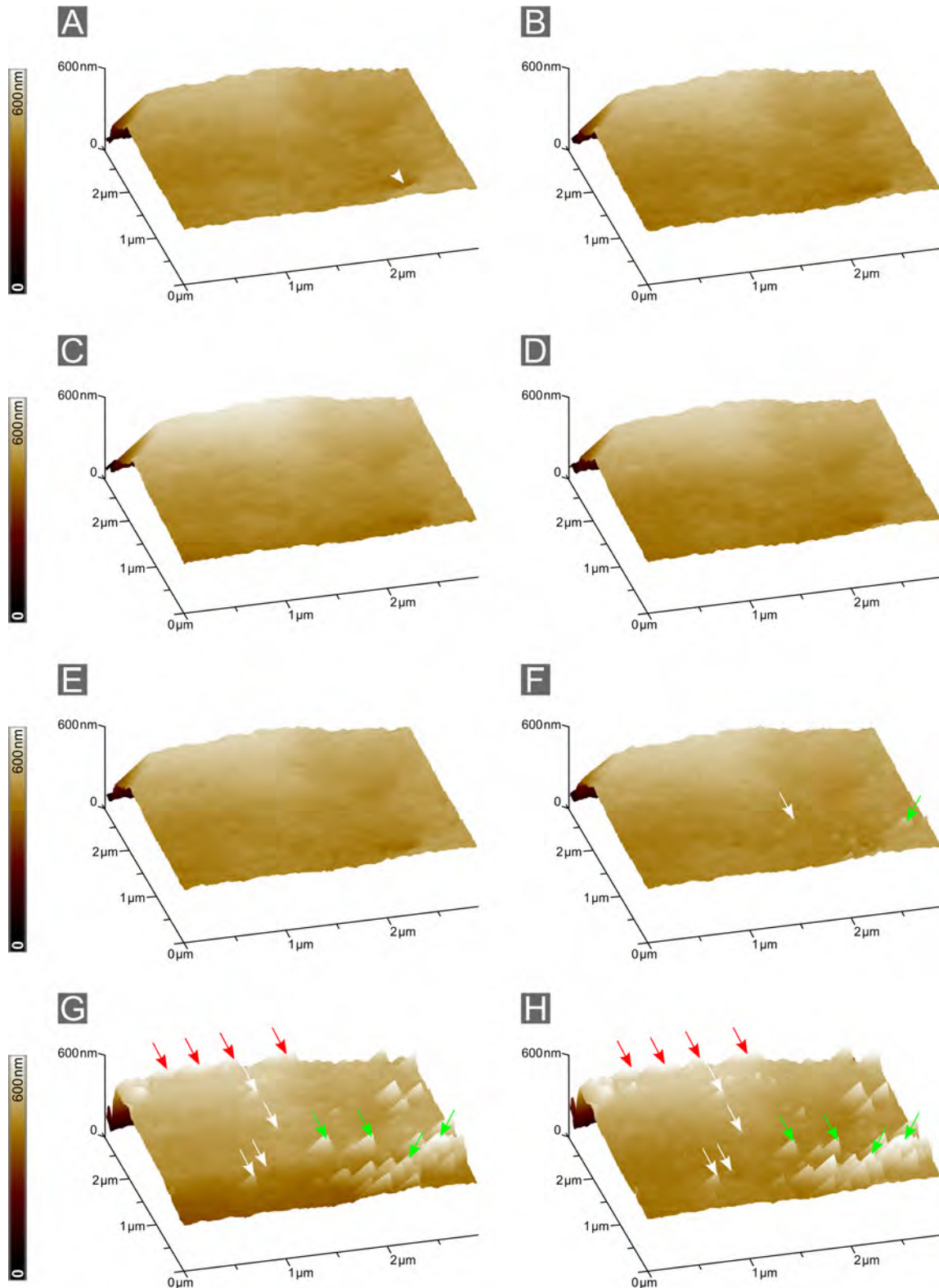


Abbildung 105: Dreidimensionale Rekonstruktionen aller in Abb. 81 gezeigten Höhen-signale. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $2,9\mu\text{m} \cdot 2,9\mu\text{m}$ zeigen denselben Probenbereich über einen Zeitraum von 310 Minuten. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (A) $0,9\text{mM}$, (B) $1,9\text{mM}$, (C) $2,6\text{mM}$, (D) $3,1\text{mM}$ und (E) bis (H) $3,4\text{mM}$. Die verschiedenfarbigen Pfeile kennzeichnen viele auf der Probenoberfläche gewachsene CaCO_3 -Kristalle.

		Wachstumsgeschwindigkeiten in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$ bei der Konzentration von 3,4 mM über den Zeitraum von 85 min (kurz nach dem vierten Austausch bis zum Bild (H1))
Calciumcar- bonatkristall	(1)	1,6 ± 0,2
	(2)	1,6 ± 0,2
	(3)	1,1 ± 0,1
	(4)	1,5 ± 0,2
	(5)	1,5 ± 0,2
	(6)	1,5 ± 0,2
	(7)	0,6 ± 0,1
	(8)	0,6 ± 0,1
	(9)	1,1 ± 0,1
	(10)	1,1 ± 0,1
	(11)	0,9 ± 0,1
	(12)	0,9 ± 0,1
	(13)	1,2 ± 0,1
	(14)	1,3 ± 0,2
	(15)	1,3 ± 0,2
	(16)	1,7 ± 0,2
	(17)	2,2 ± 0,2
	(18)	1,7 ± 0,2
	(19)	1,4 ± 0,2
	(20)	1,6 ± 0,2

Tabelle 22: Drittes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: aus den Höhenbildern der Abb. 81 ermittelte Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle (siehe Tabelle 13) in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$.

Ergänzungen zu den weiteren Wachstumsexperimenten auf Perlmutterpaltflächen (Abschnitt 5.4.4)

Im Folgenden sind zusätzliche Angaben und Bilder zu den in Abschnitt 5.4.4 beschriebenen Wachstumsexperimenten, die auf weiteren frisch gespaltenen Perlmutteroberflächen durchgeführt wurden, zu finden. Dabei gelang jeweils die Beobachtung des induzierten Wachstums von Calciumcarbonatkristallen auf den Perlmutterpaltflächen.

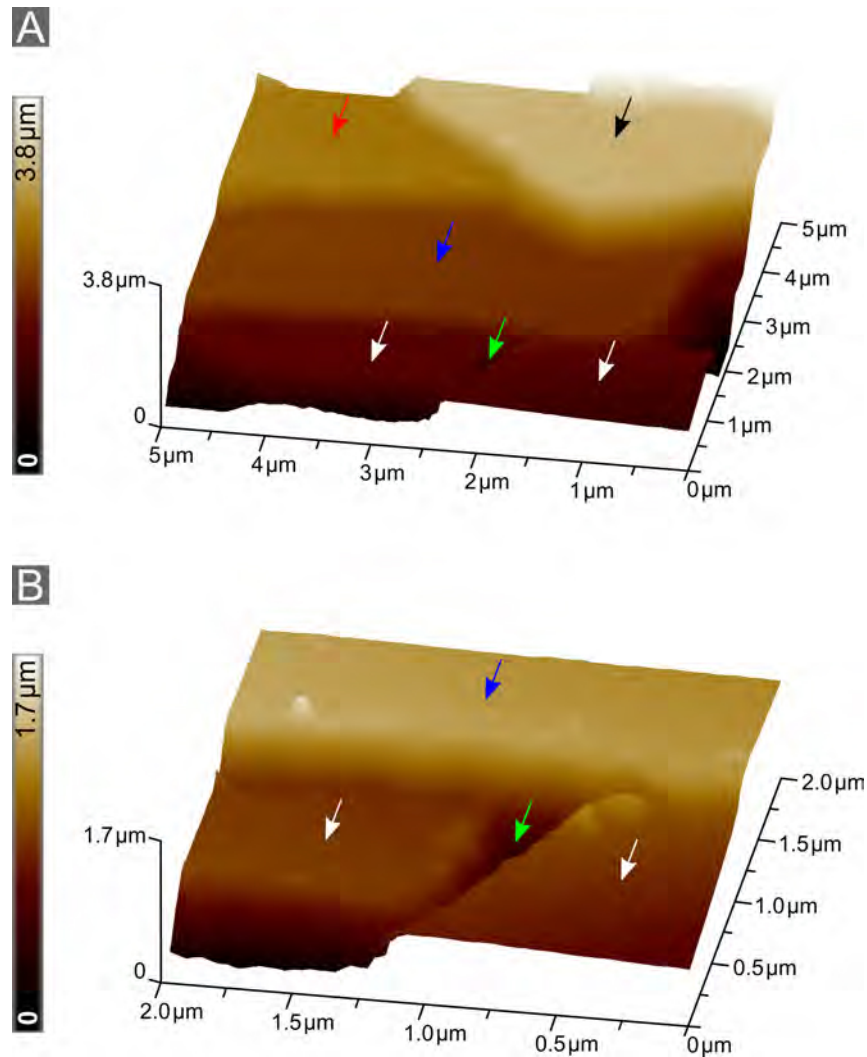


Abbildung 106: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 85 dargestellten Höhen-signale. Scanflächen: (A) $5,0\ \mu\text{m} \cdot 5,0\ \mu\text{m}$ und (B) $2,0\ \mu\text{m} \cdot 2,0\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 170° nach rechts gedreht. In (A) sind mehrere übereinanderliegende Aragonitplättchen (schwarzer, roter und blauer Pfeil sowie weiße Pfeile) beobachtbar. Die beiden mit weißen Pfeilen markierten Aragonitplättchen liegen in einer Schicht und stoßen bereits teilweise aneinander. Zwischen diesen zwei Aragonitplättchen existiert ein größerer Spalt (grüner Pfeil). (B) zeigt insbesondere den Bereich um diesen Spalt vergrößert. Dort sind sowohl die Kanten der zwei unteren, mit weißen Pfeilen markierten, Plättchen als auch die Kante des darüberliegenden, mit blauem Pfeil gekennzeichneten, Aragonitplättchens besser erkennbar. Auf diesem in (B) gezeigten Bereich der Probenoberfläche sollte das Wachstum von CaCO_3 -Kristallen direkt beobachtet werden.

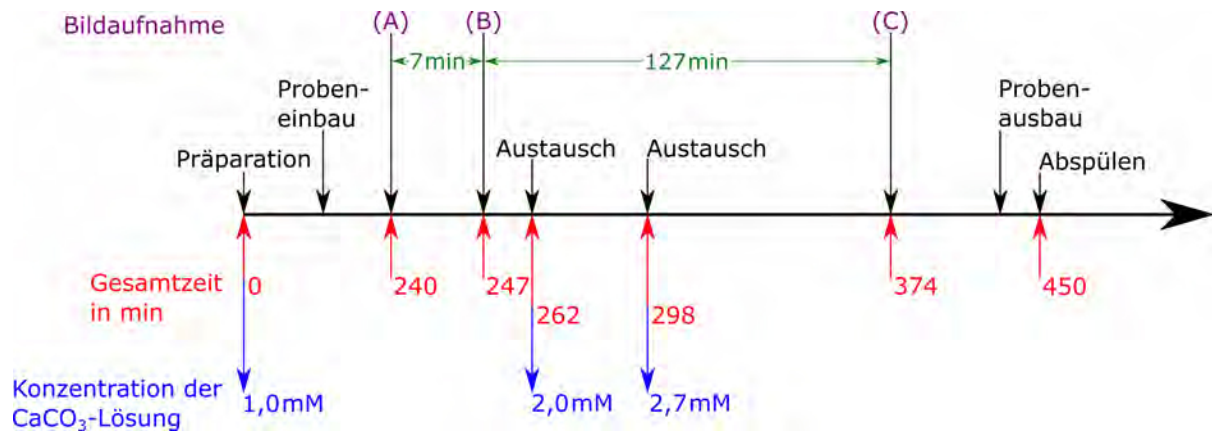


Abbildung 107: Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim vierten in Abb. 86 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. Hier sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO₃-Lösung in der Petrischale, die jeweils zwischen den Bildern (A) bis (C) vergangenen Zeitspannen, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO₃-Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben.

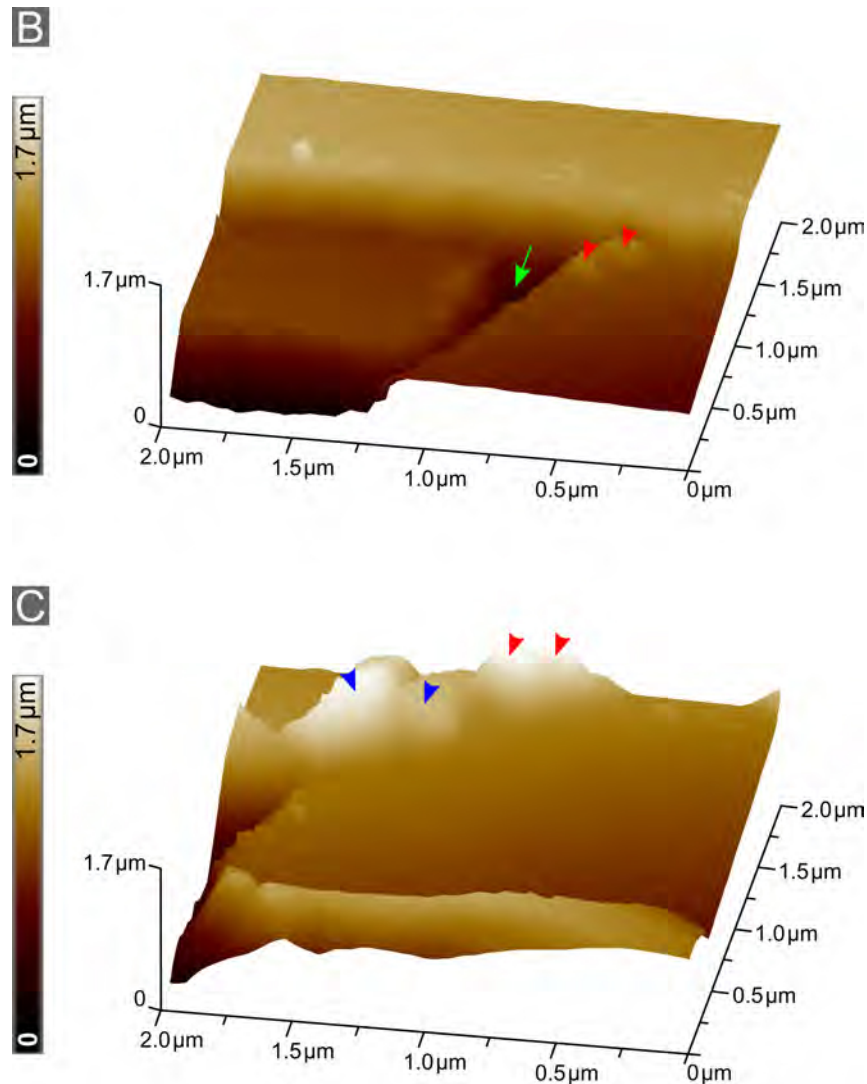


Abbildung 108: Dreidimensionale Rekonstruktionen der in Abb. 86 dargestellten Höhen-signale. Scanflächen: (B) $2,0\ \mu\text{m} \cdot 2,0\ \mu\text{m}$ und (C) $2,0\ \mu\text{m} \cdot 2,0\ \mu\text{m}$. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 170° nach rechts gedreht. (B) und (C) zeigen nahezu denselben Probenbereich zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Höhe wurde bei beiden Bildern gleich skaliert, sodass diese miteinander verglichen werden können. (B) zeigt die Probenoberfläche in 3 ml einer 1 mM CaCO_3 -Lösung vor Initiierung des Kristallwachstums. Dort ist der Spalt (grüner Pfeil) zwischen den in der unteren Schicht nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen sichtbar. Zusätzlich sind auch die Kanten dieser zwei Aragonitplättchen und des darüberliegenden Plättchens gut erkennbar. (C) stellt diesen Oberflächenbereich nach einem Zeitraum von 127 Minuten dar. Während dieser Zeitspanne wurde zweimal jeweils 1 ml der CaCO_3 -Lösung aus der Petrischale gegen 1 ml einer höher übersättigten 4 mM CaCO_3 -Lösung ausgetauscht (Details siehe Abb. 107). Bis zur Aufnahme des Bildes (C) hat sich der abgebildete Probenbereich nur marginal verschoben.

Das Calciumcarbonat ist insbesondere im Bereich des zuvor beobachteten Spalts zwischen den Aragonitplättchen und an den Kanten der Plättchen (blaue und rote Dreiecke) gewachsen.

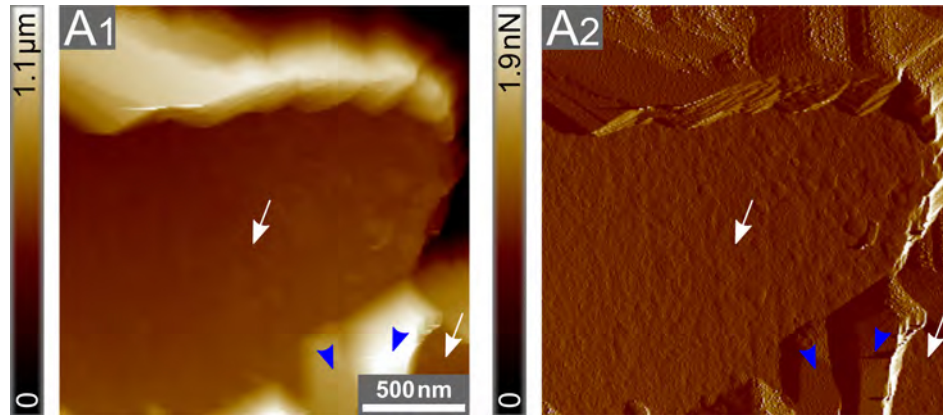


Abbildung 109: AFM-Aufnahmen der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche aus Abb. 85 in 3 ml der nun 2,7 mM CaCO_3 -Lösung aufgenommen mit der höheren Auflösung von 256×256 Pixel. Die Bildaufnahme erfolgte nach der Aufnahme des Bildes (C) aus Abb. 86. Das linke Bild (Index 1) zeigt das Höhsignal und das rechte Bild (Index 2) das entsprechende Fehlersignal. Im Vergleich zu den Bildern in Abb. 85, 86, 106 und 108 wurde die Höhskala hier von $1,7 \mu\text{m}$ auf $1,1 \mu\text{m}$ geändert. Die weißen Pfeile markieren hier wieder die zwei bereits zuvor beobachteten, in der unteren Schicht liegenden Aragonitplättchen.

Das Wachstum des Calciumcarbonats fand vor allem im Bereich um den Spalt statt (blaue Dreiecke), der zwischen den zwei unteren nebeneinanderliegenden Aragonitplättchen vor Initiierung des Kristallwachstums existierte.

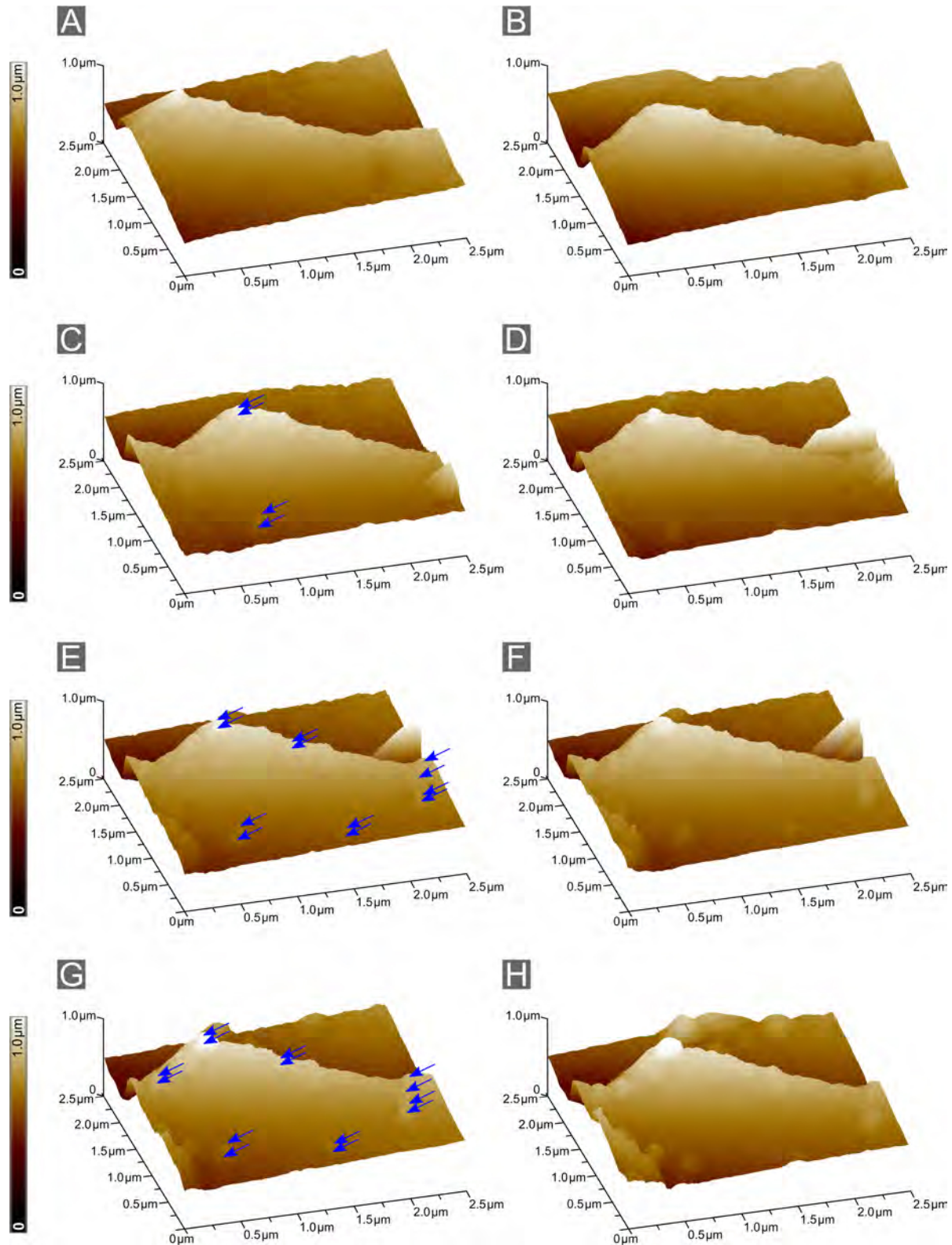


Abbildung 110: Dreidimensionale Rekonstruktionen aller in Abb. 87 dargestellten Höhengensignale. Die 3D-Rekonstruktionen sind im Vergleich zu den Höhenbildern um einen Winkel von 15° nach rechts gedreht. Die Bilder (A) bis (H) mit der Scanfläche von jeweils $2,5\ \mu\text{m} \cdot 2,5\ \mu\text{m}$ zeigen denselben Probenbereich über 361 Minuten. Die Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale betragen: (A) $0,9\ \text{mM}$, (B) $1,9\ \text{mM}$, (C) bis (E) $2,6\ \text{mM}$, (F) $2,8\ \text{mM}$ und (G) bis (H) $3,0\ \text{mM}$. Die blauen Pfeile kennzeichnen mehrere auf dem oberen Aragonitplättchen gewachsene CaCO_3 -Kristalle (siehe Abschnitt 5.4.4).

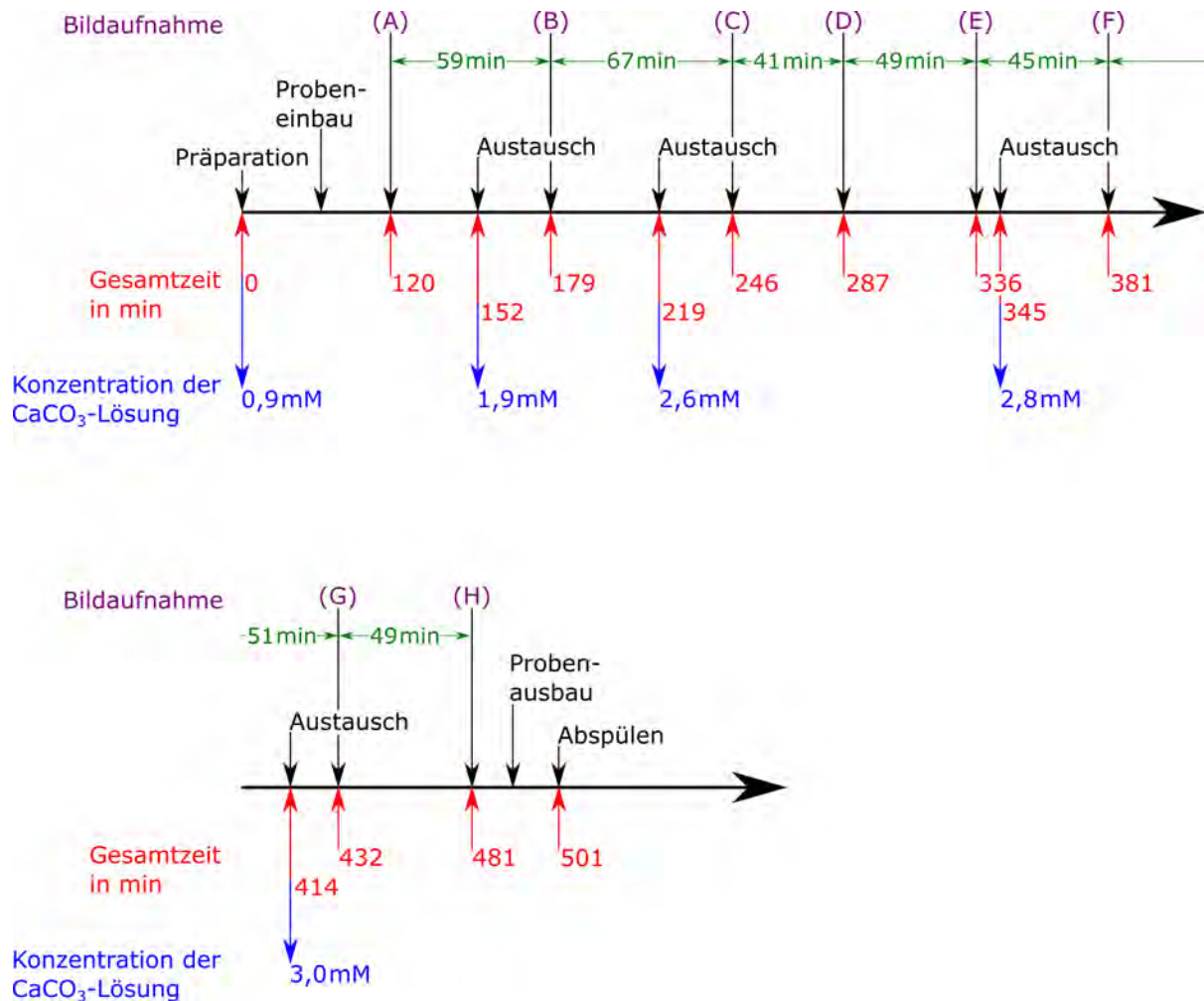


Abbildung 111: Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim fünften in Abb. 87 dargestellten Wachstumsexperiment auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche. Hier sind die verwendeten Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale, die zwischen den gezeigten Bildern vergangenen Zeitspannen, die Zeitpunkte der Bildaufnahmen und der Austausche der CaCO_3 -Lösungen sowie die gesamte Laufzeit des Wachstumsexperiments angegeben.

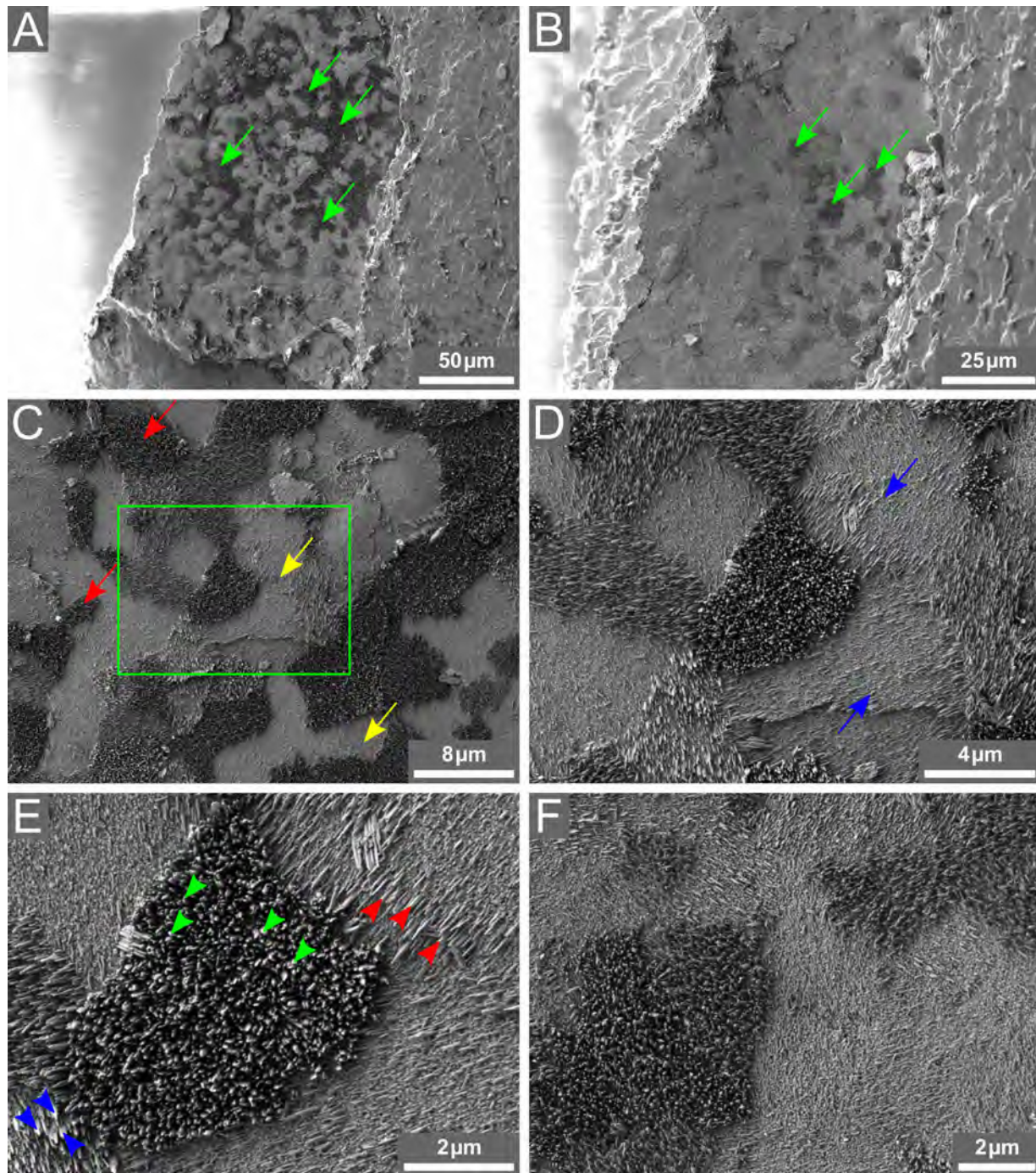


Abbildung 112: Weitere REM-Aufnahmen unterschiedlicher, ausgewählter Bereiche der bereits in Abb. 92 gezeigten ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche nach dem AFM-Wachstumsexperiment (siehe Abb. 89 und 90). Scanflächen: (A) $209\ \mu\text{m} \cdot 279\ \mu\text{m}$, (B) $104\ \mu\text{m} \cdot 139\ \mu\text{m}$, (C) $33\ \mu\text{m} \cdot 43\ \mu\text{m}$, (D) $14\ \mu\text{m} \cdot 19\ \mu\text{m}$, (E) $7\ \mu\text{m} \cdot 9\ \mu\text{m}$ und (F) $10\ \mu\text{m} \cdot 13\ \mu\text{m}$; Beschleunigungsspannung: $1,0\ \text{kV}$; Aperturblende: $30\ \mu\text{m}$; Neigungswinkel des Probenstisches: 0° . Der in (C) grün gekennzeichnete Bereich ist in (D) vergrößert dargestellt. Auf der Probenoberfläche existieren sowohl Bereiche, in denen die CaCO_3 -Kristalle mit hohen Oberflächendichten gewachsen sind (grüne Pfeile in (A) und (B) sowie rote Pfeile in (C)), als auch Bereiche, in denen weniger CaCO_3 -Kristalle vorhanden sind (gelbe Pfeile in (C) und blaue Pfeile in (D)). Die verschiedenfarbigen Dreiecke in (E) markieren beispielhaft einzelne nadelförmige CaCO_3 -Kristalle.

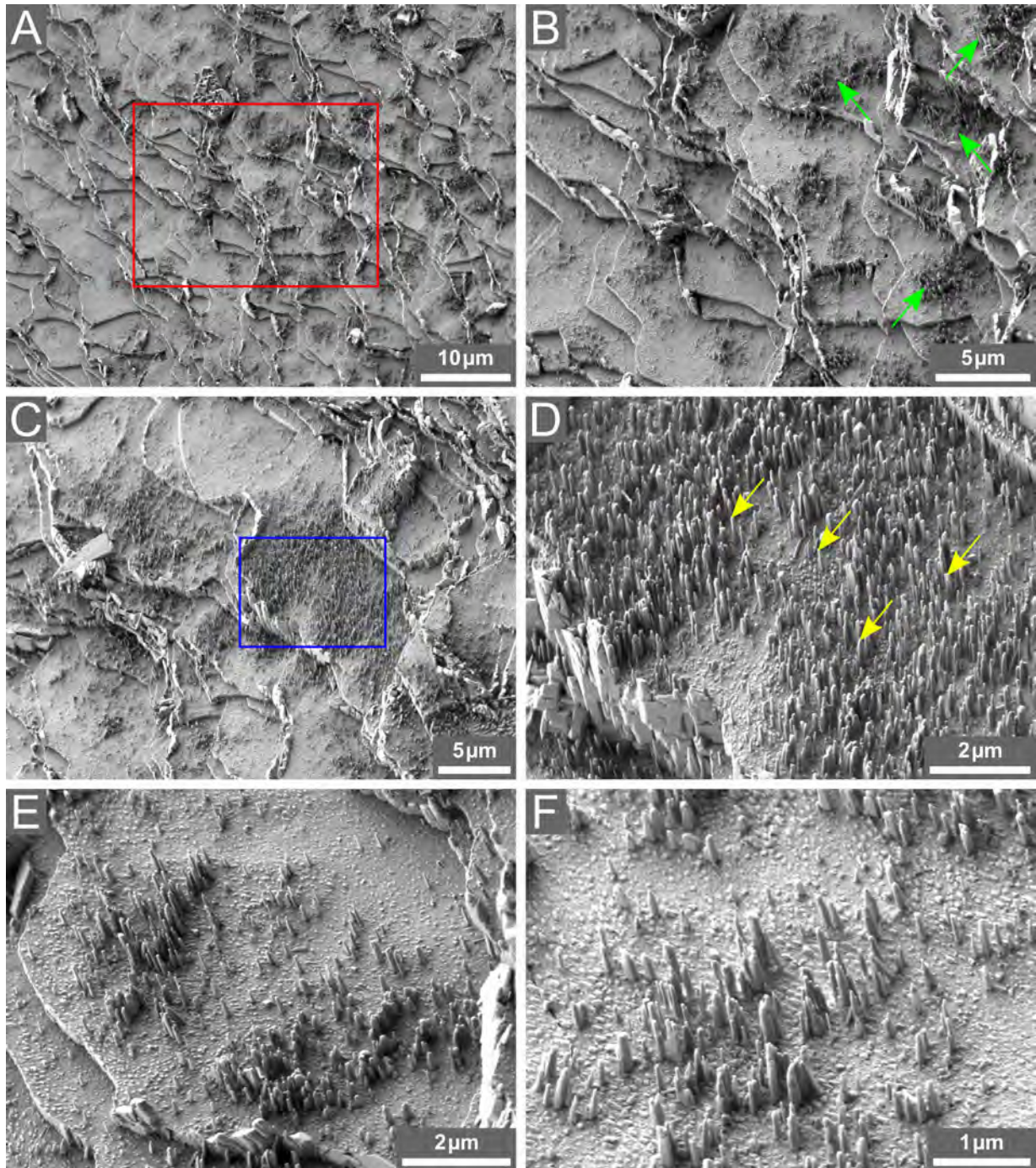


Abbildung 113: Weitere REM-Aufnahmen der bereits in Abb. 92 und 112 gezeigten Perlmutterspaltfläche unter einem Neigungswinkel des Probenstisches von $22,9^\circ$ zur besseren Beobachtung der Form der während des AFM-Wachstumsexperiments (siehe Abb. 89 und 90) gewachsenen CaCO_3 -Kristalle. Scanflächen: (A) $44\ \mu\text{m} \cdot 59\ \mu\text{m}$, (B) $21\ \mu\text{m} \cdot 27\ \mu\text{m}$, (C) $28\ \mu\text{m} \cdot 37\ \mu\text{m}$, (D) $8\ \mu\text{m} \cdot 10\ \mu\text{m}$, (E) $7\ \mu\text{m} \cdot 10\ \mu\text{m}$ und (F) $4\ \mu\text{m} \cdot 5\ \mu\text{m}$; Beschleunigungsspannung: $1,0\ \text{kV}$; Aperturblende: $30\ \mu\text{m}$. Der in (A) rot markierte Bereich ist in (B) vergrößert dargestellt und (D) zeigt eine Nahaufnahme des in (C) blau gekennzeichneten Bereichs. Die auf den Plättchenoberflächen gewachsenen CaCO_3 -Kristalle (z. B. grüne Pfeile in (B) und gelbe Pfeile in (D)) weisen eindeutig nadelartige Formen auf. Nadelartig bzw. nadelförmig bedeutet hier, dass die Höhen der Kristalle wesentlich größer sind als deren Breiten bzw. laterale Ausdehnungen.

10.6 Materialliste

Für alle Experimente

- Ethanol:

Ethanol absolut, $\geq 99,8\%$ (ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse), CAS-Nummer: 64-17-5, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ($M = 46,07 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; 94126 Fontenay-sous-Bois, Frankreich

- Handschuhe:

Peha-soft[®], puderfrei; Paul Hartmann AG; 89522 Heidenheim, Deutschland

- Parafilm:

VWR International, LLC; Radnor, PA 19087, USA

- Pasteurpipetten:

(1) aus Glas, für den Einmalgebrauch, 150 mm Länge; Brand GmbH + Co. KG; 97877 Wertheim, Deutschland

(2) aus Glas, für den Einmalgebrauch, 230 mm Länge; Brand GmbH + Co. KG; 97877 Wertheim, Deutschland

- Pipettenspitzen:

(1) epT.I.P.S.[®], 2 μl - 200 μl Volumen; Eppendorf AG; 22339 Hamburg, Deutschland

(2) epT.I.P.S.[®], 50 μl - 1000 μl Volumen; Eppendorf AG; 22339 Hamburg, Deutschland

- Reinstwasser:

deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand von $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ [4], Milli-Q, Millipak 20, Academic, Q-Gard 2, 0,22 μm ; Merck KGaA; 64293 Darmstadt, Deutschland

- Tücher:

Wischfix, dreilagige hochweiße Haushaltstücher aus 100 % chlorfrei gebleichtem Zellstoff; Fripa; 63897 Miltenberg, Deutschland

- Tücher (fusselfrei):

VWR[®] Light-Duty Tissue Wipers (VWR[®] einfache Tissue-Wischer), einlagige weiße Wischer, Abmessungen: 11,4 cm · 21,0 cm; VWR International, LLC; Radnor, PA 19087, USA

Herstellung der Calciumcarbonat-Lösungen

- Calciumchlorid:

getrocknet und gepulvert, LOT-Nummer: 8E001825, CAS-Nummer: 10043-52-4, CaCl_2 ($M = 110,99 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); BioChemica.Chemica.Synthesis.Service, AppliChem GmbH; 64291 Darmstadt, Deutschland

- Laborglasflaschen:

(1) Duran[®], 500 ml Volumen; DWK Life Sciences GmbH; 55122 Mainz, Deutschland

(2) Duran[®], 1000 ml Volumen; DWK Life Sciences GmbH; 55122 Mainz, Deutschland

- Messzylinder:

Duran[®], 250 ml Volumen; DWK Life Sciences GmbH; 55122 Mainz, Deutschland

- Natriumhydrogencarbonat:

LOT-Nummer: 6K006433, CAS-Nummer: 144-55-8, NaHCO_3 ($M = 84,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); BioChemica.Chemica.Synthesis.Service, AppliChem GmbH; 64291 Darmstadt, Deutschland

- Salzsäure:

37% (Reag. Ph. Eur. zur Analyse), CAS-Nummer: 7647-01-0, HCl ($M = 36,46 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; 94126 Fontenay-sous-Bois, Frankreich

- Wägepapier:

MN 226, transparent, Abmessungen: 9,0 cm · 11,5 cm; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; 52355 Düren, Deutschland

Proteinpräparationen

Proteinpräparation der löslichen organischen Matrix

- Citronensäure-Monohydrat:

CAS-Nummer: 5949-29-1, citric acid monohydrate ($M = 210,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89555 Steinheim, Deutschland

- Dialyseschläuche:

Spectrum[™] Spectra/Por[™] Dialysemembranschläuche, molecular weight cut-off (MWCO) of 3500 Da, 54 mm Flachbreite, 34 mm Durchmesser; Spectrum Laboratories, Inc.; Rancho Dominguez, CA 90220, USA

- Essigsäure:

99,8 % (ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse), CAS-Nummer: 64-19-7, $C_2H_4O_2$
($M = 60,05 \frac{g}{mol}$); VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; 94126 Fontenay-
sous-Bois, Frankreich

- Natriumazid:

CAS-Nummer: 26628-22-8, NaN_3 ($M = 65,01 \frac{g}{mol}$); Sigma-Aldrich Chemie GmbH;
89555 Steinheim, Deutschland

- Natriumcitrat:

CAS-Nummer: 6132-04-3, sodium citrate tribasic dihydrate ($M = 294,10 \frac{g}{mol}$);
Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89555 Steinheim, Deutschland

- Natriumhypochloritlösung:

12 %, CAS-Nummer: 7681-52-9, $NaClO$ in H_2O ($M_{NaClO} = 74,45 \frac{g}{mol}$); Carl Roth
GmbH + Co. KG; 76185 Karlsruhe, Deutschland

- Schneckenschalen:

Art: *Haliotis laevigata*; Australian Abalone Exports Pty. Ltd. (Fred Glasbrenner);
Laverton North, VIC 3026, Australien

- Sterilfilter:

(1) 0,45 μm Porengröße, Durapore[®]-Membranfilter, PVDF-Membran, Typ HVLP;
Merck Millipore Ltd.; Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork T45 KD29, Irland

(2) 0,22 μm Porengröße, Durapore[®]-Membranfilter, PVDF-Membran, Typ GVWP;
Merck Millipore Ltd.; Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork T45 KD29, Irland

- Zentrifugenröhrchen:

(1) Falcon[®], aus Polypropylen, steril, konisches Röhrchen, 15 ml Volumen;
Corning Science México S.A. de C.V.; Reynosa, Tamaulipas 88736, Mexiko

(2) Falcon[®], aus Polypropylen, steril, konisches Röhrchen, 50 ml Volumen;
Corning Science México S.A. de C.V.; Reynosa, Tamaulipas 88736, Mexiko

Proteinpräparation für AFM-Untersuchungen**- Dialyseschläuche:**

Spectrum[™] Spectra/Por[™] Dialysemembranschläuche, molecular weight cut-off
(MWCO) of 3500 Da, 18 mm Flachbreite, 11,5 mm Durchmesser; Spectrum
Laboratories, Inc.; Rancho Dominguez, CA 90220, USA

- Natriumhydrogencarbonat:

LOT-Nummer: 6K006433, CAS-Nummer: 144-55-8, NaHCO_3 ($M = 84,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$);
BioChemica.Chemica.Synthesis.Service, AppliChem GmbH; 64291 Darmstadt,
Deutschland

Bradford-Assay**- Einmalküvetten:**

UV-Küvetten, halbmikro, Abmessungen: 12,5 mm · 12,5 mm · 45 mm, 1,5 ml Mindestfüllvolumen; Brand GmbH + Co. KG; 97877 Wertheim, Deutschland

- Farbstoff:

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad Laboratories GmbH;
85622 Feldkirchen, Deutschland

- Protein (für Kalibrierung):

Lysozym, from chicken egg white; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89555 Steinheim,
Deutschland

SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)**- Antioxidant:**

NuPAGE Antioxidant; InvitrogenTM; Carlsbad, CA 92008, USA

- Bromphenolblau:

CAS-Nummer: 115-39-9; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89555 Steinheim,
Deutschland

- Dithiothreitol (DTT):

DL-Dithiothreitol, for molecular biology, CAS-Nummer: 3483-12-3; Sigma-Aldrich
Chemie GmbH; 89555 Steinheim, Deutschland

- Entfärbelösung:

Zusammensetzung: 50 ml Methanol, 75 ml Essigsäure, 875 ml Reinstwasser [84, 195]

- Essigsäure:

99,8 % (ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse), CAS-Nummer: 64-19-7, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$
($M = 60,05 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; 94126 Fontenay-
sous-Bois, Frankreich

- Farbstoff:

Coomassie-Brillantblau G-250; Carl Roth GmbH + Co. KG; 76185 Karlsruhe, Deutschland

- Färbelösung:

Zusammensetzung: 2,5 g Coomassie Blau G-250, 450 ml Methanol, 90 ml Essigsäure, 460 ml Reinstwasser [84, 195]

- Gele:

NuPAGE 12% Bis-Tris-Gele; InvitrogenTM; Carlsbad, CA 92008, USA

- Glycerin:

wasserfrei, zur Analyse, CAS-Nummer: 56-81-5, C₃H₈O₃ ($M = 92,10 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); BioChemica.Chemica.Synthesis.Service, AppliChem GmbH; 64291 Darmstadt, Deutschland

- Laufpuffer:

NuPAGE MES SDS running buffer (MES → 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, SDS → Natriumdodecylsulfat); InvitrogenTM; Carlsbad, CA 92008, USA

- Methanol:

ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. zur Analyse, CAS-Nummer: 67-56-1, CH₄O ($M = 32,04 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); Merck KGaA; 64293 Darmstadt, Deutschland

- Natriumdodecylsulfat (SDS):

CAS-Nummer: 151-21-3, sodium dodecyl sulfate, C₁₂H₂₅NaO₄S ($M = 288,38 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); BioChemica.Chemica.Synthesis.Service, AppliChem GmbH; 64291 Darmstadt, Deutschland

- Probenpuffer (Laemmli-Pufferlösung):

zweifach konzentriert, Zusammensetzung: 130 mM Tris/HCl (pH 6,8), 6,6% SDS, 20% Glycerin, 10% DTT, 0,01% (w/v) Bromphenolblau [84, 195]

- Proteinmarker:

Mark12TM Unstained Standard; InvitrogenTM; Carlsbad, CA 92008, USA

- Reaktionsgefäße:

Eppendorf Safe-Lock Tubes, farblos, 1,5 ml Volumen; Eppendorf AG; 22339 Hamburg, Deutschland

- Salzsäure:

37 % (Reag. Ph. Eur. zur Analyse), CAS-Nummer: 7647-01-0, HCl ($M = 36,46 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$);
VWR Chemicals, VWR International S.A.S.; 94126 Fontenay-sous-Bois, Frankreich

- Spritze:

Hamilton Company; Reno, NV 89502, USA

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris):

CAS-Nummer: 77-86-1, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ($M = 121,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); Sigma-Aldrich Chemie GmbH;
89555 Steinheim, Deutschland

- Trockenklemmen:

InvitrogenTM; Carlsbad, CA 92008, USA

- Trockenlösung:

Zusammensetzung: 50 ml Glycerin, 75 ml Ethanol absolut, 375 ml Reinstwasser [195]

Probenpräparation***Herstellung der „flat pearls“*****- Deckgläser:**

(1) Menzel-Gläser, rund, 10 mm Durchmesser; Thermo Fisher Scientific, Gerhard
Menzel B.V. & Co. KG; 38116 Braunschweig, Deutschland

(2) Menzel-Gläser, rund, 12 mm Durchmesser; Thermo Fisher Scientific, Gerhard
Menzel B.V. & Co. KG; 38116 Braunschweig, Deutschland

- Einmalspritzen:

(1) Injekt[®]-Solo, zweiteilig, Luer-Ansatz, 10 ml Volumen; B. Braun Melsungen AG;
34212 Melsungen, Deutschland

(2) Injekt[®]-Solo, zweiteilig, Luer-Ansatz, 20 ml Volumen; B. Braun Melsungen AG;
34212 Melsungen, Deutschland

- Meeresschnecken:

Art: *Haliotis tuberculata*; Scea France Haliotis; 29880 Plouguerneau, Frankreich

- Meerwasser:

Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung (AWI);
27570 Bremerhaven, Deutschland

- Petrischalen:

(1) aus Polystyrol, transparent, steril, 35 mm Durchmesser, 10 mm Höhe, 10 ml maximales Volumen; Sarstedt AG & Co. KG; 51588 Nümbrecht, Deutschland

(2) aus Polystyrol, transparent, steril, 60 mm Durchmesser, 15 mm Höhe, 30 ml maximales Volumen; Sarstedt AG & Co. KG; 51588 Nümbrecht, Deutschland

- Spritzenvorsatzfilter:

Millex[®]-GV Filtereinheit, 0,22 µm Porengröße, PVDF Membran; Merck Millipore Ltd.; Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork T45 KD29, Irland

Präparation für AFM-Untersuchungen**- Filterpapier:**

Rundfilter, 110 mm Durchmesser; Schleicher & Schuell BioScience GmbH; 37586 Dassel, Deutschland

- Glimmer:

Abmessungen: 150 mm · 150 mm, englisch: mica; Plano GmbH; 35578 Wetzlar, Deutschland

- Objektträger:

Menzel-Gläser, reinweißes Glas, geschliffen, ohne Mattrand, Abmessungen: 76 mm · 26 mm · 1 mm; Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; 38116 Braunschweig, Deutschland

- Petrischalen:

aus Polystyrol, transparent, steril, 35 mm Durchmesser, 10 mm Höhe, 10 ml maximales Volumen; Sarstedt AG & Co. KG; 51588 Nümbrecht, Deutschland

- Zahnstocher:

Vivess; REWE-Zentral AG; Köln, Deutschland

- Zweikomponentenkleber:

(1) Epoxykleber, zwei Stunden Topfzeit, 10 Stunden Aushärtungszeit; Bindulin; H. L. Schönleber GmbH; 90766 Fürth, Deutschland

(2) Epoxykleber, schnell aushärtend, lösungsmittelfrei, maximal vier Minuten Topfzeit, fünf Minuten Abbindezeit; Bindulin; H. L. Schönleber GmbH; 90766 Fürth, Deutschland

Vorbereitungen für AFM-Untersuchungen

Reinigungsprozeduren

- **Geschirrspülmittel:**

Ultra Joy; Procter & Gamble; Cincinnati, OH 45202, USA

- **Natriumchlorid:**

CAS-Nummer: 7647-14-5, NaCl ($M = 58,44 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); BioChemica.Chemica.Synthesis.
Service, AppliChem GmbH; 64291 Darmstadt, Deutschland

- **Wasserstoffperoxid:**

35 %, CAS-Nummer: 7722-84-1, H₂O₂ ($M = 34,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$); Sigma-Aldrich Chemie
GmbH; 89555 Steinheim, Deutschland

AFM-Untersuchungen

- **AFM-Sonden:**

(1) PeakForce-HiRs-F-A; Bruker; Billerica, MA 01821, USA

(2) ScanAsyst-Air; Bruker; Billerica, MA 01821, USA

Präparation für ergänzende REM-Untersuchungen

- **Edelkorundschleifstifte:**

(1) 2,5 mm Durchmesser, Zylinderform, gefertigt nach DIN 69 170, Nummer: 28 774;
www.proxxon.com

(2) 7,0 mm Durchmesser, Konusform, gefertigt nach DIN 69 170, Nummer: 28 778;
www.proxxon.com

- **Haftaufkleber:**

(1) leitfähig, 12 mm Durchmesser; Plano GmbH; 35578 Wetzlar, Deutschland

(2) leitfähig, 25 mm Durchmesser; Plano GmbH; 35578 Wetzlar, Deutschland

- **Klebeband:**

kupferbeschichtet, leitfähig, 6,4 mm Breite; Plano GmbH; 35578 Wetzlar,
Deutschland

- **Petrischalen:**

aus Polystyrol, transparent, steril, 60 mm Durchmesser, 15 mm Höhe, 30 ml
maximales Volumen; Sarstedt AG & Co. KG; 51588 Nümbrecht, Deutschland

- **Probenteller:**
rund, aus Aluminium, 32 mm Durchmesser; Plano GmbH; 35578 Wetzlar, Deutschland
- **Spezialstiftprobenteller:**
aus Aluminium; Plano GmbH; 35578 Wetzlar, Deutschland
- **Stiftprobenteller:**
aus Aluminium, 12,5 mm Durchmesser; Plano GmbH; 35578 Wetzlar, Deutschland
- **Trennsägeblätter:**
aus Federstahl, 22 mm Durchmesser, 0,1 mm Dicke, Nummer: 28 830; www.proxxon.com

10.7 Geräteliste

- **AFM (Rasterkraftmikroskop):**
BioScope Resolve™; Bruker; Billerica, MA 01821, USA
- **Backenbrecher:**
Pulverisette 1; Fritsch GmbH; 55743 Idar-Oberstein, Deutschland
- **Elektrophoresesystem:**
Consort EV231, X-Cell SureLock™; Invitrogen™; Carlsbad, CA 92008, USA
- **Feinwaage (für Anorganik):**
BP210D; Sartorius AG; 37079 Göttingen, Deutschland
- **Feinwaage (für Organik):**
CP225D; Sartorius AG; 37079 Göttingen, Deutschland
- **Heizplatte:** Maybaum
- **Multifunktionswerkzeug:**
Dremel®, Dremel Europe; 4825 BD Breda, Niederlande
- **Plasmareiniger:**
Ar⁺-Plasmareiniger (TPS 216); Binder Labortechnik; 85241 Hebertshausen, Deutschland
- **REM (Rasterelektronenmikroskop):**
Auriga® series, Gemini®; Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH;
73446 Oberkochen, Deutschland

- Schlammstrahler:

Typ WA 70, Strahlmittel: Aluminiumoxid-Partikel (Al_2O_3 , 0,12 mm bis 0,25 mm Durchmesser); Sigg Strahltechnik GmbH; 79787 Lauchringen, Deutschland

- Spektralphotometer:

CE 1021; Cecil Instruments Ltd.; CB24 6AZ Cambridge, UK

- Stereomikroskop:

Stemi 1000; Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH; 73446 Oberkochen, Deutschland

- UV-Lichtlampe:

Pen-Ray Lampe

- Vakuumzentrifuge:

Savant Speed Vac SPD121P; Schütt Labortechnik GmbH; 37079 Göttingen, Deutschland

10.8 Softwareliste**- Igor:**

WaveMetrics, Inc.; Lake Oswego, OR 97035, USA

- NanoScope Analysis:

Version 1.8; Bruker; Billerica, MA 01821, USA

10.9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACC	amorphes Calciumcarbonat (englisch: amorphous calcium carbonate)
AE	Augerelektronen
AFM	Rasterkraftmikroskop (englisch: atomic force microscope)
AP	Aragonitproteine (englisch: aragonite proteins)
Asp	Asparaginsäure
BSE	Rückstreuelektronen (englisch: backscattered electrons)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ILM	interlamellare Matrix
ITM	intertabulare Matrix

Abkürzung	Bedeutung
MB	Mineralbrücken
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze (englisch: molecular weight cut-off)
NP	Nanoporen
PE	Primärelektronen (englisch: primary electrons)
PILP	polymerinduzierte Flüssigvorstufe (englisch: polymer-induced liquid precursor)
REM	Rasterelektronenmikroskop (englisch: scanning electron microscope)
RS	Röntgenstrahlung
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (englisch: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
SE	Sekundärelektronen (englisch: secondary electrons)

10.10 Einheitenverzeichnis

Einheit	Bedeutung
Å	Ångström
Da	Dalton
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
s	Sekunde
wt. %	Gewichtsprozent (englisch: weight percent)
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

10.11 Formelverzeichnis

Formel	Bezeichnung
A	Oberfläche des Kristallisationskeims [14]
Δg	Differenz der molaren freien Enthalpie der beiden Phasen [62]
ΔG_K	Keimbildungsenthalpie [62]
ΔG_O	Oberflächenanteil der Keimbildungsenthalpie [62]
ΔG_V	Volumenanteil der Keimbildungsenthalpie [62]
σ	spezifische freie Grenzflächenenergie [62]
v	Molvolumen der kristallinen Phase [62]
V	Volumen des Kristallisationskeims [14]

10.12 Chemisches Formelverzeichnis

Formel	Bezeichnung
Al_2O_3	Aluminiumoxid
Ba^{2+}	Bariumion
BaCO_3	Witherit
Ca^{2+}	Calciumion
CaCl_2	Calciumchlorid
CaCO_3	Calciumcarbonat
$\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Ikait (Calciumcarbonat-Hexahydrat)
$\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Monohydrocalcit (Calciumcarbonat-Monohydrat)
$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$	Dolomit
Cl^-	Chloridion
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CO_3^{2-}	Carbonation
Fe^{2+}	Eisen(II)-ion
FeCO_3	Siderit
H^+	Wasserstoffion bzw. Proton
HCl	Salzsäure
HCO_3^-	Hydrogencarbonation
LaB_6	Lanthanhexaborid
Mg^{2+}	Magnesiumion
MgCO_3	Magnesit

Formel	Bezeichnung
Mn^{2+}	Mangan(II)-Ion
MnCO_3	Rhodochrosit
Na^+	Natriumion
NaClO	Natriumhypochlorit
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
Pb^{2+}	Blei(II)-Ion
PbCO_3	Cerussit
Sr^{2+}	Strontiumion
SrCO_3	Strontianit
Zn^{2+}	Zinkion
ZnCO_3	Smithsonit

Abbildungsverzeichnis

1	Aragonit-Kristallstruktur.	7
2	REM-Aufnahmen einer frisch erzeugten Perlmutterbruchfläche.	12
3	Schematische Zeichnung des Perlmutteraufbaus.	13
4	AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur der unlöslichen organischen Matrix aus dem Perlmutter von <i>Haliotis laevigata</i>	15
5	AFM-Aufnahmen der unlöslichen organischen Matrix aufgenommen während des Abbaus von gebundenen Proteinen mittels Proteasen.	17
6	Modell der interlamellaren organischen Matrix (ILM).	18
7	Schematische Darstellung der Verteilung von Makromolekülen in der ILM und ITM.	20
8	Mit der SDS-PAGE erhaltene Gele mit den Proteinen der löslichen und unlöslichen Matrix.	22
9	Schalen von Meeresschnecken der Arten <i>Haliotis tuberculata</i> und <i>Haliotis laevigata</i>	27
10	Wachstumsfront und „stacks of coins“.	28
11	Schematische Darstellung zur Entstehung der „stacks of coins“.	29
12	Schematische Darstellung des heteroepitaktischen Wachstumsmodells und des Mineralbrückenmodells.	31
13	Interferenz an der etwa 500 nm dicken Aragonitschicht.	33
14	REM-Bilder von AFM-Federbalken und AFM-Spitze.	35
15	Schematische Darstellung des beim AFM verwendeten Rückkopplungsmechanismus.	36
16	Schematische Zeichnung zum PeakForce Tapping-Modus	39
17	Wechselwirkungsbereich beim Rasterelektronenmikroskop (REM).	42
18	Abhängigkeit des pH-Wertes und des Sättigungsgrades der präparierten CaCO ₃ -Lösung von den Konzentrationen der Stammlösungen.	50
19	Gewinnung der „flat pearls“.	52
20	Nach sechswöchiger Inkubation entstandene „flat pearl“.	54
21	REM-Aufnahmen mehrerer „stacks of coins“ der Wachstumsfront einer nach 14-tägiger Inkubation entstandenen „flat pearl“.	55
22	Präparation der „flat pearl“-Probestücke für AFM-Untersuchungen.	56
23	Präparation der Perlmutterpaltflächen für AFM-Untersuchungen.	57
24	REM-Aufnahmen eines für AFM-Untersuchungen präparierten „flat pearl“-Probestücks.	59

25	Schematische Darstellung der Präparationsprozedur der Proben für AFM-Untersuchungen.	60
26	Verwendete Sondenhalter für AFM-Untersuchungen.	66
27	Unterseite des AFM-Kopfs mit Sondenhalter.	67
28	AFM-Kopf und „EasyAlign TM station“.	69
29	Austauschprozedur der CaCO ₃ -Lösungen während der AFM-Wachstumsexperimente.	74
30	Innenkammer des REM.	76
31	Apparatur zum Entfernen des Petrischalenrandes.	78
32	Schematische Zeichnung der Kontaktierung des Petrischalenbodens.	79
33	Innenkammer des REM mit präparierter Probe.	80
34	AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur einer nach 14-tägiger Inkubation entstandenen Wachstumsfront.	85
35	Beispielhafte Vermessung der Höhen einzelner Aragonitplättchen bei einem „stack of coins“.	86
36	AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur einer weiteren nach 14-tägiger Inkubation entstandenen Wachstumsfront.	88
37	AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur einer nach nur 10-tägiger Inkubation entstandenen Wachstumsfront.	91
38	Weiter vergrößerte AFM-Aufnahmen der nach nur 10-tägiger Inkubation entstandenen Wachstumsfront.	94
39	Schematische Zeichnung zur Höhenvermessung einzelner Filamente.	96
40	Beispielhafte Vermessung der Höhe eines einzelnen Filaments.	97
41	Histogramm der ausgemessenen Höhen für 60 Filamente.	99
42	Oberflächenstruktur von verschiedenen Wachstumsfronten aufgenommen mit ScanAsyst-Air AFM-Sonden.	100
43	Erstes Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz.	105
44	Zeitstrahl des detaillierten Ablaufs beim ersten in Abb. 43 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche.	108
45	Weitere AFM-Aufnahmen der Wachstumsfront aufgenommen beim ersten Wachstumsexperiment.	111
46	REM-Aufnahmen des „flat pearl“-Probestücks aufgenommen nach dem ersten Wachstumsexperiment.	115
47	REM-Aufnahmen zur Ausmessung der lateralen Ausdehnungen bzw. Durchmesser einzelner Aragonitplättchen der „stacks of coins“.	117

48	Zweites Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz.	122
49	Weitere Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz aufgenommen während des zweiten Wachstumsexperiments auf einer „flat pearl“-Oberfläche.	123
50	Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim zweiten in Abb. 48 und 49 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche.	124
51	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 48 dargestellten Höhsignale.	128
52	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 49 dargestellten Höhsignale.	129
53	Beispielhafte Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit eines Kristalls beim zweiten Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche.	132
54	Ausgewählte Kristalle für die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten beim zweiten Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche.	133
55	REM-Aufnahmen des „flat pearl“-Probestücks aufgenommen nach dem zweiten Wachstumsexperiment.	139
56	REM-Aufnahmen des „flat pearl“-Probestücks bei weiterer Vergrößerung aufgenommen nach dem zweiten Wachstumsexperiment.	140
57	AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche.	145
58	3D-Rekonstruktion des in Abb. 57 dargestellten Höhsignals (B1).	147
59	AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur einer weiteren frisch präparierten Perlmutterpaltfläche.	150
60	3D-Rekonstruktion des in Abb. 59 dargestellten Höhsignals (A1).	151
61	AFM-Aufnahmen von zwei frisch präparierten Perlmutterpaltflächen mit Resten der intertabularen organischen Matrix (ITM).	153
62	AFM-Aufnahmen einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche bei Bedeckung mit organischer Matrix.	155
63	AFM-Aufnahmen der Oberflächenstruktur einer weiteren Perlmutterpaltfläche.	160
64	3D-Rekonstruktion des in Abb. 63 dargestellten Höhsignals (B1).	162
65	Erstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz.	164
66	Weitere Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz aufgenommen während des ersten Wachstumsexperiments auf einer Perlmutterpaltfläche.	165
67	Zeitstrahl des detaillierten Ablaufs beim ersten in Abb. 65 und 66 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche.	166
68	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 66 dargestellten Höhsignale.	170

69	Ausgewählte Kristalle für die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten beim ersten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche.	173
70	REM-Aufnahmen der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche aufgenommen nach dem ersten Wachstumsexperiment.	177
71	Weitere REM-Aufnahmen der Perlmutterpaltfläche aufgenommen nach dem ersten Wachstumsexperiment.	178
72	Zweites Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz.	182
73	Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim zweiten in Abb. 72 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche.	184
74	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 72 dargestellten Höhengsignale.	186
75	Ausgewählte Kristalle für die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten beim zweiten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche.	188
76	REM-Aufnahmen der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche aufgenommen nach dem zweiten Wachstumsexperiment.	192
77	Beispielhafte Berechnung der Fläche eines einzelnen Aragonitplättchens. . .	194
78	Ermittlung der Oberflächendichten der auf den Aragonitplättchen vorhandenen nadelförmigen Kristalle nach dem zweiten Wachstumsexperiment. . .	195
79	Weitere REM-Aufnahmen der Perlmutterpaltfläche aufgenommen nach dem zweiten Wachstumsexperiment.	197
80	Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim dritten in Abb. 81 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche.	204
81	Drittes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz.	205
82	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 81 dargestellten Höhengsignale.	206
83	Ausgewählte Kristalle für die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten beim dritten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche.	208
84	REM-Aufnahmen der ursprünglich frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche nach dem dritten Wachstumsexperiment.	212
85	Viertes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: AFM-Aufnahmen der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche in 3 ml einer 1 mM CaCO_3 -Lösung.	214
86	AFM-Aufnahmen des in Abb. 85 gezeigten Probenbereichs der Perlmutterpaltfläche vor und nach Initiierung des Kristallwachstums.	216
87	Fünftes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: ausgewählte Aufnahmen aus der AFM-Bildsequenz.	218

88	Sechstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: AFM-Aufnahmen der frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche in 3 ml einer 0,9 mM CaCO_3 -Lösung.	221
89	Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim sechsten in Abb. 90 gezeigten Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche.	222
90	AFM-Aufnahmen des in Abb. 88 gezeigten Probenbereichs der Perlmutterpaltfläche vor und nach Initiierung des Kristallwachstums.	224
91	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 90 dargestellten Höhengsignale.	227
92	REM-Aufnahmen der Perlmutterpaltfläche aufgenommen nach dem sechsten in Abb. 89 und 90 gezeigten Wachstumsexperiment.	229
93	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 34 gezeigten Höhengsignale.	259
94	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 36 dargestellten Höhengsignale.	260
95	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 37 dargestellten Höhengsignale.	261
96	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 38 gezeigten Höhengsignale.	262
97	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 42 dargestellten Höhengsignale.	263
98	3D-Rekonstruktionen aller in Abb. 48 dargestellten Höhengsignale.	265
99	3D-Rekonstruktionen aller in Abb. 49 gezeigten Höhengsignale.	266
100	3D-Rekonstruktion des in Abb. 57 dargestellten Höhengsignals (A1).	267
101	Beispielhafte Vermessung der Aragonitplättchenhöhen bei einer Perlmutterpaltfläche.	268
102	3D-Rekonstruktionen aller in Abb. 65 gezeigten Höhengsignale.	269
103	3D-Rekonstruktionen aller in Abb. 66 gezeigten Höhengsignale.	270
104	3D-Rekonstruktionen aller in Abb. 72 gezeigten Höhengsignale.	272
105	3D-Rekonstruktionen aller in Abb. 81 gezeigten Höhengsignale.	274
106	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 85 dargestellten Höhengsignale.	276
107	Zeitstrahl für das vierte in Abb. 86 gezeigte Wachstumsexperiment auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche.	277
108	3D-Rekonstruktionen der in Abb. 86 dargestellten Höhengsignale.	278
109	AFM-Aufnahmen der Perlmutterpaltfläche mit höherer Auflösung aufgenommen nach dem vierten Wachstumsexperiment aus Abb. 85, 86 und 107.	279
110	3D-Rekonstruktionen aller in Abb. 87 dargestellten Höhengsignale.	280
111	Zeitstrahl des genauen Ablaufs beim fünften in Abb. 87 dargestellten Wachstumsexperiment auf einer frisch gespaltenen Perlmutteroberfläche.	281
112	Weitere REM-Aufnahmen der bereits in Abb. 92 gezeigten Perlmutterpaltfläche aufgenommen nach dem sechsten in Abb. 89 und 90 dargestellten Wachstumsexperiment.	282

- 113 Weitere REM-Aufnahmen der bereits in Abb. 92 und 112 gezeigten Perlmuttspaltfläche aufgenommen nach dem sechsten in Abb. 89 und 90 dargestellten Wachstumsexperiment. 283

Tabellenverzeichnis

1	Benötigte Massen an Calciumchlorid (CaCl_2) und Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) für die Herstellung der Stammlösungen.	49
2	Erstes Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung.	107
3	Ausgemessene laterale Ausdehnungen bzw. Durchmesser einzelner Aragonitplättchen mehrerer „stacks of coins“.	116
4	Berechnete Flächen einzelner Aragonitplättchen mehrerer „stacks of coins“.	118
5	Zweites Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung.	125
6	Zweites Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$	134
7	Erstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung.	168
8	Erstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$	174
9	Zweites Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung.	183
10	Zweites Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$	189
11	Ermittelte Oberflächendichten der auf einigen ausgewählten Plättchenoberflächen während des zweiten auf einer Perlmutterpaltfläche durchgeführten Wachstumsexperiments gewachsenen Kristalle.	196
12	Drittes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung.	203
13	Drittes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$	209
14	Viertes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum der Probe in der jeweiligen Lösung.	215

15	Fünftes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum des Probestücks in der jeweiligen Lösung.	219
16	Sechstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: verwendete Konzentrationen der CaCO_3 -Lösung in der Petrischale und Zeitraum des Probestücks in der jeweiligen Lösung.	223
17	Spezifikationen der PeakForce-HiRs-F-A AFM-Sonden.	257
18	Spezifikationen der ScanAsyst-Air AFM-Sonden.	258
19	Zweites Wachstumsexperiment auf einer „flat pearl“-Oberfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$	264
20	Erstes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$	271
21	Zweites Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$	273
22	Drittes Wachstumsexperiment auf einer Perlmutterpaltfläche: berechnete Wachstumsgeschwindigkeiten der CaCO_3 -Kristalle in $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$	275

Anlage 1

Erklärung gemäß § 7 (2)

Hiermit versichere ich, dass ich

1. die Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
2. keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe,
3. die, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Datum: _____

Unterschrift: _____