



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Polymerbasierte, künstliche Rezeptorschichten für die
Sensorik von Bakterienspezies unter realen
Bedingungen“

Verfasserin

Mag. rer. nat. Renata Samardzic

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, Februar 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 791 419
Dissertationsgebiet lt. Studienblatt:	Chemie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Betreuung von Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit in der Abteilung für Sensorik und Schnellanalytik am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Währinger Straße 38, 1090 Wien, Österreich.

Mein Dank geht an

Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit für hervorragende und kompetente Leitung und Unterstützung während meiner praktischen und theoretischen Arbeit.

alle meine Kolleginnen und Kollegen der Abteilung, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite gestanden sind und für hilfreiche Diskussionsbereitschaft und Anregungen aller Art immer bereit waren.

meinen Ehemann Tomislav, meine Söhne Sebastian und Benjamin und meine ganze Familie, die mich während meiner Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

Inhalt

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund	7
1.1 Chemosensor	8
1.1.1 Definition und Aufbau	8
1.1.2 Anwendungsgebiete und Anforderungen	9
1.1.3 Kommerzielle Sensorsysteme	10
1.1.4 Piezoelektrizität und Elektrostriktion	12
1.1.5 Piezoelektrizität eines Quarzkristalls	14
1.1.6 Quartz Crystal Microbalance (QCM)	15
1.1.7 Sauerbrey-Gleichung	18
1.2. Molekulares Prägen	21
1.2.1 Die Rezeptor-Schicht-Wechselwirkung	21
1.2.2 Strategien des molekularen Prägens	22
1.3. Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)	24
1.4 <i>Escherichia coli</i>	26
1.5 Schnellanalytik der <i>E. coli</i>	29
2. Experimenteller Aufbau	31
2.1. Elektrodendesign der QCM	31
2.1.1 Bauteilherstellung	32
2.1.2 Bauteilcharakterisierung	33
2.2 Die Messzellen	34
2.3 Die Oszillatormessung	36
2.4 <i>E. coli</i> -Zucht und Fluoreszenzmikroskopie	37
2.5 Herstellung und Optimierung der MIP	41
2.5.1 Polyurethan-MIP	41
2.5.2 Auftragung der Schicht	43
2.5.3 Polymeroptimierung und Generieren von Kavitäten	44
2.6 Messung in flüssiger Phase	48
3. QCM-Sensor-Messungen	51
3.1 Sensorcharakteristik	51
3.2 Reproduzierbarkeit der b- und w-MIP	55
3.3 Selektivität der b- und w-MIP	57
Resümee:	60
4. Langzeitstabilität	61
4.1 Zeitlicher Verlauf der Sensorantworten	61
4.2 Langzeitmessung: Lagerbarkeit	68

Resümee:	73
5. Messungen unter Realbedingungen	75
5.1 Die Züchtung von <i>E. coli</i> im Bioreaktor	78
5.2 Selektivitätsstudien im Bioreaktor.....	85
5.3 Monitoring von Mischkulturen.....	90
Resümee:	95
6. Sensorarrays mit <i>E. coli</i> -MIP	97
6.1 Dreielektrodenmessungen in stopped-flow Modus	99
6.2 Dreielektrodenmessungen unter Realbedingungen	103
6.2.1 Inhibierung der Züchtung mit N-Hydroxyharnstoff.....	103
6.2.2 Inhibierung der Züchtung mit Lysozym	110
Resümee:	114
7. Deutsche Zusammenfassung	115
7.1 Summary.....	117
8. Anhang	119
8.1. Geräte.....	119
8.2. Abkürzungen	120
9. Lebenslauf	121
10. Literaturverzeichnis.....	123

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

Die Analytische Chemie beschäftigt sich sowohl mit der qualitativen als auch mit der quantitativen Analyse der unterschiedlichen Substanzklassen und Moleküle. Neben der Weiterentwicklung etablierter instrumenteller Techniken, ist die Analytische Chemie bemüht, die Entwicklung neuer Messmethoden voranzutreiben. Ein zunehmend wichtiger Aspekt der Analytik sind Sensoren, chemischer und biologischer Art.

Als Sensoren werden miniaturisierte Messfühler bezeichnet, die potentiell breite, universelle Verwendung in der Chemie, der Biologie und der Technik haben können.

Beispielsweise werden in der Umweltanalytik¹ mit schnellen, zuverlässigen und kleinen Handgeräten organische Kontaminationen in Boden, Luft und Wasser bestimmt. Ebenso ist auch möglich den CO₂-Gehalt in der Luft zu bestimmen. In der Lebensmitteltechnologie, der Umweltanalytik und für Kontrollen von biologischen Prozessen² ist das Detektieren von Mikroorganismen³ und Zellen in unterschiedlichen Matrices von zunehmender Bedeutung. Chemische Sensoren werden auch immer mehr im Personenschutz, Umweltschutz und der Betriebsmesstechnik⁴ nachgefragt und fördern daher die Entwicklung schnellerer und zuverlässigerer Methoden.

Es gibt auch einige Sensorsysteme, die mehrere Elementarsensoren in eine Einheit zusammenfassen. Solche anspruchsvollere Geräte ermöglichen die Detektion mehrerer Parameter gleichzeitig, aber zeichnen sich auch durch hohe Kosten aus. Die mehrmalige Verwendbarkeit, geringe Anschaffungskosten, Erfassung von Substanzen und Molekülen vor Ort und leicht bedienbare Geräte sind die Erkennungsprofile eines Sensors.

In dieser Arbeit wurden massensensitive Bauteile (Quartz Crystal Microbalance) eingesetzt, die auf den Phänomenen der Analyt-Absorption und -Adsorption beruhen und sich durch Massenbeladung und Frequenzänderung manifestieren. Die chemische Zusammensetzung der sensitiven Schicht wirkt sich auf diese physikalischen Prozesse auf der Sensoroberfläche aus und beeinflusst die Messergebnisse. Diese sensitive Schicht wird mittels Spin-Coating-Verfahren direkt auf die Sensoroberfläche generiert und eignet sich für die Erfassung der biologischen und chemischen Proben.

1.1 Chemosensor

1.1.1 Definition und Aufbau

Nach IUPAC - (International Union of Pure and Applied Chemistry) Definition

ist ein Chemosensor *“A device that transforms chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytically useful signal. The chemical information, mentioned above, may originate from a chemical reaction of the analyte or from a physical property of the system investigated”*⁵.

Ein derartiger kleiner Messfühler ist also in der Lage, die Ab- oder Anwesenheit eines Analyten nachzuweisen, aber auch eine Änderung der Konzentration in einer Flüssigkeit oder in einem Gas zu erfassen⁶.

Das Design eines chemischen Sensors muss für genau bestimmte Applikation und den konkreten Analyten optimiert werden. Ein Chemosensor besteht prinzipiell aus vier wichtigen Teilen, nämlich einer sensitiven Erkennungsschicht (Rezeptor), einem Umwandlungssystem (Transducer), der Messelektronik und der EDV, die als Informationsverarbeitungssystem agieren⁷. Abbildung 1 fasst dieses Grundprinzip noch einmal zusammen.

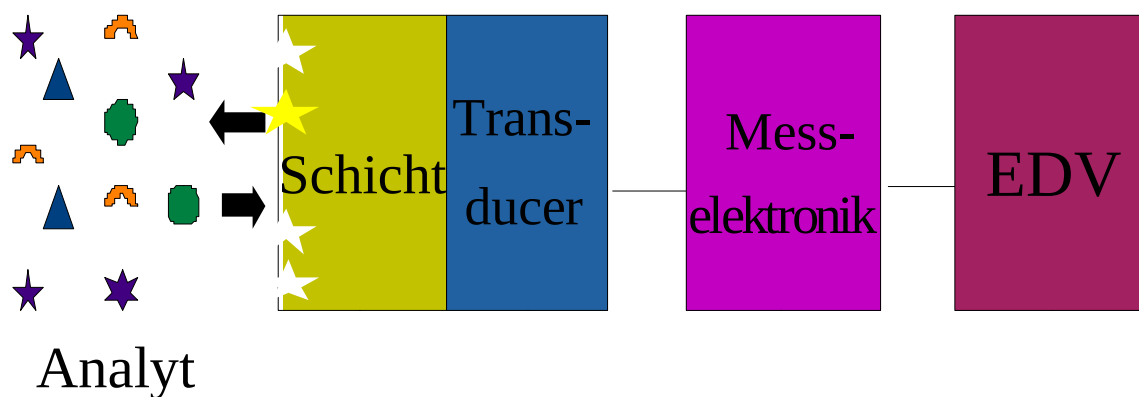


Abbildung 1: Darstellung eines Chemosensors und seine Funktionalität

Die Erkennungsschicht interagiert mit einem Analyten aus einer Matrix und lagert ihn mit möglichst hoher Empfindlichkeit und Selektivität ein. Eine Aussage über die Qualität des Chemosensors hängt von diesen beiden Parametern wesentlich ab. Die Einlagerung und Anreicherung eines Analyten führt zur Änderung physikalischer oder chemischer Eigenschaften wie Leitfähigkeit, Temperatur, Kapazität, Absorption⁸, Masse⁹ und Potential der sensitiven Schicht.

Diese Änderungen entsprechen dem Sensorsignal und werden durch den Transducer in ein elektrisches Signal umgewandelt und der Messelektronik weitergeleitet. Die so erhaltenen Rohdaten werden weiter über ein Informationsverarbeitungssystem bearbeitet.

1.1.2 Anwendungsgebiete und Anforderungen

Sensoren sind wichtige Instrumente für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten¹⁰, wie beispielsweise Verfahrenstechnik chemischer und biotechnologischer Prozesse, Kraftwerk- und Sicherheitstechnik, Fertigungstechnik (Kfz-Fertigung, Maschinenbau, Prüftechnik, Elektronikfertigung), Medizintechnik (im Labor und an unterschiedlichen Krankheitsbildern) und Luft- und Raumfahrt, Umwelt und Prüfprozesse. Die unterschiedlichen Anforderungen, die an einen Sensor gestellt werden, hängen von allgemeinen Qualitätskriterien an bestimmte Analysemethoden und spezielle Anforderungen ab¹¹. Diese sind in der

Tabelle 1 präsentiert und sie unterscheiden sich im Hinblick auf¹²:

❖ statische Eigenschaften: Genauigkeit, Empfindlichkeit, Querempfindlichkeit, Messbereich und Einfluss von Störgrößen
❖ dynamische Übertragungseigenschaften: messgrößenabhängige (Kriechen), messgrößenunabhängige (lineare Systeme) und belastungsabhängige Eigenschaften (Alterung)
❖ Systemfähigkeiten durch normierte Ausgangssignale, Bedienelemente vor Ort und Wartbarkeit
❖ Lebensdauer und Zuverlässigkeit Ausfallrate
❖ Kosten Einzelstückkosten und Degression bei Mehrstückkosten, Wartungskosten und gesamte Lebensdauerkosten
❖ Miniaturisierbarkeit und Kompatibilität zur Betriebsbedingungen Temperatur, Radioaktivität und Druck ¹³ .

Tabelle 1 :Spezielle Anforderungen und Qualitätskriterien eines Chemosensors

Ebenso können Sensoren nach ihren Funktionsprinzipien unterteilt¹⁴ werden, nämlich ob sie beispielsweise auf optischen, elektrischen oder akustischen Effekten beruhen.

Tabelle 2 fasst verschiedene Sensorprinzipien zusammen:

Funktionsprinzip	Sensortyp
Potentialänderung	ISE, Feldeffekttransistoren, Festkörper-Gassensoren
Leitfähigkeitsänderung	Organische Halbleiter, Metalloxid-Halbleiter
Resonanzfrequenzänderung	Piezoelektrische Waage, SAW-Oberflächenakustische Wellen
Stromänderung	CLARK- und Enzymelektroden, Immunsensoren
Änderung optischer Größen	Transmission/Absorption, Trübung, Remission, Fluoreszenz
Optothermische Wechselwirkung	Fotoakustischer Sensor
Wärmeeffekt	Pellistoren, thermische/kalorimetrische Sensoren

Tabelle 2: Funktionsprinzipien und Sensortypen

1.1.3 Kommerzielle Sensorsysteme

Die meisten kommerziellen Chemosensoren sind elektrochemischer Natur¹⁵. Einer der bekanntesten und weitverbreitesten Sensoren ist die Lambda-Sonde¹⁶. Sie ist ein potentiometrischer Sensor, der das optimale Verhältnis von Sauerstoff zu Treibstoff in Ottomotoren regelt. Ihre sensitive Schicht besteht aus Zirkoniumdioxid, das mit Yttrium dotiert ist¹⁷. Das Messprinzip basiert auf der potentiometrischen Messung des Verbrennungsabgases gegen Luft. Weicht die Potentialdifferenz zwischen zwei sauerstoffspezifischen Elektroden vom Sollwert ab, ist kein Sauerstoff im Abgas und die Sonde reguliert die Luftzufuhr zum Vergaser.

Ionenselektiven Elektroden¹⁸ sind eine andere Gruppe von potentiometrischen Sensoren, die etwa zur Schwermetallbestimmung in Gewässern herangezogen werden. Ihr bekanntester Vertreter ist die Glaselektrode zur pH-Bestimmung. Die Glaselektrode setzt sich aus einer Messelektrode und einer Referenzelektrode, die sich in einer Einstabmesskette befinden, zusammen. Die Referenzelektrode besteht aus Silberdraht, Silberchlorid und einer Elektrolytlösung. Die Messelektrode besteht aus Silberdraht, Silberchlorid, einer Elektrolytlösung und zusätzlich einer Pufferlösung.

Jede Glaselektrode muss vor der pH-Bestimmung mit Lösungen des bekannten pH-Wertes kalibriert werden. An der Glaselektrode bildet sich ein Potential aus, der von den Wasserstoffaktivitäten abhängig ist und der der Nernst Gleichung gehorcht.

Im Gegensatz dazu beruht der kommerziell ebenfalls sehr bedeutende Taguchi-Sensor auf konduktometrischen Messungen. Er besteht aus SnO_2 , das mit Platin oder Palladium dotiert ist. Bei Betriebstemperaturen zwischen 350°C - 500°C ist er aufgrund der Sauerstofffehlstellen ein n-Halbleiter. Das SnO_2 adsorbiert an der Luft Sauerstoff und der wird dann an der Oberfläche reduziert. Durch die Reduktion wird die Elektronenkonzentration herabgesetzt und auch die Leitfähigkeit im Halbleiter erniedrigt. In diesem Temperaturbereich reagieren die reduzierten Gase mit dem an der Oberfläche adsorbierten Sauerstoff und führen wiederum zur Leitfähigkeitserhöhung.

Auf der Amperometrie beruht die sogenannte Clark-Elektrode¹⁹, mit deren Hilfe der Sauerstoffgehalt in Lösung gemessen wird, z.B. bei Enzymreaktionen oder Blutgasanalysen. Sie besteht aus zwei Elektroden, nämlich einer als Kathode eingesetzten Platinelektrode und einer als Anode eingesetzten Silberelektrode. Diese befinden sich in einer, mit Elektrolyt z.B. KOH-Lösung gefüllten Messzelle, die mittels sauerstoffdurchlässiger Membran verschlossen ist. Die Spannung wird angelegt und konstant gehalten, wobei an der Kathode der Sauerstoff in der Lösung durch die Elektronenaufnahme reduziert wird. Die an der Anode erzeugten Elektronen wandern nun zur elektronenreduzierten Kathode. Das Elektronendefizit wird so ausgeglichen und dadurch wird messbarer Stromfluss erzeugt und gemessen. Ebenfalls auf amperometrischen Messungen beruht der weitestverbreitete Biosensor, mit dem der Glukosegehalt im Blut bestimmt wird. Er besteht aus Glukoseoxidase auf einer Arbeitselektrode. Die Oxidase katalysiert die Oxidation von Glukose mit Sauerstoff. Elektrochemisch erfolgt die Rückoxidation des Wasserstoffperoxids, wobei wieder Sauerstoff entsteht und sein Rückgang im Blut direkt proportional zum Glukosegehalt²⁰ ist. Im Jahr 1987 wurde erstes Blutzuckermessgerät von Medisense zum Selbstgebrauch angeboten. Während der Umsetzung des Monosaccharids verbraucht Glukoseoxidase Sauerstoff und produziert Wasserstoffperoxid.

1.1.4 Piezoelektrizität und Elektrostriktion

Massensensitive Sensoren haben den großen Vorteil, dass sie direkt auf einem gravimetrischen Messprinzip beruhen. Der am weitesten verbreitete massensensitive Transducer ist die Quarzmikrowaage (Quartz Crystal Microbalance, QCM) auch Schwingquarz genannt. Sie besteht aus einem dünnen Quarzplättchen, welches schwingt wenn eine Wechselspannung angelegt wird. Auf dem Quarzplättchen befinden sich an den gegenüberliegenden Flächen Elektroden. Wenn eine Elektrode eine sensitive Schicht trägt, entsteht ein Sensor, der auf die Einlagerung eines Analyten in die sensitive Schicht reagiert. Die damit verbundene Änderung der Masse der sensitiven Schicht manifestiert sich als Frequenzänderung. Die Grundlage massensensitiver Transducer ist der piezoelektrische Effekt²¹ bzw. der reziproke piezoelektrische Effekt, nämlich die Elektrostriktion.

Die Piezoelektrizität wurde im Jahr 1880 von Jaques und Pierre Curie an Turmalinkristallen und die Elektrostriktion im Jahr 1881 von Pierre Curie und J.L.Lippmann entdeckt. Die Piezoelektrizität beschreibt die Wechselwirkung zwischen elektrischen Größen wie Oberflächenladung und Polarisation mit mechanischen Größen wie Dehnung oder mechanische Spannung in einem Festkörper²². Bei mechanischer Deformation eines Kristalls kommt es zur Ladungsbildung an der Oberfläche. Im Kristallgitter werden die Atome verschoben und Schwerpunkte der Ladung getrennt. Durch die Ladungsverschiebung entsteht ein Dipolmoment. Das Kristallgitter darf polare Achsen besitzen, aber kein Inversionszentrum²³. Das Resultat der Ladungstrennung ist in diesem Fall elektrische Spannung. Abhängig von der Kompressionsrichtung laden sich entweder die Flächen, an denen Druck ausgeübt wird (longitudinaler piezoelektrischer Effekt) oder die zwei senkrecht dazu stehenden Flächen (transversaler piezoelektrischer Effekt) auf. In der Abbildung 2 sind diese Piezoeffekte dargestellt.

Bei der Elektrostriktion tritt eine mechanische Deformation auf, wenn ein elektrisches Feld entlang der polaren Achse angelegt wird. Das Kristall wird abhängig von der Kristallpolung gedehnt oder komprimiert.

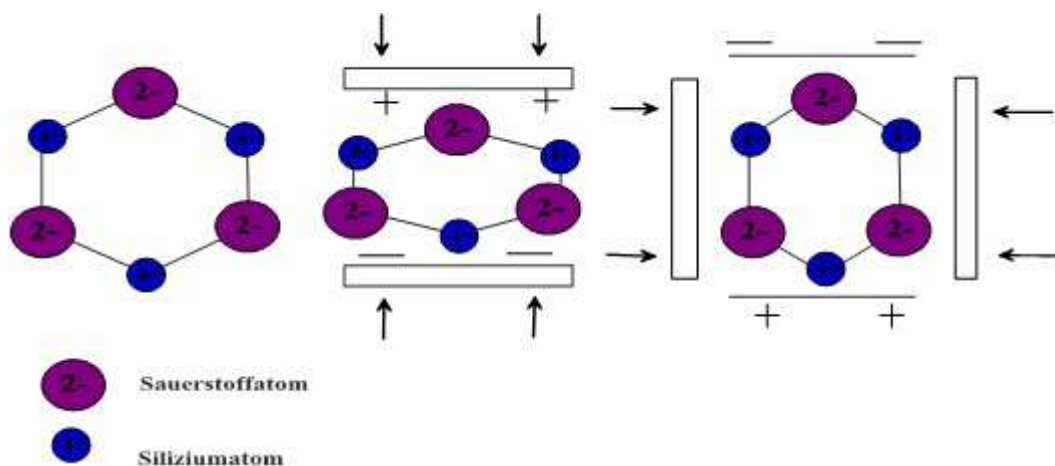


Abbildung 2: Der Piezoeffekt eines Quarzkristalls: die Sauerstoffatome und Siliziumatome verschieben sich entlang einer Achse

Durch die angelegte Wechselspannung kommt es zu den mechanischen Schwingungen des Kristalls, wie in Formel 1 beschrieben:

$$E = \delta \frac{\Delta x}{x} \quad \text{bzw.} \quad U = \delta \Delta x$$

Eelektrische Feldstärke

Uelektrische Spannung

$\Delta x, x$Auslenkung, Länge in Deformationsrichtung

δpiezoelektrischer Koeffizient

Formel 1: Inverser Piezoelektrischer Effekt

Der Piezoeffekt tritt in nichtleitenden Materialien auf. Der bekannteste Vertreter eines Piezomaterials ist Quarz (SiO_2), weitere sind Lithiumniobat, Bariumtitanat, Berlinit, Galliumorthophosphat und Minerale der Termilingruppe.

1.1.5 Piezoelektrizität eines Quarzkristalls

Siliziumdioxid (Quarz) ist eines der häufigsten Minerale der Erdkruste. Die α -Modifikation behält ihre stabilste Form bis 573°C und wird dann in die β -Modifikation umgewandelt. Die Kristallstruktur gehört zur Kristallklasse 32²⁴. Die Struktur besteht aus einem Netzwerk aus Tetraedern $[\text{SiO}_4]^{4-}$, die über ihren Ecken verknüpft sind. In Abbildung 3 ist der hexagonale Quarzkristall mit drei Achsen im Querschnitt gezeigt. Die elektrische Achse schließt unter einem Winkel von 90° mit der optischen Achse ein. Sie verläuft durch die Ecke des Quarzkristalls. Durch die Deformationen entlang der elektrischen Achse entstehen elektrische Ladungen und diese Phänomene beschreiben einen direkten Piezoeffekt. Entlang der optischen Achse wird die Doppelbrechung beobachtet, da sie durch die Spitze des Quarzkristalls verläuft. Die mechanische Achse steht senkrecht zur optischen und elektrischen Achse. Wenn entlang der elektrischen Achse eine Spannung anliegt, wird mechanische Elongation (indirekter Piezoeffekt oder Elektrostriktion) beobachtet.

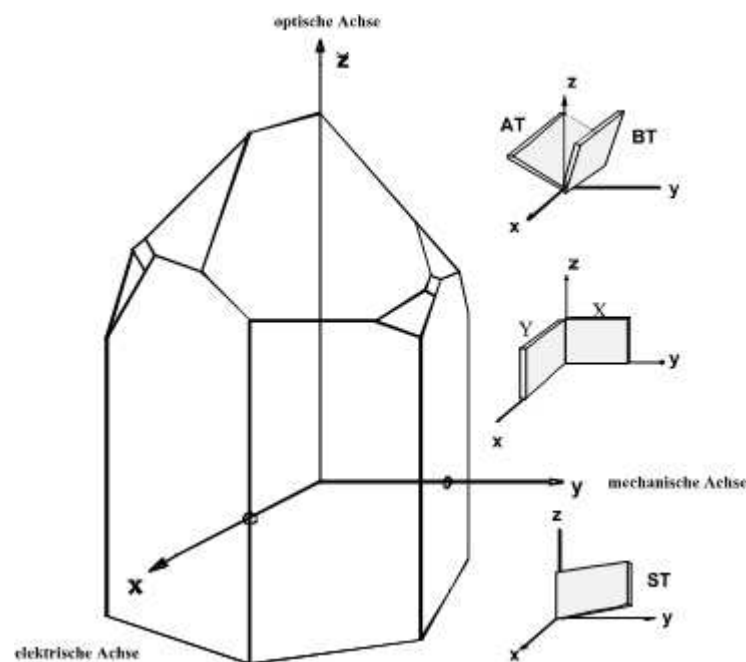


Abbildung 3: Quarzkristall mit kristallographischen Achsen: x (elektrische Achse), y (mechanische Achse) und z (optische Achse) und Schnittwinkel von Quarzbauteilen innerhalb des Quarzkristalls

1.1.6 Quartz Crystal Microbalance (QCM)

Beim Schwingquarz wird Resonanz erzeugt, da die Wechselspannung als ein Erreger der Deformation agiert und das System mit einer Frequenz anregt, die dessen Eigenfrequenz entspricht. Die Resonanzfrequenz hängt vom Abstand der Elektroden ab, welche mit der Formel 2 dargestellt wird und lautet:

$$f_0 = \frac{c}{2d} = \frac{N}{d}$$

f_0 Eigenfrequenz des Schwingquarzes

dQuarzplättchendicke (Elektrodenabstand)

cSchallgeschwindigkeit im Quarz ($c_{\text{Quarz}} = 3340 \text{ ms}^{-1}$)

NFrequenzkonstante ($AT_{\text{Quarz}} = 1670 \text{ Hz m}$)

Der doppelte Elektrodenabstand muss ein ungeradzahliges Vielfaches der Wellenlänge ausmachen und wird mit der Formel 3 beschrieben:

$$2d = (2n + 1)\lambda \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

Formel 3: Elektrodenabstand

Die Resonanzfrequenz ist auch von anderen Eigenschaften wie der Temperatur, dem kristallographischen Schnitt, der Elektrodengeometrie²⁵ der bewegten Masse, der Elastizität der Materialien, der umgebenden Viskosität und der Elektronik abhängig. Je nach Schnittwinkel des Quarzkristalls zu den kristallographischen Achsen x, y und z, wird neben der Resonanzfrequenz auch das Temperaturverhalten des Quarzes beeinflusst. Bei jedem Schnitt tritt eine bestimmte Schwingungsform auf, wie beispielsweise die Dickenscherschwingung beim AT-Schnitt (Abbildung 3) oder die Flächenscherschwingung beim CT-Schnitt. Kommerziell erhältliche Quarze sind in der Mehrzahl AT-Schnitt-Quarze, da sie die beste Frequenzstabilität, minimale Temperaturabhängigkeit (linearer Temperaturkoeffizient ist null) der Resonanzfrequenzen und sehr gute elektrische Anregbarkeit aufweisen. Die Temperaturabhängigkeit ist durch den Schnittwinkel im Quarz definiert und kann entsprechend kleingehalten werden.

Ist der Schwingquarz nicht beladen, lassen sich bei kleiner Dämpfung sein Verhalten und seine elektrischen Eigenschaften anhand des Modells von Butterworth und van Dyke^{26,27} beschreiben. In Abbildung 4 ist dieses Modell als Ersatzschaltbild schematisch dargestellt.

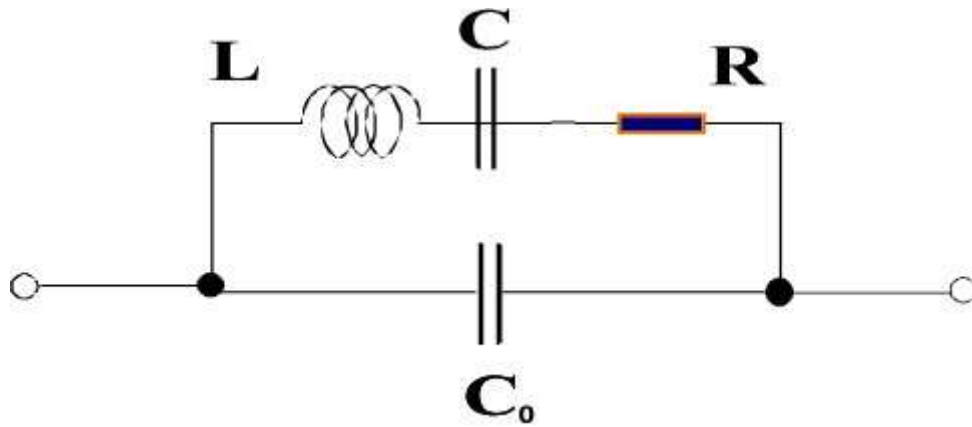


Abbildung 4: Butterworth und van Dyke-Modell als Ersatzschaltbild eines Schwingquarzes

Die dynamische Kapazität C bezeichnet eine elastische Eigenschaft des Quarzes und die Induktivität L seine schwingende Masse. Die statische Kapazität C_0 entsteht durch Goldelektroden und elektrische Anschlüsse, der Widerstand R beschreibt die Dämpfung. Wegen der statischen Kapazität C_0 und ohne Berücksichtigung des Widerstandes R , besitzt ein Schwingquarz zwei Eigenfrequenzen, nämlich die serielle und die parallele Resonanz. Diese Resonanzfrequenzen werden mit der Formel 4 beschrieben:

$$\text{Serielle Resonanz: } f_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}$$

$$\text{Parallele Resonanz: } f_p = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \sqrt{1 + \frac{C}{C_0}}$$

Formel 4: Resonanzfrequenzen eines Schwingquarzes

Mittels eines Netzwerkanalysators ist es möglich Phasenspektren und Dämpfungsspektren von Schwingquarzen im Bereich von 10 MHz aufzunehmen. Diese Spektren werden in der Abbildung 5 vorgestellt.

Neben der seriellen Resonanz, bei der die Dämpfung gegen die Null geht und der parallelen Resonanz, bei der die Dämpfung ins Unendliche geht, werden auch bei höheren Frequenzen die Nebenresonanzen wie antisymmetrische- und Twistschwingungen vorgestellt²⁸.

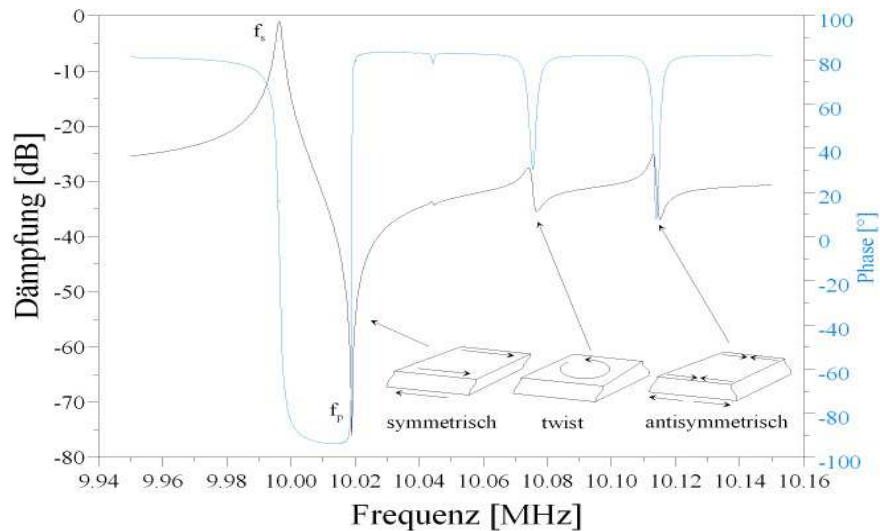


Abbildung 5: Dämpfungs- und Phasenspektrum eines 10 MHz Schwingquarzes²⁹

Die Nebenresonanzen können unterdrückt werden, indem man Durchmesser und Geometrie der Elektroden optimiert. Die Dämpfungsskala ist ein in der Elektronik und Akustik übliches Maß zur Erfassung eines Signals mit der Einheit Dezibel [dB] und wird in der Formel 5 vorgestellt:

$$dB = 20 * \log [U_{in} / U_{out}]$$

U_{in} Eingangsspannung

U_{out} Ausgangsspannung

Formel 5: Eingangs- und Ausgangsspannung eines Dämpfungsspektrums

1.1.7 Sauerbrey-Gleichung

Im Jahr 1959 erkannte G. Sauerbrey, dass eine Zunahme der Masse auch eine Zunahme der Schichtdicke bedeutet, die gleichzeitig auch zu einer Abnahme der Frequenz führt und fasste diese Erkenntnisse in der Sauerbrey-Gleichung³⁰ (Formel 6) zusammen:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = - \frac{\Delta d}{d} = - \frac{\Delta m}{\rho A d}$$

Durch Umformung mit der Formel 2 gilt

$$\Delta f = -2f_0^2 \frac{\Delta m}{\rho c A} = -f_0^2 \frac{\Delta m}{\rho N A}$$

Formel 6 :Die Sauerbrey- Gleichung

Wobei für die Parameter aus der Formel 6 gilt:

Δf	Frequenzänderung [Hz]
f_0	Eigenfrequenz [Hz]
Δm	Massenänderung [kg]
d	Dicke des Quarzes ($\Delta d + d_0$), [m]
Δd	Dicke der angelagerten Schicht [m]
ρ	Dichte der Schicht [kg/m ³]
A	Fläche der Elektroden[m ²]

Die Frequenzänderung ist direkt proportional zur Massenbeladung und steigt quadratisch mit der Grundresonanzfrequenz an. Da das Rauschen nur linear mit der Grundfrequenz ansteigt, hängt die Nachweisgrenze linear von der Grundfrequenz ab. Die Nachweisgrenze eines 10 MHz Schwingquarzes liegt im Bereich von etwa 10⁻⁹ g/cm². Die Amplitude der Scherschwingung und ihre Massenempfindlichkeit sind nicht gleichmäßig über den gesamten Bereich der Elektroden verteilt, sondern gaußförmig mit dem Maximum in der Elektrodenmitte³¹. Die Amplitude hängt von der Position ab.

Für die beschichtete Elektrodenoberfläche ist die Sauerbrey-Gleichung nur dann gültig, wenn glatte, starre und an der Oberfläche fest haftenden Schichten vorhanden sind. Sowohl die Erhöhung der Dämpfung als auch die Verringerung der Resonanzfrequenz werden durch das Abklingen der Scherwelle in der flüssigen Phase beeinflusst.

Dieses Verhalten von QCM in der Flüssigphase ist von der Dichte und der Viskosität der Lösung abhängig und wurde im Jahr 1985 von Gordon und Kanazawa³² beschrieben (Formel 7):

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_l \rho_l}{\mu_q \rho_q \pi}}$$

η_lViskosität der Lösung [$g\ cm^{-3}$]

ρ_l Dichte der Lösung [$g\ m^{-1}\ s^{-1}$]

ρ_qDichte von Quarz [$2,2658\ g\ cm^{-3}$]

μ_qSchermodul von Quarz [$2,947\ g\ cm^{-1}\ s^{-2}$]

Formel 7: Gordon- Kanazawa Gleichung

Bei den Messungen in der flüssigen Phase muss man die Temperaturabhängigkeit der Viskosität der Flüssigkeit³³, in der sich der Analyt befindet und auch ionische Effekte, die durch Zugabe von Puffersalzen entstehen, berücksichtigen. Mit einem Temperaturanstieg wird die Viskosität sinken und damit die Frequenz ansteigen.

Der Sauerbrey-Gleichung wurde deswegen ein Korrekturterm, auf den auch die Dichte und Viskosität der Flüssigkeit Einfluss haben, eingefügt (Formel 8).

$$\Delta f = -2,226 * 10^{-6} (f_0^2 \Delta m + f_0^{3/2} \sqrt{\Delta \eta_l \rho_l})$$

ΔfFrequenzänderung

f_0Resonanzfrequenz

ΔmMassenänderung

η_l Viskosität der Flüssigkeit

ρ_lDichte der Flüssigkeit

Formel 8 :Sauerbrey- Gleichung für flüssige Phase

Wegen ihrer Massenempfindlichkeit und ihrer Nachweisgrenze unter 1 ng, werden die Schwingquarze in der Sensorik eingesetzt.

Die technischen Daten, der in dieser Arbeit eingesetzten Schwingquarze, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Physikalische Eigenschaften	
Eigenfrequenz	10 Hz
Dicke des Resonators	0,168 mm
Durchmesser	15,5 mm
Elektrodenoberfläche	0,24 cm ²
Massensensitivität	951 Hz μg^{-1}
Frequenzauflösung	-/+ 0,1 Hz
Nachweisgrenze	0,6 ng
Schichtdickeneffekt	40 nm kHz ⁻¹

Tabelle 3: Die technischen Daten der eingesetzten Schwingquarze

1.2.Molekulares Prägen

Molekulares Prägen ist ein Verfahren für die Herstellung chemisch sensitiver Schichten auf Polymerbasis, die sich für die Messungen in flüssiger und auch gasförmiger Phase eignet. Die ersten Schritte auf diesem Gebiet wurde im Jahr 1930 von Polyakov erzielt, der die selektive Bindung von Analyten in einer Silikatmatrix untersuchte³⁴. Der Durchbruch gelang den Forschern K. Mosbach^{35,36} und G. Wulff³⁷ die sich Konzepten der Host-Guest-Chemie bedienten. Sie verwendeten hochvernetzte organische Polymere für die Herstellung selektiver Hohlräume für einen bestimmten Analyten, die auch für die Sensorik nutzbar sind.

Dafür wird der spätere Analyt als Templat zur Monomermischung dazugegeben und auspolymerisiert. Die Polymermatrix wächst um die Templatmoleküle herum. Nach Entfernen des Analyten aus der Schicht, bleiben reversibel besetzbare Kavitäten bzw. Hohlräume im Polymer zurück

1.2.1 Die Rezeptor-Schicht-Wechselwirkung

Die Wechselwirkungen zwischen dem Analyt und der Rezeptorschicht reichen von Ad- und Absorption über Chemosorption bis zur Physiosorption. Bei der Ad- und Absorption treten schwache Wechselwirkungen wie z.B. Van der Waals-Kräfte, deren Bindungsstärke etwa 2 kJ/mol pro Methylgruppe beträgt, auf. Diese schwachen Wechselwirkungen ermöglichen Reversibilität³⁸ bei der Einlagerung des Analyten in die Rezeptorschicht und sind genauso wie Wasserstoffbrückenbindungen erwünscht. Bei der Chemosorption sind die Wechselwirkungen stark und kovalenter Natur. Dies führt zu hoher Selektivität, aber oft auch zu Irreversibilität. Für die Entwicklung von Sensoren werden daher schwache Wechselwirkungen bevorzugt. Die Diversität der Wechselwirkungen nach ihrer Art, Reichweite und Bindungsenergie ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Wechselwirkung	Bindungsenergie [kJ/mol]	Abstandsabhängigkeit
Kovalente Bindung	~300	komplex
Ionen-Ionen	20 - 50	$1/r$
Ion-Dipol	< 20	$1/r^2$
Dipol-Dipol	< 20	$1/r^3$
Wasserstoffbrücke	< 30	$1/r^3$
Ion-induzierter Dipol	< 20	$1/r^4$
Dipol-induzierter Dipol	< 20	$1/r^6$

Tabelle 4: Bindungsenergien und Abstandsabhängigkeiten³⁹ verschiedener Wechselwirkungen

1.2.2 Strategien des molekularen Prägens

Es bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten, die molekulare Prägung durchzuführen, nämlich Bulk Imprinting (Volumenprägung) und Surface Imprinting (Oberflächenprägung). Diese Strategien sind in Abbildung 6 vorgestellt.

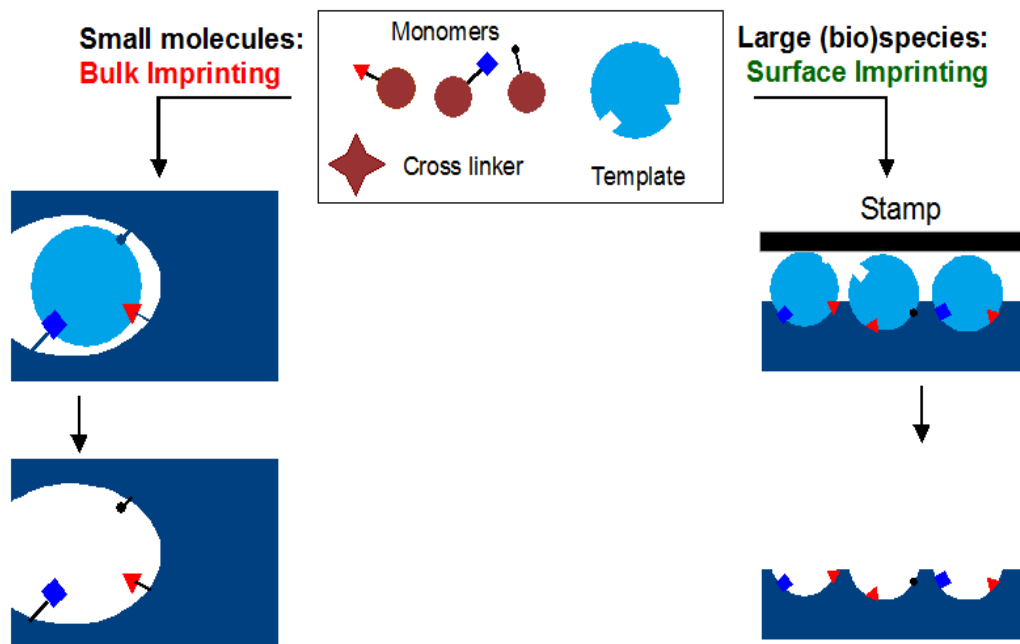


Abbildung 6: Die Strategien des molekularen Prägens in Abhängigkeit der Größe des Analyten

Für kleine Moleküle wird die Methode des Bulk Imprinting angewendet, bei der der Analyt direkt in die Monomerlösung zugefügt wird. Nach dem Aushärten der Polymerschicht, wird dieser Analyt quantitativ entfernt, wobei sich Hohlräume bzw. Kavitäten bilden, in die sich wieder der bestimmte Analyt einlagern kann.

Bei den großen Analyten wie Viren und Bakterien wird die Methode des Surface Imprinting⁴⁰ verwendet. Das Präpolymer kann prinzipiell auf zwei Arten, nämlich mittels Spin- oder Drop-Coating-Verfahren auf die beiden Goldelektroden aufgebracht werden

Beim Spin-Coating-Verfahren wird das Präpolymer auf die Substratoberfläche mit einer Gilsonpipette aufgetragen und mit einem Spinner und einer bestimmten Umdrehungszahl aufgespinnt. Das Lösungsmittel verdampft rasch, zurück bleibt eine glatte, dünne Polymeroberfläche. In das noch nicht ausgehärtete Polymer, welches richtig verdünnt werden muss um eine bestimmte Schichtdicke zu erhalten, wird ein Analytstempel⁴¹ gepresst. Eine andere Möglichkeit bietet das Überschichten des Oligomergemisches mit einer Analytsuspension, die wiederum auch aufgespinnt wird. Nach 24 Stunden ist vollständige Auspolymerisation gewährleistet, so dass der Stempel entfernt und der Analyt durch das Verwenden von verschiedenen Detergenzienlösungen ausgewaschen werden kann. Beim Drop-Coating-Verfahren wird das Präpolymerisat direkt auf die Elektroden aufgetropft. Auf die gleiche Weise wird eine bestimmte Menge (μl - Bereich) von dem Analyten auf die Polymeroberfläche der einen Elektrode aufgetragen, mit einem Stempel aus Silikon überdeckt und stehen gelassen. Nach einer bestimmten Zeit kann der Stempel und der Analyt mit Detergentien entfernt werden, wobei wieder die Hohlräume bzw. die Kavitäten als Abdrücke der Analyten auf der Polymeroberfläche bleiben.

1.3.Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)

Die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) wurde im Jahre 1986 von G. Binning, C. Gerber und C. Quate entwickelt. Sie wurde eingesetzt um mechanische Abtastungen von Oberflächen aller Art und Analysen ihrer atomaren Kräfte im Nanometerbereich durchzuführen. Diese Methode ist eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops (Scanning Tunneling Microscope, STM), das 1981 von H. Rohrer und G. Binning vorgestellt wurde. Alle diese Rastersondenmikroskope (Scanning Probe Microscopes, SPM) beruhen auf dem Prinzip der punktwisen Abtastung der Oberfläche mit einer Spitze, die sich auf einem freitragenden Ausleger (Cantilever) befindet und daraus folgenden Berechnungen der Oberflächenstruktur zu ermitteln.

Bei der Rasterkraftmikroskopie können Probenoberflächen alle Art vermessen werden. Besonders vorteilhaft ist STM bei biologischen⁴² und physikalischen Untersuchungen. Sie wird in drei verschiedenen Modi betrieben und zwar im Kontaktmodus, dem Nichtkontaktmodus und dem intermittierenden Modus, wobei ein gemeinsames Prinzip grundlegend ist. Sie beruhen alle auf einem freitragenden Ausleger aus Silizium oder Si_3N_4 , der zwischen 100 μm und 500 μm lang und zwischen 0,5 μm und 5 μm dick ist und der an der Unterseite eine Spitze (Apertur 10-15 nm) enthält, welche die Probenoberfläche kontaktiert. Ein Photodiodenlaser wird auf die Rückseite des freitragenden Auslegers fokussiert. Die Auslenkung des freitragenden Auslegers und die Ablenkung des Lichtes werden mit einer Viersegmentphotodiode erfasst. Die Auslenkung des freitragenden Auslegers, die durch die Rauigkeit der Probenoberfläche verursacht wird, wird mit einer Rückkopplungsschleife (Feedback Loop) konstant gehalten, wobei ein x,y,z-Piezoscanner die Morphologie der Probenoberfläche abbildet. Die einzelnen Komponenten eines Rasterkraftmikroskops werden in der Abbildung 7 gezeigt. Der Abstand zwischen der Spitze und Probenoberfläche sowie die Art der Bewegung des freitragenden Auslegers ordnet die Methode in die schon obenerwähnten Modi ein.

Beim Kontaktmodus (Contact Mode AFM)⁴³ wird der freitragende Ausleger an die Probenoberfläche so angenähert dass repulsive Kräfte zwischen den Elektrodenhüllen der Atome an der Probenoberfläche und der Spitze entstehen. Die Kraft, die zwischen der Probenoberfläche und der Spitze wirkt, wird konstant gehalten indem die z- Auslenkung des Scanners ständig der Oberfläche angepasst wird. Das Steuersignal des Piezo spiegelt das Aussehen der Probenoberfläche wieder. Dieser Modus ist nicht für weiche Probenoberflächen geeignet, da laterale Scherkräfte die Oberfläche mechanisch deformieren können.

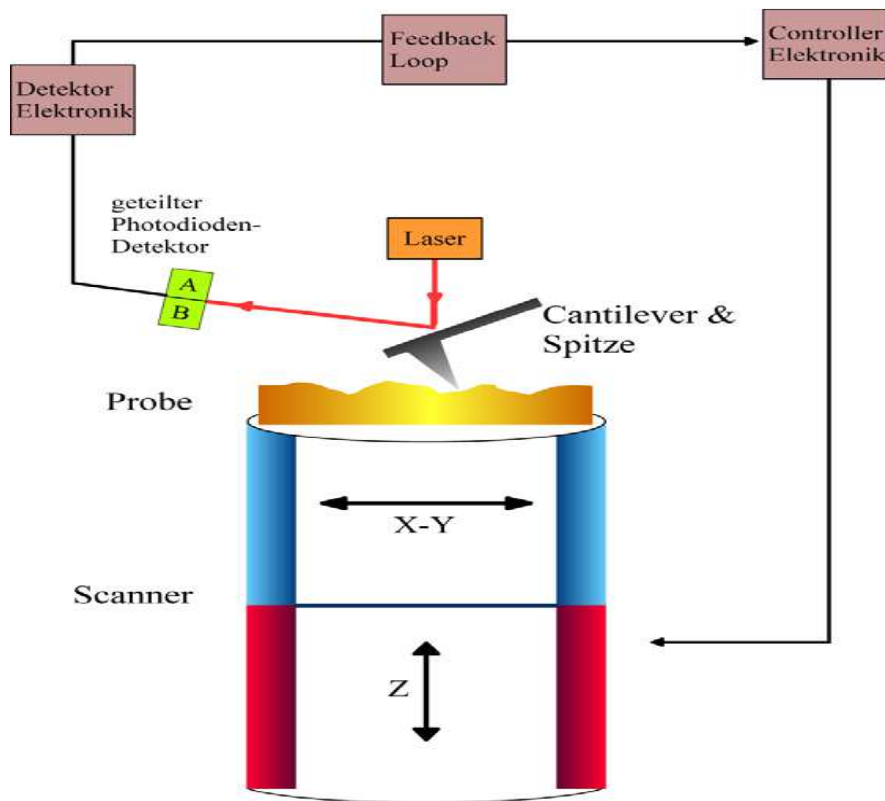


Abbildung 7: Komponenten eines Rasterkraftmikroskops⁴⁴

Die Nichtkontaktmethode (Noncontact Mode AFM) beruht auf einem dynamischen Anregungsmodus. Der freitragende Ausleger wird zum Schwingen oberhalb seiner Resonanzfrequenz angeregt. Die Spitze rastert oberhalb der Probenoberfläche und berührt sie nicht. Die Anregungsfrequenz wird von der Rückkopplungsschleife im Datenpunkt (x,y) konstant gehalten bis die Sollwert-Frequenz oder Amplitude erreicht wird. In jedem Datenpunkt (x,y) wird der Abstand zwischen der Spitze und der Probenoberfläche gespeichert und topographisch wiedergegeben. Dieser Modus ist für hydrophobe und weiche Proben geeignet.

Beim intermittierenden Modus (Tapping Mode AFM) übt die Spitze Oszillationen über die Probenoberfläche mit einer bestimmten Amplitude (30-90 nm) aus. Die Spitze tippt während der maximaler Auslenkung und ausgewählter Amplitude leicht auf die Probenoberfläche. Der Vorteil bei dieser Methode sind niedrige laterale Kräfte, die entstehen und mechanische Deformation nicht verursachen, wodurch es dann möglich ist, die weichen Probenoberflächen zu scannen.

1.4 *Escherichia coli*

*Escherichia coli*⁴⁵ ist ein Bakterium, das einzellig und ohne echten Zellkern ist. Es gehört zu den Prokaryoten, bei denen die DNA im Cytosol frei beweglich vorliegt. Die Zellteilung erfolgt asexuell durch Teilung oder Bildung von Sporen. Ihr Stoffwechsel ist aerober oder anaerober Natur. *E. coli* ist gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium, das zur Bakterienfamilie Enterobacteriaceae gehört und peritrich begeißelt ist. Es baut Zucker wie Maltose, Laktose, Saccharose und Mannitol ab und bildet Säuren und auch Gase. Da es ein fakultativ anaerober Organismus ist, kann es sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen überleben und sich vermehren. Die Zellteilung dauert etwa 20-30 Minuten und findet bei einer Temperatur von 37°C statt. In der Bakteriologie werden nicht pathogene *E. coli*-Stämme als Modellorganismen für gramnegative Bakterien eingesetzt. Die Forschungsergebnisse lassen sich auch auf pathogene Stämme, aber auch andere Bakterien, übertragen und tragen sehr viele Erkenntnisse zur Medizin bei. Zu den gramnegativen Bakterien gehören unter anderem auch Neisserien, Chlamydien, Spirochäten, Salmonellen und Cyanobakterien. Abbildung 8 zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme von *E. coli* auf einem Glasstempel.

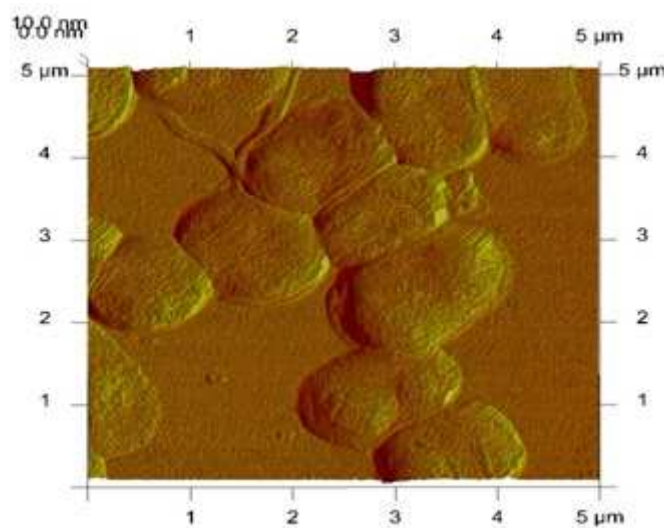


Abbildung 8: AFM- Aufnahme der *E. coli*, die sich auf einem Glasstempel befinden

Bakterien können durch unterschiedliche Gram-Färbung⁴⁶ mittels mikroskopischer Untersuchungen in grampositive und gramnegative Spezies differenziert werden. Diese Methode wurde vom dänischen Bakteriologen H. C. Gram (1884) entwickelt. Die Bakterien werden mit einem basischen Farbstoff Gentianaviolett (Kristallviolett) angefärbt und mit Iod-Kaliumiodid-Komplex nachbehandelt. Mit dem Farbstoff bildet Iod ein Komplex, welcher nicht im Wasser löslich ist, dagegen in Ethanol löslich. Durch die Behandlung mit Ethanol werden die gramnegativen Bakterien, die eine dünne Zellwand aufweisen, entfärbt. Zur Darstellung der entfärbten negativen Bakterien werden sie mit Safraninlösung gegengefärbt, wobei sie dann rot erscheinen. Die grampositiven Bakterien, die dickere Zellwand besitzen, bleiben blau-violett.

Die Zellwand (Abbildung 9) der gramnegativen Bakterien ist folgend aufgebaut:

Zytoplasmamembran, ca. 15%

- Lipopolysaccharid (LPS), ca. 15%, Kernzone, O-spezifische Seitenkette und Lipid A
- äußere Membran (8nm): Phospholipide ca. 10% und Porin
- Peptidoglykan (Mureinschicht), ca. 20%
- periplasmatischer Raum
- Lipoproteine, ca. 25%
- innere Membran (8 nm); Phospholipid

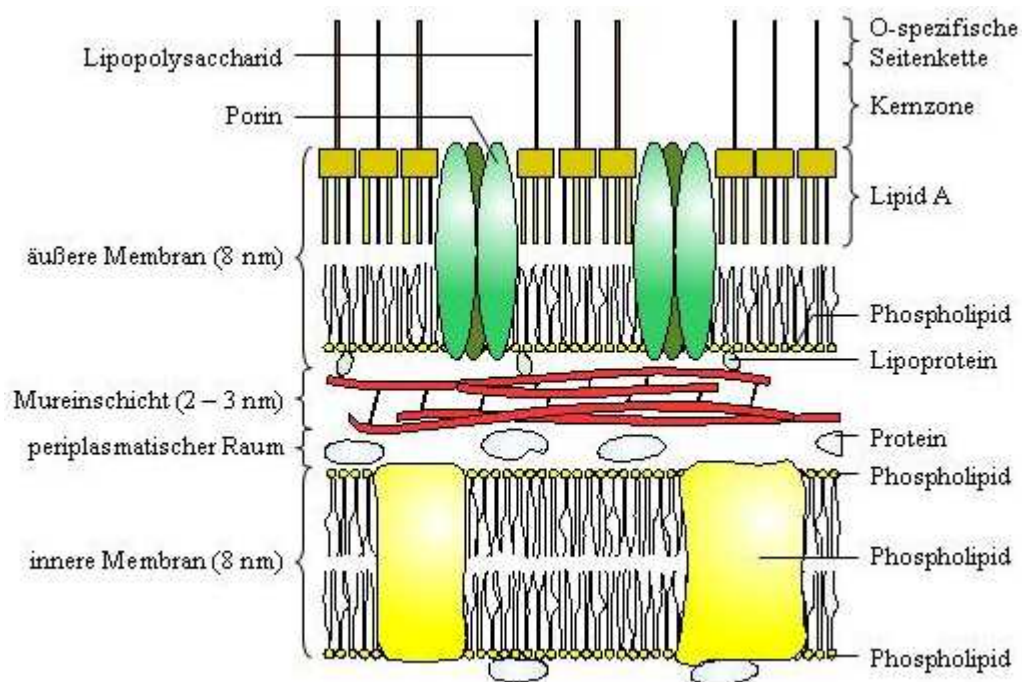


Abbildung 9: Schematische Darstellung⁴⁷ der Zellwand bei gramnegativen Bakterien

Die Zellwand der gramnegativen Bakterien bestehen aus einer etwa 2 nm dünnen Mureinschicht (Peptidoglykan, 20 %), die in ein periplasmatisches Gel eingebettet ist. Murein ist aus vielen Glykanketten, die mit Hilfe von Oligopeptiden kovalent quervernetzt sind, aufgebaut. Bei gramnegativen Bakterien wird das Periplasma durch eine äußere Membran begrenzt. Diese äußere Membran enthält in ihrer inneren Schicht ca. 10 % Phospholipide und in der äußeren Schicht ca. 15 % Lipopolysaccharide. Die Lipopolysaccharide setzen sich aus einem apolaren Fettanteil und einem polarem Zuckeranteil zusammen. Der apolare Fettanteil ist in der Lipidschicht der Doppelmembran vertreten, so dass die Hydroxygruppen in die Umgebung herausragen. Dadurch ist die Oberfläche polar. Diese Eigenschaft der Oberfläche macht das Einsetzen der *E. coli* als Templat sehr interessant. Die Zuckeranteile hängen an den Lipid A und werden noch in eine Kernzone und in O-spezifische Seitenkette, die stammspezifisch ist, unterteilt.

Der Lebensraum von *E. coli* ist der Darm von Menschen und Tieren, daher gelten sie als Indikatorkeime für fäkale Verunreinigungen von Lebensmitteln, Trinkwasser und Badewasser. Pathogene *E. coli* können eine Reihe von Krankheiten wie Gastroenteritis, Infektionen der Harnwege, des Blut und des zentralen Nervensystems verursachen, von denen Millionen von Menschen jährlich betroffen sind. Es sind mehrere *E. coli*-Pathovaren gut charakterisiert, von denen jeder viele Krankheitsfaktoren nutzt, um seine Virulenz zu potenzieren⁴⁸.

Tabelle 5⁴⁹ stellt mehrere Subtypen von *E. coli* und ihre pathogenen Effekte vor:

Subtyp der <i>E.coli</i>	Pathogene Effekte
enteroinvasiv (EIEC)	Fiber, Entzündungen
enteropathogen (EPEC):	Säuglingsdiarrhoe, Störungen beider Nahrungsaufnahme
enterotoxisch (ETEC)	Reisediarrhoe, Durchfallerkrankungen
enteroaggregativ (EAEC):	Chronische Durchfallerkrankungen
enterohämorrhagisch (EHEC):	hämorrhagische Kolitis, Thrombozytopenie und Anämie
diffus adhärente (DEAC)	Harnwegsinfektionen

Tabelle 5: Subtypen der *E. coli*

Die Ursachen der pathogenen Effekte sind durch die Pathogenese des einzelnen Subtypen bedingt und werden im Folgenden näher erläutert.

Enteroinvasive E. coli haben sowohl biochemische als auch pathogene Ähnlichkeiten mit Shigella-Bakterien. Während des Infektionsprozesses wird die Bildung von Enterotoxin nachgewiesen⁵⁰ und es findet eine Darmepithelieninvasion statt.

Enteropathogene E. coli bilden Läsionen in der Darmschleimhaut, aber kein Shigatoxin⁵¹ und können sich an die Epithelzellen des Dünndarmes anheften.

Enterotoxische E. coli exprimieren hitzelabile und hitzestabile Toxine, wobei hitzelabiles dem Pertussistoxin und hitzestabiles dem Choleratoxin ähnelt, und sind von Kolonisationsfaktoren abhängig⁵².

Enteropathogene E. coli sind mit ihrer Pathogenese an die Plasmide gebunden und exprimieren Zyto- und Enterotoxine.

Enterohämorrhagische E. coli gehören zu Humanpathovaren, bilden Shigatoxine (auch als Verotoxin bezeichnet) aus, die interzellulär wirken und Absterben der Epithelzellen bewirken. Die Infektionen führen zu schweren Krankheitssymptomen (Tabelle 5).

Diffus adhärente E. coli zeichnen sich durch ihre Adhärenz an den Epithelzellen aus. Ihre Isolate sind bei enteralen Krankheiten zu finden⁵³.

1.5 Schnellanalytik der *E. coli*

Die Untersuchungsmethoden für *E. coli* sind gut etabliert und dokumentiert, aber werden weiter entwickelt um übertragbare Erkenntnisse zu erhalten und auszubreiten. Neuere Forschungsergebnisse erlauben das Einsetzen von analytischen Methoden, wie Flüssigkeitschromatographie/Elektrospray-Massenspektrometrie (LC/ESI-MS) und Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF-MS), wodurch dann die Möglichkeit zur Charakterisierung der hitzelabilen Enterotoxin von enterotoxischen *E. coli*, deren Molekulargewicht und Struktur⁵⁴ besteht.

Mit den quantitativen Echtzeit-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Assays wird die selektive Detektion von lebensfähigen *E. coli* O157 durchgeführt, indem die Mengen an genomischer DNA von *E. coli* O157 detektiert werden. Darüber hinaus wird eine neue Propidium-Monoazid (PMA)-Echtzeit PCR, welche die klare Differenzierung lebensfähiger von abgestorbenen Zellen ermöglicht, entwickelt⁵⁵.

Für den schnellen Nachweis von *E. coli* O157 wurde ein Biosensor, basierend auf Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) entwickelt. Dabei werden BIACORE 3000 SPR Instrument und ein mit Dextran modifizierter Sensorchip (CM5) verwendet. Nach der Aktivierung mit EDC/NHS, der Anti-*E. coli* O157:H7-Antikörper wird auf die Goldoberfläche des SPR-Sensor immobilisiert, dann folgend ist die Injektion mit Ethanolamin und der Chip ist für *E. coli* O157: H7 bereit. Die Regenerierung erfolgt mit NaOH, um mehrere Proben zu ermitteln. Die Detektionszeit dauert 5 bis 7 min bis das Ergebnis der Regeneration vorliegt, sodass es dem Sensor erlaubt, für mehr als 50 Proben wiederverwendet zu werden. Diese Methode ist bequem und stabil, und zeigt Potenziale für Anwendungen im Lebensmittelbereich⁵⁶.

Es wurden auch verschiedene klinische Testsysteme entwickelt, die für den qualitativen Nachweis von *E. coli* aus verschiedenen Lebensmittel- und Umweltproben vorgesehen sind. Ein Vertreter dieser Systeme ist Singlepath®⁵⁷ *E. coli* O157 von der Fa. Merck. Dabei handelt es sich um einen immunologischen Schnelltest, der zur Gruppe der immunchromatographischen Lateral-flow-Tests zählt. Der Nachweis des *E. coli*-O157-Antigens erfolgt über gold-markierte Antikörper. Im Fall vom vorhandenen *E. coli*-O157-Antigen in der Probe bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die im Testsimplet auf der Nitrozellulose zur Testzone fließen. In der Testzone befindet sich noch ein zusätzlicher Antikörper, der gegen den goldmarkierten *E. coli*-O157-Antigen-Antikörper gerichtet ist. Bindet dieser Anti-Antikörper an dem goldmarkierten Antigen-Antikörper-Komplex, so wird die Testzone rot gefärbt und bestätigt das Vorhandensein von *E. coli*-O157-Antigen in der Probe. Die Färbung, die den kolloidalen Goldpartikeln zurückzuführen ist, basiert auf der LSPR (localized surface plasmon resonance).

2. Experimenteller Aufbau

2.1. Elektrodendesign der QCM

Für die Messungen in der flüssigen Phase werden im Rahmen dieser Arbeit sowohl Zwei- als auch Dreielektrodendesigns verwendet. Die verwendeten Quarzplättchen besitzen eine Eigenfrequenz von 10 MHz, eine Dicke von 0,15 mm und einen Durchmesser von 15,5 mm. Die Quarzplättchen sind ohne Elektroden kommerziell erhältlich. Mindestens werden jeweils Zweielektrodenanordnungen eingesetzt z. B. um Temperaturfluktuationen kompensiert zu können. Die Elektroden werden mittels Siebdruckverfahren auf ein Quarzplättchen aufgetragen. Bei dem Zweielektrodendesign dient eine Elektrode als Messelektrode und die andere Elektrode als Referenzelektrode und ihr Durchmesser beträgt 5 mm. Auf der Rückseite des Quarzplättchens befindet sich noch ein Elektrodespaar, deren Durchmesser 3 mm ist. Bei Dreielektrodendesign ist der Durchmesser auf 4,5 mm reduziert, wobei die Distanz zwischen den drei Elektroden jeweils 2 mm ist.⁵⁸. Eine Elektrode wird als Referenzelektrode und die anderen zwei als Messelektroden eingesetzt. Der Durchmesser der Elektroden, die sich auf der Rückseite befinden, beträgt 3 mm. Abbildung 10 zeigt die Elektrodendesigns der Zwei- bzw. Dreielektrodensysteme.

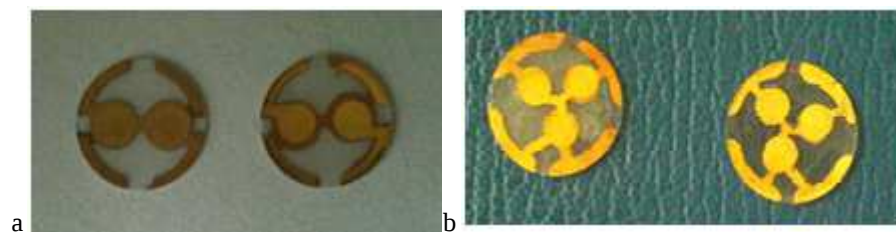


Abbildung 10: Elektrodendesign bei a) Zwei- und b) Dreielektroden-QCM für Messungen in flüssiger Phase

Nach Differenzbildung zwischen dem selektiven Kanal und dem unselektiven Referenzkanal, werden Signale, die durch physikalische Phänomene verursacht werden ermittelt. Diese Frequenzänderungen können beispielsweise durch Temperaturschwankungen, Feldlinieneffekte oder die unselektiven Adsorptionen entstehen. Bei Messungen in flüssiger Phase entstehen durch die Temperaturfluktuationen, die die Viskosität der Lösung ändert, unspezifische Effekte.

Bei den Chemosensoren, die für die Detektion in der Flüssigphase eingesetzt werden sollen, sind die Elektroden auf der Analytseite größer als die Elektroden auf der Rückseite. In der wässrigen Phase ist nur eine Seite, nämlich die Analytseite des Quarzes mit der Probelösung im Kontakt. Die unterschiedlich großen Elektroden werden verwendet, um die Frequenzänderung, die durch geänderte Ionenstärke der Lösung und der unterschiedlichen Feldlinienauslenkungen entsteht, klein zu halten. QCM sind prinzipiell analog zu einem Kondensator aufgebaut. Zwischen den breiten sich Feldlinien aus. Am Rand werden diese Feldlinien in die Flüssigkeiten abgelenkt, was eine Frequenzänderung verursacht.⁵⁹.

Bei Mehrelektrodensystemen muss die Resonanz zwischen den einzelnen Elektroden in Betracht gezogen werden, da Übereinsprechen der Schwingungsfrequenzen auftreten kann, wenn die Oszillatorfrequenzen zu nahe beieinander liegen.

2.1.1 Bauteilherstellung

Die Goldelektroden werden mittels Siebdruck über eine Schablone auf das Quarzplättchen aufgebracht. Das Siebdruckverfahren wird in der Abbildung 11 dargestellt. Um die Goldelektroden auf das Quarzplättchen aufzutragen, wird es auf eine Ansaugvorrichtung platziert, mit Vakuum auf einem Teflonblock fixiert und die Schablone mit dem gewählten Elektrodendesign darüber positioniert. Für die Herstellung der Schablone wird die geeignete Elektrodengeometrie auf eine durchsichtige Folie gedruckt und diese auf einem UV-Leuchttisch für die Belichtung aufgeklebt.

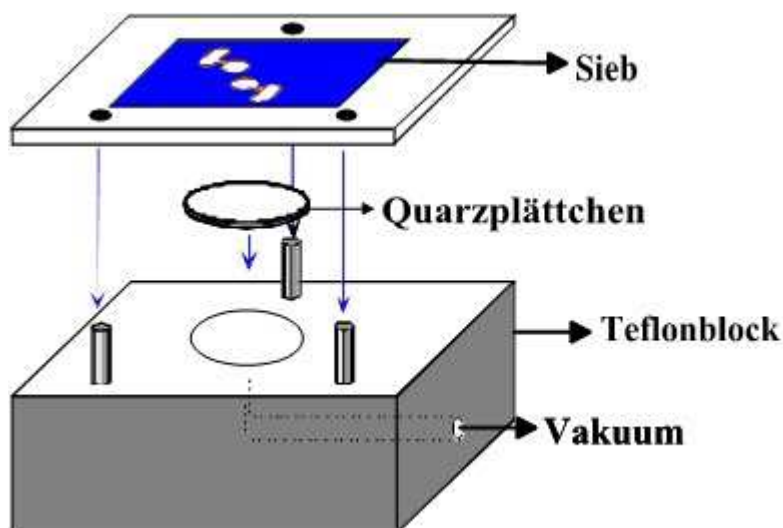


Abbildung 11: Das Siebdruckverfahren für die Aufbringung der Goldelektroden auf das Quarzplättchen

Das Sieb mit einer Maschenweite von 30 μm , wird auf einen Metallrahmen aufgespannt, mit einem positivem UV-Photolack (Azocol Poly-Plus S) beschichtet und im Dunkeln für zwei Stunden getrocknet. Danach wird die Elektrodenstruktur für 20 Sek. belichtet und der nicht ausgehärtete Lack mit warmem Wasser aus dem ausgehärtetem Photolack ausgewaschen. Die fertige Schablone kann für den Siebdruck verwendet werden. Abbildung 12 zeigt die fertigen Siebschablonen für Zwei- und Dreielektrodenschwingquarze.

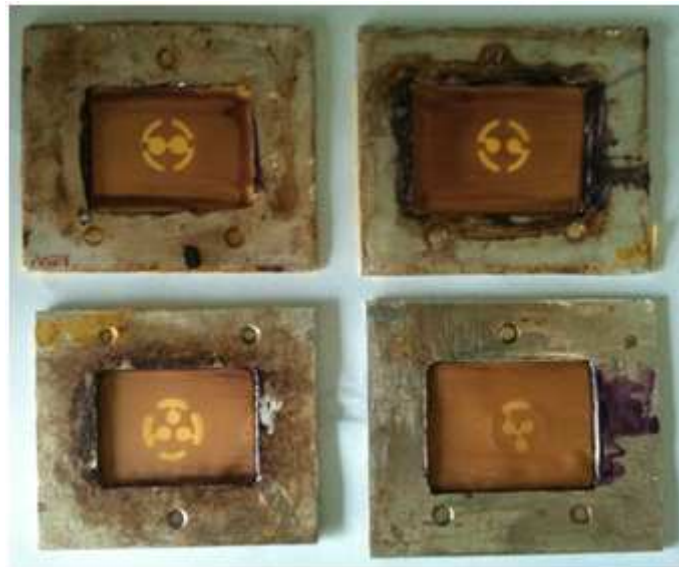


Abbildung 12: Siebschablone zur Beschichtung der Zwei- und Dreielektrodenschwingquarze

Die mit Goldglanzpaste GGP 2093, 12% der Firma Heraeus gedruckten Goldelektroden werden im Ofen 4 Stunden bei 400°C aufgedruckt. Hierbei werden die Leinölfirnisse, die in der kolloidalen Goldglanzpaste enthaltenen sind, pyrolisiert. Beim Bedarf können die Elektrodenstrukturen durch Waschen mit Königswasser entfernt und das Quarzsubstrat wiederverwendet werden

2.1.2 Bauteilcharakterisierung

Die fertigen QCM werden vor Verwendung mittels Netzwerkanalysators HP Agilent Technologies E5062A, der den Frequenzbereich von 300 kHz bis 3 MHz erfassen kann, auf ihre Dämpfung und Resonanzfrequenz kontrolliert. Als passiver Modus ermittelt er die Resonanzfrequenzänderungen bei Massenbeladung der Elektroden durch die Dämpfungsmessung des Signals. Der Netzwerkanalysator agiert wie ein Wobbler über einen Frequenzbereich von 0,5 MHz und ermittelt so das Phasen- und Dämpfungsspektrum.

2.2 Die Messzellen

Das Gehäuse der Messzelle für die Messungen in der flüssigen Phase ist aus PMMA, die eigentliche Zelle aus Polydimethylsiloxan (PDMS, Sylgard 184 Silicon Elastomer). Die Silikonmesszelle wird mit dem Gussverfahren hergestellt, wobei das Messvolumen, je nach Form, in einem Bereich zwischen 150 μl und 40 μl variieren kann. Dem 9 g Silikonbasis Silicone Elastomere wird 1g Katalysator Silicone Elastomere Curing Agent zugegeben, in eine Gussform gegossen und im Exsikkator eine Stunde lang entgast. Die Gussformen aus Messing sind aus der Abbildung 13 ersichtlich.

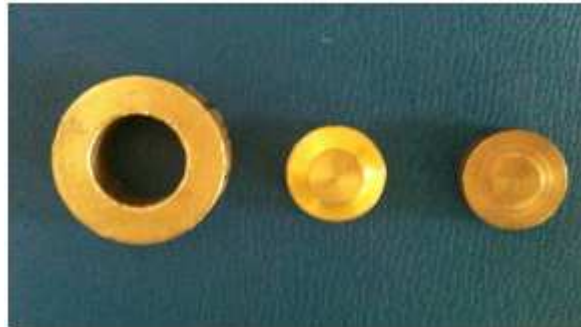


Abbildung 13: Die Gussformen aus Messing für Vorlagen der Silikonmesszellen

Danach wird 24 Stunden ausgehärtet. Die Zu- und Ableitungsanschlüsse können angebracht werden, indem zwei kleine Löcher zur Druckkompensation gestanzt werden. Das Silikon weist eine geringe Wärmeleitfähigkeit auf, weswegen die Zelle nicht extern thermostatisiert werden muss und vermindert auch einen übermäßigen Quarzverschleiß durch das Brechen des Substrats. Je nach Elektrodengeometrie sind unterschiedliche Kontaktierungen notwendig, wie in Abbildung 14 zu sehen ist.



a

Abbildung 14: Die Messzelle mit gegossenem Silikonstempel und Polyacrylatdeckel geeignet für

a) Zwei- und b) Dreielektroden-Schwingquarze



b

Der Schwingquarz wird zwischen den beiden Teilen der Silikonzelle eingelegt und dann durch Verschrauben des PMMA-Deckels zusammengeklemt. Dies stellt sowohl elektrische Kontaktierung als auch Dichtheit sicher. Die Probenzuführung erfolgt über eine Peristaltikpumpe. Frequenzzähler, Netzteil und Computer mit geeignetem Programm für die Erfassung und Bearbeitung der Daten, sind weitere Bestandteile der Messordnung. Alle elektronischen Geräte sind mit koaxialen Verbindungskabeln im Kontakt und werden in der Abbildung 15 gezeigt.

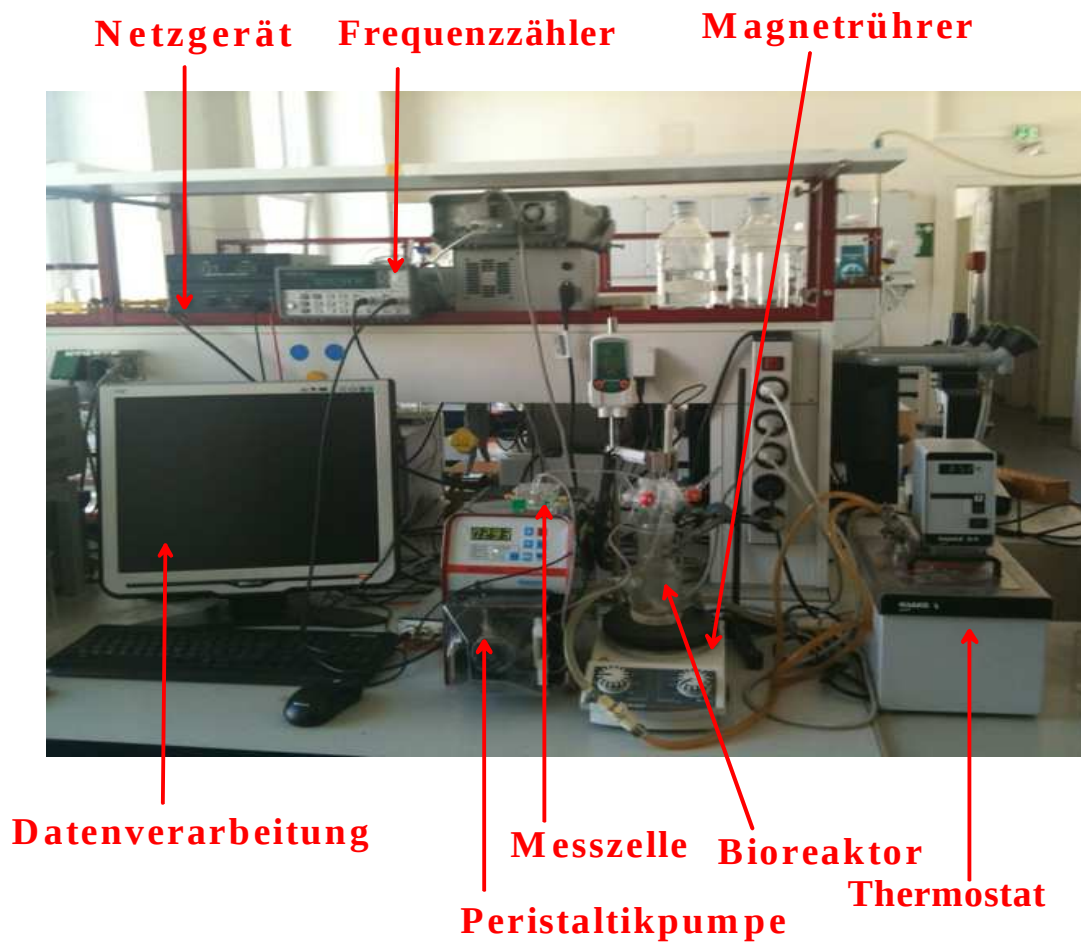


Abbildung 15: Die Messanordnung für die Beobachtung der Züchtung und Messung der *E. coli*

2.3 Die Oszillatormessung

Für den Betrieb der Sensoren werden zweistufige Verstärker mit einer Oszillatorstufe und einer Ausgangsstufe mit Operationsverstärkern der Grenzfrequenz 600-900 MHz verwendet. Die gesamte Platine wird in ein, vor äußeren mechanischen Einflüssen beschützendes Aluminiumgehäuse eingebettet (Abbildung 16). Das externe Netzgerät versorgt die Oszillatorschaltung mit Gleichspannung von ± 5 V. Das Auslesen der Frequenz erfolgt im Gegensatz zum Netzwerkanalysator, aktiv, die Eigenfrequenz des Quarzes wird nach Rückkopplung und anschließender Verstärkung in einen Frequenzzähler deponiert.

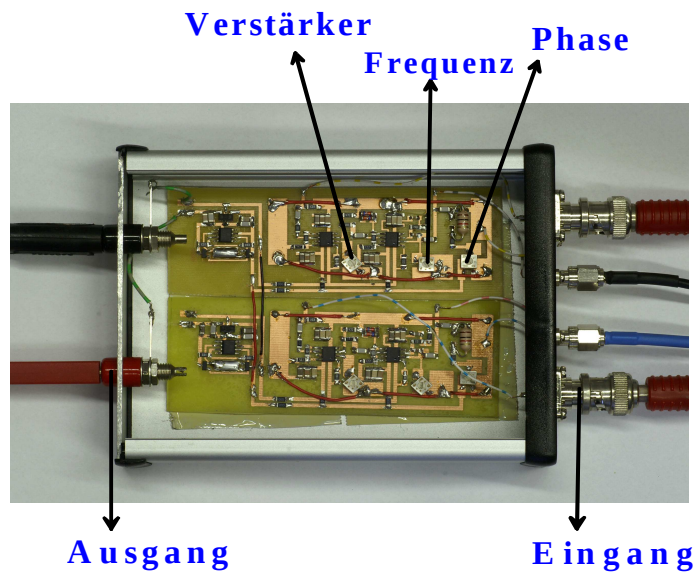


Abbildung 16: Die Oszillatorschaltung in einer Aluminiumummantelung und seine Bestandteile

2.4 *E. coli*-Zucht und Fluoreszenzmikroskopie

Die gefriergetrockneten *E. coli* (b-Stamm von ATCC 11303 und w-Stamm von ATCC 9637) werden in einem spezifischen Nährmedium (Zusammensetzung laut Tabelle 6), bei einer Temperatur von 37°C suspendiert und gezüchtet.

Pepton	10 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
D(+)-Glucose-Monohydrat	1 g

Tabelle 6: Zusammensetzung des Nährmediums. Die angegebenen Mengen werden in einem Liter destilliertes Wasser gelöst

Zu dem Nährmedium (Tabelle 6) wird eine Spatelspitze von *E. coli* zugegeben und unter ständigem Rühren für mehrere Stunden auf Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Durch die Züchtung werden die Bakterien hinsichtlich ihres Überlebens nach der Gefriertrocknung bei -20 °C selektiert. Die Bakterienlösung wird nach der Inkubation 5 Minuten lang bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Lösung, die sich über dem Pellet befindet, wird verworfen, das Pellet bzw. die gezüchteten Zellen werden mehrmals zentrifugiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gezüchteten Zellen werden im Gefrierschrank bei -20° C gelagert und für weitere Experimente aufbewahrt und verwendet. Das Aussehen der Zellen, die Richtigkeit und Stabilität der Lagerung kann durch die Färbung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und beobachtet werden. Die geeigneten Fluoreszenzfarbstoffe für *E. coli* sind Dansylchlorid (5-(Dimethylamino)naphtalin-1-sulfonylchlorid) und Bisbenzimid H 33258. Das Reagenz Dansylchlorid bindet an primäre aromatische und aliphatische Aminogruppen, mit denen es stabile blau- oder blaugrün fluoreszierende Sulfonamide bildet. Für die Markierung der *E. coli* wurde eine Lösung von Dansylchlorid 1,5 mg/ml Ethanol hergestellt und 50µl dieser Lösung wurden mit 50µl der *E. coli*-Lösung vermischt. Die gefärbten Bakterien werden auf einen Objektträger getrocknet und unter dem Lichtmikroskop beobachtet und fotografiert (Abbildung 17).

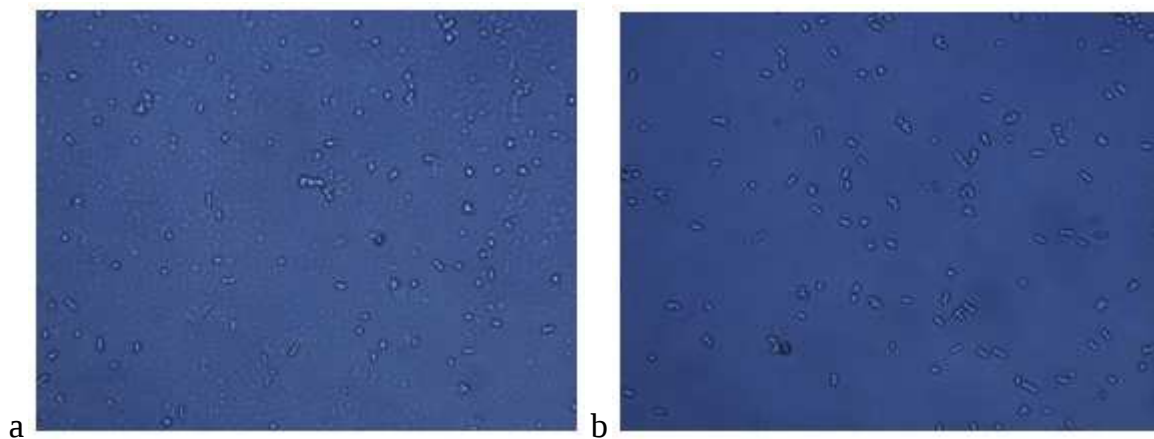


Abbildung 17: UV-mikroskopische Aufnahme der *E. coli* (100 fache Vergrößerung) a) b-Stamm 5 mg/ml und b) w-Stamm 5mg/ml gefärbt mit Dansylchlorid

Im Gegensatz dazu bindet Bisbenzimid H 33258 bevorzugt an DNA-Sequenzen mit erhöhtem A-T-Gehalt und eignet sich deshalb auch zur Färbung von Bakterienzellen. Für das Färben werden 20 mg der *E. coli* in einem Eppendorfgefäß abgewogen und in 1 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Zwei Tropfen des Farbstoffes werden dazugegeben, 5 Minuten gemischt, danach 30 Minuten stehen gelassen. Dann werden die *E. coli* 5 Minuten lang bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in destilliertem Wasser wieder resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt. Schließlich werden die *E. coli* wieder in destilliertem Wasser aufgenommen, auf einen Objektträger transferiert und getrocknet. Mit Hilfe des Lichtmikroskops werden die markierten *E. coli* fotografiert (Abbildung 18).

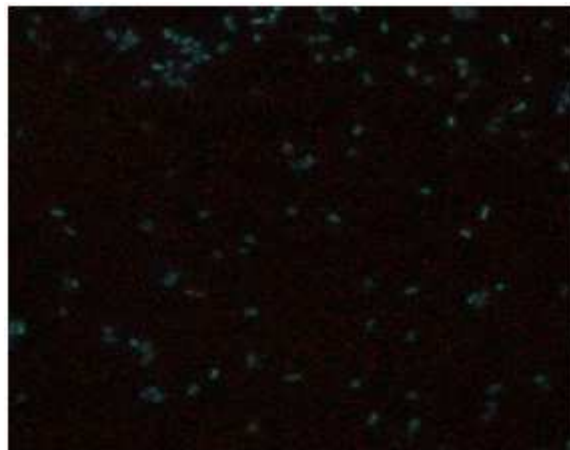


Abbildung 18: UV-mikroskopische Aufnahme der *E. coli* (100 fache Vergrößerung) w-Stamm 1mg/ml gefärbt mit Bisbenzimid

Die Änderung der Anzahl an *E. coli* kann durch das systematische Zählen bestimmt werden, was Rückschlüsse auf die Änderung der Biomasse pro Volumen zulässt. Die Wachstumsgeschwindigkeit der *E. coli* hängt von der Zusammensetzung des Nährmediums und den Kultivierungsbedingungen, wie pH oder Temperatur ab. Alle Zellzahlen und Konzentrationen der *E. coli* in dieser Arbeit beziehen sich auf die quantitative Bestimmung mit Hilfe einer Neubauer Improved Zählkammer (Abbildung 19, a), die etwa 30x80 mm groß und 5 mm dick ist. Sie ermöglicht die Bestimmung der Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit. Die Bakterien, die sich in der Zählfläche befinden, werden unter dem Lichtmikroskop visuell ausgezählt. In der Mitte der Zählkammer ist eine vertiefte Mittelfläche, wo quadratische Felder definierter Größe eingestzt sind.

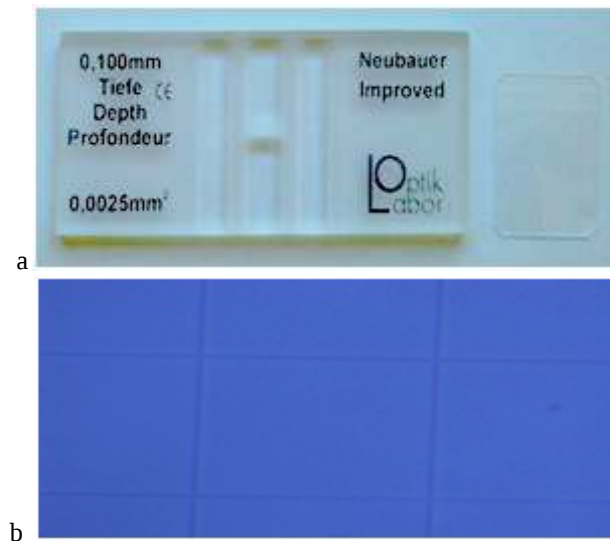


Abbildung 19: a) Neubauer Zählkammer für die Bestimmung der Zellzahlen und
b) das Auszählen der *E. coli* in der Zählkammer unter UV- Mikroskop

Die Höhe der Zählkammer wird durch ein Deckglas festgelegt und entspricht 0,100 mm. Die Netzteilung weist 3x3 große Quadrate von je 1 mm² auf. Die vier Eckquadrate werden verwendet um Bakterien und Leukozyten auszuzählen. Das Quadrat in der Mitte ist in 5x5 kleine Quadrate unterteilt, die eine Seitenlänge von je 0,2 mm und einer Fläche von 0,04 besitzen. Die Gruppenquadrate sind in 16 kleine Quadrate von je 0,0025 mm² aufgeteilt. 10 µl der Bakteriensuspension werden seitlich bei aufgelegtem Deckglas aufpipettiert, wobei sich durch die Kapillarkraft der Spalt zwischen dem Deckglas und Kammerboden füllt. Unter dem Lichtmikroskop wird die Zählfläche mit angesaugter Bakteriensuspension visualisiert und ausgezählt (Abbildung 19, b). Die Konzentration der *E. coli*-Lösung wird in Zellen pro ml aus der folgenden Formel 9 bestimmt.

$$\frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen} \cdot \text{Verdünnung [ml]}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]}} \cdot 10\text{mm}^3/\text{ml} = \text{Zellen/ml}$$

Formel 9: Berechnung der Zellenkonzentration

2.5 Herstellung und Optimierung der MIP

Für die Entwicklung eines optimal funktionsfähigen Chemosensors auf MIP-Basis ist die Auswahl des Polymers als sensitive Rezeptorschicht ein entscheidender Schritt. Die wichtigsten Parameter für die Auswahl des Polymers beinhalten die Auswahl und Zusammensetzung der Monomere, den Quervernetzeranteil, die Porosität, die Stabilität und das Quellverhalten in wässrigen Lösungen. Das entsprechende Polymer muss dann an den Analyten und seine verschiedenen Eigenschaften, wie Polarität oder Funktionalität angepasst werden, was häufig empirisch erfolgt.

2.5.1 Polyurethan-MIP

Otto Bayer und sein Mitarbeiter synthetisierten im Jahr 1937 zum ersten Mal Polyurethan. Polyurethan ist ein Kunstharz, welcher aus der Polyadditionsreaktion von Diolen bzw. Polyolen mit Polyisocyanaten entstehen, wobei für Polyurethane die Urethan-Gruppe (-NH-CO-O) charakteristisch ist (Abbildung 20). Für die Polyadditionsreaktion werden als Monomere sehr oft aromatische Alkohole (Phenole) verwendet da sie schneller als aliphatische Alkohole reagieren. In der Industrie ist Polyurethan weit verbreitet und wird in Weichschaumstoffprodukten (Matratze, Möbel, Verpackungen) bis zur Herstellung von Hartschaumstoffen (z.B. für Isolierungen) verwendet.

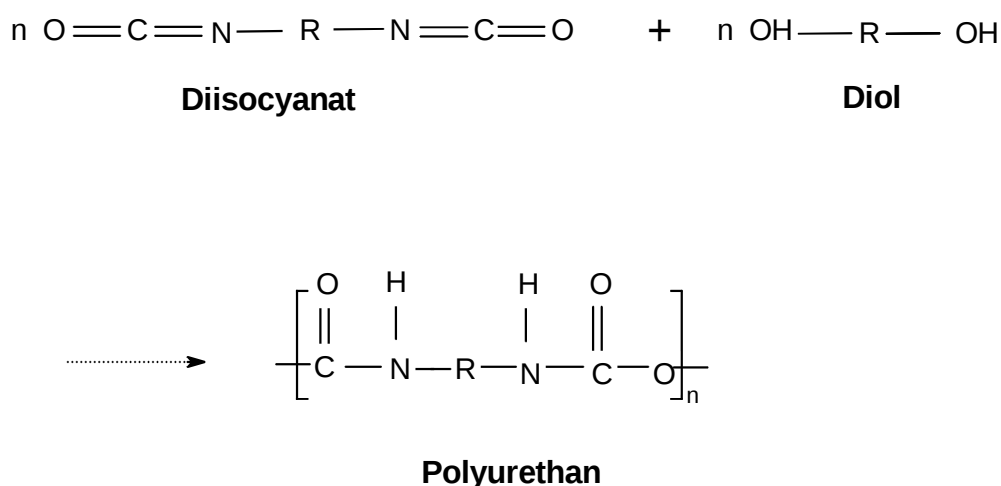
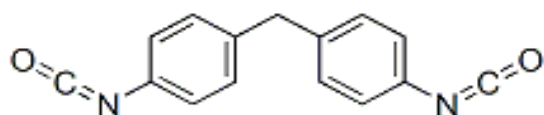
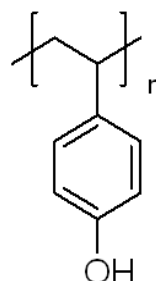


Abbildung 20: Polyadditionsmechanismus zur Synthese eines Polyurethans

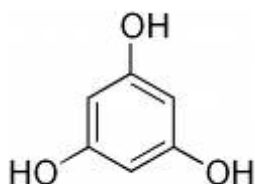
Für die Oberflächenprägung und Detektion von Bakterien und Bioanalyten hat sich Polyurethan wegen seiner Rigidität, sehr guter Beständigkeit gegenüber Umwelteinflüssen und auch wegen seiner hohen Stabilität gegen saure und alkalische Verseifungen, sehr bewährt.



Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (250,26 g/mol)



Poly (4-vinylphenol) (120,15 g/mol)



Phloroglucin (126,11 g/mol)



Tetrahydrofuran (72,11 g/mol)

Abbildung 21: Zusammensetzung des verwendeten Polyurethans

In dieser Arbeit werden 225,28 μmol Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (4,4'-MDI) und 419,5 μmol Poly (4-vinylphenol) (PVP) als Monomere verwendet, wobei 34,1 μmol Phloroglucin als Quervernetzer zwischen Polymerketten agiert. Von dessen zugegebener Menge hängt die Härte und Starrheit des Polymers ab. Als Lösungsmittel wird 200 μl Tetrahydrofuran verwendet. Die Zusammensetzung des Polyurethans ist aus der Abbildung 21 ersichtlich.

In einem Eppendorfgefäß werden Poly(4-vinylphenol) und Phloroglucinol abgewogen, in 200 μl Tetrahydrofuran gelöst und mit dem Vortex homogenisiert. Dann wird Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat zugegeben und nochmal homogenisiert.

Die Vorpolymerisation findet in einem Wasserbad unter ständigem Rühren bei 70°C statt und wird ca. nach 15 Minuten, nachdem der Geldpunkt erreicht ist, abgebrochen. Das Abbrechen der Reaktion erfolgt durch das Verdünnen mit Tetrahydrofuran im Verhältnis 1+9, wobei das Präpolymer glasklar sein sollte.

Trübungen sind ein Zeichen für Feuchtigkeitsaufnahme, welche aufgrund der Wasserempfindlichkeit des Isocyanats zu Problemen führt oder zu weit fortgeschrittenen Polymerisation. Das Präpolymer kann in der Tiefkühltruhe bei -20°C zwölf Monate oder bei 4°C drei Wochen gelagert werden. Es wird mit gezüchteten Sicherheitsstämmen w- und b-*E. coli* gearbeitet. Diese Stämme unterscheiden sich nicht in ihrer biologischen Struktur und ihrem Aufbau, sondern nur in ihrer Größe. Das b-*E. coli* Bakterium ist 1 µm bis 1,5 µm und w-*E. coli* 1,5 µm bis 3 µm groß.

2.5.2 Auftragung der Schicht

Das Präpolymer wird mittels Spin-Coating-Verfahren auf die Goldelektroden aufgetragen, wobei es nochmal 1+2 mit Tetrahydrofuran verdünnt wird. 20µl des verdünnten Präpolymerisats wird mittels einer Gilsonpipette gleichmäßig auf die Elektroden verteilt. Bessere Homogenität der Oberfläche erhält man durch das Aufspinnen der aufgetragenen Schicht mittels eines Spinners. Nach dem Auftragen der Präpolymerlösung wird der Quarz mit voreingestellter Drehzahl bei 3000 rpm für zehn Sek. geschleudert. Das Lösungsmittel verdampft rasch, zurück bleibt glatte, dünne Oligomeroberfläche. Der Verdünnungsgrad des Präpolymers, das zur Beschichtung eingesetzt wird, hat neben der Rotationsgeschwindigkeit des Spinners den größten Einfluss auf die Schichtdicke der Oberfläche. Zu diesem Zweck wird der Kontakt-Modus der Rasterkraftmikroskopie herangezogen, ein Kratzer in die Schicht vorgenommen und mittels Vermessen des Schnitts das Tiefenprofil bestimmt. Nach der Optimierung der Polymerdicke durch das Verdünnen, erfolgt anschließend die Prägung der selektiven Polymerschicht mit dem *E. coli*-Analyten. 20µl der zu bestimmenden *E. coli*-Lösung wird mittels Gilsonpipette in das noch nicht ausgehärtete Polyurethan auf einer Goldelektrode pipettiert, die dann als geprägter Bereich bezeichnet wird. Nach der beginnenden Sedimentierung auf der Polyurethanoberfläche, wird 2 Sekunden bei 3000 rpm abgespinnt, die geprägte Goldelektrode mit einem Glasstempel überdeckt und mit einer Klammer befestigt. Nur eine Elektrode wird mit dem Analyten geprägt, so dass viele Hintergrundeffekte wie z.B. Temperatureinflüsse kompensiert werden. Nach dem Aushärten über Nacht, wenn ein vollständiges Auspolymerisieren gewährleistet ist, wird der Glasstempel entfernt. Die Angaben über die quantitative Besetzung der Kavitäten, die mit der geeigneten molekularen Prägetechnik im Polymer generiert werden sind, sind von großer Interesse und Wichtigkeit für die Erkennung und Unterscheidung der Stämme im Fall der *E. coli*. Auf diese Weise wird jede QCM, deren sensitive Schicht mit *E. coli* geprägt ist, hergestellt, unter Rasterkraftmikroskop untersucht und für die Messungen in der flüssigen Phase eingesetzt.

2.5.3 Polymeroptimierung und Generieren von Kavitäten

Die früheren, experimentellen Untersuchungen haben ergeben, dass eine optimale Schichtdicke für *E. coli* in einem Bereich zwischen 350 und 450 nm liegt. Unter dem Rasterkraftmikroskop wird optische Beurteilung der Homogenität der Polymeroberfläche (Abbildung 22) und Polymerdicke (Abbildung 23) durchgeführt, wobei der Kontaktmodus herangezogen wird. Für die Beurteilung der Homogenität wird ein Bereich von 10 µm x 10 µm Breite und 10 nm Höhe inspiziert, wobei optisch eine homogene Schicht festgestellt wird.

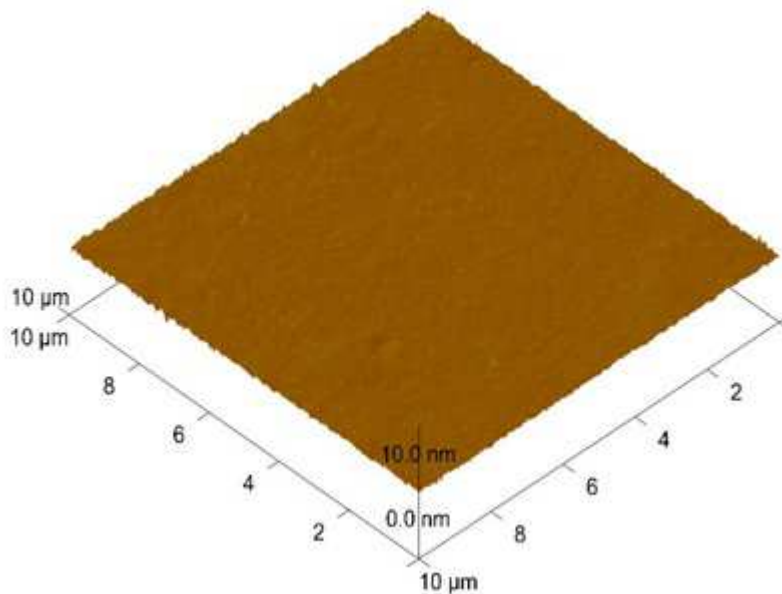


Abbildung 22: AFM- Aufnahme der Polyurethanschicht zur optischen Beurteilung der Homogenität der Polymeroberfläche

Um die Schichtdicke des Polyurethans beurteilen zu können, wurde in die Polymeroberfläche eingekratzt (Abbildung 23). Die Prüfung und die Beurteilung der Schichtdicke der sensitiven Polymerschicht wird mittels Vermessen des Schnitts analysiert untersucht (Abbildung 24). Aus der Abbildung 24 resultiert eine Schichtdicke der Polyurethanschicht von 423 nm, was für die Weiterentwicklung der QCM und für folgende Optimierung der selektiven Kavitäten wichtig ist.

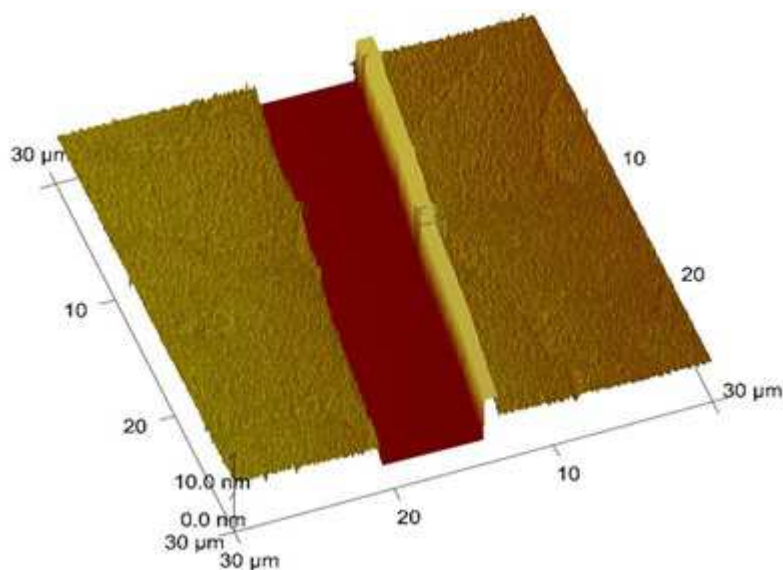


Abbildung 23: AFM- Aufnahme der Polyurethanschicht zur Beurteilung der Dicke des Polyurethanfilms

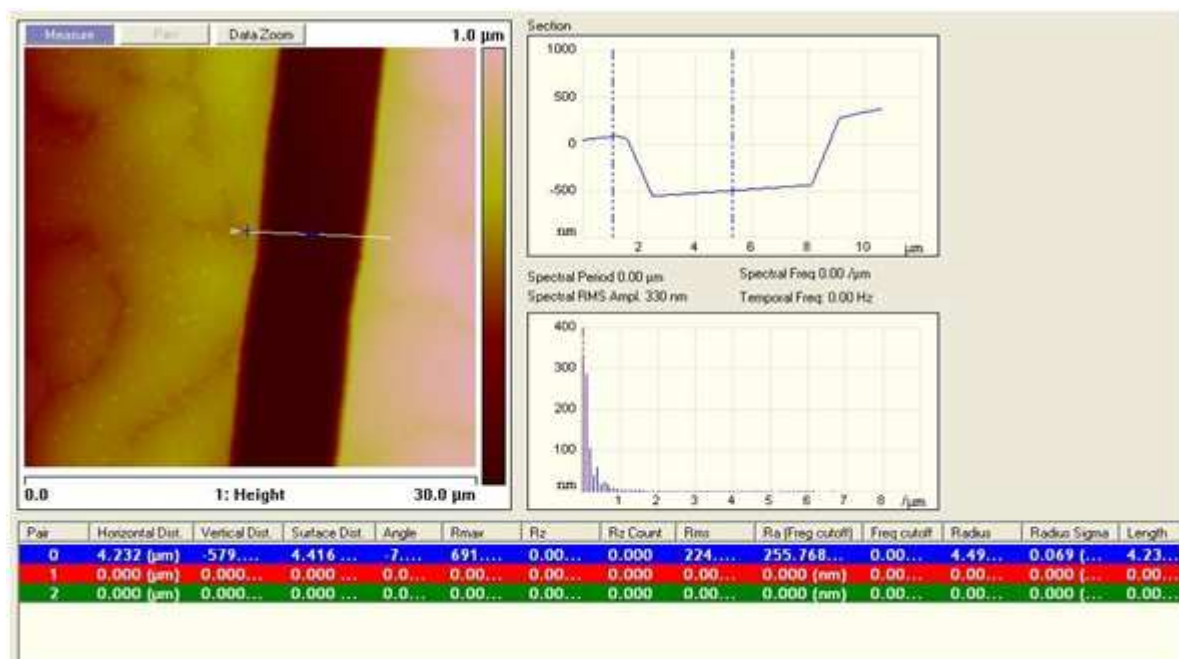


Abbildung 24: Schnittbild der Polymeroberfläche aufgenommen im Kontaktmodus

Nach der Optimierung der Polymerdicke durch das Verdünnen, erfolgt die Prägung der noch nicht ausgehärtete Polyurethanschicht mit *b-E. coli*. Nach dem Aushärten über Nacht, wenn ein vollständiges Auspolymerisieren gewährleistet ist, wird der Glasstempel entfernt. Die geprägte Polymeroberfläche wurde weiter unter Rasterkraftmikroskop untersucht.

Die Abbildung 25 zeigt *E. coli* in zweidimensionaler Darstellung, die einzeln, verteilt und eingebettet in der homogenen Polyurethanschicht vorliegen. Mittels Vermessen des Schnitts wird ihre Größe ermittelt. Die Abbildung 26 zeigt die Bakterien der w-Stämme, da sie eine Größe von 1,8 μm besitzen.

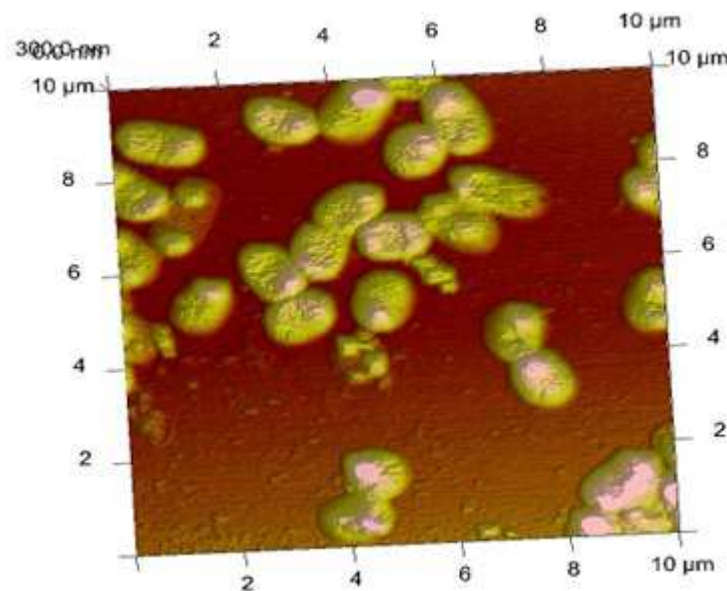


Abbildung 25: AFM-Aufnahme der Polyurethanschicht in der *E. coli* eingebettet sind

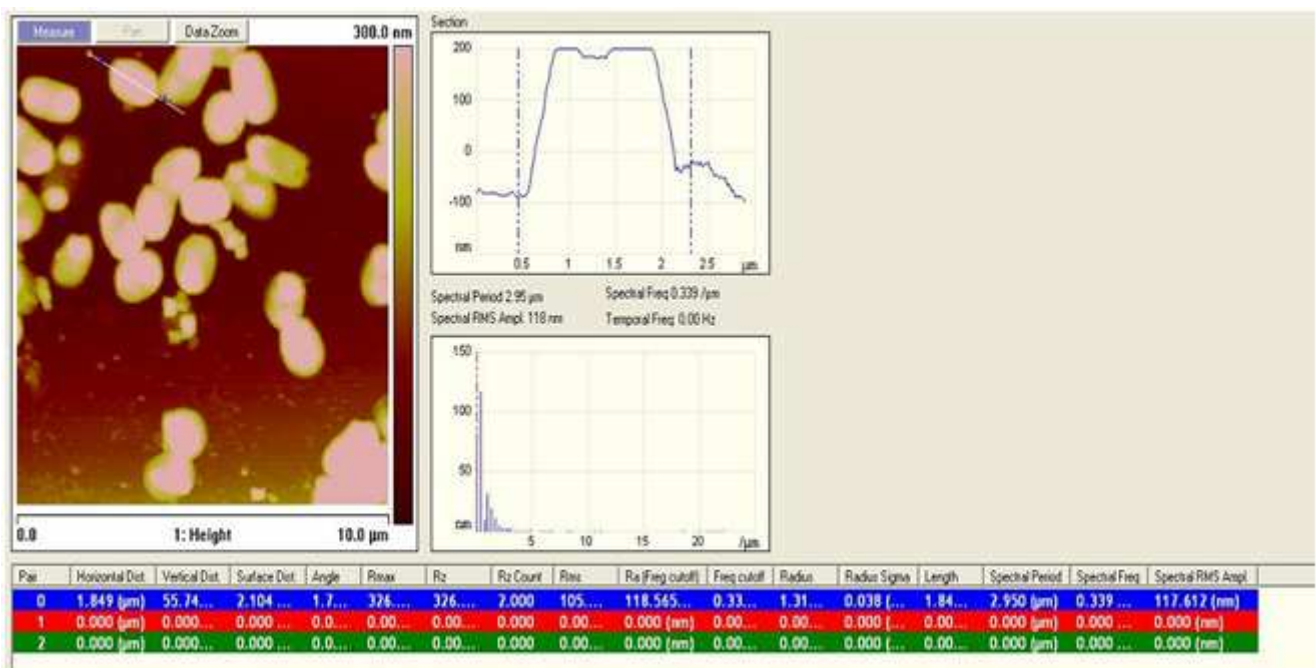


Abbildung 26: Ermittlung der *E. coli*- Größe mittels AFM-Analyse

Nach der AFM-Untersuchung und der Sektionsanalyse werden die *E. coli* durch das Auswaschen unter Rühren mit 0,1% Natriumdodecyl-sulfat aus der sensitiven Schicht entfernt. Sollte obige Methode nicht zum Erfolg führen, gibt es andere Möglichkeiten um die Analyten aus den Kavitäten zu entfernen:

- ❖ im destilliertem Wasser bei 40°C über mehrere Stunden
- ❖ Behandlung mit 0,1%- 0,5%igen NaCl-Lösung
- ❖ Behandlung mit 0,5 mg/ml Lysozym

Nach dem Entfernen von Zellen werden die Sensorschichten mittels AFM-Betrachtungssoftware WSxM⁶⁰ überprüft. Abbildung 27 zeigt eine typische *E. coli* MIP Oberfläche. Deutlich erkennt man die einzelnen Kavitäten der w-*E. coli*, deren Länge 3,55 µm beträgt. Die Bakterien sind nicht agglomeriert, so dass sie sich wieder in diese leeren Kavitäten reversibel einlagern können.

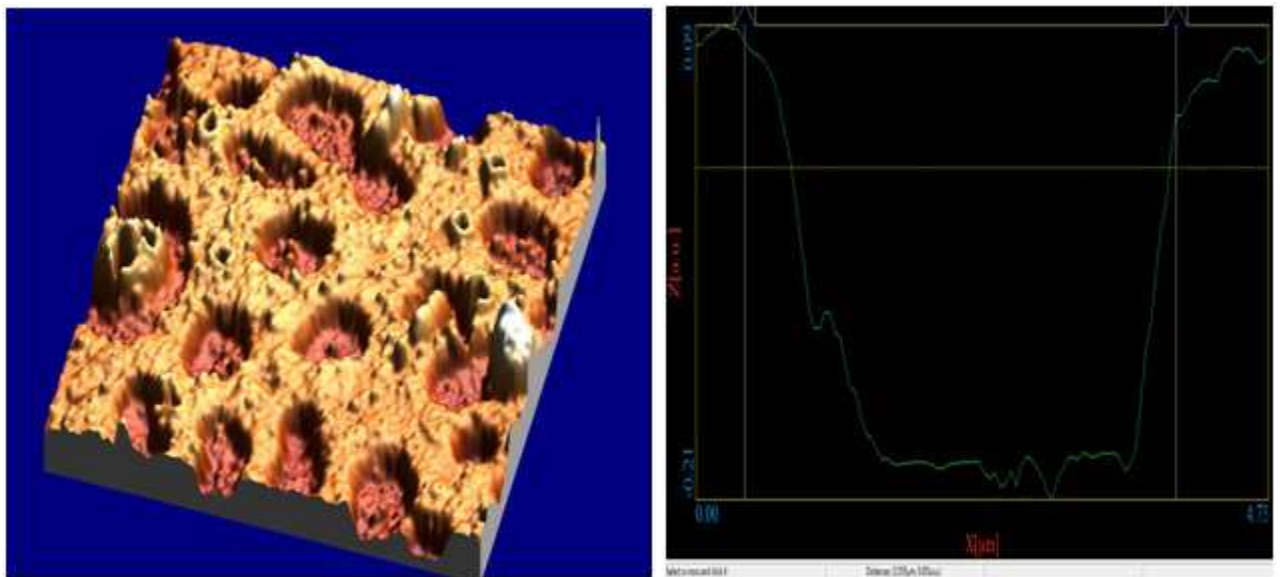


Abbildung 27: AFM-Aufnahme und die Analyse der *E. coli*- Kavitäten in der Polyurethanschicht mittels WSxM- Programm

2.6 Messung in flüssiger Phase

Für die folgenden Messungen in der flüssigen Phase wurden b- und w-stämmige *E. coli* gezüchtet, unter dem Lichtmikroskop in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei 0,1 mg/ml etwa 8×10^8 Bakterien entspricht, und daraus Bakteriensuspensionen in unterschiedlichen, genau definierten Konzentrationen hergestellt. Während der Messung wird destilliertes Wasser bzw. die Analytlösung in die Messzelle in einem stopped-flow-Modus mit Hilfe einer Peristaltikumpe eingepumpt, wobei die Stabilität und die Langlebigkeit des QCMs kleinere Flussraten (0,8ml/min.) erfordert. Jede Messung in Flüssigkeiten beginnt mit einem Spülvorgang, während dessen sich die konstante Frequenz einstellt bzw. das sogenannte Einschwingen des Sensors stattfindet (Abbildung 28). Das bedeutet meist eine Frequenzerniedrigung während der ersten 100-120 Minuten (auch Frequenzerhöhungen können wegen der Änderung der mechanischen Eigenschaften des Polymers sowie Herauslösen von Resten des Analytes, auftreten). Dieses Verhalten ist auf die Sättigung der Polyurethanschicht mit destilliertem Wasser oder dem jeweiligen Medium zurückzuführen. Diese Sättigung verursacht ein Quellen der Rezeptorschicht und damit eine Massenerhöhung, die mit einer Frequenzerniedrigung beider Elektroden resultiert.

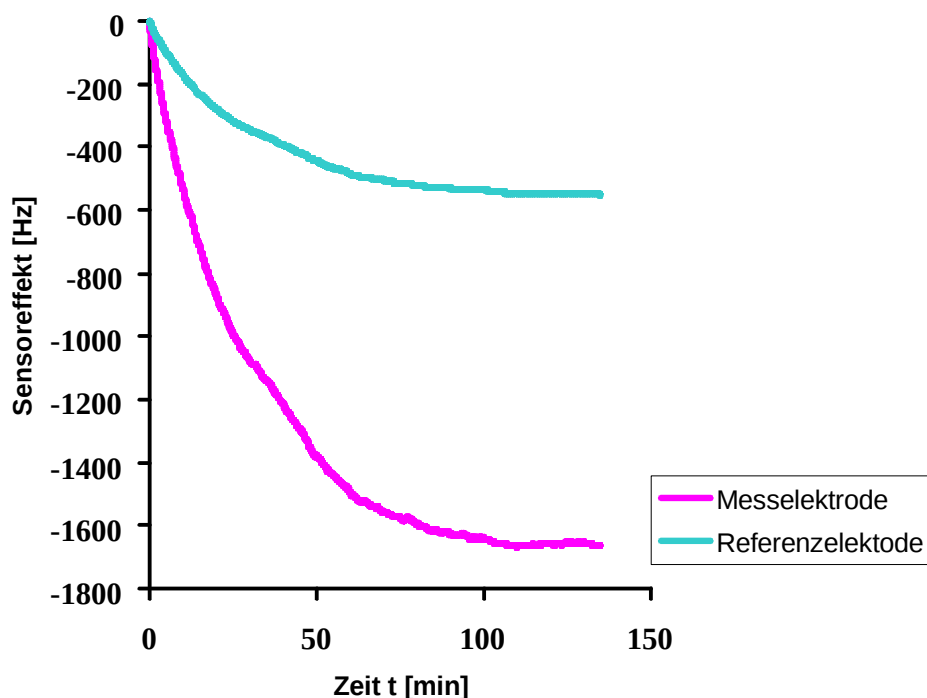


Abbildung 28: Einschwingphase eines QCMs in der flüssigen Phase

Nach der Stabilisierung der Einschwingfrequenzen wird die Messung kurz unterbrochen, die Bakterien in die Messzelle eingebracht und wieder die Messung gestartet.

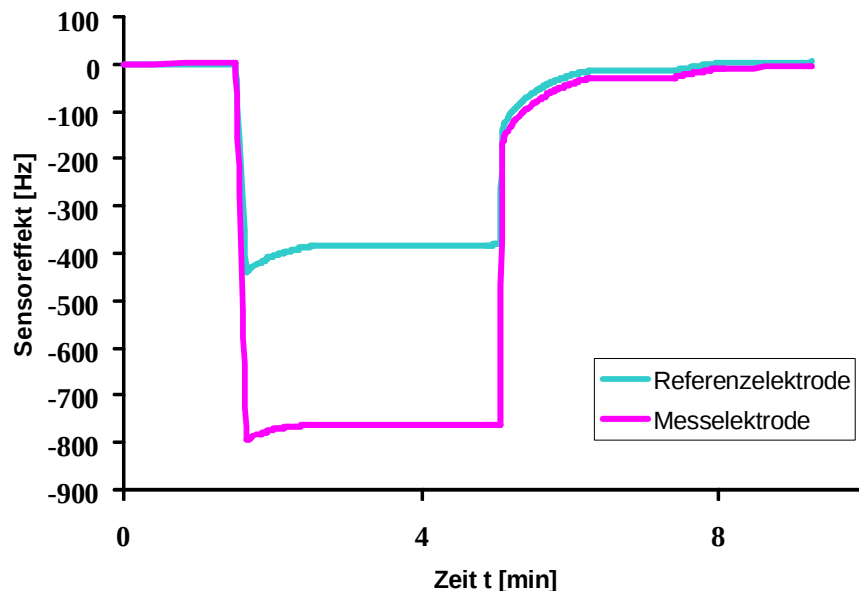


Abbildung 29: Frequenzänderung während der reversiblen Einlagerung und Entfernung von *E. coli* am MIP; Zweielektrodenschwingquarz mit 10 MHz; Messlösung w-*E. coli* 1,5 mg/ml; Messung im stopped- flow Modus bei Raumtemperatur

Abbildung 29 zeigt dass durch die Einlagerung der Bakterien in die leeren Kavitäten zur Massenbeladung und damit zu einer Frequenzerniedrigung von 790 Hz der geprägten Elektrode, der sogenannten Messelektrode, führt. Bei der ungeprägten Elektrode, der sogenannten Referenzelektrode, wird eine sehr niedrige Frequenzerniedrigung beobachtet. Dieser unspezifische Effekt ist auf eine gewisse Affinität des Analyten zum Polymer sowie leichte Unterschiede in Temperatur, Viskosität oder Salzgehalt der Messlösung gegenüber der Referenzlösung, zurückzuführen. Diese Effekte können aber mit Hilfe der Referenz eliminiert werden. Während des Waschvorganges der Bakterien mit destilliertem Wasser aus den Kavitäten, wird die Messung unterbrochen. Nach dem Waschen und der Entfernung der Bakterien, wird die Messung wieder gestartet wobei die Frequenz in ihren Grundzustand übergeht und die Basislinie der Messung wieder erreicht ist.

3. QCM-Sensor-Messungen

Eine einzigartige Eigenschaft von QCM-Messungen ist es Masseänderungen und strukturelle Veränderungen zu erfassen, aber gleichzeitig Informationen über viskoelastischen Eigenschaften der sensitiven Schicht zu sammeln⁶¹.

3.1 Sensorcharakteristik

Um Sensorcharakteristiken für die QCM-Sensoren zu erstellen wurden diese mit Konzentrationsreihen von *b-E. coli* kalibriert. Die Proben mit bekannten Konzentrationen, für *b-E. coli* enthielten 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml und 2,5 mg/ml und für *w-E. coli* 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1mg/ml und 3,5 mg/ml. Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die dabei erhaltenen Ergebnisse.

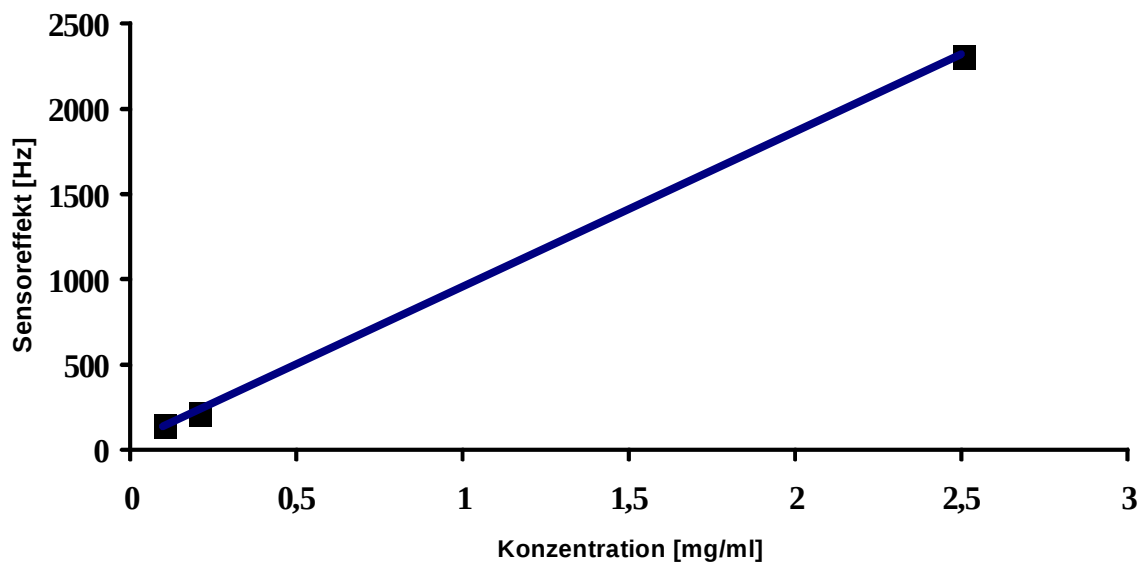


Abbildung 30: QCM Sensorcharakteristik der *b-E. coli*-MIP

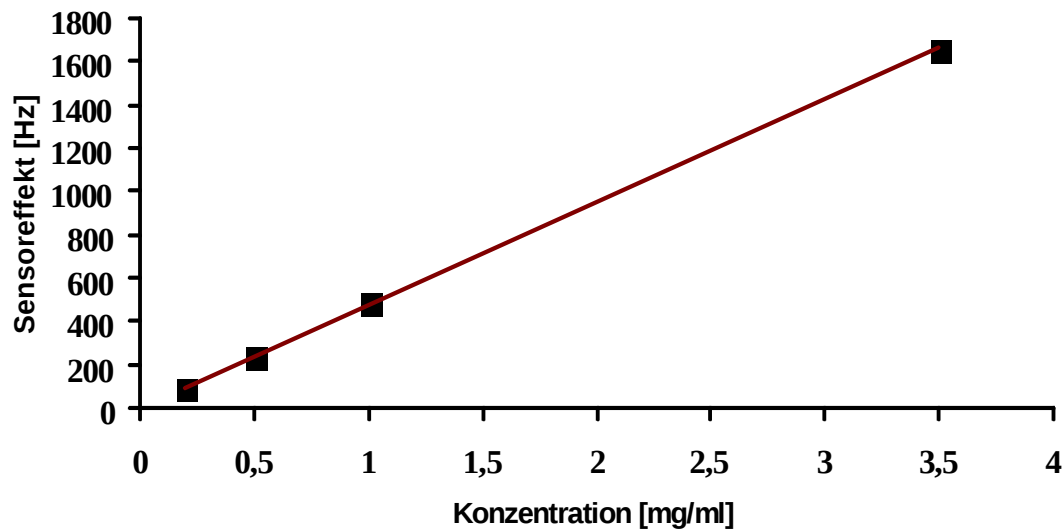


Abbildung 31: QCM Sensorcharakteristik der *w-E. coli*-MIP

Aus den Charakteristiken lässt sich trotz der vergleichsweise geringen Zahl an Messpunkten eine lineare Konzentrationsabhängigkeit des reversiblen Sensorsystems ableiten. Die grundlegenden Anforderungen für eine Sensorvorrichtung in Bezug auf Robustheit und Sensorcharakteristiken sind erfüllt. Daher werden weitere Untersuchungen bezüglich der Empfindlichkeit, der Reproduzierbarkeit und der Selektivität durchgeführt.

Nach den Kalibrierungen der Sensorsysteme werden Empfindlichkeiten der b- und w-MIP auf unterschiedlichen Konzentrationen analysiert. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen Sensormessungen von b- und w-MIP und Referenzmaterial auf QCM, die eine klare Korrelation zwischen den Bakterienkonzentrationen und der Frequenzerniedrigung zeigen.

Abbildung 32 zeigt die Sensorantworten des b-MIPs auf die Konzentration 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml und 2,5 mg/ml b-*E. coli*. Die Sensoreffekte, die durch die Einführung der b-*E. coli*-Lösungen in die Messzelle und Beladung in ihre Kavitäten entstanden sind. Die raschen Sensorantworten wurden beobachtet, wobei die Frequenzen auf der Mess- und Referenzelektrode durch das Spülen mit destilliertem Wasser mit einer Flussrate von 0,5 ml/min zum Ausgangswert zurückkehren.

Sowohl der MIP mit den Kavitäten als auch die ungeprägte Referenzelektrode NIP zeigen einen Effekt, der durch die Sedimentationseinflüsse bedingt ist. Bei der Messelektrode tritt ein größerer Effekt, wobei die Frequenzerniedrigung stärker ausgeprägt ist als bei der Referenzelektrode. Je höher die Bakterienkonzentrationen desto größer sind Sensoreffekte auf dem MIP (Tabelle 7). NIP, also Polymer zeigt keine besondere Affinität zum *E. coli* und deswegen zeigt er keine korrelierenden Sensoreffekte im Vergleich zum MIP.

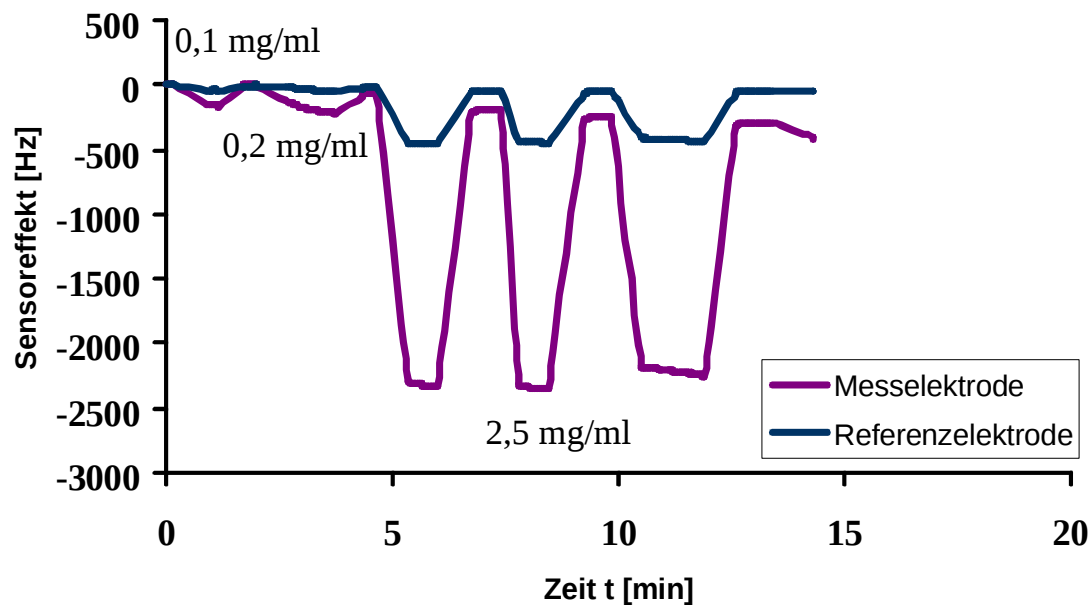


Abbildung 32: Empfindlichkeit eines, mit *b-E. coli* geprägten Zweielektrodenschwingquarzes 10 MHz; Messlösungen *b-E. coli* 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml und 2,5 mg/ml im stopped-flow Modus bei Raumtemperatur; das Entfernen der Bakterien aus den Kavitäten erfolgte mit destilliertem Wasser

In der Tabelle 7 sind Sensoreffekte des *b-E. coli*-MIP noch einmal zusammengefasst.

Bakterienkonzentration	Sensoreffekt (Messelektrode)
0,1 mg/ml ($8 \cdot 10^8$ Zellen/ml)	163 Hz
0,2 mg/ml ($1,6 \cdot 10^9$ Zellen/ml)	223 Hz
2,5 mg/ml ($2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml)	2313 Hz

Tabelle 7: Ermittelte Sensoreffekte in Abhängigkeit der Konzentration der *b-E. coli*-Lösungen

Bei der folgenden Messung wurde die Empfindlichkeit eines *w-E. coli*-Sensors in Konzentrationen von 0,2 mg/ml bis 3,5 mg/ml untersucht und die Sensorcharakteristiken in Abbildung 33 vorgestellt. Der MIP zeigt ein konstantes Signal in Abhängigkeit der unterschiedlichen Konzentrationen, welches der Sauerbrey-Gleichung entsprechende Sensorantworten liefert.

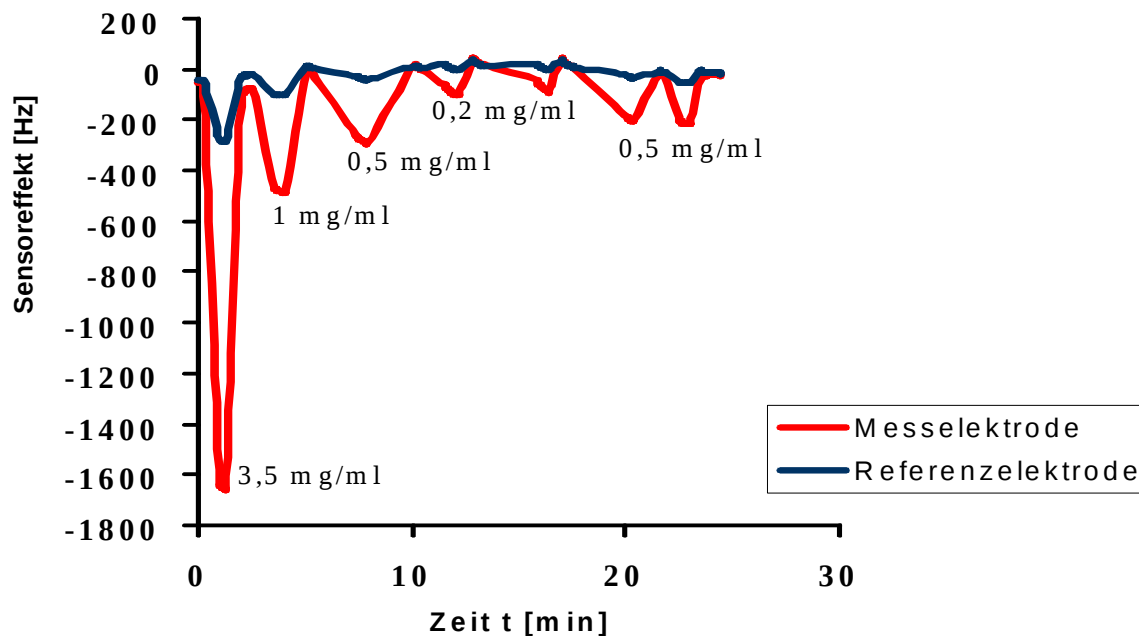


Abbildung 33: Empfindlichkeit eines *w-E. coli*-MIP Zweielektrodenschwingquarzes 10 MHz; gemessen wurden Messlösungen *w-E. coli* im Konzentrationsbereich von 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 3,5 mg/ml in stopped-flow Modus bei Raumtemperatur; das Entfernen der Bakterien aus den Kavitäten erfolgte mit destilliertem Wasser

Die Tabelle 8 stellt die Ergebnisse der Messungen in unterschiedlichen Konzentrationen der *w-E. coli*-Lösungen dar.

Bakterienkonzentration	Sensoreffekt (Messelektrode)
0,2 mg/ml, ($1,6 \cdot 10^9$ Zellen/ml)	95 Hz
0,5 mg/ml, ($4 \cdot 10^9$ Zellen/ml)	237 Hz
1 mg/ml, ($8 \cdot 10^9$ Zellen/ml)	483 Hz
3,5 mg/ml, ($2,8 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml)	1659 Hz

Tabelle 8: Ermittelte Sensoreffekte in Abhängigkeit der Konzentration der *w-E. coli*-Lösungen

3.2 Reproduzierbarkeit der b- und w-MIP

Die Reproduzierbarkeit eines *b-E. coli*- und eines *w-E. coli*-Sensors wurde bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml ($2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) untersucht. Die Bakterienlösung wurde mit einer Flussrate von 0,8 ml/min. eine Minute lang in die Messzelle befördert, dann gestoppt und gemessen. Zwischen jeder Messung erfolgte eine Spülung der Messzelle mit destilliertem Wasser ca. zwei Minuten lang, wobei die Basislinie des Sensors erreicht wurde, d.h. die Kavitäten wurden geleert und somit bereit für die neue Besetzung mit *E. coli*. In Abbildung 34 ist die Reproduzierbarkeit des b-MIP zusammengefasst.

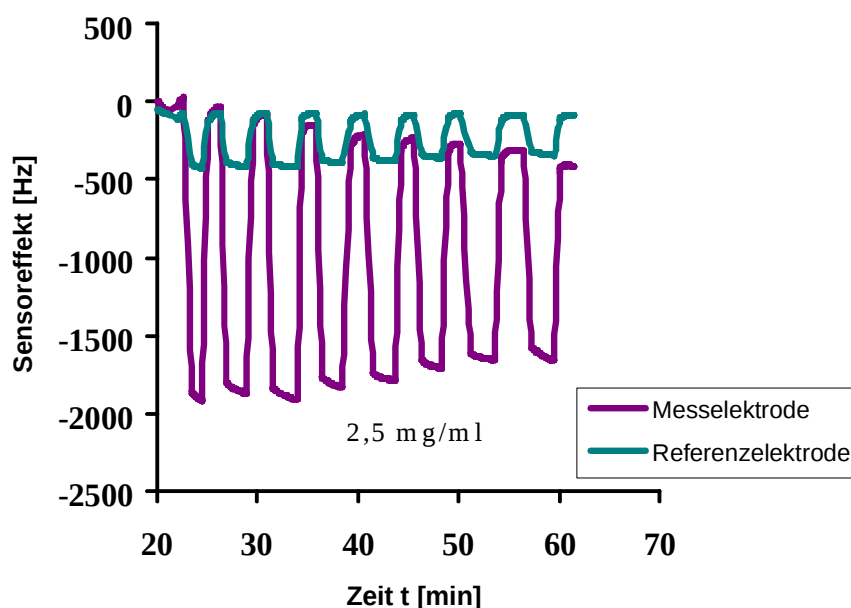


Abbildung 34: Reproduzierbarkeit des Sensoreffektes bei einem Bakteriensensor mit Polyurethanbeschichtung und *b-E. coli*- MIP; Messung in stopped-flow Modus durch Zugabe von 2,5 mg/ml *b-E. coli* bei Raumtemperatur; Auswaschen des Analyts mit destilliertem Wasser

Die Sensoreffekte auf eine 2,5 mg/ml *b-E. coli* Lösung sind im Bereich zwischen 1846 Hz und 1351 Hz vertreten bzw. in einem Unterschiedsbereich von ca. 495 Hz zwischen den Sensormessungen. Die Sensoreffekte streuen über einen großen Frequenzbereich nicht, so dass die Stabilität des Sensors gegeben ist. Es wurde beobachtet dass nach der Spülung mit destilliertem Wasser die Frequenz auf dem NIP zum Ausgangswert zurückkehrt. Auf dem MIP wurde beobachtet dass keine vollkommene Rückkehr auf das anfängliche Signal stattfindet.

Dieses Sensorverhalten kann verursacht werden, wenn einige der Bakterien durch nicht vollständige Reversibilität aus den Kavitäten nicht befreit werden können oder das Absterben der Bakterien in der Lösung schon stattgefunden hat, wobei die Bakterien untereinander verklumpen. Obwohl der b-MIP teilweise irreversibel reagiert, ist er als Rezeptor gut geeignet, wie aus den Sensorantworten (Tabelle 9) ersichtlich ist.

Bakterienkonzentration	Sensoreffekt (MIP)	Korrigierte Sensoreffekte MIP
2,5 mg/ml ($2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml)	1921 Hz	1846 Hz
	1875 Hz	1802 Hz
	1916 Hz	1839 Hz
	1830 Hz	1677 Hz
	1786 Hz	1568 Hz
	1717 Hz	1480 Hz
	1661 Hz	1457 Hz
	1665 Hz	1351 Hz

Tabelle 9: Reproduktionswerte des *b-E. coli*- Sensors bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml *b-E. coli*

In Abbildung 35 ist analog dem Experiment vorher die Reproduzierbarkeit des *w-E. coli*-Sensors bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml gezeigt.

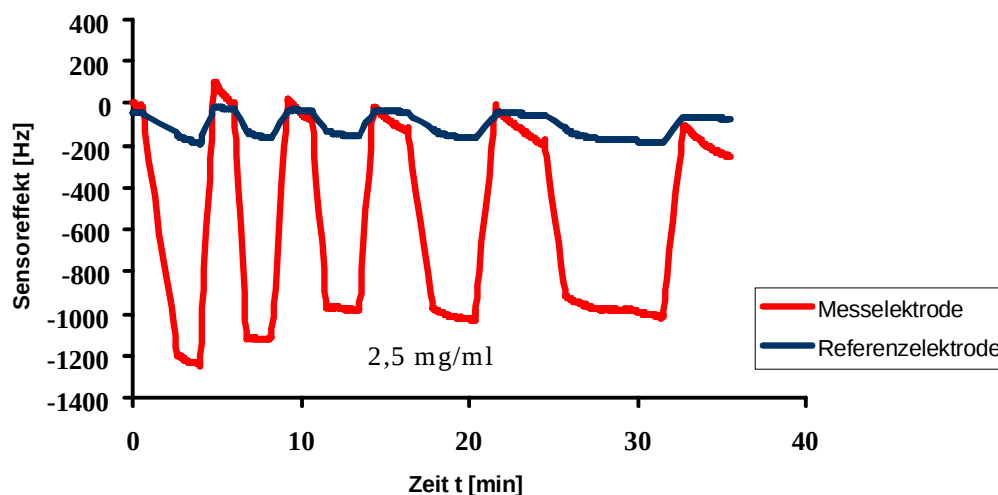


Abbildung 35: Reproduzierbarkeit des Sensoreffektes bei einem Bakteriensensor mit Polyurethanbeschichtung und *w-E. coli*- MIP; Messung in stopped-flow Modus durch Zugabe von 2,5 mg/ml *w-E. coli* bei Raumtemperatur

Die ermittelten Sensoreffekte und Konzentrationen der w-*E. coli* sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Bakterienkonzentration	Sensoreffekt (Messelektrode)
2,5 mg/ml, ($2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml)	1249 Hz
	1123 Hz
	982 Hz
	1009 Hz
	1011 Hz

Tabelle 10: Reproduktionswerte des w- *E. coli*- Sensors bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml w- *E. coli*

Die Sensoreffekte sind im Bereich zwischen 1249 Hz und 982 Hz vertreten bzw. in einem Unterschiedsbereich von ca. 270 Hz zwischen den Sensormessungen. Die Sensoreffekte streuen über etwa $\pm 15\%$, so dass die Reproduzierbarkeit des w- *E. coli*- Sensors auch gegeben ist.

3.3 Selektivität der b- und w-MIP

Anbei der bereits erwähnten Stämme der *E. coli* kann die Selektivität ermittelt werden. Wie schon erwähnt, liegt der Unterschied wesentlich nicht in der Oberfläche und Struktur, sondern nur in der Größe der Bakterien. Abbildung 36 zeigt die Querselektivität des b-*E. coli*-MIP.

Ein b-*E. coli*-Sensor wurde zunächst den b-*E. coli* Bakterien ausgesetzt. Die Frequenz an der Messelektrode erniedrigt sich wesentlich stärker als bei der NIP-beschichteten Referenz. Die erste Sensorantwort entspricht der Wechselwirkung zwischen dem MIP und einer Lösung mit 3 mg/ml ($2,4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) b-*E. coli* und beträgt 2345 Hz. Nach Spülen mit destilliertem Wasser, wurde dieselbe Bakterienlösung nochmals vermessen, wobei die zweite Sensorantwort 2754 Hz ist. Danach wurde der MIP einer Lösung mit 3 mg/ml ($2,4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) w-*E. coli* überspült, was nur zu 50 Hz Antwort führte. Die vierte Sensorantwort beträgt 2184 Hz, wobei wieder 3 mg/ml ($2,4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) b-*E. coli* verwendet wurde. Daraus resultiert, dass der Sensor und sein MIP seinen Anforderungen entsprechen, reversible Sensorantworten geben und eine hohe Querselektivität gegenüber den anderen Bakterienstämmen besitzt.

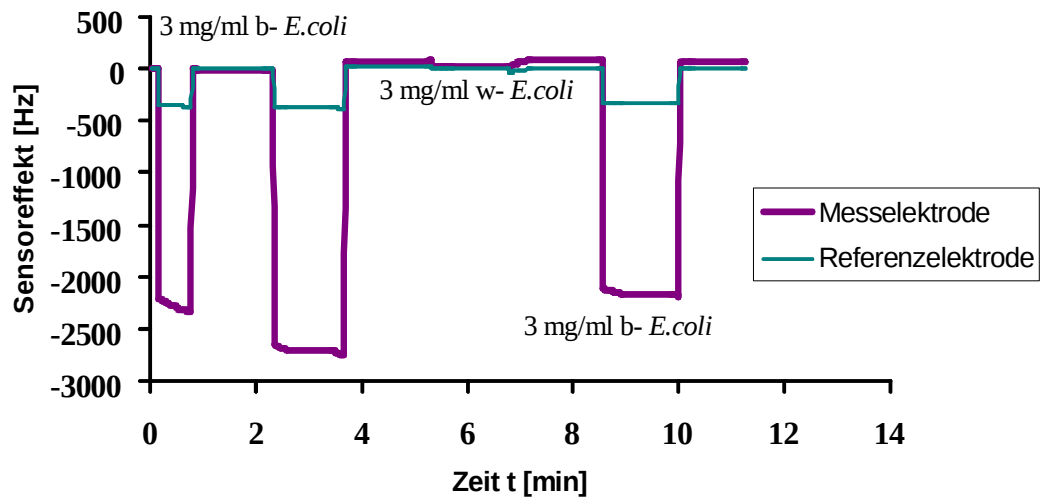


Abbildung 36: Selektivität der *b-E. coli*; 10 MHz Quarz beschichtet mit Polyurethan, Schichtdicke 400 nm; MIP mit *b-E. coli*; Basislinie wurde mit destilliertem Wasser

Die Abbildung 37 zeigt eine Messung der Selektivität mit *w-E. coli* geprägtem MIP und den 5 mg/ml w- und b-*E. coli*-Lösungen.

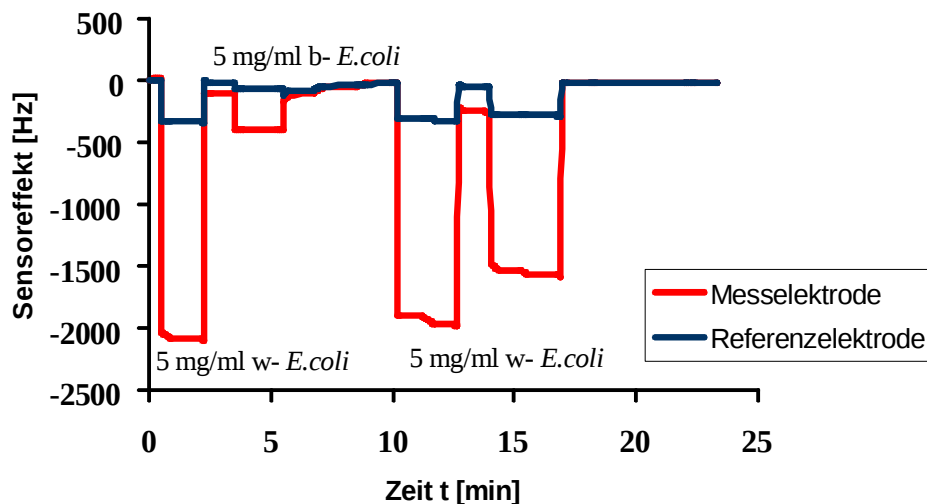


Abbildung 37: Selektivität der *w-E. coli*; 10 MHz Quarz beschichtet mit Polyurethan, Schichtdicke 400 nm; MIP *w-E. coli*; Basislinie wurde mit destilliertem Wasser erreicht. Zugabe von b- und w-*E. coli* bei Raumtemperatur; Messungen in stopped-flow Modus.

In Abbildung 37 entspricht die erste Sensorantwort der Wechselwirkung zwischen dem MIP und einer Lösung mit 5 mg/ml ($4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) *w-E. coli* und beträgt 2094 Hz. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser, wurde der Sensor derselben Konzentration *b-E. coli* ausgesetzt, was zur einer Sensorantwort von 401 Hz führte. Die dritte Sensorantwort bezieht sich wieder auf die Wechselwirkung zwischen dem MIP und einer Lösung mit 5 mg/ml ($4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) *w-E. coli* und beträgt 1974 Hz und die vierte Sensorantwort beträgt 1583 Hz. Das Diagramm in der Abbildung 38 fasst die insgesamt erhaltenen Daten zusammen.

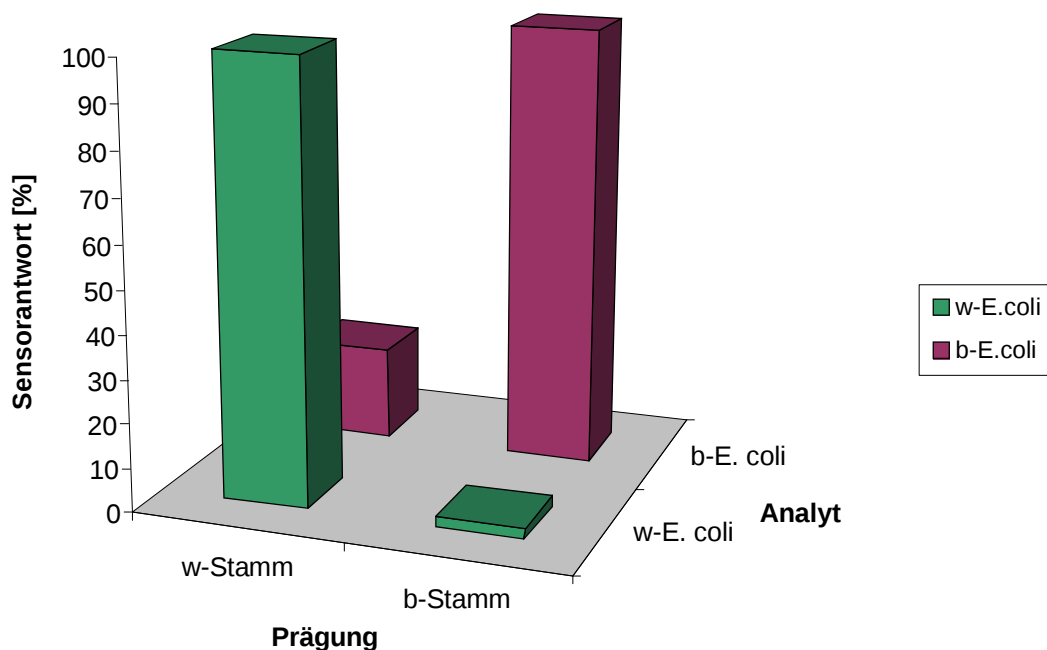


Abbildung 38: Selektivitäten der beiden Bakterienstämmen: Vergleich der relativen Sensorantworten von b- und w- geprägten *E. coli* auf Polyurethansensorschicht (1) MIP w-Stamm *E. coli*, (2) MIP b- Stamm *E. coli*. Zusammenfassung der Messergebnisse aus den Abbildung 37 und Abbildung 37, beide Bakteriensensoren sind durch die spezifische Prägung entsprechend sensitiv auf eigenen Bakterienstamm

Bei einem b-stämmigen Sensor, bei dem die Kavitäten durch die b-stämmigen *E. coli* (3 mg/ml) entstanden sind, gibt es naturgemäß eine 100% Sensorantwort auf den b-stämmigen *E. coli*-Anayten. Für den w-stämmigen *E. coli* (3 mg/ml) gibt es eine Sensorantwort von 2%. Bei dem w-stämmigen Sensor wurde ein Sensorantwort auf die b-stämmigen *E. coli* (5mg/ml) von 21% und auf die w- stämmigen *E. coli* (5 mg/ml) von 100% gemessen.

Resümee:

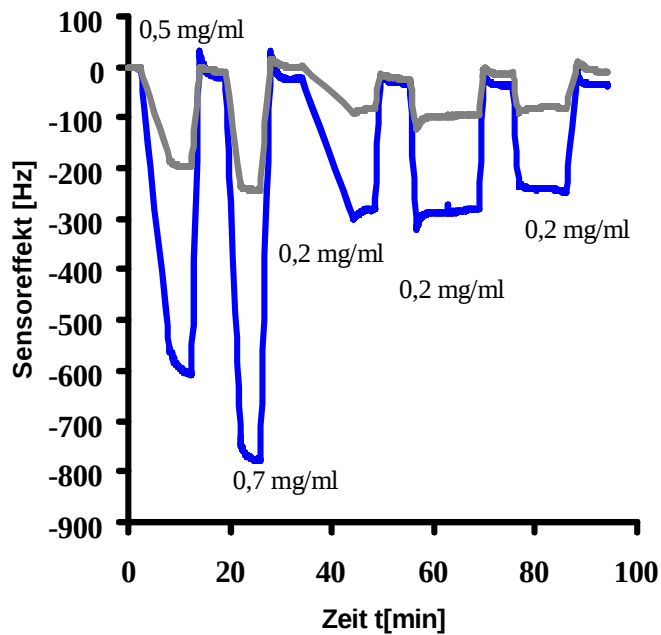
Ein 10 MHz QCM, basierend auf b- und w-*E. coli*-MIP und Massenspezifität, wurde verwendet um Empfindlichkeiten, Reproduzierbarkeiten und Sensitivitäten von *E. coli* in wässrigen Lösungen zu analysieren. Dabei verhält sich der MIP wie ein künstlicher Rezeptor. Darüber hinaus werden ein bemerkenswertes Verhalten der QCM und nachvollziehbare Ergebnisse während den Messungen erreicht. Die b-stämmigen *E. coli* sind kleiner als w-stämmigen *E. coli* und dementsprechend sind auch die Kavitäten im Polyurethan kleiner, was eine zusätzliche Steigerung der Sensitivität bedeutet. Die in Abbildung 32 gezeigte Messungen der Sensitivität für b-*E. coli* Sensor zeigen dass sie höhere Sensoreffekte vorweisen als die Messungen des w-*E. coli*-Sensors (Abbildung 33) bei gleicher Konzentration. Die b-*E. coli* können besser in den Kavitäten haften und somit mehr zur Sensorantwort beitragen, wodurch sie auch sensitiver sind. Auch die Oberfläche, die für die Prägung zur Verfügung steht ist gleich groß. Es besteht die Möglichkeit dass mehr b-Kavitäten auf der Oberfläche entstehen und so auch höhere Sensorantworten bei b-MIP liefern. Die Reproduzierbarkeit beider Sensoren wurde bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml untersucht, wobei wie schon erwähnt die b-*E. coli* höhere Sensorantworten liefern. Bei einem b-stämmigen Sensor ist es sehr wichtig, dass er eine sehr hohe Querselektivität gegenüber den w-stämmigen *E. coli* aufweist und umgekehrt. Bei der Untersuchung der Querselektivitäten eines b-geprägten Sensors hat man eine Querselektion ausgeschlossen da sich nur 2 % der w-*E. coli* in die b-*E. coli*- Kavitäten einlagern können. Die b-*E. coli* können sich zu 21 % in die w-*E. coli*- Kavitäten einlagern, weil sie kleiner sind und die Querselektivität teilweise gegeben ist.

4.Langzeitstabilität

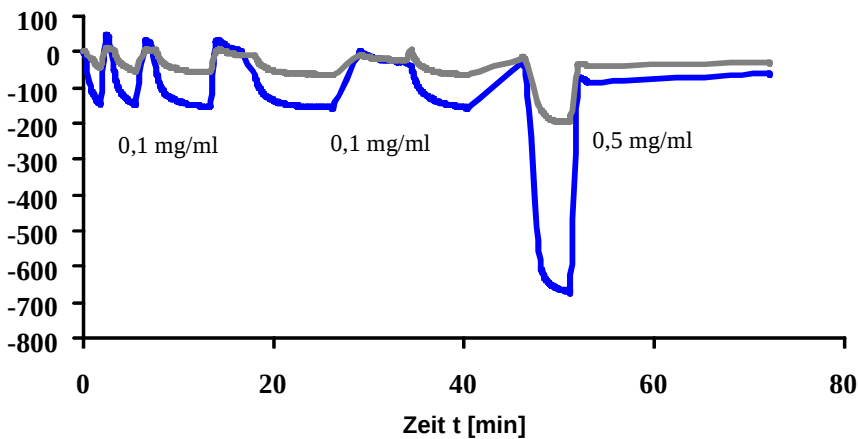
Die Prüfung der Langzeitstabilität und die Änderung der Sensoreigenschaften als Funktion der Zeit erlauben eine eingehende Beurteilung über deren Fähigkeit, Realbedingungen standzuhalten bzw. prinzipiell kommerziell verwertbar zu sein. Dies beinhaltet insbesondere die Erfassung von Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Querselektivität der Sensoren als Funktion der Messzeit, was letztlich auch die Kalibrierung beeinflusst. Daher werden die Alterungsprozesse der *E. coli*-MIP über einen Zeitraum von acht Tagen bei b-MIP und neunundzwanzig Tagen bei w-MIP und dann in sechsmonatigen Zeitintervallen untersucht.

4.1 Zeitlicher Verlauf der Sensorantworten

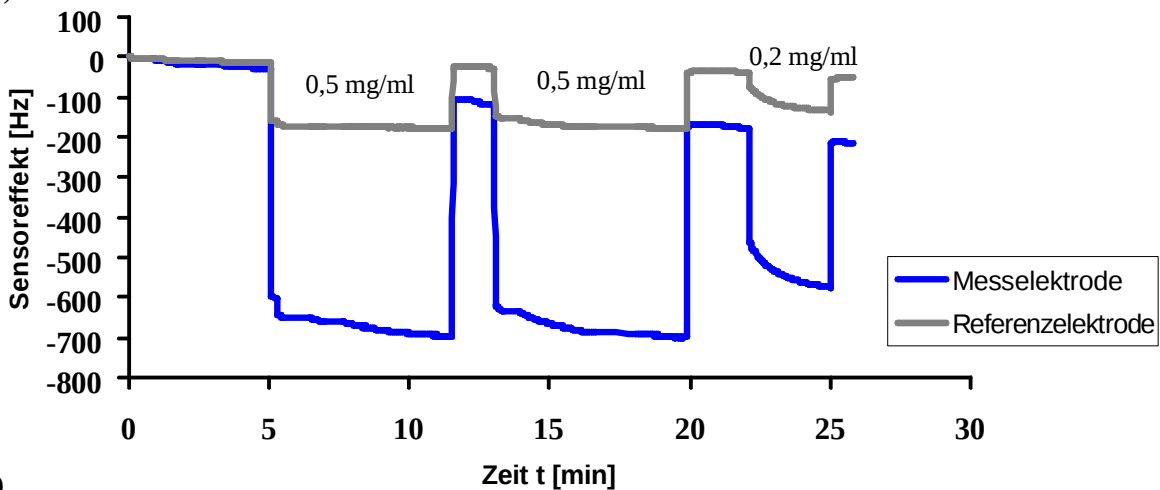
Abbildung 39 fasst die Ergebnisse der der Messungen eines b-*E. coli* geprägten Sensors bei verschiedenen Konzentrationen an verschiedenen Tagen zusammen. Diese Abbildung zeigt Signale am ersten, vierten und achten Tag. Die Sensorcharakteristik wurde nur am ersten Tag gemessen. Danach wurde eine mittlere und optimale Konzentration gewählt, um einerseits sicher nicht in die Sättigung der Sensorschichten zu sein. Andererseits kann man beim Abbau des MIP eher eine Abnahme der Signale erwarten. Der Grund dafür ist dass der NIP sehr geringe Effekte zeigt, womit man nicht zu niedrig konzentriert sein soll. Für die Langzeitmessungen erwies sich eine Konzentration von 0,5 mg/ml ($4 \cdot 10^9$ Zellen/ml) als geeignet, da b-*E. coli*-MIP in den ersten acht Tagen konstante Signale bei Spülgeschwindigkeiten von 1,5 ml/min zeigte. Diese erhöhte Spülgeschwindigkeit wurde ausgewählt um zu prüfen ob und wie diese Änderung auf die Stabilität und Langlebigkeit des Sensors einen Einfluß hat.



a)



b)



c)

Abbildung 39 :Langzeitstabilität des b-*E. coli* geprägten Sensors am a) ersten b) vierten und c) achten Tag bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml b-*E. coli*; Basislinie wurde mit destilliertem Wasser erreicht; Messungen in stopped-flow Modus bei Raumtemperatur

Tabelle 11 zeigt die Sensorantworten des b-MIP an acht aufeinanderfolgenden Tagen bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml b-*E. coli*.

Tag	Mittelwerte der Sensoreffekte (MIP) in [Hz]
1	605
2	640
3	620
4	675
5	600
6	595
7	620
8	670

Tabelle 11: Sensoreffekte eines b-*E. coli*- Sensors erfasst in einem Zeitraum von acht Tagen

Die Frequenzänderungen, die in einem Zeitraum von acht Tagen erfasst wurden, bewegen sich zwischen 595 Hz und 670 Hz. Durch die gemessenen Frequenzänderungen wurde entsprechende Charakterisierung der Sensorstabilität erhalten (Abbildung 39). Die Darstellung in Abbildung 40 deutet auf einen linearen Zusammenhang zwischen den Bakterienzellen bei gleichen Konzentrationen an.

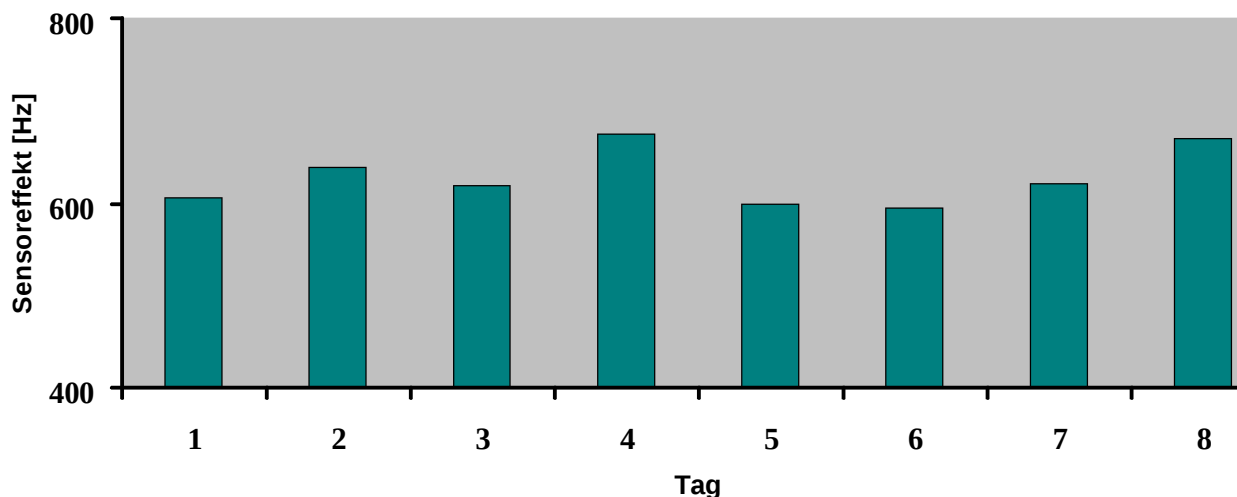
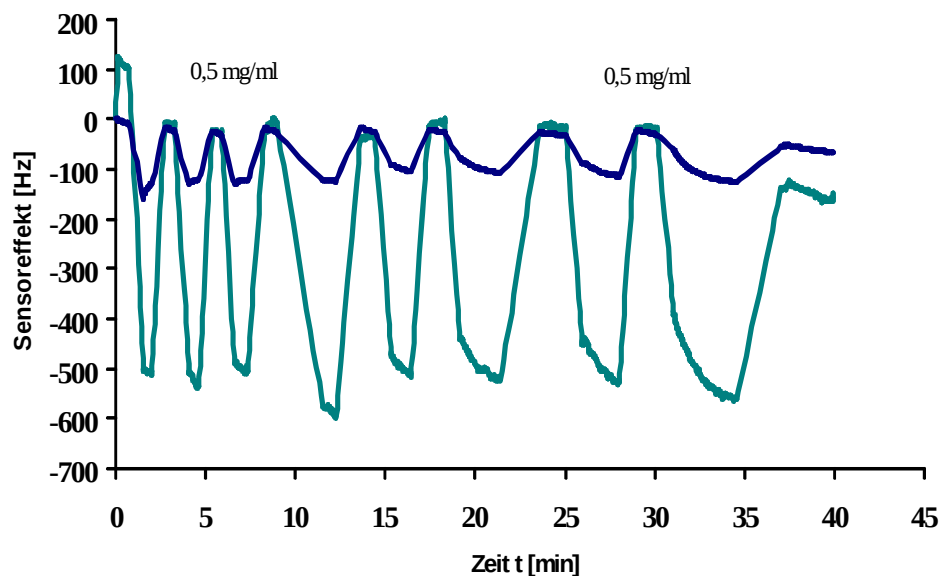
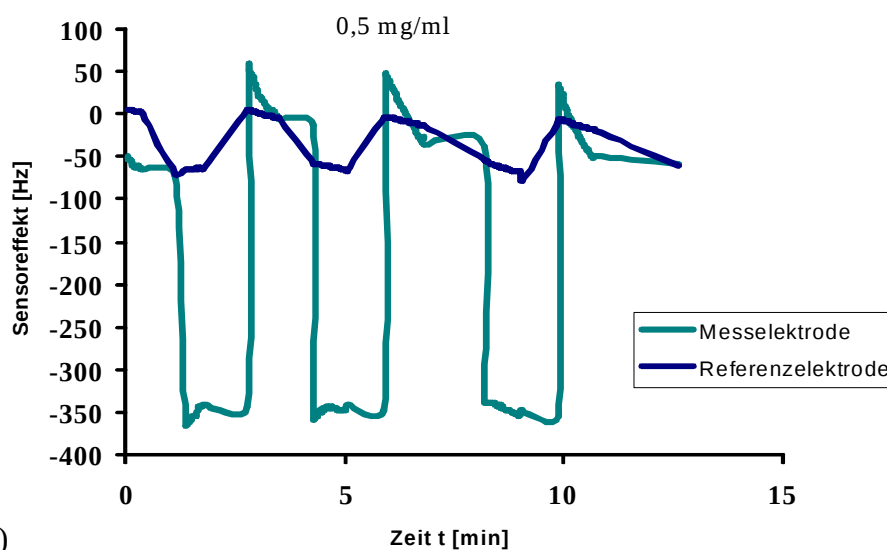


Abbildung 40: Charakterisierung der b-*E. coli*- Sensorstabilität bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml ($4 \cdot 10^9$ Zellen/ml) b-*E. coli*; Messung an acht aufeinanderfolgenden Tagen mit gleichem Sensor in stopped-flow Modus und bei Raumtemperatur

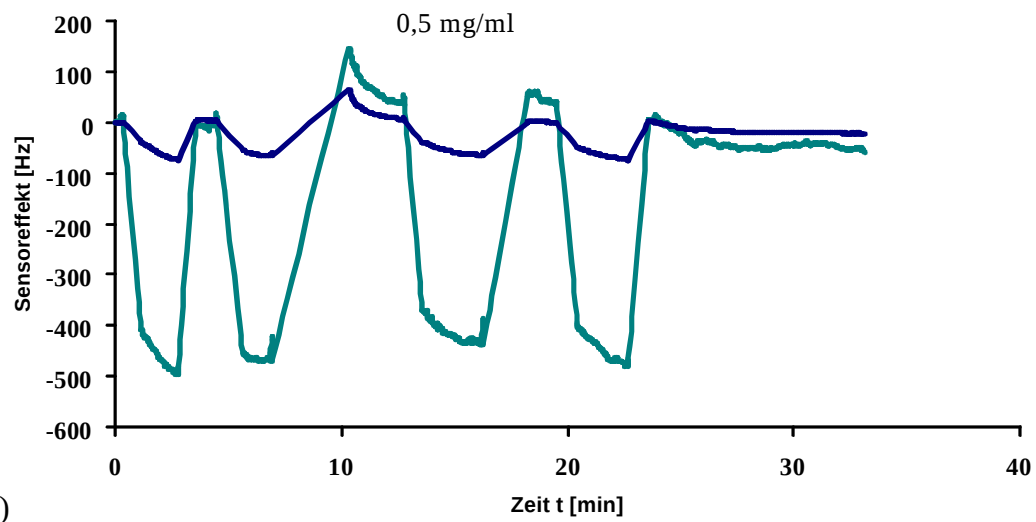
Wie bei den *b-E.coli*-Langzeitstabilitätsuntersuchungen wurden analoge Experimente bei *w-MIP* durchgeführt. Bei den Messungen wurde geringere Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min eingestellt, wodurch die sensitive Schicht vorsichtiger behandelt wurde. In Abbildung 41 sind die Sensoreffekte eines *w-E. coli* geprägten Sensors bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml ($4 \cdot 10^9$ Zellen/ml) *w-E. coli* am ersten, fünften, zehnten, fünfzehnten, zwanzigsten, fünfundzwanzigsten und neunundzwanzigsten Tag vorgestellt.



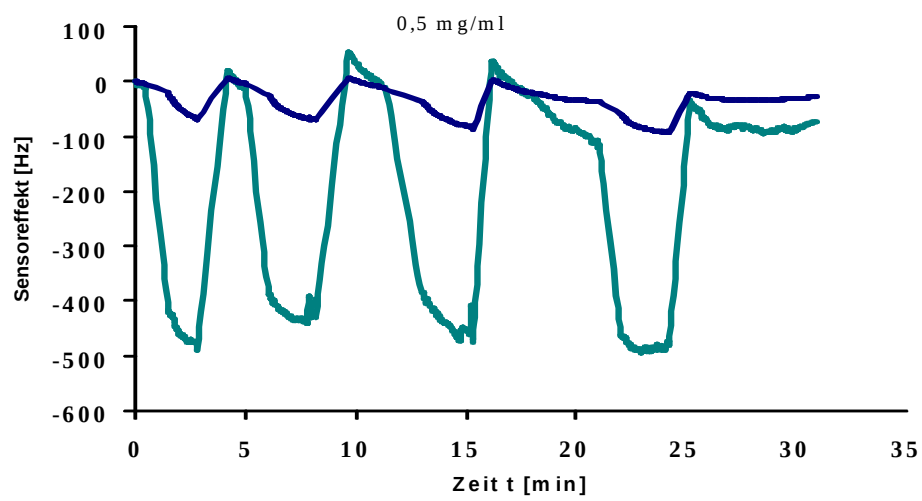
a)



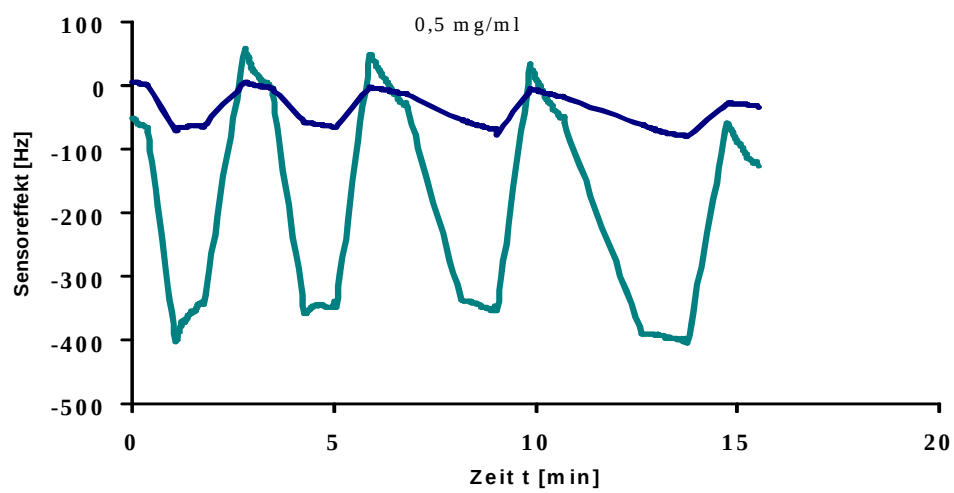
b)



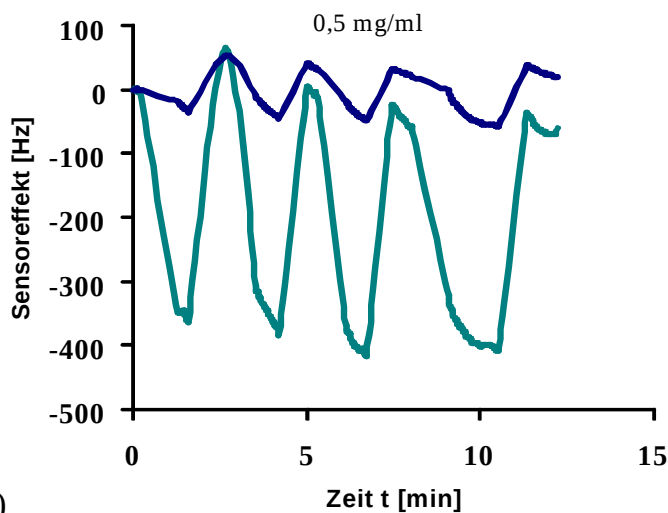
c)



d)



e)



f)

Abbildung 41: Langzeitstabilität des w-*E. coli* geprägten Sensors am a) ersten, b) fünften, c) zehnten, d) fünfzehnten, e) zwanzigsten und f) fünfundzwanzigsten Tag bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml w-*E. coli*; Basislinie wurde mit destilliertem Wasser erreicht

An neunundzwanzig aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Stabilitätsmessungen bei der gleichen Konzentration von 0,5 mg/ml w- *E. coli* untersucht wobei die Sensorantworten in der Tabelle 12 zusammengefasst sind.

Tag	Sensoreffekt	Tag	Sensoreffekt	Tag	Sensoreffekt
1	555 Hz	11	472 Hz	21	440 Hz
2	550 Hz	12	470 Hz	22	425 Hz
3	541 Hz	13	500 Hz	23	400 Hz
4	502 Hz	14	514 Hz	24	390 Hz
5	528 Hz	15	460 Hz	25	370Hz
6	514 Hz	16	457 Hz	26	360 Hz
7	512 Hz	17	450 Hz	27	355 Hz
8	520 Hz	18	470 Hz	28	355 Hz
9	500 Hz	19	495 Hz	29	354 Hz
10	495 Hz	20	445 Hz		

Tabelle 12: Sensoreffekte eines w- *E. coli*-Sensors erfasst in einem Zeitraum von neunundzwanzig Tagen

Die Frequenzänderungen, die in einem Zeitraum von neunundzwanzig Tagen erfasst wurden, bewegen sich zwischen 555 Hz und 350 Hz. Durch die gemessenen Frequenzänderungen wurde entsprechende Charakterisierung der Sensorstabilität erhalten (Abbildung 42). Die Darstellung deutet auf einen linearen Zusammenhang bei gleichen Bakterienkonzentrationen an, wobei die Stabilität nach zwanzig Messtagen abnimmt und eine Änderung von 440 Hz auf 350 Hz zu beobachten ist.

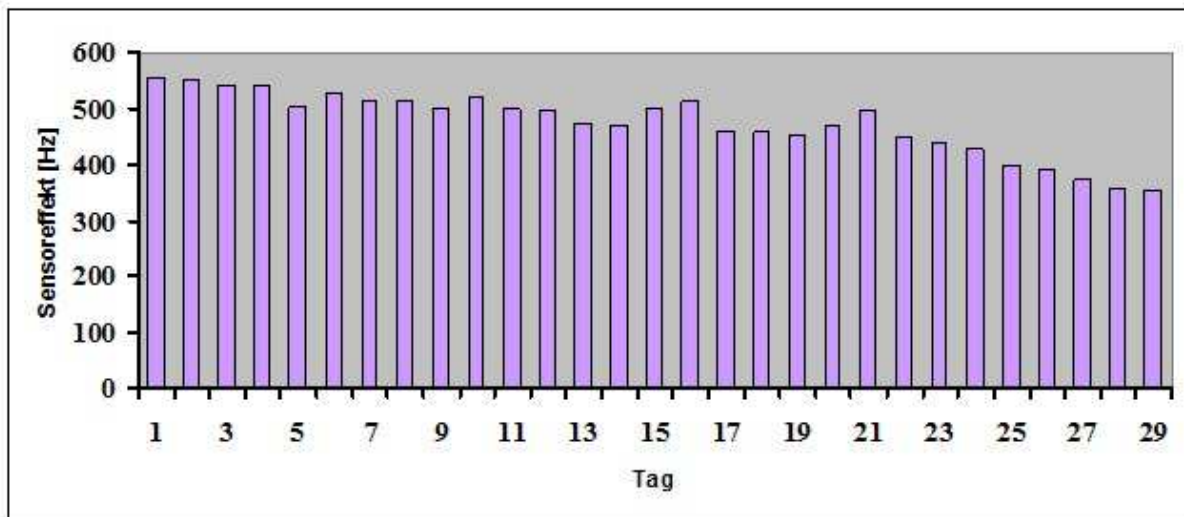


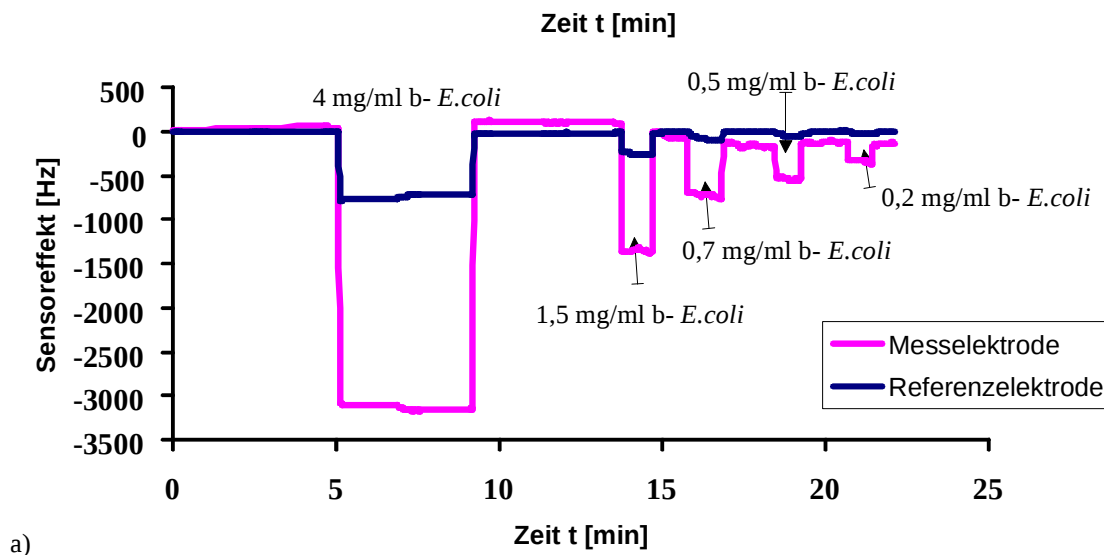
Abbildung 42: Charakterisierung der *w-E. coli*-Sensorstabilität bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml ($4 \cdot 10^9$ Zellen/ml) *w- E. coli*; Messung an neunundzwanzig aufeinanderfolgenden Tagen mit gleichem Sensor in stopped-flow Modus und bei Raumtemperatur

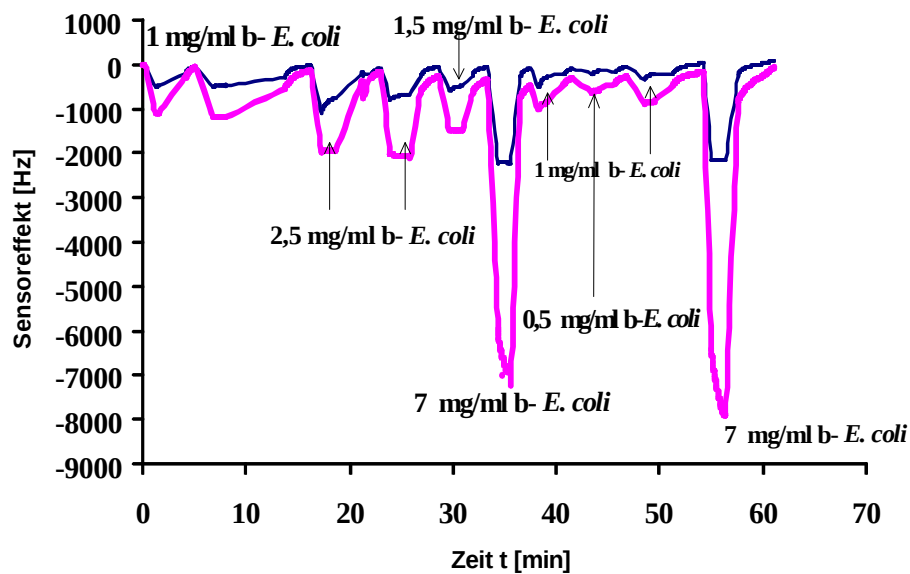
Die relativ kleinen Signalabweichungen bei b-MIP, die sich in einem Frequenzbereich von 100 Hz bewegen, konnten nur eine empirisch-quantitative Aussage zulassen, da die Fließgeschwindigkeit der Peristaltikpumpe einen großen Einfluß auf die Stabilität hat. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,5 ml/min, so daß eine Messreihe an acht aufeinanderfolgenden Tagen möglich war. Dagegen konnten bei w-MIP die Sensorantworten an neunundzwanzig aufeinanderfolgenden Tagen erfasst werden. Das Signal war bis zum zwanzigsten Tag annähernd konstant und dann in den letzten neun Tagen um bis zu 90 Hz ab. Da die beiden Polymere die gleiche Zusammensetzung haben, kann dieser Unterschied auf die unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten zurückgeführt werden, die wahrscheinlich zu unterschiedlicher mechanischer Belastung der Schichten führen.

4.2 Langzeitmessung: Lagerbarkeit

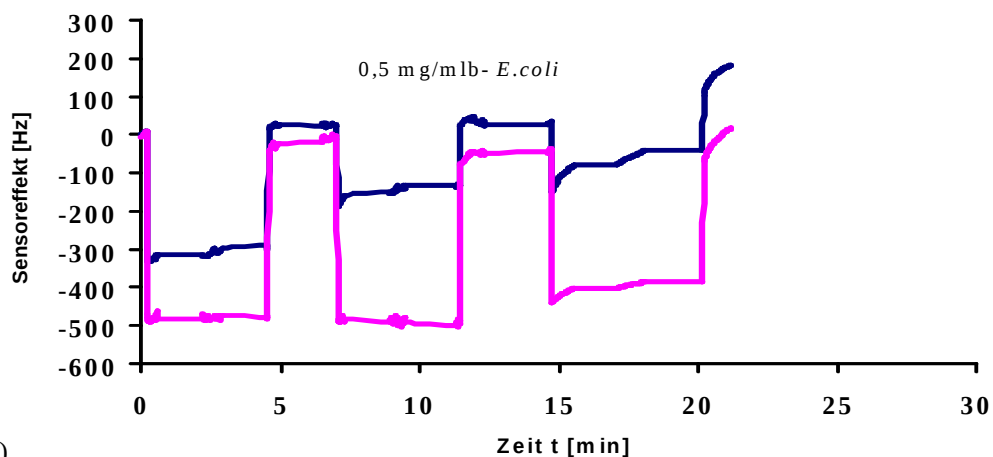
Es konnte also nachgewiesen werden, daß beiden MIP als Sensorschichten mindestens eine Woche bis einen Monat lang verwendbar bleiben und damit ihre Stabilität und Regenerierbarkeit insbesondere im Vergleich zu biologischen Rezeptorsystemen sehr gut ist und damit sie prinzipiell für technische Anwendungen brauchbar sind. Eine weitere offene Frage betrifft die Lagerbarkeit der einzelnen Sensoren. Dafür wurde die gleiche Messmethode wie im Kap. 3.1 eingesetzt. Die Sensoren wurden im Dunkeln und bei Raumtemperatur gelagert. Alle sechs Monate wurden mit Sensoren Messungen durchgeführt, was zu insgesamt achtzehn Monaten Einsatz der Bauteile führte.

Abbildung 43 fasst die Messergebnisse des b-geprägten Sensors in sechsmonatigen Zeitintervallen zusammen. Die Messkonzentrationen liegen im Bereich von 0,2 mg/ml bis 7 mg/ml b-*E. coli*. Für die Aussagen der Lagerbarkeit wurde aber die Konzentration von 0,5 mg/ml beobachtet, wobei die Fließgeschwindigkeit auf 0,8 ml/min. reduziert wurde.





b)



c)

Abbildung 43: Lagerbarkeit des b-*E. coli* geprägten Sensors nach a) sechs, b) zwölf und c) achtzehn Monate bei unterschiedlichen b-*E. coli* Konzentration; Basislinie wurde mit destilliertem Wasser erreicht; Messungen in stopped-flow Modus bei Raumtemperatur

Bei dieser Konzentration von 0,5 mg/ml b-*E. coli* konnten die folgenden Messeffekte beobachtet werden:

- a) nach sechs Monaten wurde eine Sensorantwort von 535 Hz
- b) nach zwölf Monaten eine Sensorantwort von 570 Hz und
- c) nach achtzehn Monaten eine Sensorantwort von 500 Hz erzielt.

Abbildung 44 summiert diese Ergebnisse noch einmal graphisch. Die Überprüfung der Lagerbarkeit und Langzeitstabilität konnte verfolgt werden, weil die Abweichungen der Sensoreffekte minimal sind und die Frequenzänderung des MIP sich im Bereich zwischen 500 Hz und 570 Hz befand. Allerdings steigt generell mit der Zeit das Signal an der Referenzelektrode stark an, wofür sowohl zunehmende die ansteigende Rauigkeit der nichtgeprägten Schicht (NIP) oder die zunehmend nichtspezifische Anlagerung der Bakterien auf den NIP die Ursache sein könnte. Da der b-MIP seine Erkennungsfähigkeit beibehalten hat, kann man annehmen dass die ideale Lagerbarkeit und Langzeitstabilität auch mit der geringen Fließgeschwindigkeit der Messlösung zusammenhängt und deren Einfluss daher berücksichtigt werden muss.

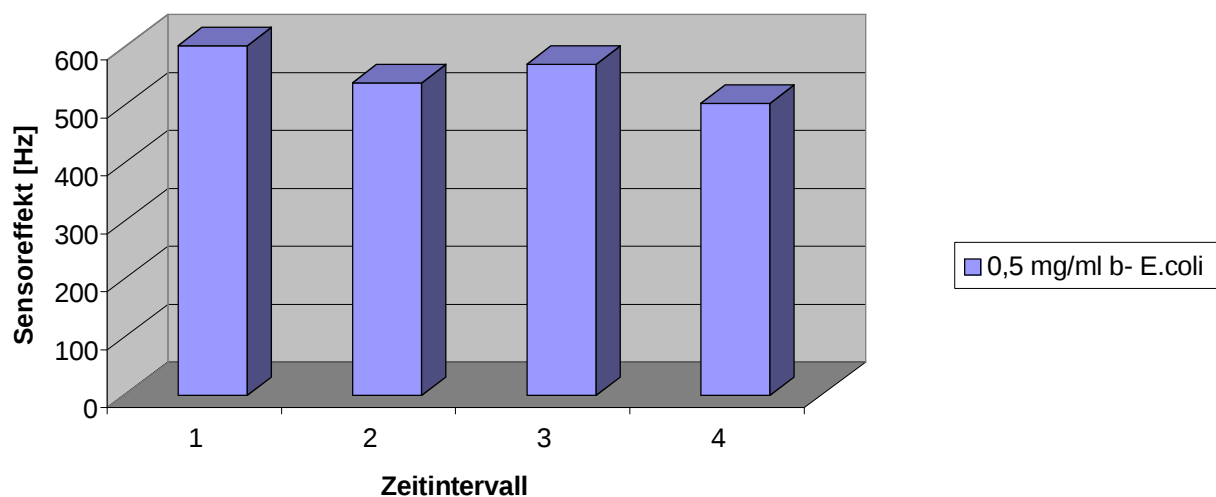
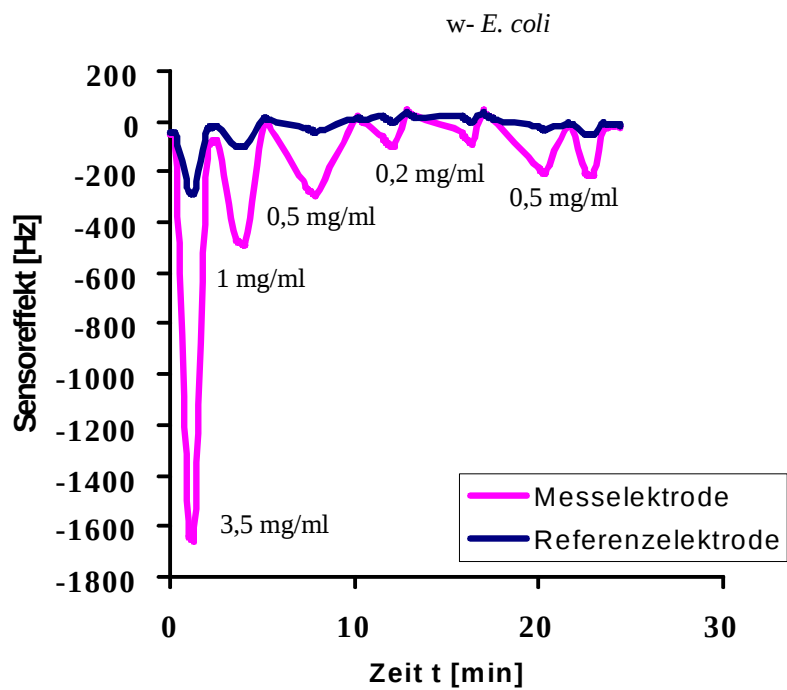
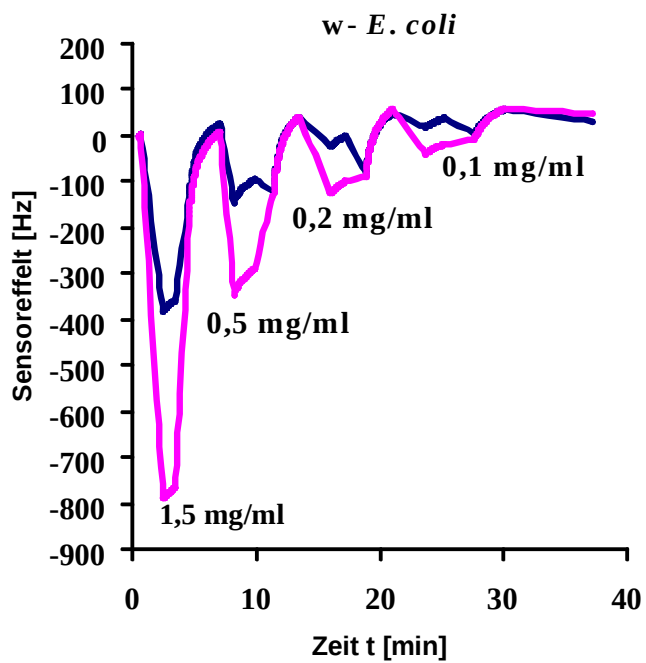


Abbildung 44: Zeitintervallmessung nach 1) einem, 2) sechs, 3) zwölf und 4) achtzehn Monaten bei b-Stamm- MIP und mit b-*E. coli* 0,5 mg/ml

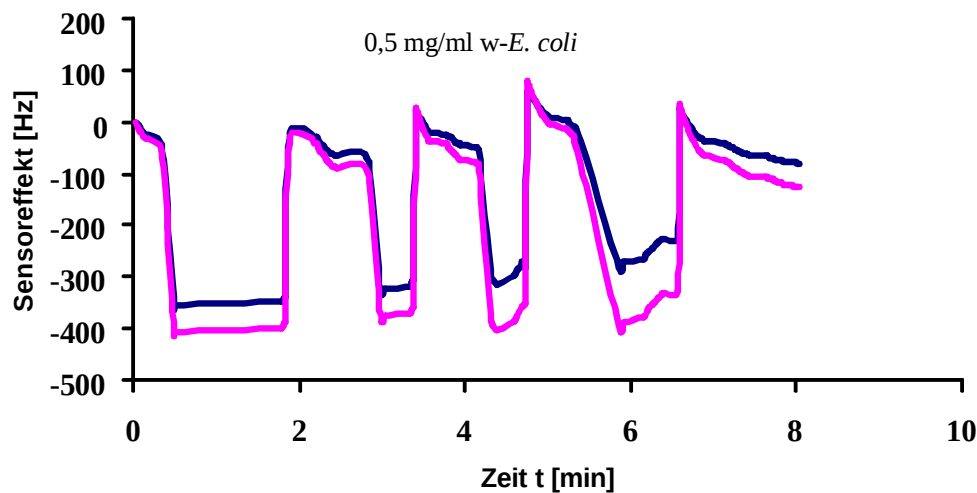
Analoge Messungen wurden mit dem w-MIP wiederholt und ergaben folgende Ergebnisse (Abbildung 45):



a)



b)



c)

Abbildung 45: Lagerbarkeit des w-*E. coli* geprägten Sensors nach a) sechs, b) zwölf und c) achtzehn Monate bei unterschiedlichen w-*E. coli* Konzentration; Basislinie wurde mit destilliertem Wasser erreicht; Messungen in stopped-flow Modus bei Raumtemperatur

Wieder lassen sich die Effekte am MIP für Suspensionen mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml wie folgt zusammenfassen:

- a) nach sechs Monaten wurde eine Sensorantwort von 450 Hz.
- b) nach zwölf Monaten eine Sensorantwort von 380 Hz und
- c) nach achtzehn Monaten eine Sensorantwort von 390 Hz

Abbildung 46 zeigt graphisch die Ergebnisse der vorherigen Messungen bei der Konzentration von 0,5 mg/ml w-*E. coli*. Der Einfluss der Lagerbarkeit auf die Sensormessungen und Langzeitstabilität konnten wieder verfolgt werden, da die Abweichungen der Sensoreffekte und sich die Frequenzänderung der MIP im Bereich zwischen 450 Hz und 390 Hz bewegen. Allerdings steigt mit der Zeit das Signal wieder an der Referenzelektrode stark an, wobei die ansteigende Rauigkeit der nichtgeprägten Schicht oder die zusätzliche Schichtanlagerung der Bakterien auf NIP wieder die Ursache sein könnte. Da der w-MIP seine Erkennungsfähigkeit wie auch b-MIP, beibehalten hat, kann man annehmen dass die Lagerbarkeit und Langzeitstabilität mit der geringen Fließgeschwindigkeit der Messlösung während der Messung zusammenhängt und deren Einfluss auch berücksichtigt werden muss.

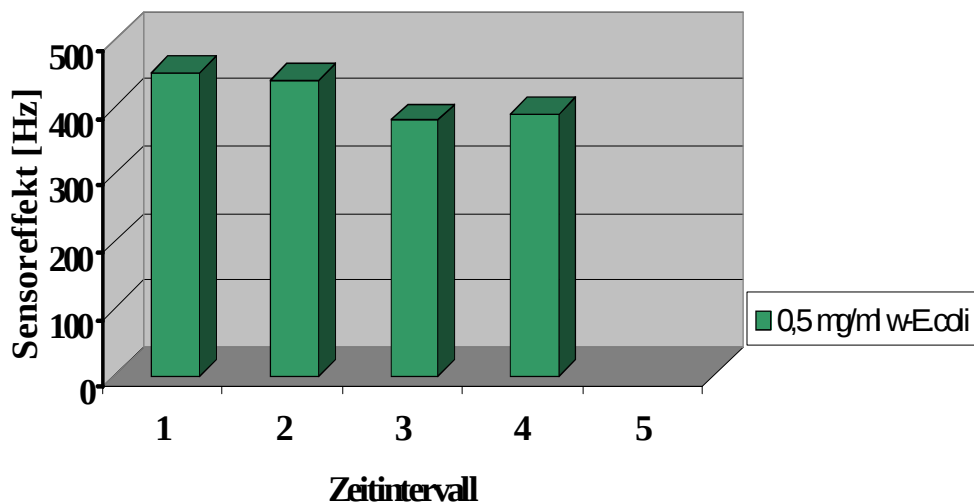


Abbildung 46: Zeitintervallmessung nach 1) einem, 2) sechs, 3) zwölf und 4) achtzehn Monaten bei w- Stamm- MIP und mit w- *E. coli* 0,5 mg/ml

Resümee:

Messungen an dem b-MIP bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min ergaben acht Tage lang Haltbarkeit des Sensors, wobei ein Frequenzänderungsbereich zwischen 595 Hz und 670 Hz (Abbildung 40) erreicht wurde. Mit der kleineren Fließgeschwindigkeitsrate wurde bei w- *E. coli*-MIP eine sukzessive Messungsdauer von neunundzwanzig Tagen erreicht, wobei eine Frequenzänderung zwischen 555 Hz und 350 Hz (Abbildung 42) resultiert ist. Daraus läßt sich klar ableiten, daß die Fließgeschwindigkeit der Probe einen direkten Einfluß auf die Stabilität des Materials haben muß, da die MIP hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung gleich sind. Prinzipiell erfreulich ist die lange Lagerbarkeit der Sensoren von bis zu 18 Monaten. Allerdings steigen mit der Zeit die Sensoreffekte an der Referenzelektrode stark an, was einerseits auf ansteigende Rauigkeit der Polymere oder andererseits auf die zusätzliche Anlagerung von Bakterien am NIP zurückzuführen sein könnte. Klarheit darüber, welcher der Fälle auftritt, können nur weitere Struktur- bzw. Korrosionstests an den Materialien schaffen.

5. Messungen unter Realbedingungen

Wie man in den vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit sehen konnte, kann mittels molekularen Prägens ein stabiles, robustes und wiederverwertbares Sensorsystem für die Detektion von *E. coli* entwickelt werden. Für die weitere Beurteilung ist es aber von experimenteller Bedeutung, ob diese auch außerhalb standardisierter Laborbedingungen betrieben werden kann. Zu diesem Zweck dienen in dieser Arbeit Messungen in einem Bioreaktor, in dem *E. coli* gezüchtet werden und gleichzeitig der Zuwachs an Biomasse online überwacht wird. Dafür wurde ein kleiner Bioreaktor (50 ml Volumen) aufgebaut, der aus einem thermostatisierten Glasgefäß besteht und in dem Bakterien unter optimalen und sterilen Bedingungen kultiviert werden können. Gleichzeitig ermöglicht der Aufbau Parameter wie Temperatur, Sauerstoffzufuhr, pH-Wert und Zusammensetzung des Nährmediums zu erfassen und zu regeln.

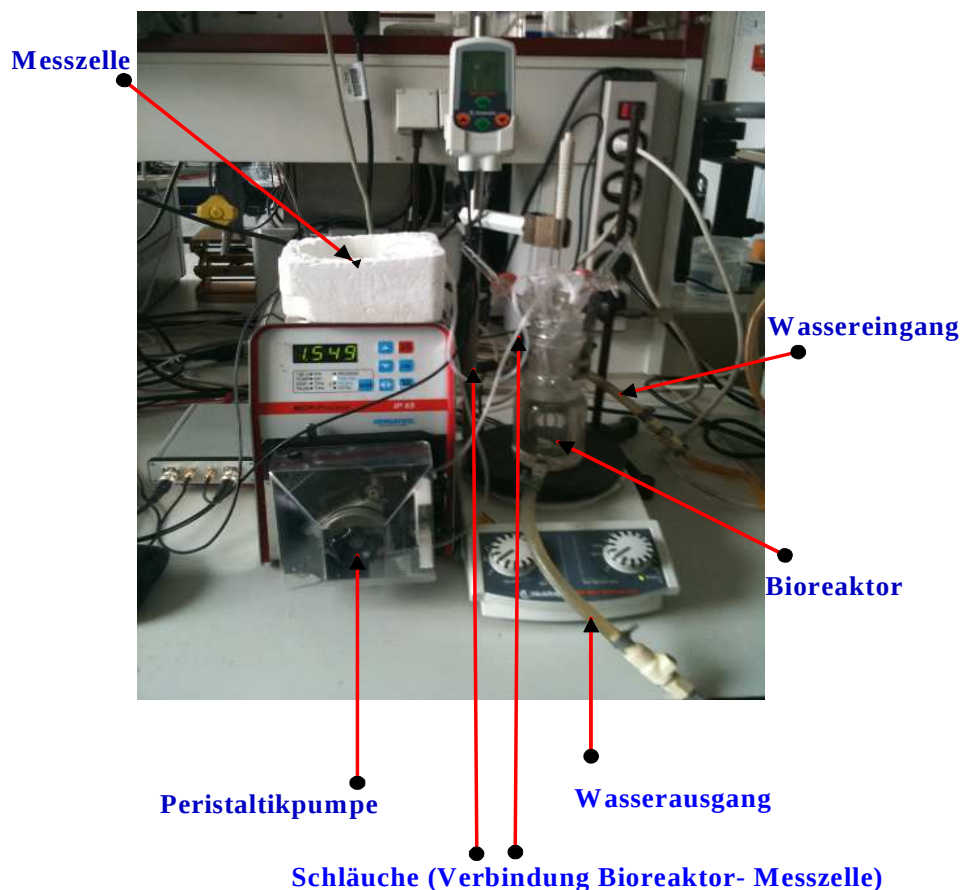


Abbildung 47: Bioreaktor für die Kultivation der *E. coli* unter realen Bedingungen

Abbildung 47 zeigt den Messaufbau ohne den notwendigen Thermostaten. Die Messzelle ist aus praktischen Gründen nicht direkt in dem Bioreaktor eingebaut, sondern an einem flow by-System, in dem konstant Nährlösung aus dem Bioreaktor über eine Peristaltikpumpe am Sensor vorbei im Kreislauf geführt wird, wobei die Flussrate 0,2 ml/min. ist. Die Züchtung der *E. coli* erfolgt in folgendem Nährmedium (Tabelle 13):

1 % Pepton
1% Hefe
0,5% NaCl
0,1 % Glucose

Tabelle 13: Zusammensetzung des Nährmediums für die Züchtung der *E. coli*

Das Nährmedium wird für jede Zucht frisch hergestellt und auf 37°C mit dem thermostatisierten Bioreaktor erwärmt. Die *E. coli* mit einer definierten Konzentration werden dann in das Nährmedium eingebracht und mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0,2 ml/min ständig in die Messzelle befördert. Die *E. coli* produzieren während der Zucht CO₂, wodurch dann die CO₂-Luftblasen in die Schläuche sowohl auch in die Messzelle gelangen und das Ergebnis verfälschen können.

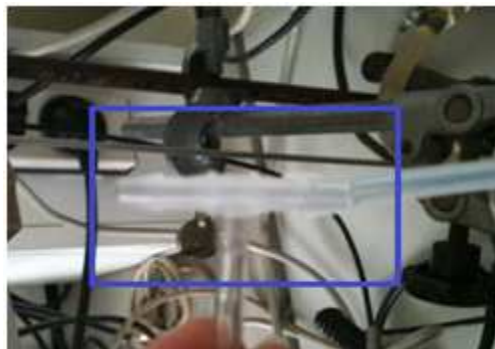


Abbildung 48: T- Stück für die Reduktion der Beförderung der CO₂-Luftblasen in die Schläuche, die die Bakterienlösung in die Messzelle transferieren

Deswegen ist es sehr wichtig dass das Nährmedium, in dem sich die Bakterien befinden, nicht gerührt wird. An den Eingangsschläuchen, durch die die Bakterienlösung in die Messzelle befördert wird, wird eine Reduktions-T-Stück (Abbildung 48) angebracht, durch welches die CO₂-Bläschen nicht passieren können.

Zusätzlich wird in der Messzelle zwischen dem PDMS-Deckel und dem Silikonring noch ein zusätzlicher Silikonring eingeführt, der keine Konusform besitzen darf. Diese Maßnahmen sind notwendig, um die Analysen mit wirklichen Ergebnissen durchführen zu können.

Während des Wachstumsprozesses⁶² durchläuft die Bakterien ein Zyklus von vier Phasen:

- ❖ Lag-Phase: Adaptation der Bakterien an das Nährmedium, die Enzyme stellen sich auf die Nährstoffe des Mediums ein. Die Dauer der Lag-Phase hängt von der Zusammensetzung des Nährmediums und Vorkultur der Bakterien ab, je mehr sie sich unterscheiden desto länger dauert sie.
- ❖ Exponentielle Phase: nach der erfolgreichen Adaptation des Bakterienstoffwechsels und des Nährmediums, erlebt die Bakterienkultur ein exponentielles Wachstum. Die Generationszeit der E. coli beträgt 20-30 min. und diese bleibt über mehrere Zellteilungsdurchgänge in dieser Phase konstant.
- ❖ Stationäre Phase: nachdem die Nährstoffe aufgebraucht sind und die Reaktorkapazitätsgrenze erreicht ist, nimmt die Zellzahl der Bakterien nicht mehr zu, wobei sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellt, d.h. die Zahl der absterbenden und durch Zellteilung neu gezüchteten Bakterien ist gleich.
- ❖ Absterbe-Phase: in den Zellen sind keine Energiereserven mehr vorhanden, die Bakterien scheiden Giftstoffe aus und sterben an eigenen ab.

In Abbildung 49 ist die Wachstumskurve mit den Wachstumsphasen graphisch dargestellt.

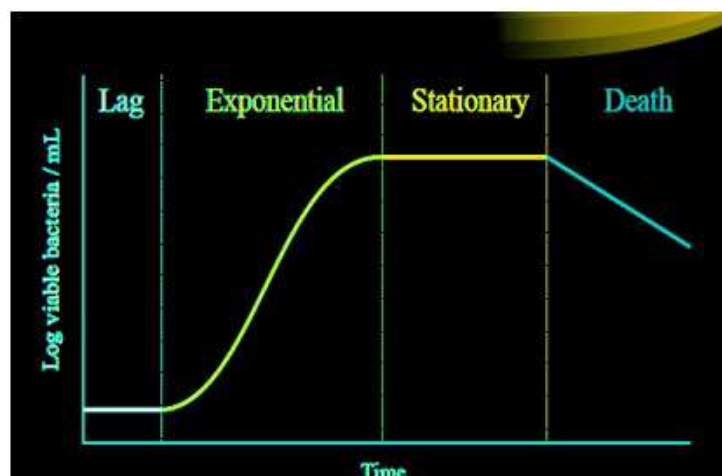


Abbildung 49: Wachstumskurve einer Bakterienzüchtung⁶³

Für die Überwachung der Wachstumsphasen und einer erfolgreichen Züchtung der Bakterien, werden in bestimmten Zeitabständen die Bakterienproben direkt aus dem Bioreaktor entnommen und unter Lichtmikroskop in der Neubauer-Zählkammer mittels Auszählen auf die Zellzahl und mittels Fotografieren auf das Absterben beurteilt.

5.1 Die Züchtung von *E. coli* im Bioreaktor

Die Züchtung der b-*E. coli* findet in flüssigem Nährmedium, dessen genaue Zusammensetzung in der Tabelle 13 vorgegeben ist, statt. Das *E. coli*-Wachstum kann im Labor nur dann real beobachtet werden, wenn die optimale Temperatur von 37°C und optimale Nährstoffzusammensetzung erreicht ist

Abbildung 50 zeigt die erste Realmessung während einer Bakterienzüchtung. Dafür wurden 10 µl b-*E. coli*-Lösung mit der 1,6 mg/ml ($12,8 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) in 50 ml Nährmedium eingebracht und dann die Sensorantworten des geprägten und des ungeprägten Kanals aufgenommen, wobei die Bakterienlösung mittels Peristaltikpumpe konstant am Sensor vorbei im Kreislauf floss. Wie erwähnt, wurden parallel Proben aus dem Reaktor gezogen und ausgezählt.

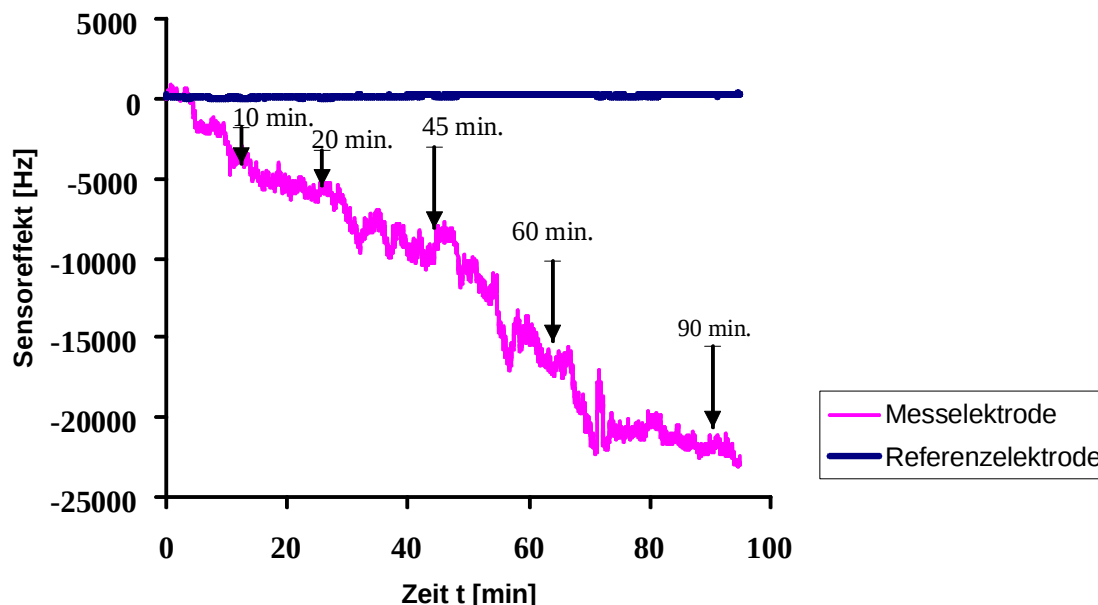


Abbildung 50: Bioreaktor- Züchtung der 1,6 mg/ml b-*E. coli* in flow System und bei einer konstanten Temperatur von 37°C

In Tabelle 14 sind die Sensoreffekte und ermittelte b-*E. coli*-Konzentrationen während einer Messung in der Dauer von 90 min. dargestellt.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
10	$8,7 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 1,1 mg/ml	3030
20	$1,58 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 1,98 mg/ml	5470
45	$2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 2,5 mg/ml	8820
60	$2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 2,53mg/ml.	15200
90	$2,4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 3mg/ml.	23000

Tabelle 14: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der b-*E. coli*-Züchtung im Nährmedium und bei einer Temperatur von 37°C

In der Abbildung 51 sind fotografische Aufnahmen nach bestimmten Generationszeiten aufgenommen worden, um auch optisch die Züchtung der b-*E. coli* zu verfolgen.

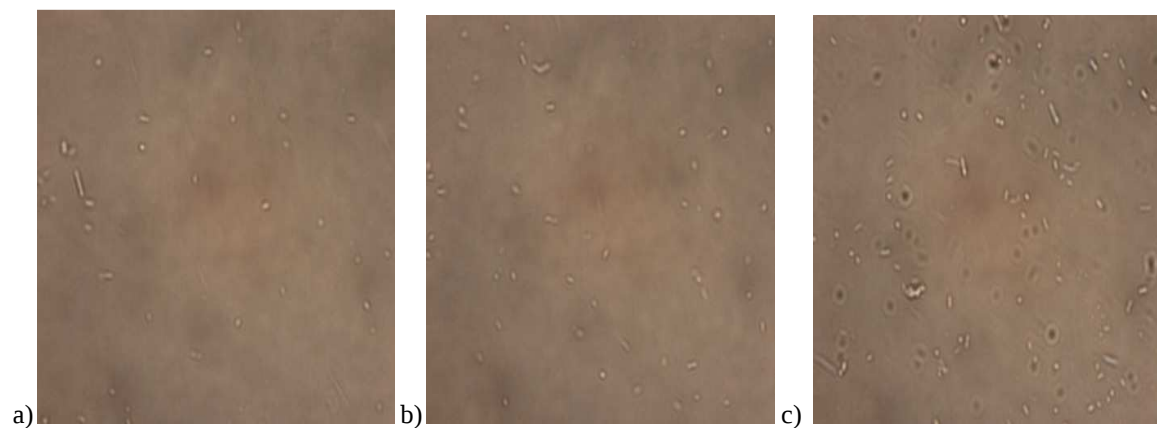
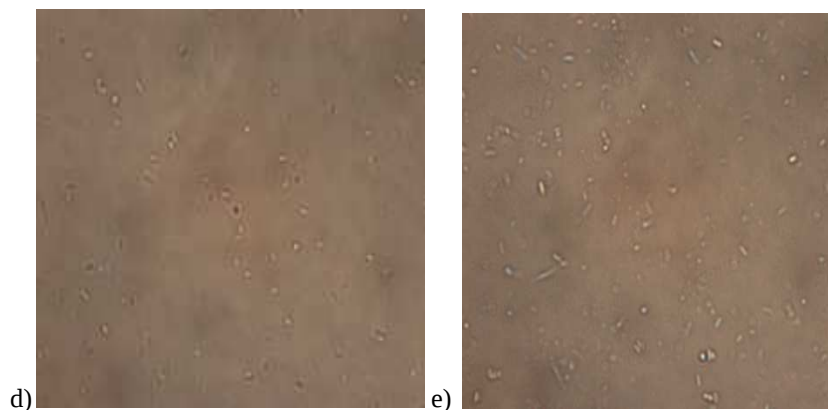


Abbildung 51: Fotografische Aufnahmen der b-*E. coli* nach a) 10 min., b) 20 min., c) 45 min., d) 60 min. und e) 90 min.



Die Wachstumsphasen und ein lineares Wachstumsverhalten, die in der Abbildung 49 beschrieben sind, konnte man auch bei den *b-E. coli*-Messung (Abbildung 50) und anhand der Ergebnisse (Tabelle 14) erkennen. Die Lag-Phase wurde in ersten 5 min. beobachtet, wo die Vermehrung der Bakterien noch nicht startete und die Konzentration der *b-E. coli* kleiner war als die Ausgangskonzentration der Bakterien, die dem Nährmedium zugegeben wurde. Die exponentielle Phase wurde im Zeitbereich von 10 min. bis 60 min. durchlebt, wobei sich die Bakterienkonzentration verdoppelte. Dies ist langsamer als erwartet, aber im Bioreaktor verlangsamt sich jedoch nach einiger Zeit das Wachstum der Bakterien. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich eine Verknappung des Nährstoffangebots und Entstehung störender Stoffwechselprodukte, die die Bakterienvermehrung hemmen. Nach 70 min. stellte sich die stationäre Phase ein, in der die Zellzahl nicht mehr zunahm, sondern konstant blieb, was auch zu einer konstanten Sensorantwort führte und eine beginnende Sättigung zeigte. Die *b-E. coli*-NIP zeigte keinen Effekt. Diese Daten der ersten Messreihe im Bioreaktor zeigen, daß die Strategie prinzipiell funktioniert und deshalb für weitere Analysen herangezogen werden kann.

In einem weiteren Experiment (Abbildung 50) wurde eine höhere Ausgangskonzentration gewählt, um deren Einfluss festzustellen. Bei diesem Experiment wurden 10 µl der *b-E. coli*-Lösung ($6,4 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml = 80 mg/ml) in 50 ml Nährmedium eingebracht und das Bakterienwachstum bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mittels Sensor beobachtet.

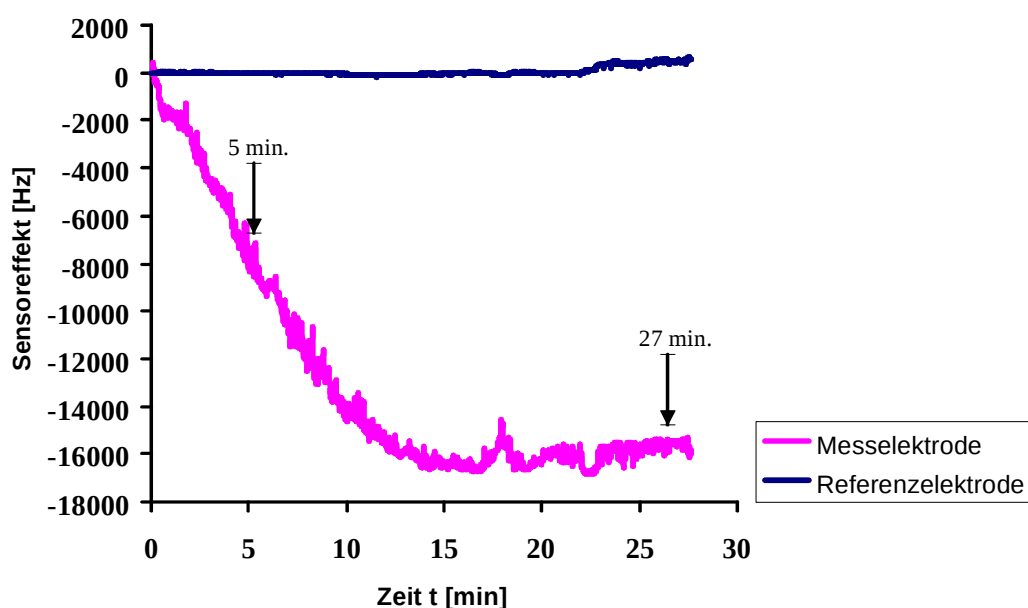


Abbildung 52: Bioreaktor- Züchtung der 80 mg/ml *b-E.coli* in flow- by System und bei einer konstanten Temperatur von 37°C

In Tabelle 15 sind die Sensoreffekte und die ermittelten *b-E. coli*-Konzentrationen während einer Messdauer von 30 min. zusammengefasst.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
5	$9,6 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml bzw. 120 mg/ml	7980
27	$2,72 \cdot 10^{12}$ Zellen/ml bzw. 340 mg/ml.	15800

Tabelle 15: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der *b-E.coli*-Züchtung im Nährmedium und bei einer Temperatur von 37°C

In der Abbildung 53 sind fotografische Aufnahmen nach einer Generation aufgenommen worden, um auch optisch die Züchtung der *b-E. coli* zu verfolgen.

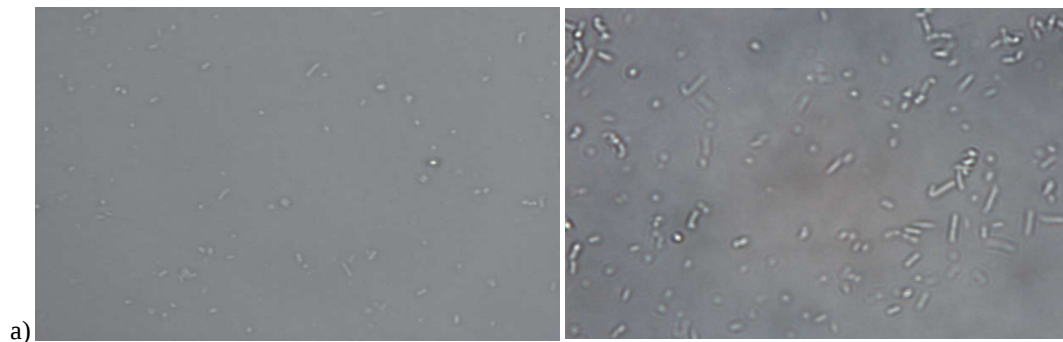


Abbildung 53: Fotografische Aufnahmen der *b-E. coli* nach a) 5min. und b) 27 min.

Bei diesem Experiment wurde wieder lineares Wachstumsverhalten beobachtet, nur führte die höhere Ausgangskonzentration dazu, dass sich der Ansatz schon nach 5 min. in der exponentiellen Phase befand und sich die Bakterien bereits vermehrt hatten. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Konzentration 120 mg/ml. Da die Nährstoffe verbraucht waren, begann die Sättigung schon nach 15 min., womit die stationäre Phase eintrat. Nach 27 min. wurde eine Konzentration von 340 mg/ml gezählt. Ganz offensichtlich wird der Einfluss der Ausgangskonzentration, da im ersten Fall die Sättigung nach 70 min. eintrat.

Analoge Zuchtexperimente wurden auch für *w-E. coli* durchgeführt. Deren Ergebnisse sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 zusammengefasst. Die Ausgangskonzentration für die Züchtung der *w-E. coli* beträgt 0,079 mg/ml und wie man in der Abbildung 54 sieht, dauerte die exponentielle Phase nur 20 min., wobei eine Generation der Bakterien sich vermehrt hatte und eine Endkonzentration von 0,1 mg/ml ergab.

Nach 20 min. trat die stationäre Phase auf und dauerte 20 min., wonach der Effekt auf dem MIP anstieg und bei 80 min. eine Konzentration von 0,3 mg/ml ergab. Die Ursache dafür ist der Eintritt der Bakterien in die Absterbe- Phase.

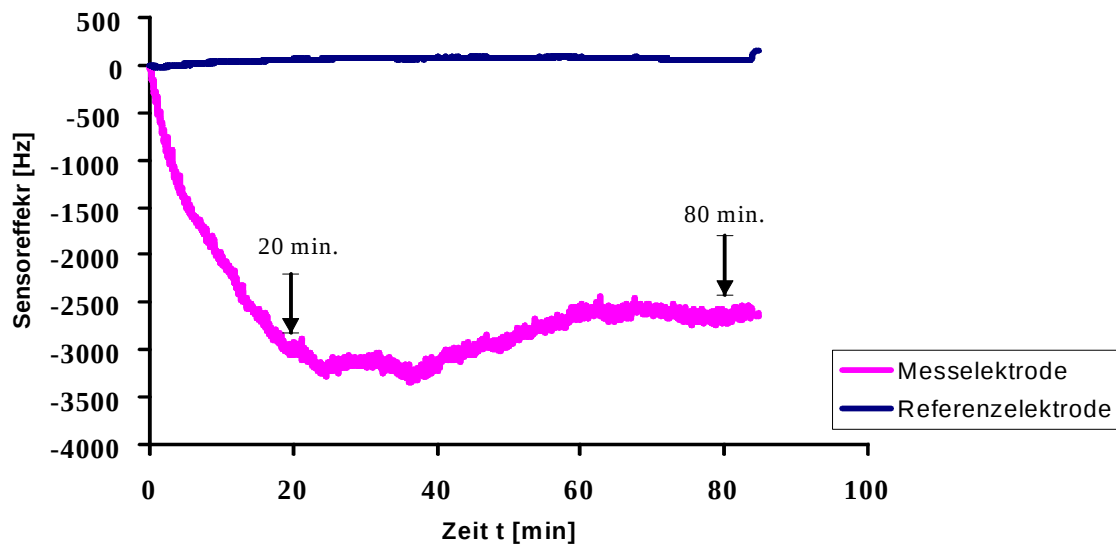


Abbildung 54: Bioreaktor-Züchtung der 0,079 mg/ml w-*E. coli* in flow System und bei einer konstanten Temperatur von 37°C

In Tabelle 16 sind die Sensoreffekte und die ermittelten w-*E. coli*-Konzentrationen während einer Messdauer von 80 min. zusammengefasst.

Entnahme [min]	Konzentration	Sensoreffekt [Hz]
20	$8 \cdot 10^8$ Zellen/ml bzw. 0,1mg/ml.	3050
80	$2,4 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0,3mg/ml	2300

Tabelle 16: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der w-*E. coli*-Züchtung im Nährmedium und bei einer Temperatur von 37°C

In Abbildung 55 sind fotografische Aufnahmen nach bestimmten Generationszeiten aufgenommen worden, um auch optisch die Züchtung der *w-E. coli* zu verfolgen.

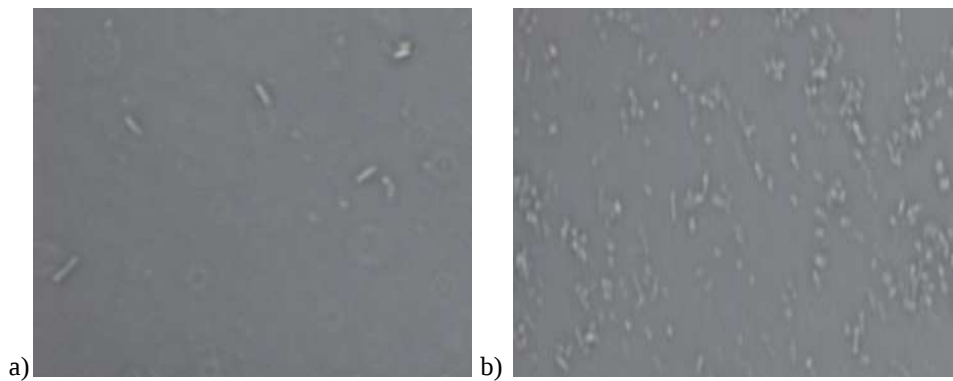


Abbildung 55: Fotografische Aufnahmen der *w-E.coli* nach a) 20 min. und b) 80min.

In der Abbildung 55 b) sieht man dass sich die Bakterien im Gegensatz zur Abbildung 55 a) vermehrt haben aber es ist auch das Verklumpen der Bakterien zu sehen. Die Ursache dafür kann die angetretene Absterbe- Phase sein, die sich auch als MIP- Anstieg in der Abbildung 54 bemerkbar gemacht hat.

In dem nächsten Experiment (Abbildung 50) wurde eine höhere Ausgangskonzentration von 20 mg/ml *w-E. coli* gewählt, um deren Einfluss festzustellen. Bei diesem Experiment wurden 10 μ l der *w-E. coli* Lösung in 50 ml Nährmedium eingebracht und das Bakterienwachstum bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mittels Sensor überwacht.

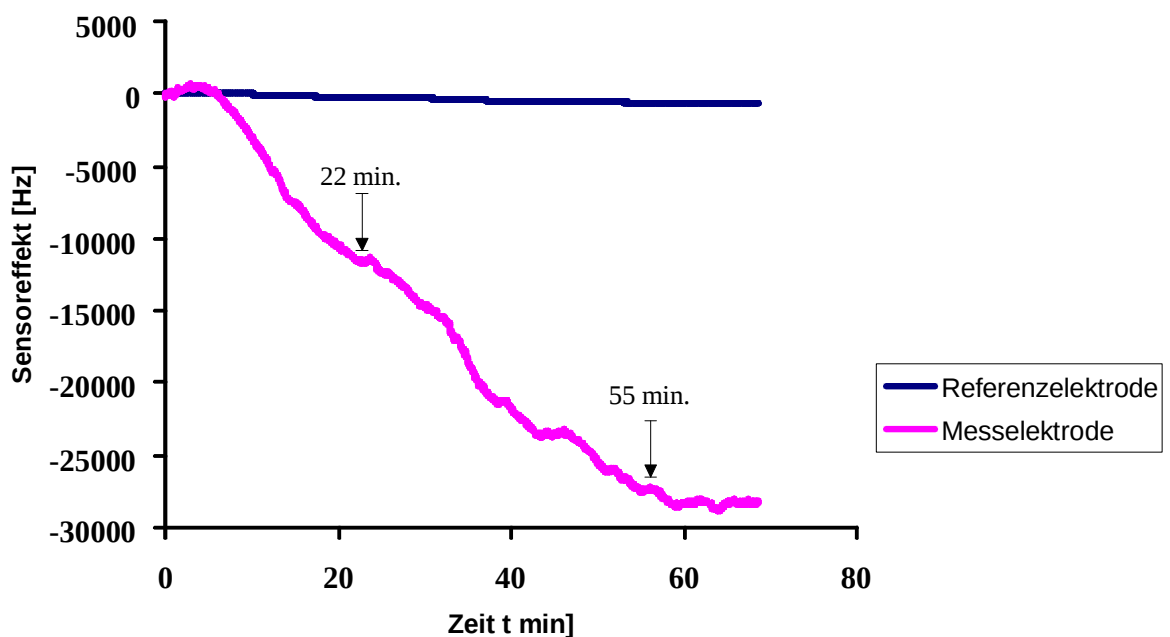


Abbildung 56: Bioreaktor- Züchtung der *w- E. coli* bei einer Konzentration von 20 mg/ml

In der Tabelle 17 sind wiederum die Zählergebnisse zusammen mit den Sensoreffekten zusammengefasst.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
22	$2,4 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml bzw. 30 mg/ml.	11550
55	$1,6 \cdot 10^{12}$ Zellen/ml bzw. 200 mg/ml.	27600

Tabelle 17: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der *w-E. coli*-Züchtung im Nährmedium und bei einer Temperatur von 37°C

Abbildung 57 zeigt die entsprechenden fotografischen Aufnahmen nach 22 und 55 Minuten.

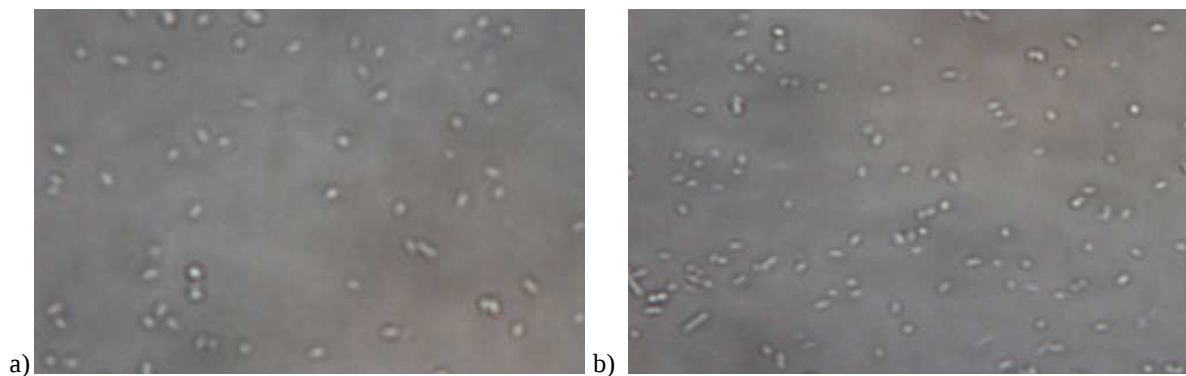


Abbildung 57: Fotografische Aufnahmen der *w-E. coli* nach a) 22 min. und b) 55 min.

Die Messung wurde während eines Zeitraumes von siebenzig Minuten aufgenommen, was eine Züchtung von zwei Generationen ermöglichte. Nach der Züchtung der ersten Generation wurde eine Konzentration von 30 mg/ml und eine Sensorantwort von 11550 Hz ermittelt. Nach zusätzlichen dreißig Minuten, in denen noch eine Bakteriengeneration gezüchtet wurde, wurde eine Konzentration von 200 mg/ml und eine Sensorantwort von 27600 Hz ermittelt. In Abbildung 56 ist zu sehen, dass die Messkurve nach 55 min. in die Sättigung geht, die Bakterien vermehren sich also nicht mehr und haben die stationäre Phase erreicht ist, da die Nährstoffe aufgebraucht sind.

5.2 Selektivitätsstudien im Bioreaktor

Die Aufgabe dieser Selektivitätsstudie ist es zu prüfen ob es prinzipiell möglich ist die Züchtung der Bakterien selektiv mit den MIP zu überwachen. Für diesen Zweck ist es zunächst einmal notwendig, den jeweils falschen MIP in einer Zucht einzusetzen. Dazu wurden die Bakterien der *b-E. coli* (0,1 mg/ml) im Bioreaktor bei der Temperatur von 37°C und im 50 ml Nährmedium (Tabelle 13) gezüchtet. Die Überwachung der Züchtung und Weitervermehrung der *b-E. coli* wurde mit einem, mit *w-E. coli*-geprägten (falschen MIP) Sensorsystem erfasst. Analog zu den oben schon durchgeführten Messungen im Bioreaktor, erfolgten sie immer in flow-by-System.

Die Messung in der Abbildung 58 veranschaulicht die Sensoreffekte während der Züchtung der *b-E. coli* mit einer Ausgangskonzentration von 0,1 mg/ml.

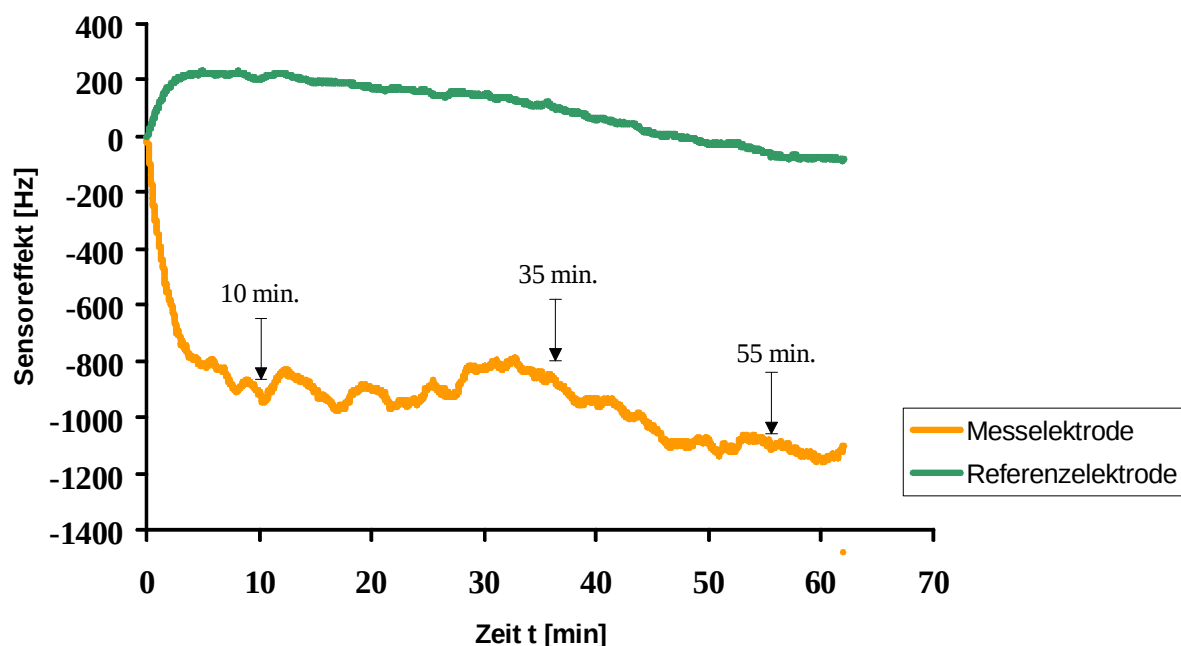


Abbildung 58: Züchtung der *b-E. coli* im Nährmedium und Erfassung des Bakterienwachstums mit *w-E. coli*-MIP

Die Bakterienproben wurden nach 10 min, 35 min. und 55 min. entnommen, wobei die Bestimmung der Konzentrationen durch die Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer erfolgte. Die Tabelle 18 zeigt die ermittelten Konzentrationswerte und Sensoreffekte, die *b-E. coli* am falschen MIP hervorgerufen haben.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
10	$8 \cdot 10^8$ Zellen/ml bzw. 0,1mg/ml.	900
35	$1,6 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0,2 mg/ml.	850
55	$4,4 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0,55 mg/ml	970

Tabelle 18: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der *b-E. coli*-Züchtung im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit falschem MIP

Die Ergebnisse der Messung zeigen die Querselektivität des Stammes w und b, wobei sich die Bakterien im Nährmedium vermehren, die Generationszeit von 55 min. erlaubt ein Zyklus der Züchtung. Der falsche MIP reagiert am Anfang auf die Züchtung, geht aber sehr schnell in die Signalsättigung obwohl laut Zählung die Bakterienkonzentration stark ansteigt. Im Vergleich dazu ergab die Messung mit dem richtigen Analyten (Tabelle 14) *b-E. coli* mit *b-E. coli*-MIP einen stets steigenden Faktor um das siebenfache vorweisen.

Abbildung 59 zeigt das Ergebnis des analogen Experiments der Züchtung von 0,1 mg/ml *w-E. coli* unter realen Bedingungen, bei dem im Sinne der Querselektivität mit einem *b-E. coli* geprägtem Sensor gemessen wurde.

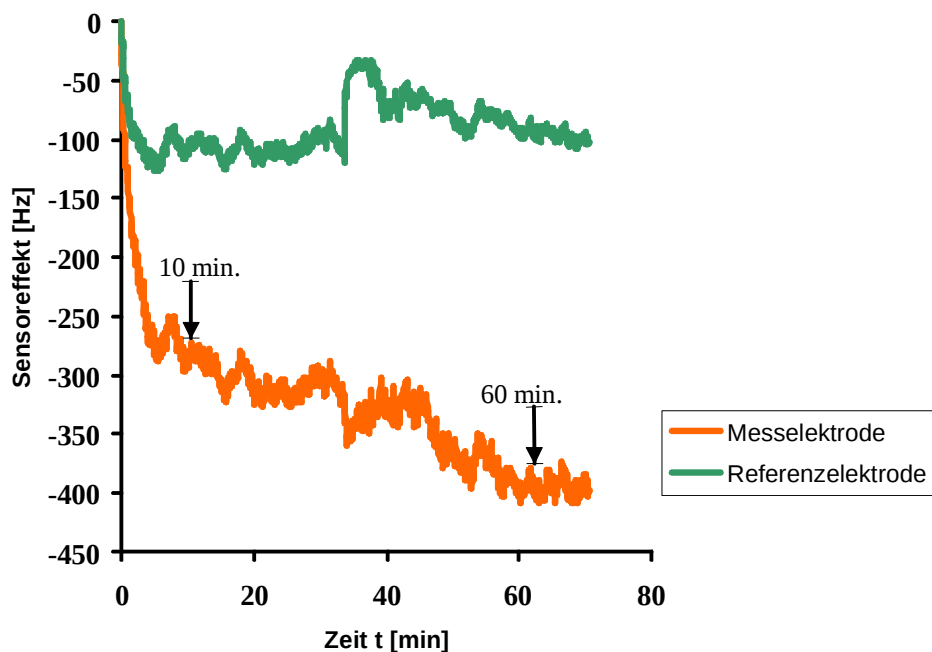


Abbildung 59: Züchtung der *w-E. coli* im Nährmedium und Erfassung des Bakterienwachstums mit *b-E. coli* bzw. falschem MIP

In Tabelle 19 ist der Messverlauf basierend auf den Konzentrationen und den Sensoreffekten, die durch die Züchtung der *w-E. coli* auf einem *b-E. coli*-MIP entstanden sind, vorgestellt.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
10	$7,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml bzw. 0,09mg/ml.	300
60	$6,4 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0,8mg/ml	400

Tabelle 19: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der *w-E. coli*-Züchtung im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit *b-E. coli*-MIP

Die Messung fand während eines Zeitraumes von sechzig Minuten statt, was eigentlich eine Züchtung von zwei Generationen ermöglicht. In den ersten zehn Minuten fand die Lag-Phase statt d.h. die Zeit wo die Bakterien sich an das Nährmedium adaptieren. Im Bereich von zehn-fünfundvierzig Minuten passieren *w-E. coli* die exponentielle Phase. Das Auszählen der Bakterien im Nährmedium bestätigt die Vermehrung. Da es sich aber bei der Sensorschicht um den falschen MIP handelt, kann man diese messtechnisch nicht nachweisen. *w-E. coli* sind größer als die *b-E. coli* und haben dadurch nicht die Möglichkeit, sich in *b-E. coli*-Kavitäten einzulagern. Im Gegensatz dazu, sind die Sensorantworten der *b-E. coli* mit *w-E. coli*-MIP bei gleicher Konzentration um den Faktor zwei größer. Die Ursache dafür ist die Tatsache dass die *b-E. coli* kleiner sind und das ermöglicht denen die unselektive Einlagerung in die *w-E. coli*-Kavitäten. Um das Verhalten der Querselektivität und der Züchtung und Erfassung der Bakterien mit falschen MIP bei höheren Konzentrationen und gleichen Volumina an dem Nährmedium zu vergleichen, wurden die Experimente unter gleichen Bedingungen wiederholt und durchgeführt.

Abbildung 60 fasst die Züchtung der *b-E. coli* mit *w*-MIP und einer Ausgangskonzentration von 1mg/ml zusammen. Die Entnahme der Bakterienlösung aus dem Nährmedium erfolgte nach 10 min als sich die Bakterien nicht vermehrt hatten, dann nach 140 min. als die Sensormessung bereits Sättigung zeigt. Nach 140 min. wurden die Nährstoffe verbraucht, so dass die Bakterien in die stationäre Phase übergetreten sind und keine Sensorantworten mehr lieferten. Da aber sich *b-E. coli*-Bakterien nicht (oder nur in geringem Maß) in die *w-E. coli*-Kavitäten selektiv einlagern, resultiert dies nicht in entsprechenden Sensorantworten.

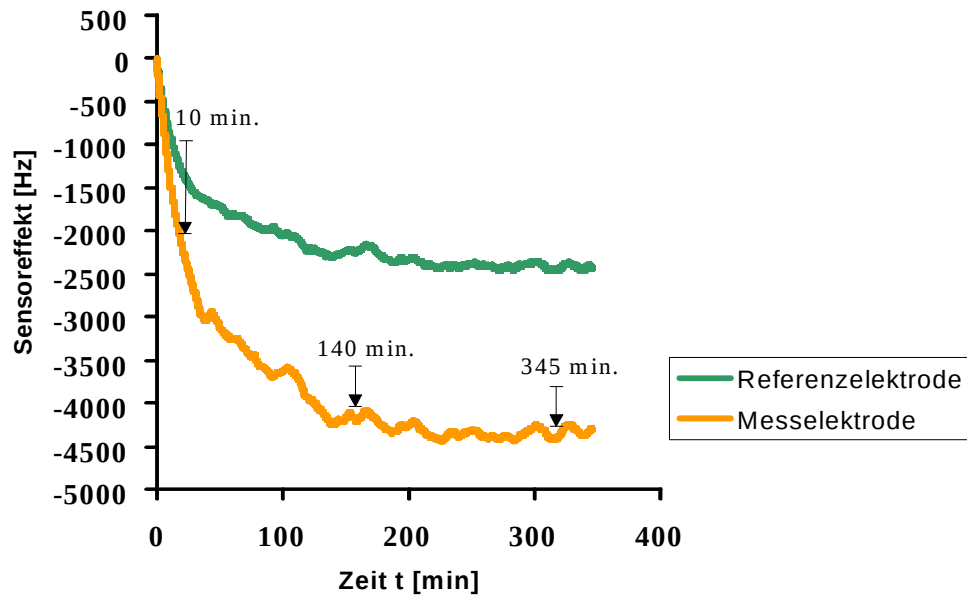


Abbildung 60: Züchtung der b-*E. coli* im Nährmedium und Erfassung des Bakterienwachstums mit w-*E. coli*-MIP bei einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml

Tabelle 20 fasst die ermittelten Konzentrationen und Sensoreffekte der b-*E. coli*-Züchtung nochmals zusammen.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
12	$4,8 \cdot 10^9$ Zellen/ml, 0,6 mg/ml	1600
140	$3,2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 4 mg/ml	4200
345	$3,04 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 3,8 mg/ml	4300

Tabelle 20: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der b-*E. coli*-Züchtung im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit w-*E. coli*-MIP

Das analoge Experiment wurde für die w-*E. coli*-Züchtung bei einer Ausgangskonzentration von 2 mg/ml wiederholt und ist in Abbildung 61 zu sehen. Die Bakterien lagern sich unselektiv oder überhaupt nicht in die b-*E. coli*-Kavitäten ein. Dementsprechend sind auch die erfassten Sensoreffekte klein und wurden in einem Zeitrahmen von 160 min. und einem Frequenzbereich von 3100 Hz erfasst. Die Vermehrung der Bakterien korreliert mit der Zeit und Volumen des Nährmediums, aber nicht mit erfassten Sensorantworten (Tabelle 21).

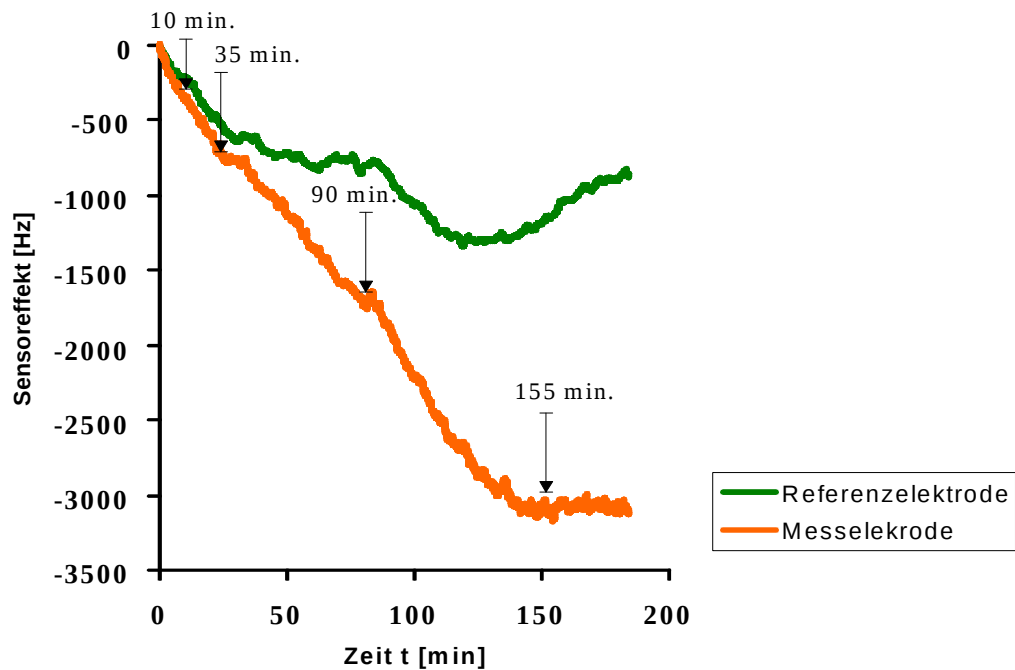


Abbildung 61: Züchtung der w-*E. coli* 2 mg/ml im Nährmedium und Erfassung des Bakterienwachstums mit b-*E. coli* bzw. falschem MIP

Aus Tabelle 21 resultieren die ermittelten Konzentrationen und Sensoreffekte der w-*E. coli*-Züchtung.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
10	$1,68 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 2, 1mg/ml	350
35	$3,2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 4mg/ml	830
90	$6 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 7,5 mg/ml	1880
155	$1,12 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml, 14 mg/ml	3100

Tabelle 21: Ermittelte Bakterienkonzentrationen und Sensoreffekte während der w-*E. coli*-Züchtung (2 mg/ml) im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit b-*E. coli*-MIP

5.3 Monitoring von Mischkulturen

Die genauere Betrachtung der Selektivitäten erfordert auch die Messung unter kompetitiven Bedingungen, d.h. unter Anwesenheit beider Bakterienspezies

In 50 ml des Nährmediums wurden je 10 µl b- und w-*E. coli*-Lösung in Konzentrationen von 1mg/ml ($8 \cdot 10^9$ Zellen/ml) für die Züchtung eingebracht und für die Messung in einer b-*E. coli* geprägten Schicht vorbereitet. Die Zugabe der Bakterienlösung erfolgte sobald der Sensor eine konstante Basislinie erreicht hatte. Abbildung 62 zeigt das Ergebnis der Messung.

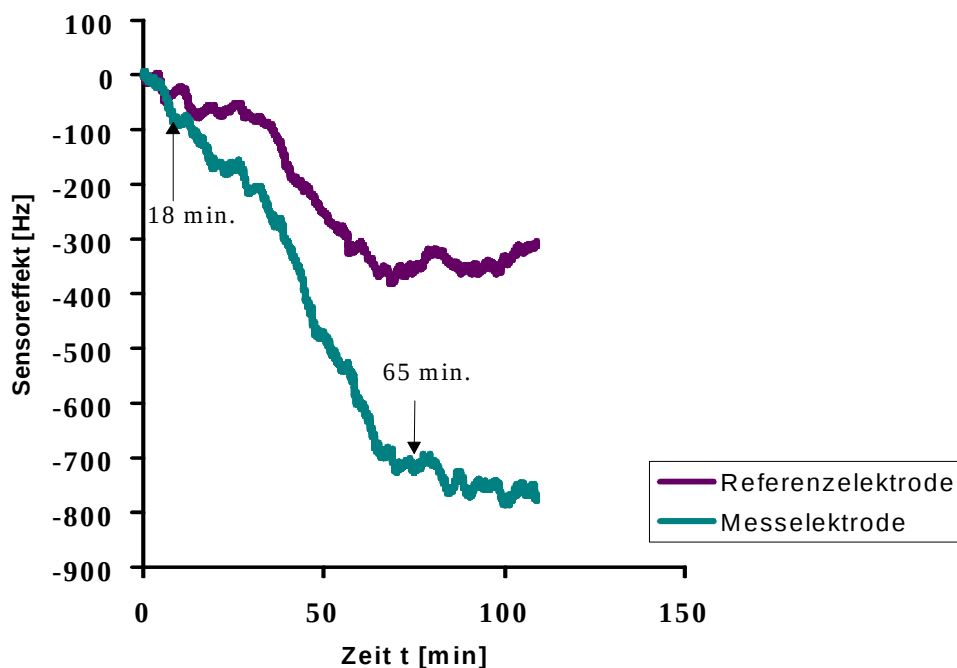


Abbildung 62: Bakterienzüchtung in Kombination 1mg/ml b- *E. coli* und 1mg/ml w-*E. coli* mit einem b-MIP

Die dazugehörigen, ermittelten Werte der Konzentrationen und der Sensoreffekte der Bakterienmischung sind in Tabelle 22 zu sehen.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
18	$8 \cdot 10^9$ Zellen/ml, 1 mg/ml	140
65	$1,2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 1,5mg/ml	700

Tabelle 22: Ermittelte Bakterienkonzentrationen der gemischten Zucht (b- und w-*E. coli*) und Sensoreffekte im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit b- *E. coli*- MIP

Um die Konzentration der gemischten Bakterienlösung während der Messung zu bestimmen, wurden nach 18 min. und nach 65 min. je 10 µl von der Bakterienlösung aus dem Nährmedium entnommen, ausgezählt und fotografiert. Da ein Bakteriengemisch vorliegt, kann man nur einheitlich die Zahl der Zellen bestimmen, aber nicht die Konzentration zu jeweiligem Stamm zuordnen, da sich die Größenbereiche überlappen. In Abbildung 63 sind die Bakterien der w- und b- *E. coli*, die sich eigentlich nur in ihrer Größe unterscheiden, gezeigt.

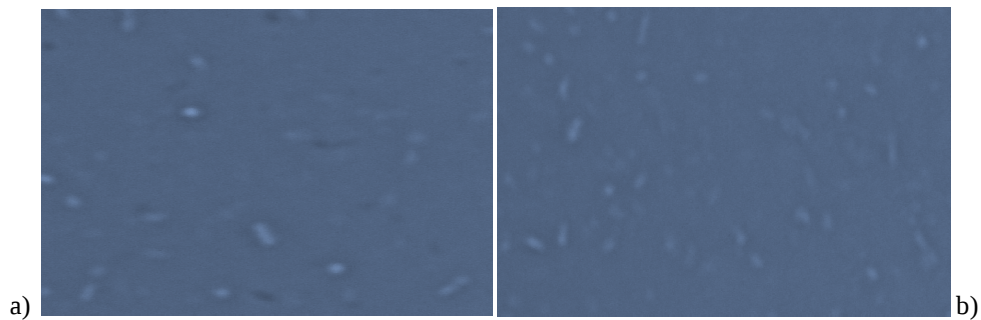


Abbildung 63: Fotografische Aufnahmen der Konzentrationsgemische 1mg/ml b-*E. coli* und 1 mg/ml w-*E. coli* nach a) 18 min und b) 65 min.

Weiteres wurde wieder in 50 ml des Nährmediums die gleiche Zusammensetzung der Bakterienlösung wie im vorherigen Experiment für die Züchtung regeneriert und für die Messung mit einem w-*E. coli*-MIP vorbereitet. In Abbildung 64 ist das Ergebnis dargestellt. In einem Zeitraum von hundertzwanzig Minuten wurde 1mg/ml der Bakterienmischung gezüchtet. In dieser Zeit befinden sich die Bakterien laut der Sensorantwort nur zwanzig Minuten lang in der exponentiellen Phase. Wenn man nach der Größe der Bakterien beurteilt, dann passt sich diese Bakterienmischung den w-Kavitäten besser an als den b-Kavitäten und dementsprechend sind auch die Sensorantworten bei w-MIP größer. Obwohl die Frequenzantwort zeigt, dass sich die Bakterien ab der zwanzigsten Minute in der stationären Phase befinden und sich nicht mehr vermehren, wurde nach fünfundsechzig Minuten eine Bakterienlösung entnommen und ausgezählt. Dieses führte zum Schluss dass diese aber durch den Sensor nicht mehr erfasst wurden, da die Kavitäten im MIP bereits abgesättigt waren.

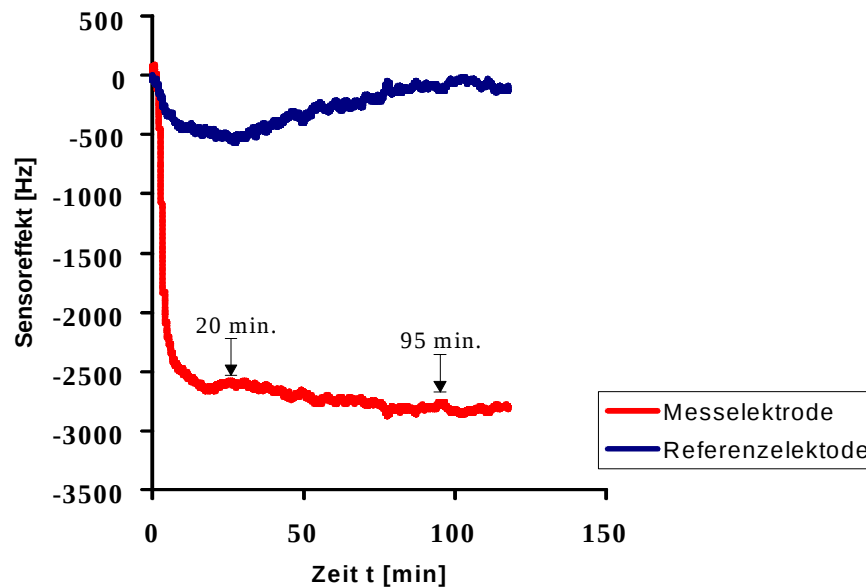


Abbildung 64: Gemischte Zucht (b- und w-*E. coli*) und Erfassung mit einem w-MIP

In Tabelle 23 sind die Konzentrationen und Sensoreffekte der Bakterienmischung zusammengefasst.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
20	$4 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0, 5mg/ml	2650
95	$1,2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 1,5mg/ml.	2800

Tabelle 23: Ermittelte Bakterienkonzentrationen der gemischten Zucht (b- und w-*E. coli*) und Sensoreffekte im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit w-*E. coli*-MIP

Weiteres wurde die Kombination der Mischung von 15 µl 1 mg/ml w-*E. coli* und 5 µl 1mg/ml b-*E. coli* in einem b-*E. coli* geprägtem Sensor untersucht und erfasst. In der Bakterienmischung sind die w-*E. coli* in Mehrzahl. Diese Erkenntnis beeinflusst die Sensorantworten und Einlagerung der Bakterien in die b-*E. coli*-Kavitäten. Wenn man als Vergleich das Ergebnis der Messung aus der Abbildung 62 betrachtet, wo das Mischverhältnis der b- und w-Bakterien 1:1 und bei einer Konzentration von 1 mg/ml ist, dann kann die Erniedrigung der Sensoreffekte um 300 Hz in der stationären Phase beobachten werden. Das resultiert aus der Belegung der Kavitäten mit den richtigen Bakterien.

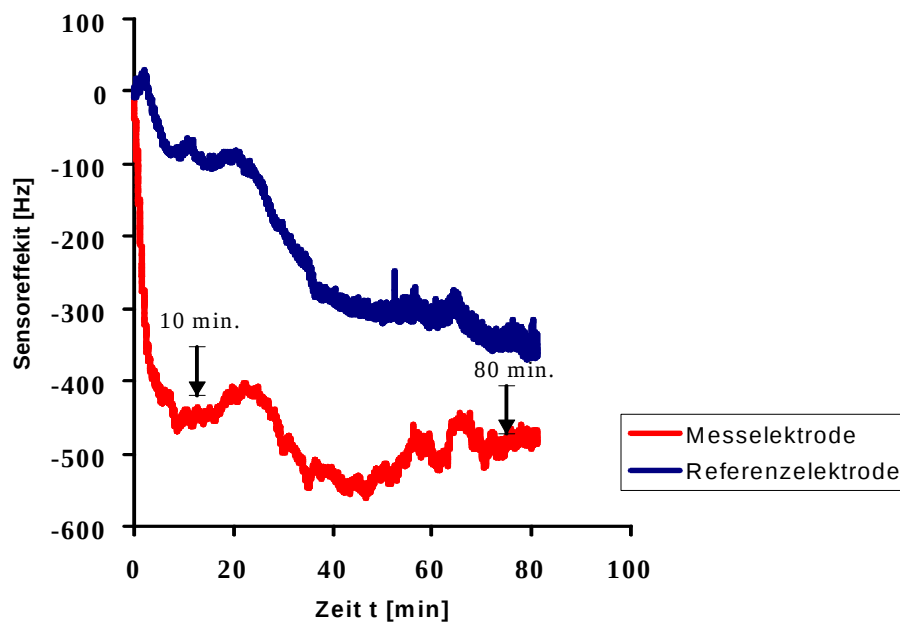


Abbildung 65: Bakterienzüchtung in Kombination 15 μ l 1mg/ml w-*E. coli* und 5 μ l 1mg/ml b-*E. coli* mit einem b-MIP

In Tabelle 24 befinden sich die Konzentrationen und Sensoreffekte, die während der Züchtung der Bakterienmischung ermittelt wurden.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
10	$7,2 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0,9 mg/ml	450
80	$1,2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 1,5mg/ml	480

Tabelle 24: Ermittelte Bakterienkonzentrationen der gemischten Zucht (b- und w-*E. coli*) und Sensoreffekte im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit b- *E. coli*-MIP

Weiteres wurde in einem analogen Experiment die Kombination der Mischung von 15 μ l 1 mg/ml b-*E. coli* und 5 μ l 1mg/ml w-*E. coli* in einem w-*E. coli* geprägtem Sensor untersucht und erfasst (Abbildung 66). In der Bakterienmischung sind die b-*E. coli* in Mehrzahl. Wenn man als Vergleich das Ergebnis der Messung aus der Abbildung 64 betrachtet, in der das Mischverhältnis der b- und w-Bakterien 1:1 und bei einer Konzentration von 1 mg/ml ist, dann können die ähnlichen Sensoreffekte in der stationären Phase beobachten werden, da die b-*E. coli* sich noch zusätzlich unselektiv in die w-Kavitäten einlagern.

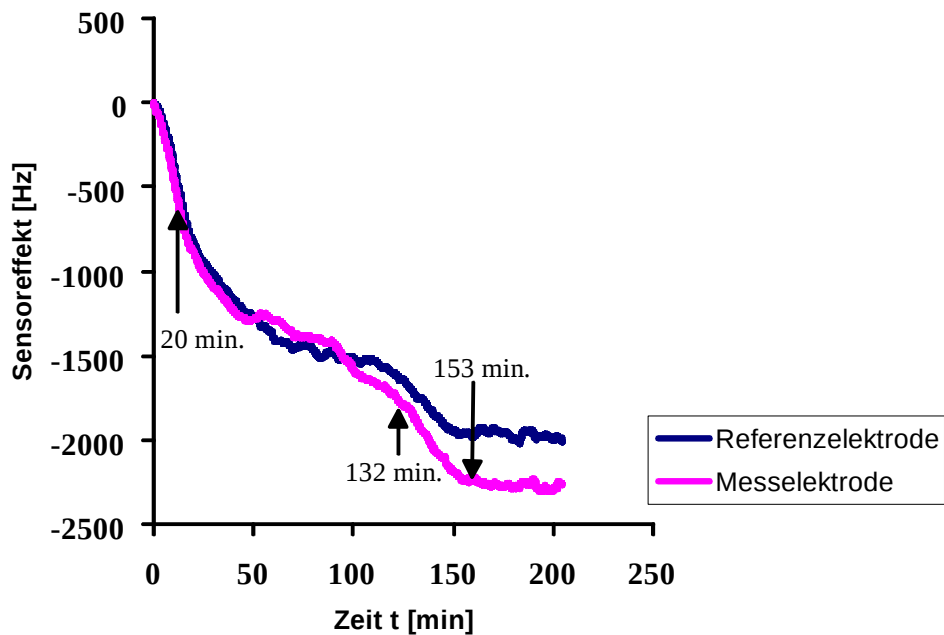


Abbildung 66: Bakterienzüchtung in Kombination von 5 μl 1mg/ml b-*E. coli* und 15 μl 1mg/ml w-*E. coli* mit einem w-MIP

Die Tabelle 25 zeigt die erfassten Bakterienkonzentrationen und ihre Sensoreffekte während der Züchtung. Die Konzentration bezieht sich auf die Bakterienmischung, da es nicht möglich ist, die Bakterienstämme zu differenzieren.

Entnahme [min]	Zellzahl	Sensoreffekt [Hz]
20	$9,6 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 1,2 mg/ml	1500
132	$4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 5 mg/ml	1750
153	$4,08 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 5,1 mg/m	2200

Tabelle 25: Ermittelte Bakterienkonzentrationen der gemischten Zucht (b- und w-*E. coli*) und Sensoreffekte im Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C und Erfassung mit w-*E. coli*-MIP

Resümee:

In diesem Kapitel wurden Messungen in einem Bioreaktor, in dem *E.coli* gezüchtet werden und gleichzeitig der Zuwachs an Biomasse online überwacht, durchgeführt. Dafür wurde ein kleiner Bioreaktor im Labor aufgebaut, der aus einem thermostatisierten Glasgefäß etabliert ist und in dem sich das Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C befindet. Alle durchgeführten Messungen im Bioreaktor erfolgten immer in flow-by-System.

Die Bakterienzahl verdoppelt sich alle 20-30 min. im Nährmedium und ihre Zucht wurde dann mittels Zweielektroden-Sensoren aufgenommen. Während den Messungen durchlaufen die Bakterien vier Wachstums-Phasen, wobei sie sich in der exponentiellen Phase vermehren und die größten Sensoreffekte liefern. Wenn die Bakterien in die stationäre Phase kommen, bildet die Frequenzantwort ein Plateau, die Bakterien vermehren sich nicht mehr, da sie keine Nährstoffe mehr haben. Sie beginnen die Toxine auszuscheiden und leiten so ihre Absterbe-Phase ein. Sobald sie erreicht ist, kommt es zur Reduktion der Konzentration und der Sensoreffekte. Die Selektivität der MIP wurde überprüft um ein Erkenntnis über die Möglichkeit der Züchtung der Bakterien mit dem MIP zu gewinnen. Unterschiedliche Konzentrationen an b- und w-Bakterienlösungen und mit jeweils falschen MIP wurden bei den Züchtungen eingesetzt. Sie weisen auf unterschiedliches Zeitverhalten zwischen den Bakterienstämmen auf und ermögliche damit eine Unterscheidbarkeit der Bakterien.

Beim Monitoring der Mischkulturen wurde angenommen dass die kleinen b-*E. coli* sich zusätzlich und unselektiv in die großen w-*E. coli*-Kavitäten einlagern und dadurch höhere Sensorantworten erreichen als bei den Messungen mit b-MIP.

6. Sensorarrays mit *E. coli*-MIP

Die Selektivitäten der MIP und eine mögliche Applikation in realen Systemen legen es nahe einen Sensorarray zu entwickeln, der es ermöglicht mehrere Bakterienstämme gleichzeitig in einer Analysenprobe zu bestimmen und zu erfassen. Dafür war es zunächst notwendig, neue Elektrodengeometrien zu entwickeln, die auch in der modifizierten Dreielektrodenmesszelle kontaktiert werden können. Um das Übersprechen der benachbarten drei Elektroden zu vermeiden, erfordert die Herstellung und Optimierung eine präzise Anpassung an das Quarzplättchen. Mittels Optimierung der Goldschichtdicke ist es möglich, die hohen Unterschiede zwischen den Resonanzfrequenzen zu reduzieren. Die Grundresonanz des QCM beträgt 10 MHz, mit einer Dicke von 0,15 mm und einem Durchmesser von 15,5 mm. Beim multiplen Elektrodendesign ist der Durchmesser auf der Messelektrode auf 4,5 mm reduziert, für die Phasenseite 3,00 mm, wobei die Distanz zwischen den Elektroden 2 mm ist. Weitere Verkleinerung des Elektrodendurchmessers würde die Sensitivität des Sensors reduzieren.

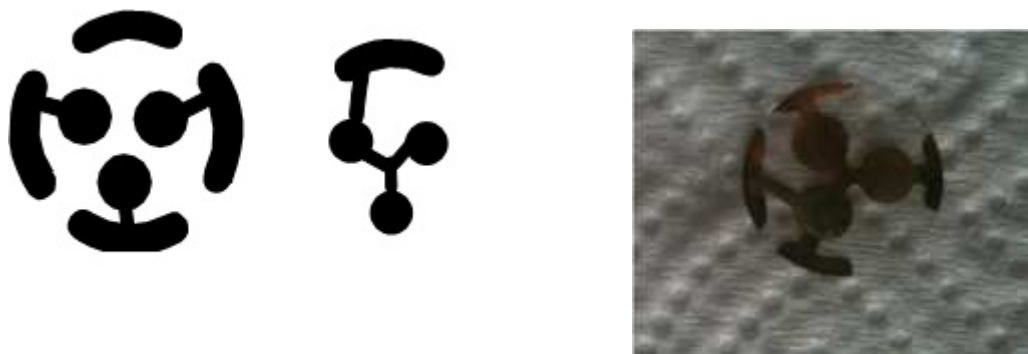


Abbildung 67: Aufbau der Dreielektroden-Geometrie für die Simultanbestimmung der verschiedenen Bakterienstämmen in der flüssigen Phase (Vorder- und Rückseite)

Wie vorher schon in Kapitel 2 erläutert, kann es zur Kopplung der elektroakustischen Welle mit der zu untersuchenden Lösung kommen. Um diesen Effekt zu minimieren, werden die Elektroden auf der Vorderseite größer als die Elektroden auf der Rückseite mit dem Siebdruckverfahren auf das Quarzplättchen aufgetragen, wobei die Elektroden mit größerem Durchmesser mit der Lösung in Kontakt kommen. Wie bei den bisherigen Messungen und Analysen, werden die Elektroden mittels Spin-Coating-Verfahren mit Polyurethan (Zusammensetzung in der Tabelle 20) beschichtet. Eine der drei Sensorschichten bleibt ungeprägt, eine wird mit *b-E. coli* und die andere mit *w-E. coli* geprägt.

Nach dem Aushärten der geprägten Schichten, werden die *E. coli* mittels 0,1 % SDS aus den Kavitäten ausgewaschen. Messungen mittels Netzwerkanalysator zeigen, daß dabei gleiche Schichtdicken und gleiche Sensorantworten erwartet werden können, wie im Fall der Einzelsensoren (trotz der Änderungen in der Elektroden-Geometrie). Analog der Zweielektroden-Messzelle mußte auch Dreielektroden-Messzelle an drei Kanäle und vier elektrische Kontakte zwischen dem Sensor und Messzelle angepaßt werden (Abbildung 68).

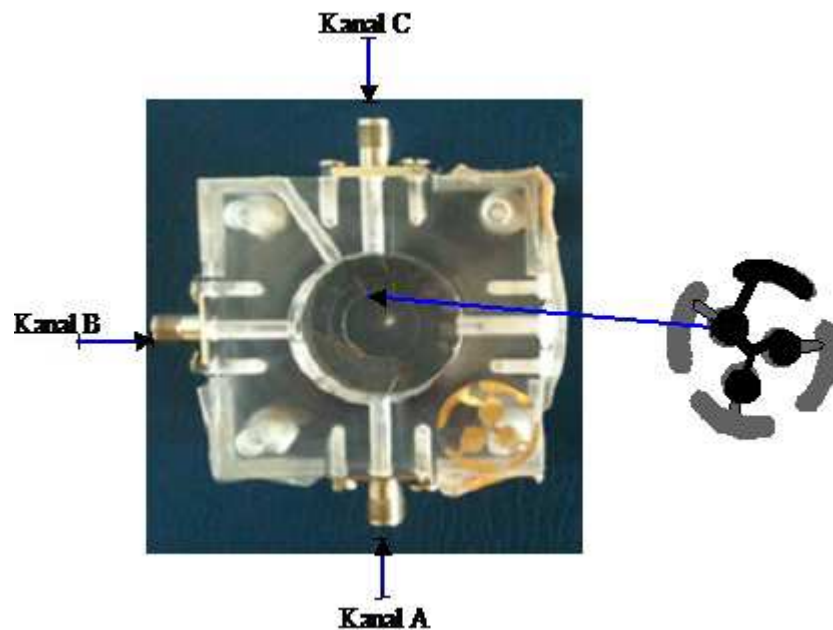


Abbildung 68: Meszelle für Dreielektroden-Messungen in der flüssigen Phase mit drei Kanälen und vier elektrischen Kontaktstellen

Analog den früheren Messungen, befindet sich der Sensor ständig in der Flüssigkeit, so dass die geprägte Schicht quellen kann. Vor jeder Messungsreihe wird der Sensor stabilisiert, kalibriert und erst dann ist er einsatzbereit. Die Messungen beziehen sich wieder auf die Massenänderung während des Beladens der sensitiven Schicht, wobei die Änderung der Masse entweder durch die Änderung der Konzentration oder durch das Auswaschen der Analyten aus den Kavitäten erfolgt. Der Prozeß läuft im stopped-flow Modus oder während der Zucht der Bakterien im Bioreaktor dann im flow-by-System mit einer konstanten Geschwindigkeit. Wie bei den Messungen zuvor, wird im stopped-flow Modus die Zufuhr der Analytlösung während der Messung unterbrochen. Es besteht die Möglichkeit, die Frequenz- und damit Massenänderung ununterbrochen während der Züchtung der Bakterien im Nährmedium zu erfassen. Die Analytlösung und das Nährmedium befinden sich dann im bereits vorgestellten Bioreaktor.

6.1 Dreielektrodenmessungen in stopped-flow Modus

Für den Nachweis der *b-E. coli* in der Lösung mittels dieses Sensorarrays aus drei individuellen QCM-MIP-Sensoren wurde eine Konzentration an Bakterien in der Suspension von 12 mg/ml ($9,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) mit Neubauer Zählkammer ermittelt. Abbildung 69 zeigt das Resultat einer der ersten Messungen. Alle drei Elektroden, nämlich die zwei ungeprägten Referenzelektroden und die eine geprägte Messelektrode zeigen beim Einführen der Bakteriensuspension in die Messkammer eine Frequenzänderung. Bei der Messelektrode beträgt er 11200 Hz und ist daher um einen Faktor sieben größer, als die entstandenen Sensoreffekte bei den Referenzelektroden, die 1500 Hz betragen, was wieder auf erfolgreiche MIP-Synthese hindeutet. Die Frequenzerniedrigung an den zwei Referenzelektroden entspricht einer unselektiven Anlagerung der Bakterien in die Polyurethanschicht. Die Sensoreffekte sind praktisch gleich und im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit geben sie ein bestätigendes Ergebnis.

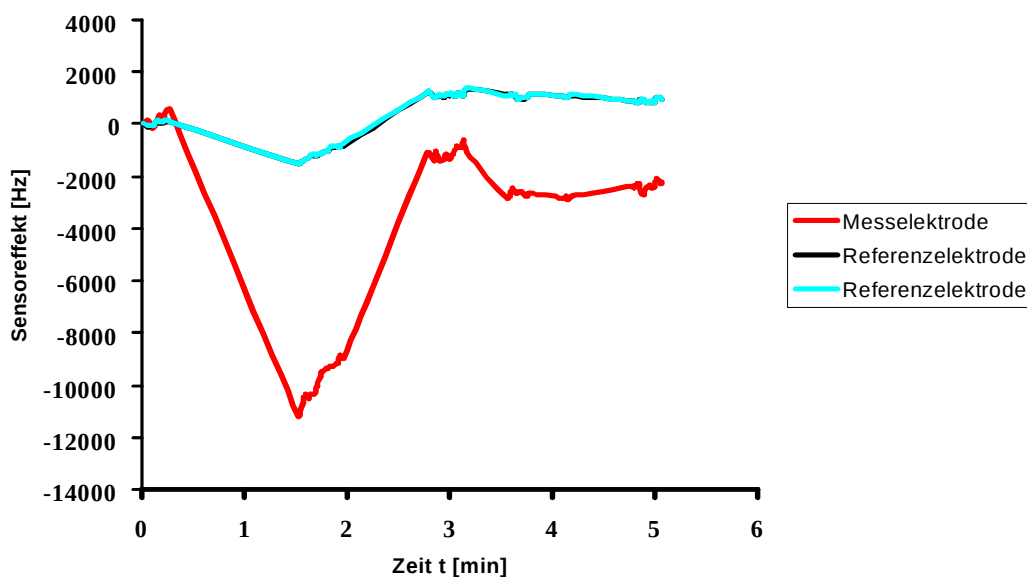


Abbildung 69: Sensoreffekt eines 10 MHz *b-E. coli*-Sensor mit Polyurethanbeschichtung; Messelektrode: Prägung mit *b-E. coli*; zwei Referenzelektroden: ungeprägtes Polyurethan; Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destilliertem Wasser; Zugabe von 12 mg/ml *b-E. coli*-Bakteriensuspension bei Raumtemperatur; Messmodus: stopped-flow

Weiters wurde das analoge Experiment wiederholt, wobei eine Referenzelektrode und zwei gleich beschichteten Messelektroden, nämlich mit *w-E. coli* geprägt, verwendet wurden. Für die Detektion der *w-E. coli* wurde eine Bakteriensuspension von 5 mg/ml ($4 \cdot 10^9$ Zellen/ml) eingesetzt, das Ergebnis ist in Abbildung 70 zu sehen. Die Sensoreffekte der *w-E. coli*-Messelektroden betragen 2000 Hz bzw. 2500 Hz und sind um den Faktor sieben größer als die Sensoreffekte der Referenzelektrode. Diese Ergebnisse deuten wieder auf eine gelungene MIP-Synthese hin. Die Reproduzierbarkeit der gleich geprägten Messelektroden ist viel versprechend, da sie die gleichen Sensoreffekte hervorrufen. Die am NIP beobachtete Frequenzerniedrigung ist durch die instabile und unselektive Anlagerung der Bakterien in die ungeprägte Polyurethanschicht bedingt.

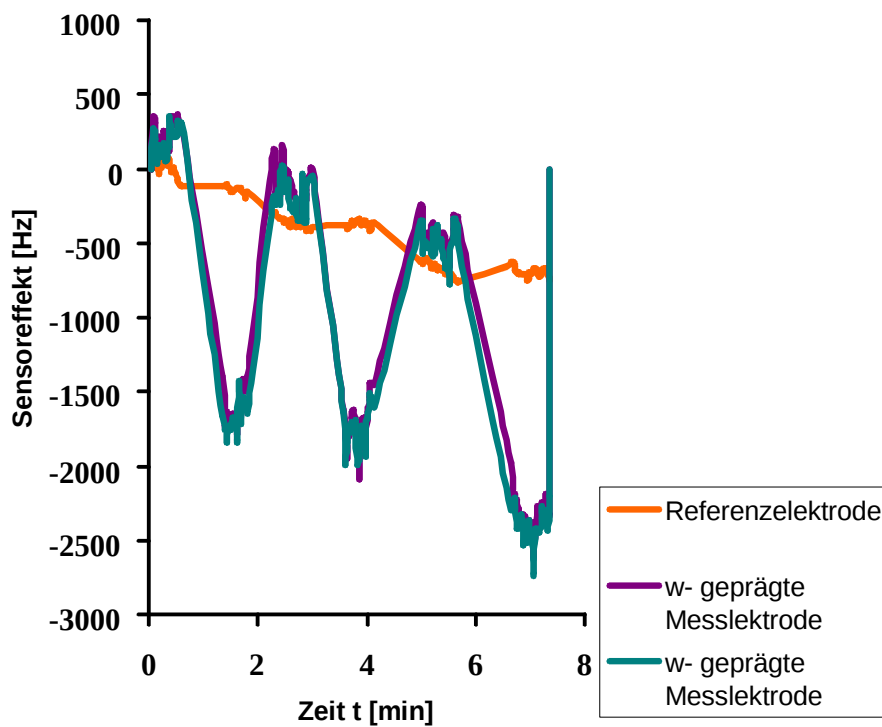


Abbildung 70: Sensoreffekte eines *w- E. coli*-Sensors; zwei Messelektroden: Prägung mit *w-E. coli*; Referenzelektrode: ungeprägtes Polyurethan; Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destilliertem Wasser, Zugabe von 5mg/ml *w-E. coli*- Bakteriensuspension bei Raumtemperatur; Messmodus: stopped-flow

Der nächste logische Schritt ist, ein Experiment wo die erste Messelektrode mit *w-E. coli* und die zweite Messelektrode mit *b-E. coli* geprägt, wobei eine Referenzelektrode vorhanden ist, durchzuführen. Für den Nachweis der *w-E. coli* in der Lösung wurde eine Bakteriensuspension von 18 mg/ml ($1,44 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml) eingesetzt. Die Messkurve der *w-E. coli* belegt die Reproduzierbarkeit und die Stabilität des Messsignals. Beim mehrmaligen, wiederholten Messen der gleichen Bakterienkonzentration bleiben die Frequenzänderungen gleich hoch, nämlich 7700 Hz, 7100 Hz und 6300 Hz. Die Messkurve der *b-E. coli* ist unselektiver, da sich bei der Messung um Nachweis von *w-E. coli* handelt und deswegen sind ihre Sensoreffekte dementsprechend viel kleiner: 1700 Hz, 520 Hz und 550 Hz. Der Differenzfaktor der beiden, unterschiedlich geprägten Messlektroden beträgt zwischen 5 und 10, was eigentlich ein wichtiger Parameter ist, da diese Messung eine erstmalige „in-situ“-Parallelmessung mit zwei verschiedenen Bakterienstämmen ist.

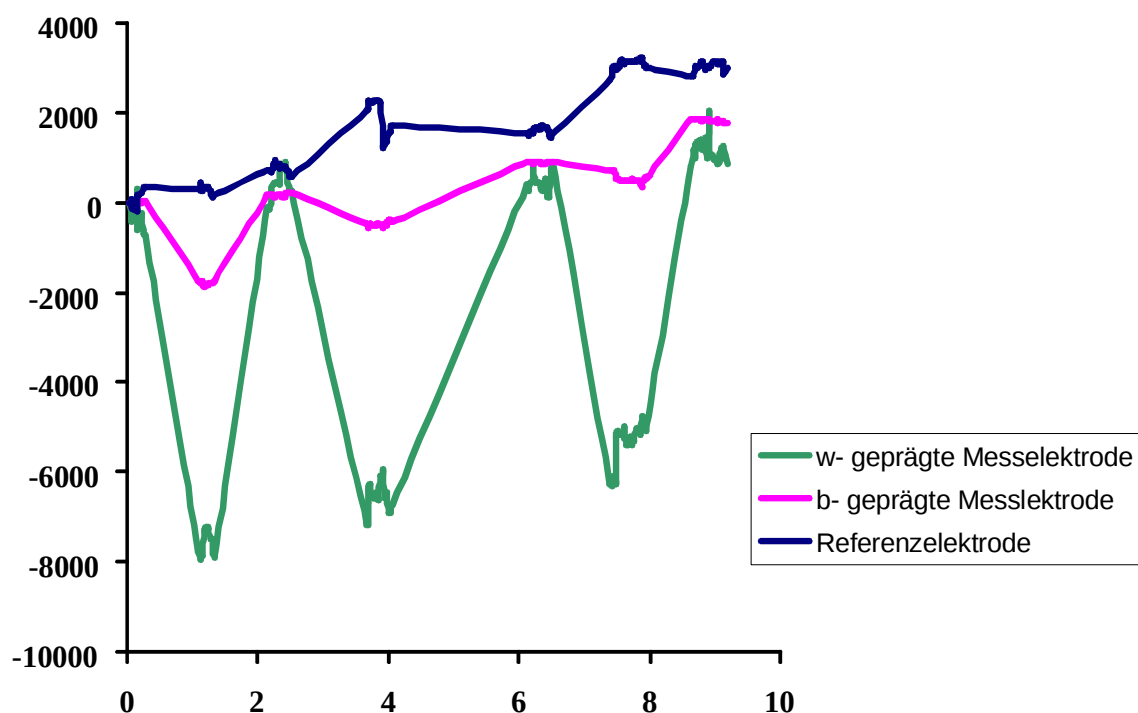


Abbildung 71: Sensoreffekte b- und w- *E. coli*-Sensor; erste Messelektrode: Prägung mit *w-E. coli*; zweite Messelektrode: Prägung mit *b-E. coli*; eine Referenzelektrode: ungeprägtes Polyurethan; Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destilliertem Wasser, Zugabe von 18 mg/ml *w-E. coli*-Bakteriensuspension bei Raumtemperatur; Messmodus: stopped-flow

Die folgende Abbildung 72 zeigt die Resultate von w-*E. coli*-MIP auf einer Messelektrode und b-*E. coli* auf der anderen Messelektrode. Die Messkonzentration beträgt 12 mg/ml ($9,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) b-*E. coli*. Die drei unterschiedlich geprägten Elektroden zeigen auch unterschiedliche Sensorantworten. Die Messkurve zeigt eine Reproduzierbarkeit und Stabilität im Bezug der w-*E. coli*-MIP, begründet mit Sensorantworten von 11700Hz, 11700 Hz, 10500 Hz und 11100 Hz. Dadurch erfolgt auch der Nachweis der w-*E. coli*-Lösung, aber auch die Feststellung der Tatsache daß sich b-*E. coli* auch in die w-*E. coli*-Kavitäten einbetten können und größere Sensorantworten liefern können, begründet mit den Sensorantworten von 4500 Hz, 4600 Hz, 4100 Hz und 4300 Hz. Die Sensoreffekte der w-*E. coli*- Messelektrode ist um den Faktor 2 größer als die Sensorantworten der b-*E. coli* und im Gegensatz zu der vorherigen Messung (Abbildung 71) wo die w-*E. coli*-Bakterien in b-*E. coli*-Kavitäten nicht hineinpassen und dementsprechend auch kleinere Messeffekte liefern.

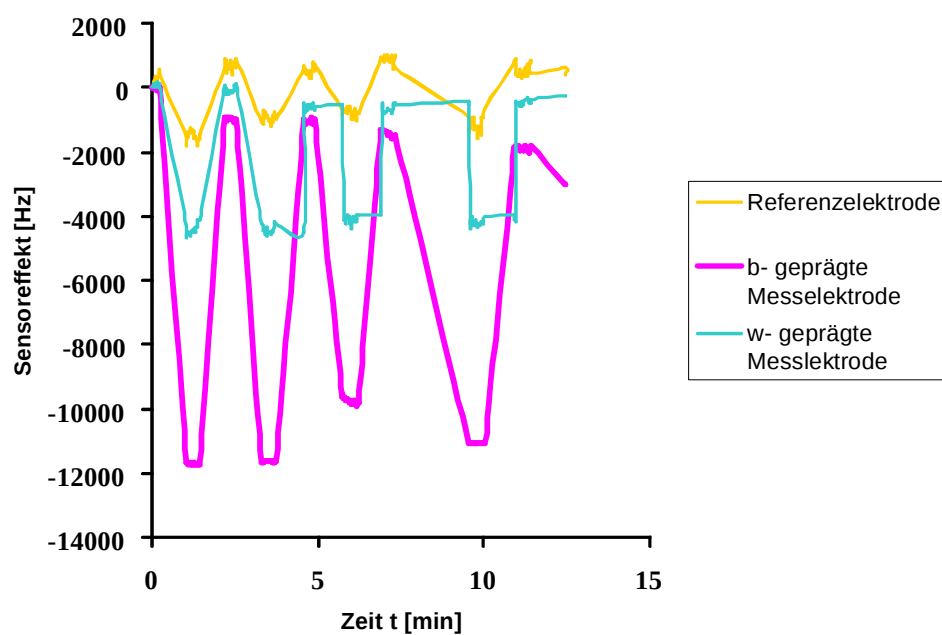


Abbildung 72: Sensoreffekte eines b- und w-*E. coli*-Sensor; erste Messelektrode: Prägung mit b-*E. coli*; zweite Messelektrode: Prägung mit w-*E. coli*; eine Referenzelektrode: ungeprägtes Polyurethan. Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destilliertem Wasser, Zugabe von 12 mg/ml b-*E. coli*-Bakteriensuspension bei Raumtemperatur; Messmodus: stopped-flow

6.2 Dreielektrodenmessungen unter Realbedingungen

Die Dreielektrodenmessungen wurden auch in dem in Kapitel 6 vorgestellten Bioreaktor durchgeführt. Da in dieser Arbeit schon die Züchtung der Bakterien unter realen Bedingungen bei Zweielektrodenmessungen untersucht wurde, beschränken sich die Studien mit dem QCM-Array im Bioreaktor auf die Verlangsamung, Hemmung oder Verhinderung der Züchtung durch unterschiedliche Hemmstoffe wie beispielsweise Lysozym und N-Hydroxyharnstoff. Die Wirkung des N-Hydroxyharnstoffes⁶⁴ beruht auf der Verhinderung der Zellvermehrung, indem das Enzym Ribonukleotidreduktase gehemmt wird und dadurch die DNA-Synthese eingeschränkt wird. Der Hemmstoff Lysozym⁶⁵ ist eine Hydrolase, die den Peptidoglykan in der Zellwand der Bakterien abbaut und so einen Einfluss auf die Vermehrung der Bakterien hat. Alle angeführten Experimente werden in flow-by-Modus stattfinden.

6.2.1 Inhibierung der Züchtung mit N-Hydroxyharnstoff

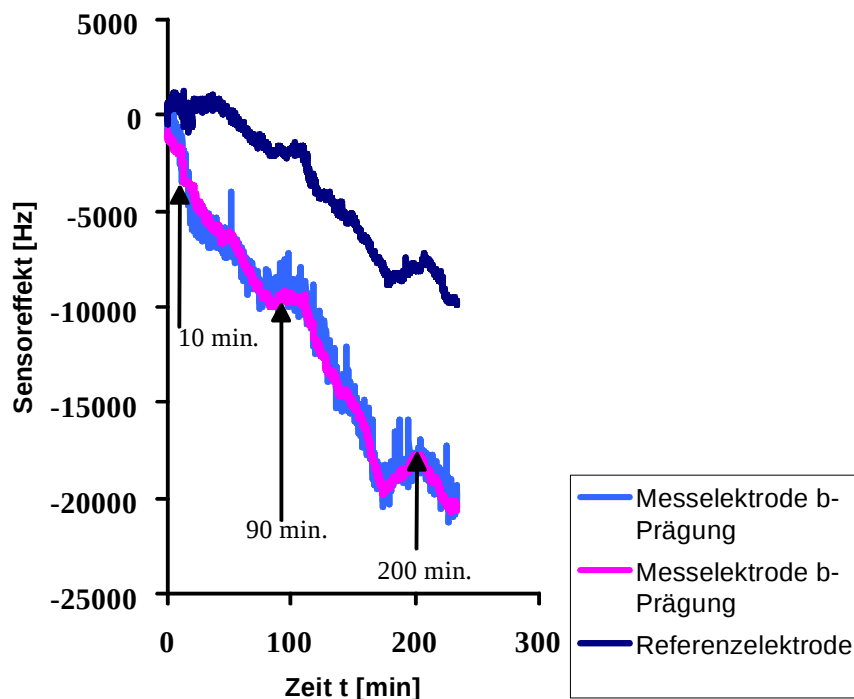


Abbildung 73: Bioreaktor-Zucht der *b-E. coli* mit einem Dreielektroden-Sensorarray; zwei Messelektroden: b-MIP; eine Referenzelektrode, Zugabe: 1 mg/ml *b-E. coli*- Lösung

Abbildung 73 zeigte die Züchtung der Bakterien *b-E. coli* in einem Sensorarray, bei dem zwei Messelektroden mit b-MIP beschichtet und eine Referenzelektrode ohne Prägung vorhanden war.

Dieses Experiment kombiniert erstmals eine in-situ-Messungen während der Zucht und den Einsatz eines Sensorarrays. Beide Messkanäle sind mit dem selben MIP beschichtet, was erfreulicherweise in gleichen Sensorantworten mündet. Das Ergebnis dieser Messung zeigt wieder eine gute Reproduzierbarkeit in der Synthese der MIP. Die Referenzelektrode zeigt auch Sensorantworten, die durch unselektive Einlagerung entstanden sind. Während dieses Messvorganges wurden die Bakterien in vier Zyklen generiert und ergaben am Ende einen Konzentrationswert von 12 mg/ml, danach entstand die stationäre Phase. In der Tabelle 26 sind die Sensoreffekte und Konzentrationen, die während der Messung ermittelt wurden, vorgestellt.

Entnahmezeit [min]	Konzentration	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 1	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 2
10	$6,4 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0,8 mg/ml	1750	1800
90	$1,92 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 2,4 mg/ml	9800	9700
200	$9,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 12 mg/ml	18000	18200

Tabelle 26: Ermittelte Sensoreffekte bei Züchtung der b-*E. coli* in einem Sensorarray, wobei zwei Messelektroden mit b-*E. coli* geprägt sind

In Abbildung 74 ist die Zucht und das Verhalten der *b-E. coli*-Bakterien bei der Zugabe von 400 mg des Inhibitors N-Hydroxyharnstoff gezeigt, wobei zwei Messelektroden mit *b-E. coli* geprägt wurden. Die Ausgangskonzentration betrug 1 mg/ml *b-E. coli*.

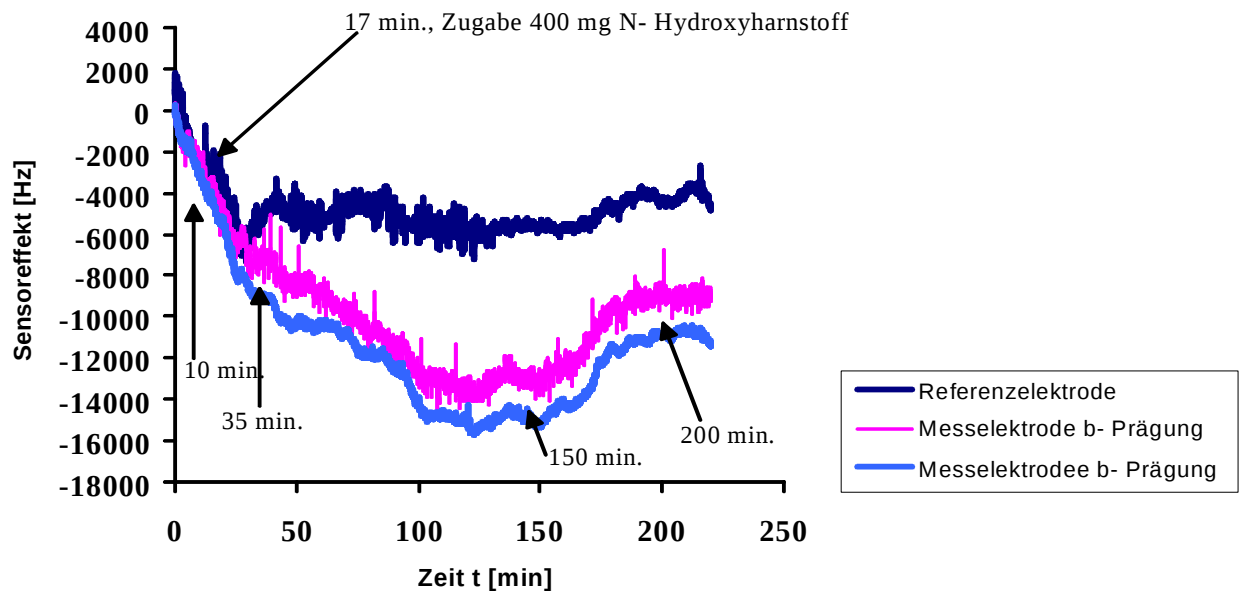


Abbildung 74: Bioreaktor-Zucht der *b-E. coli* von einem Dreielektroden-Sensorarray; zwei Messelektroden: Prägung mit *b-E. coli*; eine Referenzelektrode; Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destilliertem Wasser, Zugabe von 1 mg/ml *b-E. coli*- Bakteriensuspension bei einer Temperatur von 37°C; Messmodus: flow-by; nach 17 min. Zugabe des Inhibitors N-Hydroxyharnstoff 400 mg

In der folgenden Tabelle 27 wurden die Sensorantworten und Konzentrationen während der Messung vor und nach der Zugabe des Inhibitors N- Hydroxyharnstoff ermittelt.

Die Sensorantworten der beiden mit *E. coli*-MIP beschichteten Messelektroden verlaufen parallel zu den Ergebnissen aus der Tabelle 26, wo die Ausgangsbedingungen die gleichen waren. Der Unterschied trat auf, nachdem der Inhibitor N-Hydroxyharnstoff auf die Bakterien zu wirken begann. Da die ausgewählte Konzentration von N-Hydroxyharnstoff klein ist, braucht der Hemmstoff auch länger um seine Wirkung zu entfalten und inhibierend zu wirken. Die Bakterien wurden nach 150 min. gehemmt, begannen zu verklumpen (Abbildung 75 d) womit die Resonanzfrequenz wieder anstieg.

Entnahmezeit [min]	Konzentration	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 1	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 2
10	$7,2 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 0,9mg/ml	2500	2550
17	Zugabe des N- Inhibitors N-Hydroxyharnstoff	5050	4900
35	$1,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 2 mg/ml	9000	8400
150	$6,4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 8 mg/ml	15000	13500
200	$2,4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 3 mg/ml	10500	9000

Tabelle 27: Sensoreffekte der *b-E. coli*, wobei zwei Messelektroden mit *b-E. coli* geprägt sind und nach 17 min. die Inhibition des Wachstums mit N-Hydroxyharnstoff begonnen wurde

Die Messung dauerte insgesamt zweihundert Minuten in denen die Bakterien alle Phasen ihres Wachstums durchlebten. In Abbildung 75 sind die Bakterien in unterschiedlichen Phasen und in Abhängigkeit des Messverhaltens aufgenommen worden. Die Hemmung der Bakterien erfolgte nach der Zugabe von 400 mg N-Hydroxyharnstoff, was sich durch Verklumpen der Bakterien bemerkbar gemacht hat. Die Bakterienkonzentration wurde von 8 mg/ml auf 3 mg/ml reduziert, was sich auch auf die Erniedrigung der Sensoreffekte bemerkbar machte. Die Messelektroden geben wieder einheitliche Sensoreffekte, so dass die Reproduzierbarkeit wieder vorhanden ist. Die Erniedrigung der Sensoreffekte ist auf den Sensoren nicht so stark zu sehen, die Messeffekte bleiben etwas größer. Die Ursache kann an der Anlagerung von abgestorbenem Material auf der Sensoroberfläche liegen.

Unter dem Mikroskop wurde das Zusammenklumpen der Bakterien wegen der Hemmung der Züchtung beobachtet. Wie auch oben in der Tabelle 27 gezeigt, die erfasste Konzentration erniedrigt sich mit der Zeit, da die Bakterien nicht in verklebtem Zustand in die Kavitäten befördert und aufgenommen werden können.

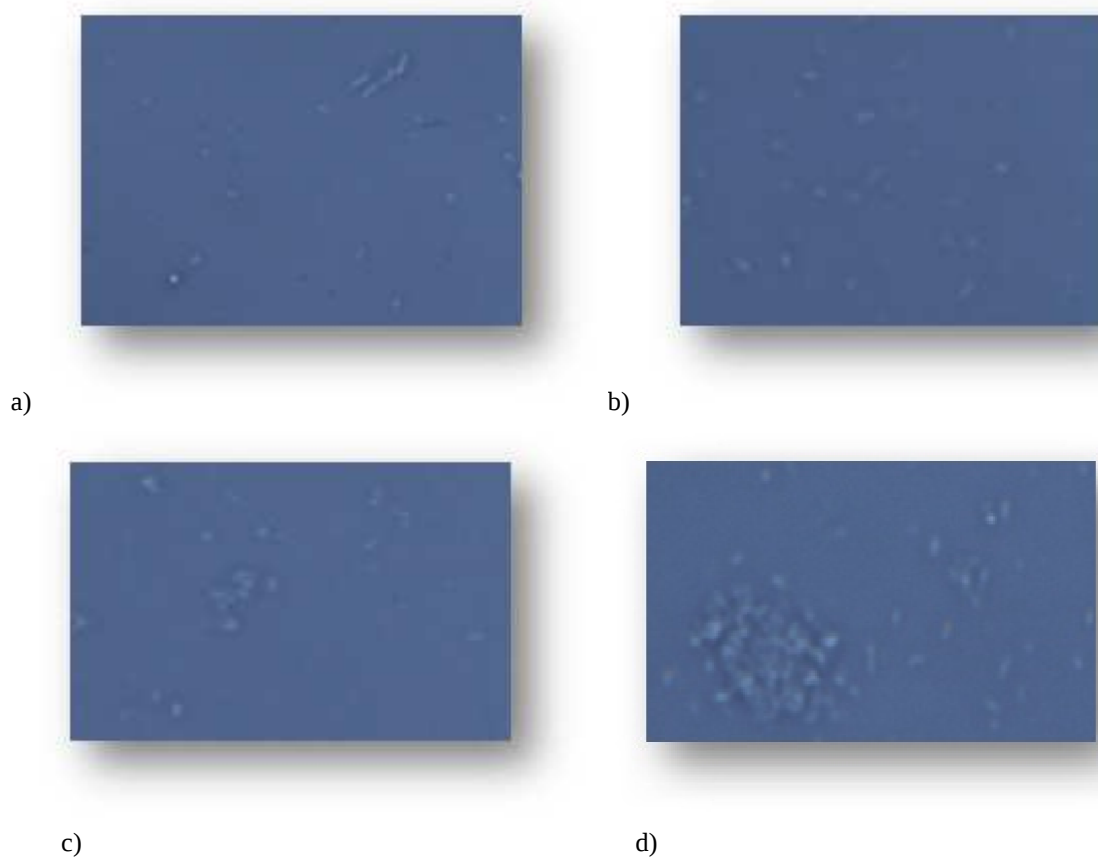


Abbildung 75: Fotografische Aufnahmen der Inhibierung (400 mg N-Hydroxyharnstoff) der Züchtung der Bakterien *b-E. coli* (Ausgangskonzentration 1 mg/ml) nach a) 10 min., b) 35 min., c) 150 min. und d) 240 min.

Analog zu den Experimenten mit *b-E. coli*, wird die Züchtung der Bakterien *w-E. coli* in einem Sensorarray, wo zwei Messelektroden mit w-geprägt und eine Referenzelektrode ohne Prägung vorhanden ist, in Abbildung 76 gezeigt. Diese Messung wurde als Vergleich zu den anderen Messungen mit *w-E. coli*, wo Inhibitoren verwendet werden, ausgewählt. Ihre Ausgangskonzentration ist 5 mg/ml *b-E. coli* und die Züchtung ist nicht gehemmt.

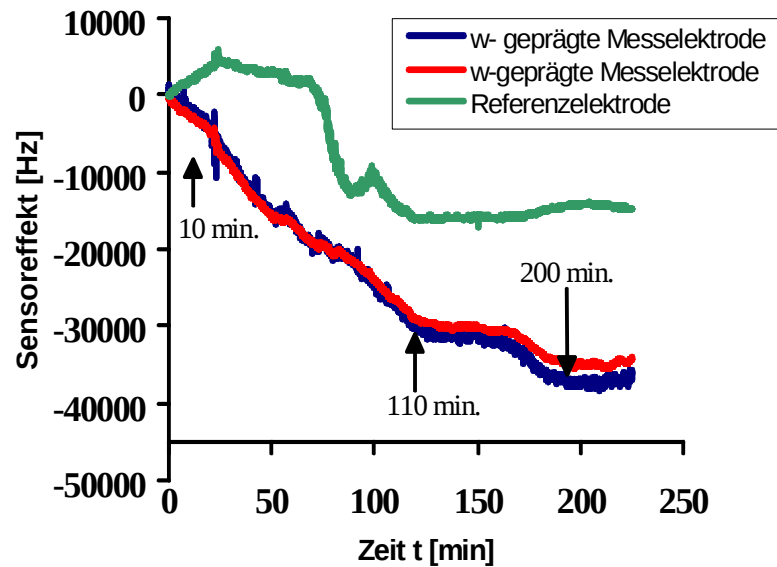


Abbildung 76: Bioreaktor-Zucht der *w-E. coli* von einem Dreielektroden- Sensorarray; zwei Messelektroden: Prägung mit *w-E. coli*; eine Referenzelektrode; Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destilliertem Wasser, Zugabe von 1 mg/ml *w-E. coli*- Bakteriensuspension bei einer Temperatur von 37°C; Messmodus: flow-by

In Tabelle 28 sind die Sensoreffekte und Konzentrationen, die während der Messung ermittelt wurden, zusammengefasst.

Entnahmezeit [min]	Konzentration	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 1	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 2
10	$3,84 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml, 4,8 mg/ml	2600	2500
110	$2,4 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml, 30 mg/ml	30100	30100
200	$5,4 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml bzw. 68 mg/ml	38000	37500

Tabelle 28: Ermittelte Sensoreffekte der *w-E. coli*, wobei zwei Messelektroden mit *w-E. coli* geprägt sind

Die Messelektroden, die gleich geprägt sind und in der Abbildung 76 gezeigt wurden, zeigen ähnliche Verläufe der Sensoreffekte, wobei diese Aussage auch in der Tabelle 28 durch die ermittelten Sensoreffekte bekräftigt wurde. In einer Zeitspanne von 200 min. kommt es zur Zellzahländerung von $3,84 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml auf $5,4 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml bzw. 68 mg/ml.

Das Ergebnis dieser Messung basiert auf guter Reproduzierbarkeit und Synthese der MIP. Die Referenzelektrode, die eigentlich nicht geprägt ist, zeigt wegen der unselektiven Anlagerungen der Bakterien auf ihrer Oberfläche Sensoreffekte.

Abbildung 77 zeigt das Verhalten der *w-E. coli*-Bakterien bei der Zugabe von 400 mg des Inhibitors N-Hydroxyharnstoff, wobei zwei Messelektroden mit *w-E. coli* geprägt wurden. Die Ausgangskonzentration beträgt 1 mg/ml *w-E. coli*.

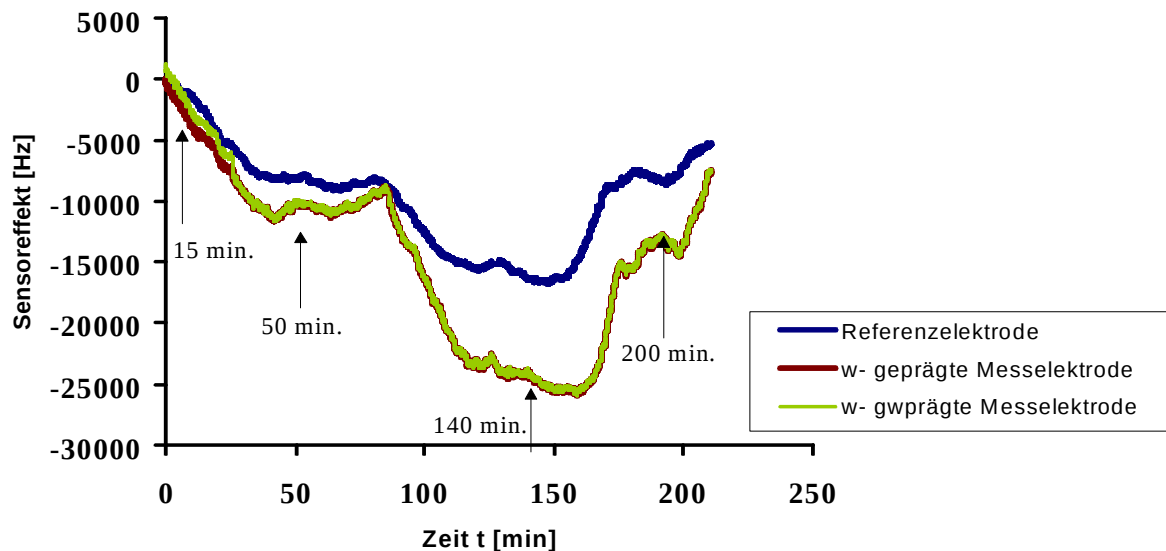


Abbildung 77: Bioreaktor-Zucht der *w-E. coli* von einem Dreielektroden-Sensorarray; zwei Messelektroden: Prägung mit *w-E. coli*; Zugabe der 1 mg/ml *w-E. coli*-Bakteriensuspension; Messmodus: flow-by; nach 50 min. Zugabe des Inhibitors N- Hydroxyharnstoff 400 mg

In der folgenden Tabelle 29 wurden die Sensorantworten und Konzentrationen während der Messung vor und nach der Zugabe von 400 mg des Inhibitors N-Hydroxyharnstoff ermittelt.

Entnahmezeit [min]	Konzentration	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 1	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 2
15	$9,6 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 1,2 mg/ml	4600	4000
50	Zugabe des N- Inhibitors N-Hydroxyharnstoff	10700	10750
140	$1,28 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml bzw. 16 mg/ml	24200	24000
200	$5,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 7 mg/ml	14000	13900

Tabelle 29: Ermittelte Sensoreffekte der *w-E. coli* , wobei zwei Messelektroden mit *w-E. coli* geprägt sind; nach 50 min. die Inhibition der Züchtung mit N-Hydroxyharnstoff

Die Bakterienzüchtung dauerte etwa 150 min., wobei der Inhibitor um 100 min. vorher zugegeben wurde. Danach wurde eine enorme Frequenzänderung beobachtet, was auf die hemmende Wirkung des Inhibitors auf die Bakterienzucht zurückzuführen ist. Die Bakterienkonzentration wurde von 16 mg/ml auf 7 mg/ml reduziert, was sich aus den entsprechenden Sensoreffekten ableiten lässt. Die Messelektroden geben wieder einheitliche Sensoreffekte, was wieder auf die gute Reproduzierbarkeit der Polymerherstellung hindeutet.

6.2.2 Inhibierung der Züchtung mit Lysozym

Eine andere Möglichkeit der Hemmung des Bakterienwachstums ist die Verwendung einer Lysozymlösung und ihre Zugabe zum Nährmedium. Die genaue Zusammensetzung der Lysozymlösung ist in der Tabelle 30 angegeben.

EDTA	5 g
NaOH	0,56 g
NaCl	0,6 g
Lysozym	20 mg
Dest. Wasser	100 ml
pH	8,0

Tabelle 30: Zusammensetzung der Lysozymlösung

Verwendet wurde ein 10 MHz Sensorarray mit Polyurethanbeschichtung, dessen zwei Messelektroden mit b-*E. coli*-MIP beschichtet sind und dessen Referenzelektrode ungeprägtes Polyurethan enthält. Bei Raumtemperatur wurde dem Nährmedium (37°C) 1,5 mg/ml b-*E. coli*-Bakteriensuspension zugegeben. Nach 65 min. erfolgte die Zugabe von 10 ml Lysozym. In Abbildung 78 und Tabelle 31 sind die entsprechenden Daten der Sensormessung zusammengefasst.

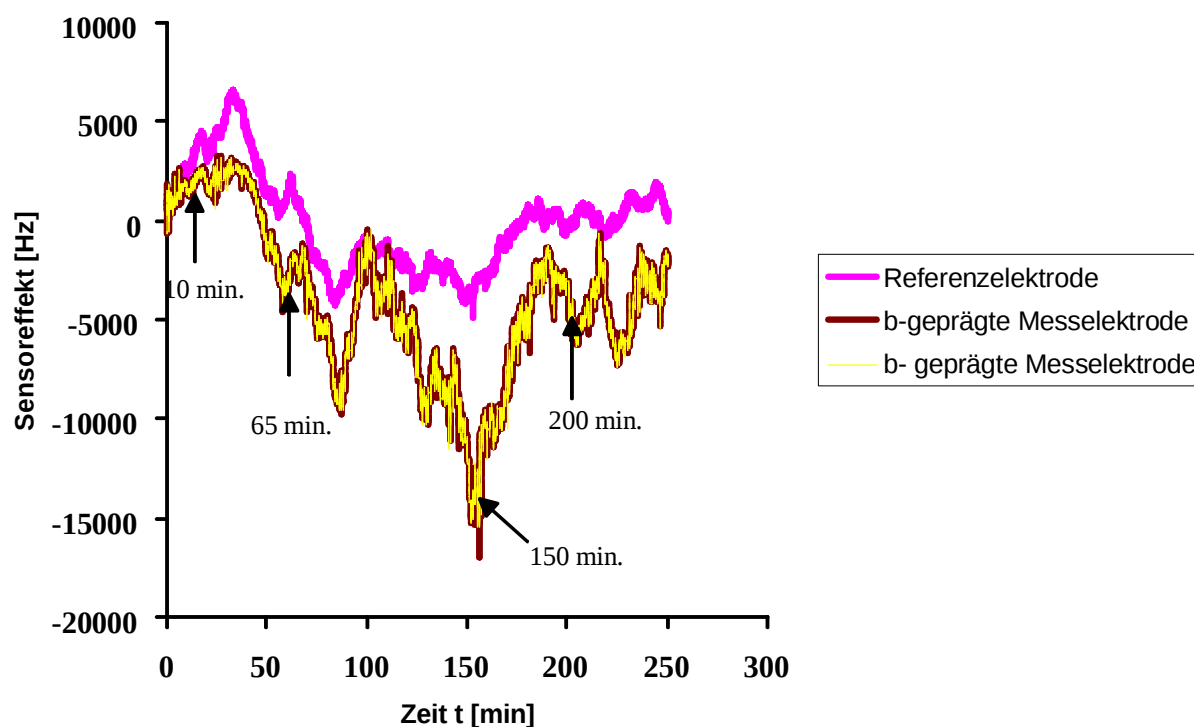
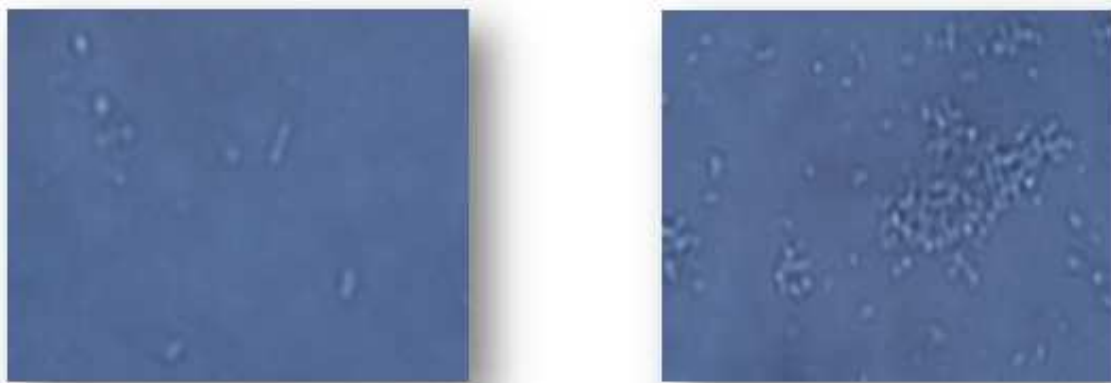


Abbildung 78: Bioreaktor- Zucht der b-*E. coli* von einem Dreielektroden- Sensorarray; zwei Messelektroden: Prägung mit b-*E. coli*; eine Referenzelektrode: ungeprägtes Polyurethan. Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destillierten Wasser, Zugabe von 1,5 mg/ml b- *E. coli*- Bakteriensuspension bei Raumtemperatur; nach 65min. Zugabe des Inhibitors Lysozym; Messmodus: flow by

Entnahmezeit [min]	Konzentration	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 1	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 2
10	$1,2 \cdot 10^9$ Zellen/ml bzw. 1,5mg/ml	1550	1500
65	Zugabe der Lysozymlösung	2500	2500
150	$1,1 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml bzw. 14,3 mg/ml	15000	14500
200	$4,16 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 5,2 mg/ml	3500	3400

Tabelle 31: Ermittelte Sensoreffekte der b-*E. coli* , wobei zwei Messelektroden mit b-*E. coli* geprägt sind; nach 65 min. erfolgte die Inhibition der Züchtung mit Lysozym

Das Ergebnis der Inhibierung von *b-E. coli* mit dem Lysozym und Aufnahmen der Bakterien an b-MIP zeigen unregelmäßige Änderungen im Frequenzbereich. Nach 150 Minuten kommt es zur endgültigen Hemmung der Bakterien, wobei die Frequenz wieder ansteigt. Abbildung 79 zeigt die entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen, an denen man das Verklumpen der Bakterien erkennt und die ein Hinweis auf die Hemmung bzw. das Absterben der Bakterien darstellen. Der Vergleich der Resultate der beiden Inhibitoren zeigt, daß Lysozym *b-E. coli* stärker in ihrem Wachstum hemmt als N-Hydroxyharnstoff.



a) b)

Abbildung 79: Fotographische Aufnahmen der Lysozyminhibierung der *b-E. coli*-Züchtung nach a) 10 min. und b) 200 min.

Analog dazu wurden auch Experimente mit *w-E. coli* und deren Inhibierung mit Lysozym durchgeführt. Die Anfangskonzentration beträgt 1,5 mg/ml, wobei wieder eine Zugabe von 10 ml Lysozym nach 50 min. erfolgte. Abbildung 80 und Tabelle 32 fassen die entsprechenden Daten der Sensormessung zusammen.

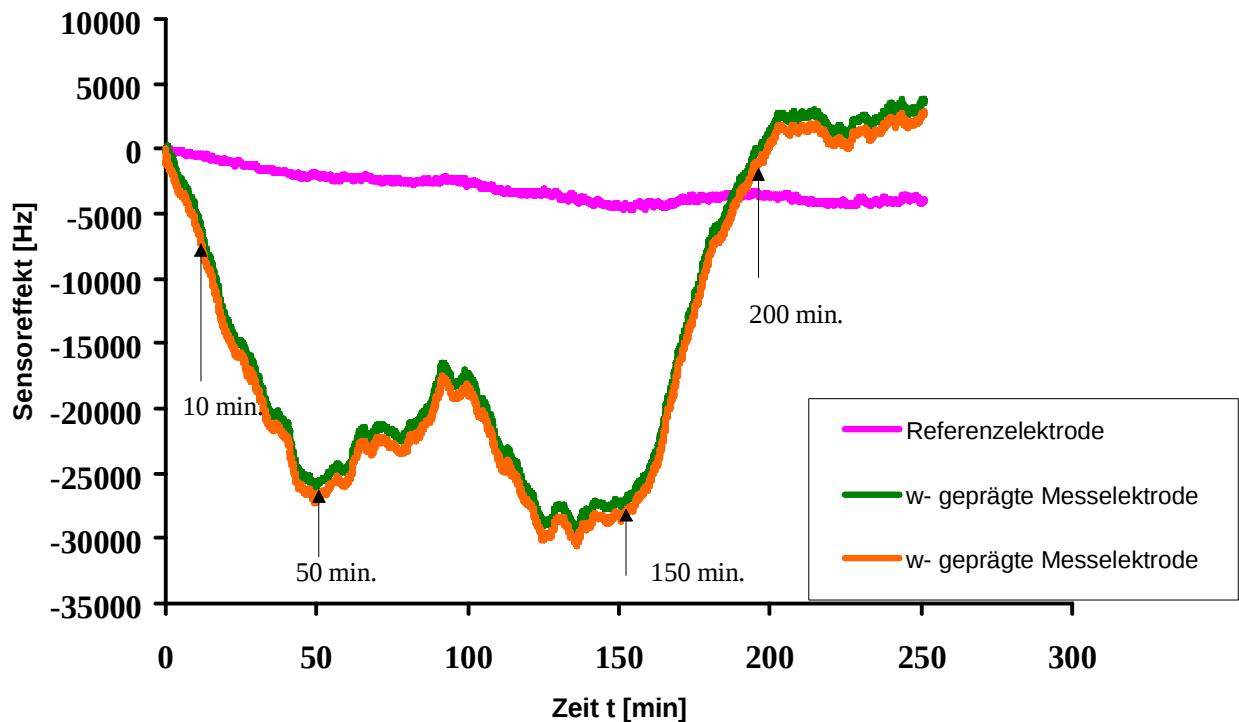


Abbildung 80: Bioreaktor- Zucht und Inhibierung der w-*E. coli* in einem Dreielektroden-Sensorarray; zwei Messelektroden: Prägung mit w-*E. coli*; eine Referenzelektrode: ungeprägtes Polyurethan; Messkurve: Einschwingen des Sensors mit destilliertem Wasser, Zugabe von 1,5 mg/ml w-*E. coli*-Bakteriensuspension bei Raumtemperatur; nach 50min. Zugabe von 10 ml des Inhibitors Lysozym; Messmodus: flow by

Entnahme [min]	Konzentration	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 1	Sensoreffekt [Hz] Messelektrode 2
10	$1,2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 1,5 mg/ml	5100	5000
50	Zugabe der Lysozymlösung	26500	26000
150	$2,4 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml bzw. 30 mg/ml	28600	28000
200	$4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml bzw. 5 mg/ml	500	500

Tabelle 32: Ermittelte Sensoreffekte der w-*E. coli* , wobei zwei Messelektroden mit w-*E. coli* geprägt sind; nach 50 min. erfolgte die Inhibition der Züchtung mit Lysozym

Die Ergebnisse der ermittelten Konzentrationen und Sensoreffekte zeigen deutlich daß sich die Bakterien während der Messung vermehren und vier Generationszeiten durchleben. Ab dem Zeitpunkt der Lysozymzugabe, beobachtet man schnelle Hemmung des Wachstums, so dass die stationäre Phase hundert Minuten dauert.

Danach sterben die Bakterien ab und verklumpen miteinander. Durch den Vergleich der Inhibitoren bei den *w-E. coli*, wurde festgestellt dass Lysozym bessere Wirkung auf die Hemmung der *w-E. coli* hat als der N- Hydroxyharnstoff. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis von *b-E. coli* überein.

Resümee:

Der Schwerpunkt dieses Kapitels war die Entwicklung eines Sensorarray, der die Selektivitäten und mögliche Applikation in realen Systemen befördert und gleichzeitig es ermöglicht, mehrere Bakterienstämme gleichzeitig zu bestimmen und zu erfassen. Es wurden drei Elektroden auf einem einzigen QCM Substrat entwickelt. Notwendig ist es gewesen, die Messzelle für Dreielektrodensysteme zu entwickeln und die Elektrodengeometrie zu optimieren. Die Messungen in der flüssigen Phase und unter stopped-flow-Modus folgten den Ergebnissen der Zweielektrodensysteme. Die Messelektroden, die gepaart geprägt wurden, zeigten gleiche und überlappende Effekte, so daß die Reproduzierbarkeit der MIP gegen war. Bei den Dreielektrodenmessungen unter realen Bedingungen im Bioreaktor und unter flow- by beschränken sich die Studien mit dem QCM-Array auf die Messungen der Zucht mit unterschiedlichen Prägungen der Elektroden und auf die Messungen der Verlangsamung, der Hemmung oder der Verhinderung der Züchtung durch unterschiedliche Hemmstoffe wie beispielsweise Lysozym und N-Hydroxyharnstoff. Die Wirkung des N-Hydroxyharnstoffes beruht auf der Verhinderung der Zellvermehrung, indem das Enzym Ribonukleotidreduktase gehemmt wird und dadurch die DNA-Synthese eingeschränkt wird. Der Hemmstoff Lysozym ist eine Hydrolase, die den Peptidoglykan in der Zellwand der Bakterien abbaut und so einen Einfluss auf die Vermehrung der Bakterien hat. Die Experimente zeigten wieder die Reproduzierbarkeiten der MIP während der Messungen. Der Inhibitor Lysozym zeigt radikales Abstarben und Verklumpen der Bakterien nach seiner Einwirkzeit bei beiden Bakterienstämmen, wobei die Sensoreffekte und Konzentrationen in dieser Phase abnehmen. Der Inhibitor N-Hydroxyharnstoff ermöglicht den Bakterien ein langsames Übergehen in die Absterbe-Phase, wobei die Erniedrigung der Sensoreffekte und Reduzierung der Konzentrationen langsamer voranschreiten.

7. Deutsche Zusammenfassung

Nicht pathogene *E. coli* Bakterien der Stämme b und w waren eine Grundlage für die Entwicklung von Chemosensoren und Sensorarray, basierend auf Zwei- und Dreielektrodensystemen, die in der Flüssigphase und unter Realbedingungen in einem Bioreaktor anwendbar sind. Als Rezeptormaterialien wurden molekular geprägte Polymere (MIP) eingesetzt, wobei sich die Methode der Oberflächenprägung mittels Spin-Coating als besonders zielführend herausstellte.

Der erste Teil dieser Arbeit charakterisiert die MIP hinsichtlich Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit, Querselektivität sowie Langzeitstabilität und Lagerbarkeit mittels Zweielektroden-QCM. Der erreichbare Detektionsbereich liegt zwischen 0,1 mg/ml ($8 \cdot 10^8$ Zellen/ml) und 5 mg/ml ($4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml). Die Selektivitätsstudien ergaben für den b-*E.coli* MIP eine Sensorantwort von 2% gegenüber dem w-Stamm. Für den b-*E. coli* bei einem w-MIP betrug diese Sensorantwort 21%. Dies ist durch den geringfügigen Größenunterschied erklärbar (b-Stamm 1-1,5 μm , w-Stamm 1,5-3 μm). Bei der Prüfung der Langzeitstabilitäten wurden, neben der unterschiedlichen MIP auch verschiedene Fließgeschwindigkeiten der Beförderung der Bakterien in die Messzelle in Betracht gezogen. Es wurde beobachtet, dass MIP bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min. acht Tage lang stabil war und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min. sogar neunundzwanzig Tagen. Gleichzeitig konnten die Sensoren bis zu achtzehn Monate gelagert werden, allerdings mit leicht ansteigender Rauigkeit der Polymere und zusätzlicher Anlagerung von Bakterien am NIP.

Die optimierten MIP wurden schließlich in ein Bioreaktormodell eingebracht um Sensormessungen für die Züchtung der *E. coli* unter Realbedingungen zu entwickeln. Diese Messungen weisen auf unterschiedliches Zeitverhalten zwischen den Bakterienstämmen hin und ermöglichen damit eine Unterscheidbarkeit der Bakterien.

Beim Monitoring der Mischkulturen wurde angenommen dass die kleinen b-*E. coli* sich zusätzlich und unselektiv in die großen w-*E. coli*-Kavitäten einlagern und dadurch höhere Sensorantworten erreichen.

Des Weiteren wurde ein Sensorarray mit drei Elektroden entwickelt und konstruiert. Die Herstellung wurde durch die Optimierung der Elektrodengrößen aber auch deren Geometrie gelenkt. Diese neue Strategie wurde sowohl bei den Messungen in stopped-flow Modus als auch zur massensensitiven real-time Bestimmung, Unterscheidung und Überwachung der Inhibierung der Bakterien mit N-Hydroxyharnstoff und Lysozym eingesetzt.

Die Experimente im Bioreaktor zeigte einerseits die wiederholende Reproduzierbarkeit der MIP bei den Messungen und andererseits Unterscheidbarkeit zwischen Inhibitoren und ihrer Wirkung auf die Bakterien während der Online-Überwachung.

7.1 Summary

Non-pathogenic strains of *Escherichia coli* (w and b) were used as the starting point for developing chemical sensors and their arrays based on two- and three-electrode QCM devices for measuring in liquid phase under real-life conditions. Receptor materials were based on molecularly imprinted polymers (MIP). Surface imprinting after spin-coating turned out to be the optimal strategy for this purpose.

The first part of this work characterized MIP according to their sensitivity, reproducibility, crossselectivity and also long-term stability and storability. The detection range is from 0.1 mg/ml (8×10^8 cells/ml) till 5 mg/ml (4×10^{10} cells/ml). The selectivity studies showed for the b-E.coli MIP a sensor response of 2% over the w strain. For the b-E. coli at a w-MIP sensor was this response 21%. This can be explained by the slight difference in size (b strain from 1 to 1.5 μm w strain 1.5-3 μm) Tests of the long-term stability revealed that flow rate in the system plays an important role: at a flow rate of 1.5 ml/min. MIP lasted for eight days, at 0.8 ml/min. for even twenty-nine days. At the same time sensors could be stored for up to 18 months. However roughness of the polymers slightly increases with time leading to some attachment of bacteria on the MIP.

Finally, optimized MIP were deployed in a model bioreactor to develop sensor measurements at real-life conditions. Such measurements reveal that. At the two strains differ in their time behavior which enables a differentiation of the bacteria.

During monitoring of mixed cultures was assumed that the smaller b-E. coli are also incorporated unselectively by the larger w-E. coli cavities leading to higher sensor responses.

Furthermore, a sensor array with three electrodes was designed. This required optimization of the electrode diameters and geometries. Arrays on the one hand proved the reproducibility of the MIP and on the other hand differentiated the inhibitors N-hydroxyurea and Lysozyme. with respect to their effect on bacteria.

8. Anhang

8.1. Geräte

Frequenzzähler (HP 53131A)

Netzwerkanalysator (HP 8752C; 300 kHz bis 3 GHz)

Thermostat (Haake DC10 Mess- und Regeleinheit, Haake B3 Wasserbehälter)

AFM Nanoscope IIIa, Extended Multimode (Digital Instruments)

Auflichtmikroskop (Wild Heerbrugg M3Z)

Software Winsens XP

Bioreaktor

Lichtmikroskop (Nikon Eclipse LV 100),

Netzgerät (EA PS 2032-025),

Ofen (Heraeus Thermicon P 750/1),

Peristaltik-Pumpe (Ismatech IP 65),

UV-Belichtungsgerät

Zählkammer (Neubauer improved)

8.2. Abkürzungen

AFM Atomic Force Microscopy

C Kapazität

dB Dezibel

E.Coli Escherichia Coli

V Frequenz

Hz Hertz

IR Infrarote Strahlung

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

L Induktivität

MIP Molecular Imprinted Polymer

NaCl Natriumchlorid

NCO- Isocyanatgruppe

PA Polyacrylat

QCM Quartz Crystal Micro Balance

R Widerstand

RT Raumtemperatur

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

SPM Scanning Probe Microscopy

THF Tetrahydrofuran

TSM Thickness Shear Mode Resonator

UV Ultraviolette Strahlung

V Volt

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort

28. Januar 1983 in Banja Luka,
Bosnien und Herzegowina

Familienstand

verheiratet, zwei Kinder

Berufliche Tätigkeiten

Juli 2012 bis heute

Evonik Para-Chemie, Laborleiterin

November 2010 bis Juni 2012

Institut für Analytische Chemie an der
Universität Wien,
Universitätsassistentin PraeDoc
Mutterschutz

Juni 2010 bis September 2010

März 2010 bis Mai 2010

Institut für Analytische Chemie an der
Universität Wien,
Tätigkeit: Studentenbetreuung während des
Analytischen Praktikums

Studium

Oktober 2010 bis heute

Doktoratsstudium der Chemie an der
Universität Wien,
Institut für Analytische Chemie

12. Mai 2010

Abschluss des Diplomstudiums mit
Auszeichnung an der Universität Wien,
Institut für Analytische Chemie

November 2009 bis Mai 2010

Diplomarbeit an der Universität Wien:
Optimierung von Polyurethanen mittels FT-
IR zur Entwicklung von Sensormaterialien
für die Detektion von Bakterien, Projekt
Nanosecure EU-FP6 IP 26549

März 2003 bis April 2010

Diplomstudium der Chemie an der
Universität Wien

Oktober 2002 bis Februar 2003

Studium der Chemie an der
Naturwissenschaftlich- Mathematischen
Fakultät, Zagreb, Kroatien

Schule

21. Juni 2002

Matura mit Auszeichnung an der Höheren
Lehranstalt für das Gesundheitswesen,
Zagreb, Kroatien

September 1998 bis Mai 2012

Höhere Lehranstalt für das
Gesundheitswesen, Fachausbildung:
pharmazeutischer Techniker, Zagreb,
Kroatien

Januar 1995 bis Juni 1998	Realschule Andershof, Stralsund , Deutschland
Februar 1993 bis Dezember 1994	Volksschule, Zagreb, Kroatien
September 1989 bis Januar 1993	Volksschule, Banja Luka, Bosnien und Herzegowina

Sprachen

Kroatisch	Muttersprache
Deutsch	fließend in Wort und Schrift
Englisch	sehr gut , B2 Sprachniveau

Publikationen

A. Findeisen, J. Wackerlig, R. Samardzic, J. Pitkänen, O. Anttalainen, F. L. Dickert, P. A. Lieberzeit (31 July 2012), Artificial receptor layers for detecting chemical and biological agent mimics. Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 170, Pages 196-200

P. A. Lieberzeit, R. Samardzic, K. Kotova, M. Hussain (2012) MIP Sensors on the Way to Biotech Application: Selectivity and Ruggedness. Procedia Engineering, Volume 47, Pages 534-537

S. Z. Bajwa, G. Mustafa, R. Samardzic, T. Wangchareansak, P. A Lieberzeit (2012) Nanostructured materials with biomimetic recognition abilities for chemical sensing Nanoscale Res Lett.; 7(1): 328

P. A. Lieberzeit, A. Findeisen, J. Mähner, R. Samardzic, J. Pitkänen, O. Anttalainen, F.L. Dickert (2010) Artificial receptor layers for detecting chemical and biological threats. Procedia Engineering, Volume 5, Pages 381-384

Vortrag

8. ASAC JunganalytikerInnen Forum 01.06. – 02.06.2012

R. Samardzic: QCM Process Sensing of *E. coli* in a Bioreactor based on Imprinted Polymers

10. Literaturverzeichnis

- ¹ F. L. Dickert, P. A. Lieberzeit (2009) Chemosensors in Environmental Monitoring: Challenges in Ruggedness and Selectivity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 - 467
- ² F. L. Dickert, P. A. Lieberzeit, K. Seidler (2009) Application of yeast imprinting in biotechnology and process control. *Analyst* 134, 361
- ³ F. L. Dickert, O. Hayden (2003) Nano- and micro-structuring of sensor materials – from molecule to cell detection. *Synthetic Metals* 138, 65 - 69
- ⁴ F. Oehme (1991) *Chemische Sensoren*. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH; Braunschweig
- ⁵ A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingmann (1991) *Pure and Appl. Chem.* Vol. 63, No. 9, pp. 1247 - 1250, IUPAC
- ⁶ F. L. Dickert (1992) Sensoren für Gase und Lösungsmitteldämpfe–Ein Beitrag zur Umweltanalytik. *Chemie unserer Zeit* 3
- ⁷ R. Tränkler, E. Obermeier (1998) *Sensortechnik, Handbuch für Praxis und Wissenschaft*. Springer-Verlag Heidelberg, New York, 4
- ⁸ F. L. Dickert, A. Haunschild (1993) *Advanced Materials* 12, 887 - 895
- ⁹ M. Niewenhuizen, A. Venema *Mass-sensitive Devices. Sensor- A Comprehensive Survey*, Hrsg. J.N.Zemel, W.Göpel, J.Hesse Vol. 2, VCV-Verlag, Weinheim, 191 - 297
- ¹⁰ H. R. Tränkler, E. Obermeier (1998) *Sensortechnik, Handbuch für Praxis und Wissenschaft*. Springer-Verlag Heidelberg, New York, 5
- ¹¹ M. Otto (2011) *Analytische Chemie*. Wiley -Vch Verlag GmbH & Co. KGaA 523

-
- ¹² H. R. Tränkler, E. Obermeier (1998) Sensortechnik, Handbuch für Praxis und Wissenschaft. Springer- Verlag Heidelberg, New York, 5 - 6
- ¹³ M. Otto (2011) Analytische Chemie. Wiley -Vch Verlag GmbH &Co. KGaA, 523
- ¹⁴ M. Otto (2011) Analytische Chemie. Wiley -Vch Verlag GmbH &Co. KGaA, 523
- ¹⁵ http://www.univie.ac.at/anchem/sensor/index.php?option=com_content&task=view&id=23&Itemid=39#Potentiometrisch
- ¹⁶ E.M. Logothetis (1991) Automotive Oxygen Sensors. Chemical Sensor Technology, Vol. 3, Hrsg. N.Yamazoe, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 89 - 104
- ¹⁷ S. Matsuura (1993) Sensors Actuators B 13-14: 7-11
- ¹⁸ W. Buchberger (1998) Elektrochemische Analyseverfahren. Spektrum Akademischer Verlag Berlin 12 - 35
- ¹⁹ M. Nanfo, G. Guilbault (1974) Analytical Chemistry. 46: 1769
- ²⁰ W. Stöcklein (2006) Biosensoren-Moleküldetektive. Chemie in unserer Zeit Volume 40 Issue 1 32-40
- ²¹ A. R. West (1992) Grundlagen der Festkörperchemie. 1. Auflage VHC Verlagsgesellschaft Weinheim New York Cambridge Base 371- 372
- ²² H. R. Tränkler, E. Obermeier (1998.) Sensortechnik Handbuch für Praxis und Wissenschaft. Springer- Verlag Heidelberg New York 36-37
- ²³ W. Borchardt-Ott (1990) Kristallographie. 3.Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokio 128-129

-
- ²⁴ W. Kleber (1990) Einführung in die Kristallographie. 17. Auflage Verlag Technik Berlin 178-188
- ²⁵ W. Briese (1985) Schwingquarze, ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik. Vistas Verlag, 5-108 Berlin
- ²⁶ A. Arnau, T. Sogrob, Y. Jimenez (2000) A continuous motional series resonant frequency monitoring circuit and a new method of determining Butterworth–Van Dyke parameters of a quartz crystal microbalance in fluid media. Preview of scientific Instruments 71 2563 -2571
- ²⁷ W. Briese (1985) Schwingquarze, ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik. Vistas Verlag 5-108 Berlin
- ²⁸ W. Briese (1985) Schwingquarze ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik. Vistas Verlag Berlin 5-108
- ²⁹ S. Krassnig (2007) Biomimetrische Sensorik auf Basis von nativen und synthetischen Templaten. Wien16
- ³⁰ G. Sauerbrey (1959) The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for Microweighing. Zeitschrift f. Physik, 155: 206 – 222
- ³¹ J. Delawski., M. D. Ward (1991) Radial mass sensivity of the quartz crystal Microbalance in liquid media. Anal. Chem. 63: 886 – 890
- ³² K. K. Kanazawa, J.G. Gordon (1985) The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. Anal. Chim. Acta, Vol. 175, 99-105
- ³³ P. Hauptmann (1990) Sensoren: Prinzipien und Anwendungen. Carl Hanser Verlag München Wien 101-169
- ³⁴ M. V. Polyakov (1931) Adsorption properties and structure of silica gel. Zhur. Fiz. Khim 2: 79

-
- ³⁵ K. Mosbach (2001) Toward the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding, of compounds with biological activity 132 (biomimetics). *Analytica Chimica Acta*, 435: (1) 3-8
- ³⁶ K. Haupt, K. Mosbach (1998) Plastic antibodies: developments and applications. *Trends in Biotechnology* 16, (11), 468-475
- ³⁷ G. Wulff (1995) Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - A Way towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34 (17) 1812-1832
- ³⁸ F. L. Dickert, H. Reif, H. E. Stathopoulos (1996) Molecular Modeling of Host – Guest Inclusion Compounds: Calculations and Practical Application to Chemical Sensors. *J. Mol. Model.* 2, 410
- ³⁹ P. Grillberger, (2009) Massensensitive Detektion von Hefen, Bakterien und Sporen – Antisauerbrey bei Biopartikel. Wien
- ⁴⁰ C. J. Tan, Y. W. Tong (2009) Molecularly imprinted beads by surface imprinting. *Anal. Bioanal. Chem.* 389(2), 369- 76
- ⁴¹ O. Hayden, F. L. Dickert (2002) Bioimprinting of Polymers and Sol-gel Phases, Selective detection of yeast with imprinted Polymers. *Anal. Chem.* 74, 1303 – 1306
- ⁴² O. Hayden, R. Bindeus and F.L. Dickert (2003) Combining Atomic Force Microscope and Quartz Crystal Microbalance Studies for Cell Detection. *Meas. Sci. Technol.* 14, 1876-1881
- ⁴³ N. K. Myshkin, A. Y. Grigoriev, S. A. Chizhik, K. Y. Choi and M. I. Petrokovets (2003) Surface Roughness and Texture Analysis in Microscale. *Wear*, Volume 254, Issue 10, 1001-1009
- ⁴⁴ P. Grillberger (2009), Massensensitive Detektion von Hefen, Bakterien und Sporen – Antisauerbrey-Verhalten bei Biopartikel. Wien, 37

-
- ⁴⁵ C. Zimmer, Microcosm (2009) E-coli and the New Science of Life. Arrow Bks.
- ⁴⁶ G. Fuchs (2007) Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 126-139
- ⁴⁷ http://www.biostudies.de/2.2.2.2.2_Zellwandaufbau_gramnegativer_Bakterien
- ⁴⁸ A. M. Croxen, B. Finlay (2010) Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nature Reviews Microbiology 8, 26-38
- ⁴⁹ Pschyrembel–Klinisches Wörterbuch (2007) 261. Auflage Walter de Gruyter, Berlin-New York, 568
- ⁵⁰ R. Lan, B. Lumb, D. Ryan, PR. Reeves (2001) Molecular Evolution of Large Virulence Plasmid in Shigella Clones and Enteroinvasive Escherichia coli. Infect. Immun. 69, 6303-6309
- ⁵¹ J. B. Kaper, J. P. Nataro, L. T. Mobley (2004) Pathogenic Escherichia coli. Nat. Rev. 2, 123-140
- ⁵² M. K. Wolf (1997) Occurrence, Distribution and associations of O and H Serogroups colonization factor antigens and toxins of enterotoxigenic Escherichia coli. Clinical Microbiol. Rev. 10, 569-584
- ⁵³ A. Servin (2005) Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev. 18, 264-292
- ⁵⁴ I. Sospedra, C. D. Simone, J. M. Soriano, J. Mañes, P. Ferranti, A. Ritie (November 2012), Characterization of Heat-Labile toxin-subunit B from Escherichia coli by liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Food and Chemical Toxicology, Volume 50, Issue 11, 3886-3891

-
- ⁵⁵ B. Li , J. Q. Chen (Mai 2012) Real-time PCR methodology for selective detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 cells by targeting Z3276 as a genetic marker. *Appl Environ Microbiol.*,78(15), 5297-304
- ⁵⁶ C. Y Si , Z. Z Ye , Y. X Wang , L. Gai , J. P Wang , Y. B. Ying (Oktober 2011) Rapid detection of *Escherichia coli* O157 : H7 using surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.*;31(10):2598-601
- ⁵⁷ M. Bülte, A. Stahl, A. Bubert (2003) Singlepath® *E. coli* O157: Entwicklung und Evaluierung eines verbesserten immunologischen Schnelltests zum Nachweis von *E. coli* O157 aus Lebensmitteln. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 43: Part 1 / 2, S. 184-189
- ⁵⁸ U. Latif, A. Mujahid, A. Afzal, R. Sikorski, P. A. Lieberzeit und Franz L. Dickert (2011) Dual and tetraelectrode QCMs using imprinted polymers as receptors for ions and neutral analytes. *Anal Bioanal Chem.* 400:2507–2515
- ⁵⁹ F. L. Dickert, K Halikias. (2001) Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials. *Sensors and Actuators B* 3768, 1-4
- ⁶⁰ H. R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero and A. M. Baro (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*, Volume 78, Issue 1
- ⁶¹ C. E. Reed, K. K. Kanazawa and J. Kaufman (1990) Physical description of a viscoelastically loaded AT-cut quartz resonator. *J. Appl. Phys.* 68(5)
- ⁶² M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl, D. P. Clark (2008) *Brock Biology of Microorganisms*. Global Edition, Pearson Academic
- ⁶³ Bacterial Growth, Environmental Effects and Strategies (Mai 2012)
<http://trishul.sci.gu.edu.au/courses/bbs2710/Module 2>

⁶⁴ Wirkung von Hydroxyharnstoff und 5-Fluoruracil auf Enzymmuster und Ultrastruktur von Leber, Niere und Pankreas der Ratten(January 1974).Histochemistry, Volume 38, Issue 3, 203-211

⁶⁵ L. Callewaert, M. Walmagh, C.W. Michiels und R. Lavigne (April 2011) Food applications of bacterial cell wall hydrolases. In: Current Opinion in Biotechnology. 22, Nr. 2, 164-171
