

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Massensensitive Detektion von Hefen, Bakterien und
Sporen – Antisauerbrey bei Biopartikel“

Verfasser

Mag.rer.nat. Paul Grillberger

angestrebter akademischer Grad

Doktor der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

Wien, Oktober 2009

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 9913170
Dissertationsgebiet lt. Studienblatt:	Chemie
Betreuerin / Betreuer:	O.Prof.Dr. Franz L. Dickert

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2007 bis Juni 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. F. L. Dickert am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien.

Dank geht an...

Herrn O. Prof. Dr. F. L. Dickert für die interessante Themenstellung, seine Anregungen und Unterstützung sowie für sein stetes Interesse am Fortschritt der Arbeit.

alle meine Mitarbeiter der Abteilung für Ihre stete Diskussionsbereitschaft und Anregungen aller Art.

die Europäische Union für die Finanzierung der vorliegenden Arbeit.

meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Wien, Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
2	Chemosensoren.....	10
2.1	Definition, Aufbau.....	10
2.2	Anforderungsprofil.....	11
2.3	Anwendungsgebiete	12
2.4	Zielsetzung	13
3	Massensensitive Sensoren.....	15
3.1	Einführung.....	15
3.2	Der piezoelektrische Effekt.....	15
3.3	Schwingquarze	16
3.4	Sauerbreygleichung.....	18
3.5	Schwingquarze in flüssiger Phase.....	20
4	Wechselwirkung Schicht-Analyt.....	22
4.1	Einführung.....	22
4.2	Supramolekulare Chemie	22
4.3	Molecularly Imprinted Polymeres (MIPs)	24
4.4	MIPs und ganze Organismen	24
5	Fertigung und Analyse der Sensoren.....	26
5.1	Elektroden	26
5.2	Siebdruckverfahren	28
5.3	Netzwerkanalysator.....	29
5.4	Oszillatorschaltung.....	32
5.4.1	Fertigung.....	32
5.4.2	Funktionsweise	33

5.5	Messzelle	34
5.6	Messanordnung	34
5.7	AFM	36
5.7.1	Funktionsweise	36
5.7.2	Contact-Mode	38
5.7.3	Tapping-Mode	38
6	Elektrodenbeschichtungen	39
6.1	Polyurethan.....	39
6.2	Polyacrylat.....	43
6.3	Polyvinylpyrrolidon.....	45
6.4	Aufbringen der Schicht	46
7	Sauerbrey und Nicht-Sauerbrey Verhalten von Hefesensoren	47
7.1	Einführung.....	47
7.2	Zellzyklus	47
7.3	Anti-Sauerbrey Verhalten	49
7.4	Experimentelles	50
7.4.1	QMB Messungen.....	50
7.4.2	Passives Auslesen der Frequenz/Phase am Netzwerkanalysator	56
7.5	Zusammenfassung und Interpretation	59
8	Massensensitive Detektion von Bakterien.....	61
8.1	Einleitung	61
8.2	Escherichia Coli	62
8.3	Bacillus Subtilis, Bacillus Thuriensis	64
8.4	QCM Sensoren Escherichia Coli.....	66
8.5	QCM Messungen Escherichia Coli	73
8.5.1	Flüssigphasenmessungen mit unterschiedlichen Polymeren.....	73

8.5.2	Konzentrationsabhängigkeit	77
8.5.3	Querempfindlichkeit	79
8.6	Flüssigphasenmessungen <i>Subtilis</i> , <i>Thurigiensis</i>	83
8.6.1	Querempfindlichkeiten	86
8.7	Gasphasenmessungen <i>Escherichia Coli</i>	88
8.7.1	Piezoschwingendes Element	89
8.7.2	Mainhard Zerstäuber	91
8.8	Zusammenfassung und Interpretation	93
9	Zusammenfassung	95
10	Summary	97
11	Anhang	99
11.1	Geräte	99
11.2	Abkürzungen	99
12	Lebenslauf	101
13	Literatur	102

1 Einleitung

Die Analytische Chemie beschäftigt sich mit der Analyse von Molekülen und Substanzklassen aller Art. Ihr Hauptaufgabengebiet ist die qualitative wie quantitative Zusammensetzung von Proben zu bestimmen. Bei realen Proben wird zumeist systematisch in zwei Teile differenziert. Der nachzuweisende Stoff, der Analyt ist umgeben von der Matrix. In der Regel muss vor dem Einsatz einer instrumentellen Analyseverfahren eine Abtrennung oder zumindest Aufreinigung erfolgen. Die differentielle Analytik berücksichtigt zusätzlich die räumliche Verteilung des Analyten in der Probe.

Zur Separation der einzelnen Stoffe einer Probe hat sich in den letzten Jahrzehnten die Chromatographie in all ihren Varianten durchgesetzt. Die Moleküle werden ihrer Polarität oder Größe nach getrennt. Daran angeschlossen ist ein separates Detektorsystem mit welchem sich die Substanz eindeutig nachweisen lässt. Je nach Anforderung kann ein optisches oder elektrochemisches Signal ausreichen. Bei anspruchsvollen Fragestellungen oder unzureichender Auftrennung kommt zumeist die Massenspektroskopie als Detektionssystem zum Einsatz. Effizienz und geringe Nachweisgrenzen zeichnen die angeführten klassischen instrumentellen Methoden aus.

Die anspruchsvollen Geräte verlangen allerdings nach hohen Kosten. Anschaffung, Betrieb und Wartung durch gut ausgebildetes Personal verschlingen Unsummen. Zusätzlich werden noch umweltbelastende Lösungsmittel und Chemikalien gebraucht. Auch ist der Nachweis vorort, die konstante Überwachung und das Monitoring von gefährlichen und schädlichen Stoffen mit den aufwändigen Methoden nicht oder nur stark zeitversetzt möglich. In Zeiten des steigenden ökonomischen Drucks wird jedoch nach immer billigeren Geräten verlangt. Durch die stets steigende Industrialisierung, besonders der Schwellenländer Asiens, wird eine Überwachung der Umweltwerte immer wichtiger.

Geringe Anschaffungs- und Betriebskosten, Monitoring von Substanzen am Ort des Geschehens, vom Laien bedienbare Geräte. Schlagwörter die in das Anforderungsprofil von Chemosensoren passen.

2 Chemosensoren

2.1 Definition, Aufbau

Die International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definiert einen Chemosensor¹ als „small device capable of continuously recognizing concentrations of chemical constituents in liquids or gases and converting this information in real-time to an electrical or optical signal“².

Es handelt sich demnach um einen Messwertfühler mit dem die An-, oder Abwesenheit sowie die Konzentrationsänderung des Analyten in einer bestimmten Phase nachgewiesen werden kann. Der schematische Aufbau eines Chemosensors kann in drei, voneinander unterscheidbare, Kompartimente unterteilt werden.

- Rezeptor- bzw. Erkennungssystem
- Transducer- bzw. Umwandlungselement
- elektronische Signalverarbeitungseinheit

Die Rezeptorschicht stellt den Kontakt des Bauteils mit der Umwelt her. Der Rezeptor ist in der Lage den Analyten zu binden. Die Selektivität und Sensitivität der Bindung entscheidet über die Qualität des Bauteils. Die Schicht muss bei An bzw.

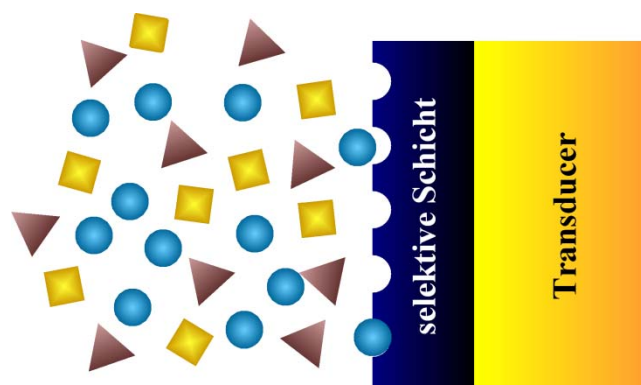


Abb. 1: Der Analyt bindet an die Rezeptorschicht welche daraufhin eine ihrer Eigenschaften ändert. Die Änderung wird über den Transducer in ein Signal umgewandelt.

Abwesenheit des Analyten eine ihrer chemischen oder physikalischen Eigenschaften ändern.

Die Eigenschaft, bzw. dessen Änderung wird vom Transducer übersetzt und an der Signalverarbeitungseinheit ausgelesen. Als erfassbare Eigenschaft kommen Absorption³, Masse^{4,5}, Widerstand und Potential in Frage.

2.2 Anforderungsprofil

Das Anforderungsprofil an einen einsatzfähigen Chemosensor umfasst eine Reihe von Punkten^{6,7}:

- Reversibilität und Reproduzierbarkeit des Sensorsignals
- Schnelles Ansprechverhalten
- Langzeitstabilität der Transducerschicht
- Niedrige Kosten in Produktion, Betrieb und Wartung
- Miniaturisierbarkeit
- Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen
- Sensitivität
- Spezifität und Selektivität
- hohes Signal/Rausch Verhältnis
- leichte Bedienbarkeit

Bislang gelingt es nur vereinzelt mit den zur Verfügung stehenden Mitteln Sensoren herzustellen, welche all diesen hohen Ansprüchen genügen. Begrenzter Selektivität des Sensorsignals kann durch Einsatz von Sensorarrays⁸ mit nachgelagerten mathematischen Programmen gegengesteuert werden. Anstatt auf eine Schicht zu vertrauen werden mehrere, mit unterschiedlichen Selektivitäten, eingesetzt. Bei der

komplexen Signalauswertung kommen chemometrische Methoden⁹ wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA) oder Neuronale Netze¹⁰ zur Anwendung.

2.3 Anwendungsgebiete

Die meisten erhältlichen Sensoren basieren auf der Änderung einer elektrischen Eigenschaft. Der wohl bekannteste, am weitest verbreitete Sensor ist die Lambda Sonde¹¹. Seit ~1980 werden Ottomotoren serienmäßig mit der Sauerstoffsonde ausgestattet. Der Sauerstoffgehalt der Abgasluft wird kontinuierlich durch ein potentiometrisches Messverfahren überwacht. Weicht das Verhältnis von Luft/Kraftstoff vom theoretischen Wert ab, welcher zur optimalen, umweltschonenden Verbrennung führt, so regelt der Sensor die Sauerstoffzufuhr neu. Auf diese Weise gelingt es die Atmosphäre jährlich vor Tonnen von umweltschädigenden Schadstoffen wie Kohlenmonoxide, Stickoxide und Kohlenwasserstoffe zu verschonen.

Auf Basis der Potentiometrie arbeiten ebenso die vielfältigen Ionenselektiven Elektroden,¹² welche etwa zur Bestimmung von Schwermetallen in Gewässern oder zur Alkali/ Erdalkalierfassung im Blut herangezogen werden können. Besonders in Japan hat sich der von N.Taguchi entwickelte „Figaro“ Sensor zum Monitoring reduzierender Gase durchgesetzt.

Wegen der hohen Selektivität setzen viele Biosensoren auf Enzyme als Wechselwirkungspartner. So wurde bereits 1987 ein Blutzuckermessgerät zum Selbstgebrauch eingeführt (Exactech, Fa.Medisense)¹³. Die Glucoseoxidase verbraucht bei der Umsetzung des Monosaccharids Sauerstoff. Dessen Abnahme ist demnach direkt proportional zum Glucosegehalt im Blut.

Optische Sensoren welche die Änderung der Absorption der direkt oder indirekt aufzeichnen sind vor allem aus biochemischen Fragestellungen nicht mehr wegzudenken. Besonderer Beliebtheit erfreut sich die Methode der Surfaceplasmonenresonanz, kurz SPR¹⁴. Wird auf eine etwa 80nm dünne Goldoberfläche polarisiertes Licht eingestrahlt, so wird ein Teil der Energie in Plasmonenschwingungen übertragen. Die Intensität des reflektierten Strahls hängt ganz empfindlich vom Streuwinkel und vom Brechungsindex der angrenzenden Phase

ab. Werden Antikörper kovalent gebunden, kann so über eine Änderung des Brechungsindex das zugehörige Antigen bestimmt werden. Auf diese Weise lassen sich auch Komplexbildungskonstanten derartiger Wechselwirkungen auf bequeme Weise ermitteln¹⁵.

Die nachfolgende Tabelle fasst die derzeit im Einsatz befindlichen Chemosensoren und deren Wirkprinzipien zusammen.

Tab. 1: Sensortypen mit den zugehörigen Wirkprinzipien¹⁶

Wirkprinzip des Sensors	Sensortyp
Leitfähigkeitsänderung	Metalloxid-Halbleiter, Organische Halbleiter
Potentialänderung	ISE, Festkörper-Gassensoren, Feldeffekttransistoren
Stromänderung	Amperometrie (CLARK ¹⁷ - und Enzymelektroden, Immunsensoren, Festelektrolytsonden)
Resonanzfrequenzänderung	Piezoelektrische Waage, SAW-Oberflächenakustische Wellen
Änderung optischer Größen	Transmission/Absorption, Trübung, Remission, Fluoreszenz, Lichtbrechung
Optothermische Wechselwirkungen	Photoakustischer Sensor
Wärmeeffekte	thermische/kalorimetrische Sensoren, Pellistoren

2.4 Zielsetzung

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Fertigung und den Anwendungsmöglichkeiten von massensensitiven Hefesensoren. Die durch Oberflächenprägung von verschiedenen Polymerbeschichtungen hergestellten Biosensoren sollten bezüglich ihrer Selektivitäten gegenüber Hefezellen verschiedener Entwicklungsstadien untersucht werden. Es sollte im Speziellen ein anzutreffendes

anomales Verhalten, welches zur gegebenen Zeit noch nicht durch die Theorie beschrieben werden kann, einer genaueren Untersuchung unterzogen werden.

Ob das Prinzip der massensensitiven Detektion auf Mikroorganismen der Gattung *Escherichia Coli* übertragbar ist sollte im Zuge des zweiten Teils beantwortet werden. Hintergrund ist die Beteiligung an einem EU-weiten Projekt. Ziel von „Nanosecure“, ProjektID NMP3-CT-2007-026549 ist die Frage nach der Machbarkeit eines Detektionsnetzwerks für biologische und chemische Gefahrenpotentiale.

3 Massensensitive Sensoren

3.1 Einführung

Massensensitive Sensoren arbeiten auf der Grundlage von Schwingquarzen¹⁸. Unter Schwingquarz wird ein dünnes Quarzglasplättchen verstanden, welches bei geeigneter Wechselspannungsfrequenz vibriert. Schwingquarze finden in der Elektronik und Elektrotechnik schon seit langer Zeit Anwendung. Wegen ihrer hohen Frequenzschärfe werden sie etwa als Taktgeber in Oszillatoren eingesetzt. Wird an eine Seite des Quarzes eine selektive Schicht über der Elektrode aufgebracht, so kann das Bauteil als Sensor fungieren. Die Schwingungsfrequenz ist empfindlich von der Masse der Schicht abhängig. Ein/Auslagerung eines nachzuweisenden Stoffes führt demnach zu einer Änderung der Frequenz (=Signal).

3.2 Der piezoelektrische Effekt

Als piezoelektrischer Effekt¹⁹ wird das Ausbilden einer elektrischen Spannung bei angelegtem mechanischen Druck verstanden. Entdeckt und beschrieben wurde das Phänomen bereits im Jahr 1880 von Pierre und Jaques Currie. Bekannte piezoelektrische Verbindungen sind Turmalin, Zinkblende, Lithiumniobat, Bariumtitanat, und, der in dieser Arbeit Verwendung findende, Quarz²⁰ der α -Modifikation. Damit es zum Ausbilden einer Spannung kommen kann, muss das Kristallgitter ganz bestimmten Voraussetzungen genügen. So muss der Kristall (das Gitter) zumindest eine polare Achsen bzw. kein Inversionszentrum besitzen. Eine polare Achse ist dadurch gekennzeichnet dass der Kristall nach einer 180°-Drehung um eine zur polaren Achse, senkrechten Symmetrieachse, nicht mit sich selbst zur Deckung gebracht werden kann. Bei Druck entsteht durch Ladungsverschiebung ein Dipolmoment in, oder senkrecht zur, Richtung der polaren Achse, welches proportional zur, der durch die Kraft erzeugten, Deformation ist (Abb. 2). Es erfolgt demnach eine direkte Umwandlung von mechanischer in elektrische Energie. Die Quarzmikrowaage wird in umgekehrter Richtung betrieben. Durch Anlegen einer Spannung deformiert der Quarz (Elektrostrikction).

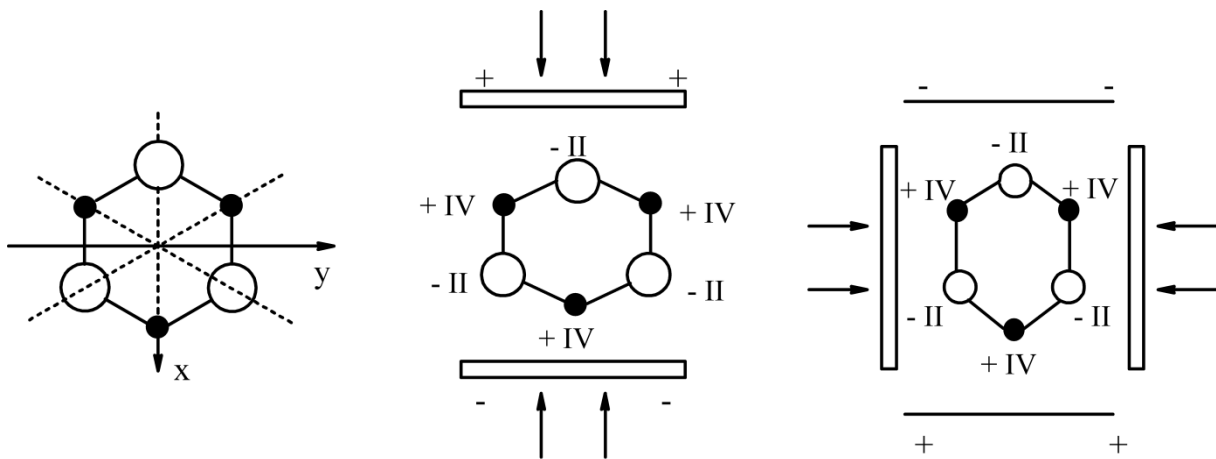


Abb. 2: Der piezoelektrische Effekt kommt durch Verschiebungen der Siliziumatome (Punkte) und Sauerstoffatome (Kreise) entlang einer Achse zustande. Für die Sensorik wird die Elektrostriktion genutzt: Durch eine angelegte Wechselspannung wird im Resonanzfall eine stehende Welle ausgebildet.

3.3 Schwingquarze

Werden auf das Glasplättchen Elektroden aufgebracht, kann über eine elektrische Kontaktierung eine Spannung angelegt werden. Die Wechselspannung und die Deformation im Quarz führen im Resonanzfall zur Ausbildung einer stehenden Welle im Quarzmaterial. Resonanz tritt immer dann ein, wenn der doppelte Elektrodenabstand ein ungeradzahliges Vielfaches der Wellenlänge beträgt:

$$2d = (2n + 1)\lambda \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad \text{Gl. 1}$$

Der Zusammenhang zwischen der Resonanzfrequenz und dem Abstand der Elektroden lautet

$$\nu_0 = \frac{\nu}{2d} = \frac{N}{d} \quad \text{Gl. 2}$$

ν_0 Grundfrequenz

ν Schallgeschwindigkeit im Quarz ($c_{\text{Qu}} = 3340 \text{ m s}^{-1}$)

d Elektrodenabstand (Dicke des Plättchens)

N Frequenzkonstante (AT-Quarz: $N = 1670 \text{ Hz m}^{-1}$)

Aus der Gleichung ergibt sich für einen Quarz mit einer Grundfrequenz von 10 MHz eine Dicke von 168 μm . Die Oberschwingungen sind nach Gleichung 1 bei 30, 50, 70 MHz zu finden. Die, sich vorzugsweise ausbildenden, Schwingungsformen hängen von Faktoren wie Schnittwinkel und Elektrodengeometrie ab¹⁸. Die Frequenzen nehmen in der Reihe Biege-, Dehnungs-, Flächenschers- und Dickenscherschwingung zu.

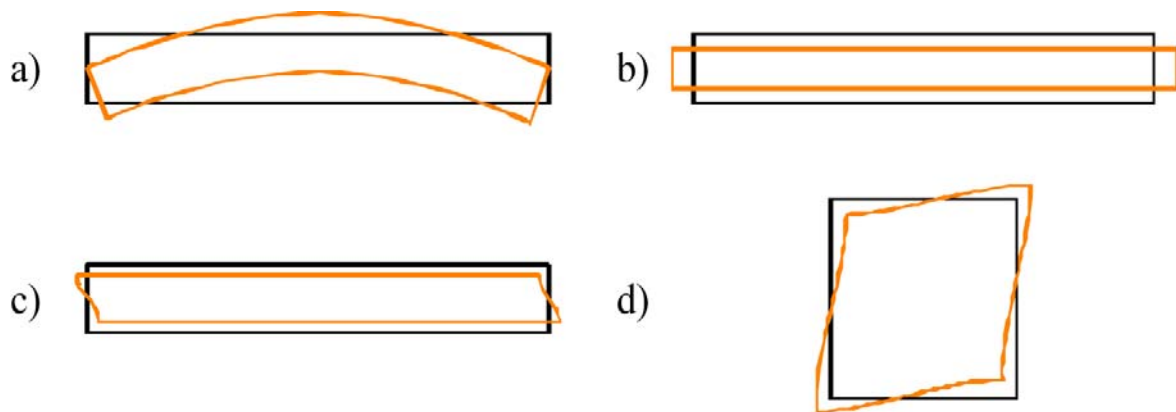


Abb. 3: Mögliche Schwingungsformen des Quarzsubstrats

- a) Biegeschwingung b) Dehnungsschwingung
c) Dickenscherschwingung d) Flächenscherschwingung

Im Gegensatz zu den, ebenfalls massenempfindlichen, SAW-Bauteilen²¹ (SAW: Surface Acoustic Wavelength) breitet sich die Welle durch den gesamten Kristall aus. Als polymorphes Material tritt Quarz in mehreren unterschiedlichen Modifikationen auf. Für den Einsatz als Substrat für einen massensensitiven Chemosensor kommt einzig die α -Form in Frage. Nur in dieser Kristallstruktur zeigt Quarz piezoelektrische Eigenschaften. Oberhalb von etwa 570°C findet die langsame Umwandlung in die, nicht piezoaktive, β -Form statt. Technisch hergestellt werden die Quarzplättchen indem aus einem natürlichen, oder häufiger, gezüchteten Quarzkristall die Scheibe in einem bestimmten Winkel herausgeschnitten wird. Wenngleich alle Formen der Bewegung zur massensensitiven Detektion beschränkt geeignet sind, wird fast ausschließlich die Dickenscherschwingung (TSM) herangezogen.

Um gezielt die „thickness shear mode“ (TSM) anzuregen, werden die Quarze im AT-cut herausgeschnitten. Vorzüge der Dickenscherschwingung sind hohe Massenempfindlichkeit sowie niedrige Druck- und Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz.

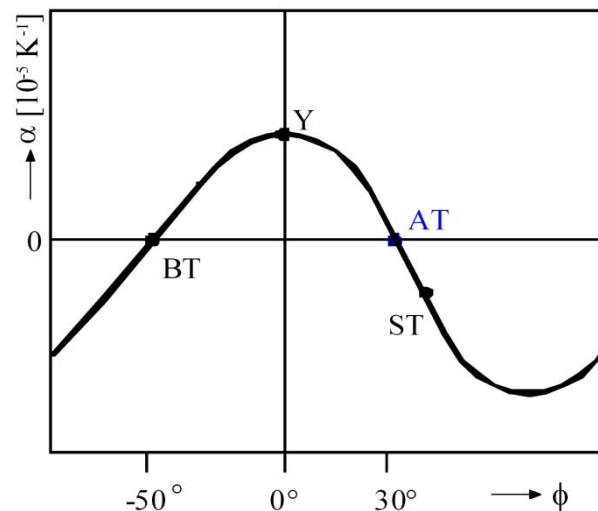


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit der Quarzschnitte. Beim AT-Cut ist der lineare Temperaturkoeffizient gleich 0.

3.4 Sauerbreygleichung

Nach Gleichung 1 ist die Wellenlänge und damit auch die Frequenz von dem Abstand zwischen den Elektroden abhängig. G. Sauerbrey zeigte bereits 1958 dass eine Änderung der Dicke formal mit einer Änderung der Masse gleichgesetzt werden kann²².

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta d}{d} = -\frac{\Delta m}{\rho A d} \quad \text{Gl. 3}$$

Δf Frequenzänderung (Hz)

f_0 Grundfrequenz (Hz)

d Dicke des Quarzes (m)

Δm Massenänderung (kg)

ρ Dichte der Schicht (kg/m³)

A Elektrodenfläche (m²)

Gleichung 3 kann mit Hilfe von Gleichung 2 umgeformt werden zu

$$\Delta f = -2f_0^2 \frac{\Delta m}{\rho c A} \quad \text{Gl. 4}$$

Die Änderung der Frequenz bei Massenbelegung ist demnach direkt proportional zum Quadrat der Grundresonanzfrequenz. Verdoppelung der Grundfrequenz führt zu vierfacher Empfindlichkeit. Der 10 MHz Quarz mit einer Dicke von 168 μm bietet einen guten Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und Handhabung. Die erreichbare Nachweisgrenze liegt bei etwa 10^{-9} g/cm^2 . Die Amplitude der Massenempfindlichkeit ist gaußförmig über die Elektrodenoberfläche verteilt. Der Wert ist über die Elektrodenoberfläche gemittelt.

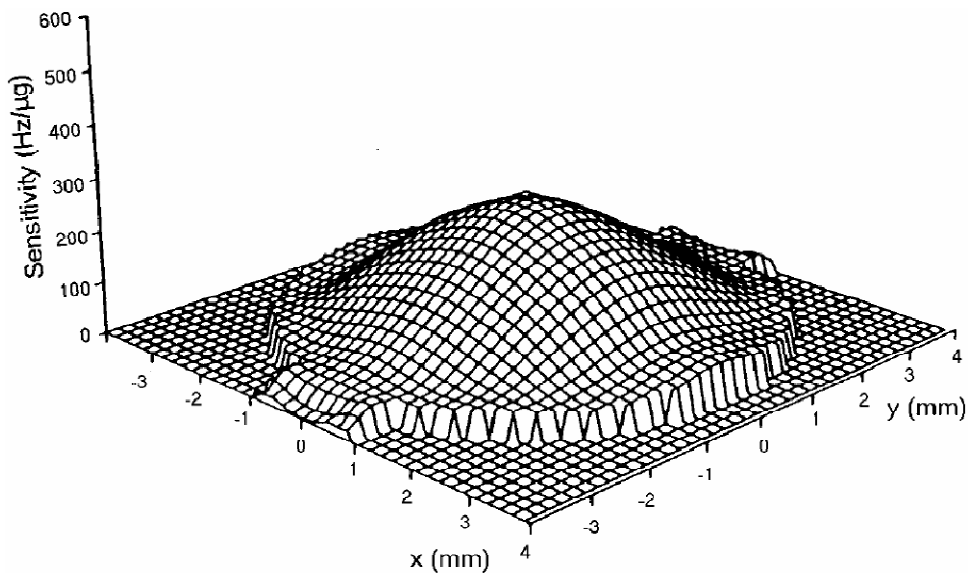


Abb. 5: Die Massenempfindlichkeit über der Elektrodenoberfläche folgt einer Gaußverteilung²³.

Eine wesentliche Sensitivitätssteigerung kann durch den Einsatz von Oberflächenwellenresonatoren erreicht werden. Die SAW Quarze besitzen Grundfrequenzen bis in den Gigahertzbereich. Die Oberflächenwellen erzeugt man durch photolithographisch aufgebrachte, kammartig ineinandergreifende Fingerelektroden (IDT: Interdigital Transducer). Die Steigerung der Grundfrequenz ist von einem Anstieg des Rauschens begleitet. Das Hintergrundrauschen selbst steigt allerdings bloß linear mit der Frequenz an. Die technischen Daten der eingesetzten Bauteile fasst Tabelle 2 zusammen.

Tab. 2: Technische Daten der eingesetzten Quarzsubstrate. Die Frequenzauflösung bezieht sich auf die Gasphase. In der flüssigen Phase ist dieser Wert stark von der Oberflächenbeschaffenheit abhängig.

Eigenfrequenz	10 MHz	Frequenzauflösung	± 0.1 Hz
Resonatordicke	168 µm	Massensensitivität	951 Hz µg ⁻¹
Elektrodenoberfläche	0.24 cm ²	Nachweisgrenze	0.6 ng
Durchmesser	15,5 mm	Schichtdickeneffekt (für ρ ≈ 1 g/cm ³)	40 nm kHz ⁻¹

3.5 Schwingquarze in flüssiger Phase

Für beschichtete Elektroden ist die Gültigkeit der Sauerbreygleichung nur für rigide, glatte, fest an der Oberfläche haftende Coatings gewährleistet. Soll der Sensor in flüssiger Phase betrieben werden, so erfolgt beim Eintauchen eine Frequenzänderung²⁴:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_l \rho_l}{\pi \rho_q \mu_q}} \quad Gl. 5$$

ρ_l Dichte der Flüssigkeit (kg/L)

η_l Viskosität der Flüssigkeit (m² s⁻¹)

μ_q Schermodul des Quarzes [2,947*10¹¹ g/(cm s²)]

Dieser, 1984 von Kazanawa gefundenen Sachverhalt berücksichtigt ein Mitschwingen der Flüssigkeit in der Nähe der Beschichtung. Die abklingende Scherwelle in der flüssigen Phase erhöht die Dämpfung des Quarzes bei gleichzeitiger Verringerung der Resonanzfrequenz. Die mitschwingende Flüssigkeit kann als zusätzliche Masse betrachtet werden. Wieder ist die Gleichung nur für glatte Oberflächen gültig, da jede Rauheit das Verhalten der mitschwingenden Flüssigkeit beeinflusst. Die Dicke der mitschwingenden Schicht ergibt sich zu

$$d_s = \sqrt{\frac{\eta_l}{\pi \rho_l f_0}} \quad Gl. 6$$

Zu berücksichtigen ist bei Messungen in der flüssigen Phase die Temperaturabhängigkeit der Viskosität der Flüssigkeit. Mit steigender Temperatur sinkt im Allgemeinen die Viskosität. Geringere Viskosität bedeutet nach Gleichung 5 ein Ansteigen der Frequenz. Der von Sauerbrey gefundene Zusammenhang zwischen Massenbelegung und Frequenzänderung muss um einen Term, der die Dichte und Viskosität der benetzenden Flüssigkeit berücksichtigt, erweitert werden:

$$\Delta\nu = -2,26 * 10^{-6}(\nu_0^2\Delta m + \nu_0^{3/2}\sqrt{\Delta\eta_l\rho_l}) \quad Gl. 7$$

Als Problem in der Praxis erweist sich zuweilen die, durch die Beladung auftretende, stärkere Dämpfung der Schwingung. Die Quarzschwingung selbst wird über Rückkopplung mit einer Oszillatorschaltung verstärkt (siehe Kap.5.4). So ist es möglich noch stark gedämpfte Schwingungen bis zu etwa 15dB auszulesen. Mit steigender Abschwächung der Schwingung nimmt allerdings das Rauschen zu.

4 Wechselwirkung Schicht-Analyt

4.1 Einführung

Für die Weiterentwicklung der massensensitiven Chemosensorik, ist die Entwicklung auf der Erkennungsebene ganz wesentlich. Unabhängig von der nötigen Selektivität muss die Schicht einer ganzen Reihe von physikalischen Ansprüchen genügen. Dazu gehören thermische Stabilität wie Resistenz gegenüber milden Agenzien. Die Auswahl der Schicht wird an den jeweiligen nachzuweisenden Analyten angepasst. So kann bei Molekülen die Eigenschaft einer funktionellen Gruppe, sofern Vorhanden, für die selektive Erkennung ausschlaggebend sein. Die Anlagerung kann beispielsweise über koordinative Wechselwirkungen erfolgen. Verfügt der Analyt über ein freies Elektronenpaar (Lewis Base) können mit Metallionen (Lewis Säuren) der Schicht starke Komplexbindungen ausgebildet werden. Vielfach wird die Wechselwirkung nicht über wenige starke, sondern über eine Vielzahl schwacher Bindungen übertragen. Dieses Konzept ist bestens aus biologischen Systemen bekannt. DNA-DNA, Enzym-Substrat und Antigen-Antikörper Bindungen sind eine Auswahl der in der Natur vorkommenden Beispiele.

4.2 Supramolekulare Chemie

Die höchste Selektivität zwischen sensibler Schicht und Analyt kann durch den Einsatz von natürlichen Antikörpern erreicht werden. Diese Form der Bindung findet besonders in der Surface Plasmonenresonanz Anwendung²⁵. Eine Anlagerung an die Goldoberfläche wird über aurophile Mercaptofunktionen erreicht. Der hohen Selektivität stehen allerdings auch Nachteile gegenüber. Ein Sensor basiert auf einer reversiblen Wechselwirkung. Ergeben die einzelnen schwachen Wechselwirkungen in Summe eine zu starke Bindung, so ist die Reversibilität nicht mehr gewährleistet. Das Bauteil fungiert dann nicht als Sensor sondern als Dosimeter. Desweiteren ist der Einsatz von Antikörpern mit hohem Zeit und Kostenaufwand verbunden.

Eine zukunftsweisende Strategie ist die Supramolekulare Chemie²⁶. Auf Grundlage des Gast - Wirt Prinzips lassen sich aus Monomeren polymere Strukturen erzeugen, die eine dem Analyten angepasste Geometrie besitzen. Bestens bekannt sind Cyclodextrine (CD)^{27,28}, welche aus sechs (α -CD), sieben (β -CD) oder acht (γ -CD) 1,4-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten ringförmig aufgebaut sind. Diese Verbindungsklasse wird in vielen verschiedenen Bereichen der Industrie eingesetzt: Durch den Einschluss von Aromastoffen helfen sie die Stabilität von Lebensmittel zu erhöhen. Da sämtliche Hydroxygruppen der CD's nach außen gerichtet sind, können sie in ihrem Inneren eine Reihe von apolaren Stoffen binden und so zu deren Löslichkeit beitragen. Bei zusätzlich vorhandenen funktionellen Gruppen am Monomer kann die Selektivität noch deutlich gesteigert werden. Die Substanzklassen der Cyclophane²⁹ und Calixarene³⁰ sind weitere Beispiele für Hohlraumbildende zyklische Verbindungen. Um für einen Einsatz als Schichtmaterial geeignet zu sein, müssen die Substanzen mit und ohne Änderung der Konformation in die Schicht eingelagert werden können. Eine Spezialfall der Supramolekularen Chemie sind molekular geprägte Polymere (MIPs).

Tab. 3: Wechselwirkungen, Bindungsenergien und Abstandsabhängigkeit.

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

4.3 Molecularly Imprinted Polymeres (MIPs)

Als Erfinder des molekularen Prägens gilt Polyakov^{31,32,33}. Bereits in den 1930er Jahren untersuchte er die selektive Einbindung verschiedenster Analyte in eine Silikatmatrix. Linus Pauling^{34,35} postulierte 1940, dass durch Prägeprozesse die Selektivität von Antikörpern erreicht werden könne. Der Durchbruch gelang durch die Arbeiten von Wulff³⁶ und Mosbach³⁷ in den 70er Jahren. Sie beschrieben die Bildung von selektiven Kavitäten in hochvernetzte Polymersysteme. Werden als Templat Moleküle verwendet, so wird zur Synthese der Analyt der Monomerlösung beigemengt. Nach dem Aushärten des Polymers wird dieser, möglichst quantitativ, aus der Schicht entfernt. Auswaschen mit geeigneten Lösungsmitteln oder, bei flüchtigen Verbindungen, Erhöhung der Temperatur kann den Analyten aus der Schicht verdrängen. Zurück bleiben entsprechende Hohlräume (Wirt-Gast-Chemie^{38,39}).

4.4 MIPs und ganze Organismen

Das Prinzip der molekularen Prägung kann auf große Bioanalyte wie Viren und Zellen ausgeweitet werden^{40,41}. Bei größeren Analyten ist das Bulk-Imprinting, das Zufügen des Analyten zur Monomerlösung, aber oft nicht zielführend. Nach dem Polymerisieren und Aushärten der Schicht ist es nicht möglich das Templat aufgrund der Größe zu verdrängen. Als Alternative hat sich die Behandlung der Oberfläche mit einem Stempel bewährt⁴². Dabei wird ein Vorpolymerisat auf die Goldoberfläche aufgetragen. Um eine möglichst homogene Schicht zu erhalten wird die Lösung mit Hilfe eines „spin-off“ Prozesses verteilt. In das, noch weiche Polymer wird der Stempel gepresst. Nach Aushärten des Polymers wird der Stempel entfernt (Abb. 6). Je nach Polymer wie Analyt bleiben auf der Oberfläche Abdrücke oder das verankerte Templat zurück. Für den letzteren Fall muss vor einem Einsatz des Sensors das Templat verdrängt werden. Verschiedene Praktiken wie Ultraschallbadbehandlung oder das Verwenden von diversen Detergenzienlösungen kommen zum Einsatz.

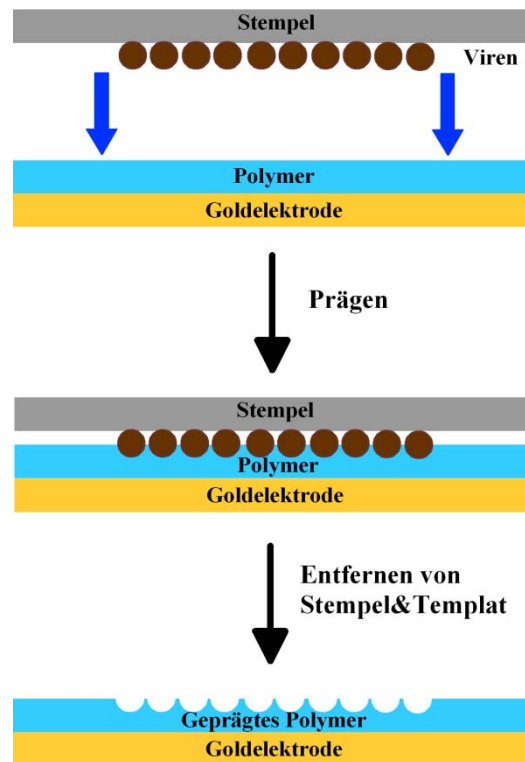


Abb. 6: Oberflächenprägung von Schichten mittels Templatstempel. Gemeinhin muss das Templat nach Ablösen des Stempels aus den Kavitäten verdrängt werden. Auf der Oberfläche bleiben Abdrücke in welche sich der Analyt selektiv einlagert.

Die für die Selektivität verantwortliche Erkennung erfolgt auf zwei unterschiedlichen Ebenen. Der geometrische Fit spiegelt die Größenverhältnisse des Analyten wieder. Dabei spielt die Form - kugelförmig, stäbchenförmig etc. – ebenso eine Rolle wie das Verhältnis zwischen Kavität und Analyt. Weicht das Verhältnis Kavität/Analyt von 1 ab, wird der Analyt nicht oder nur wenig eingelagert. Bei einem Verhältnis von über 1, Größe des Analyten unter derjenigen der Kavität, kann es zusätzlich zu einer nichtklassischen Erhöhung der Frequenz kommen. Neben diesem geometrischen Merkmal hinterlässt der Analyt auf der Oberfläche auch eine chemische Information. Während des Aushärtens lagern sich die noch beweglichen Polymerketten in energetisch günstigster Weise an die Oberfläche des Analyten. Dabei kommt es zur Ausbildung von schwachen chemischen Bindungen aller Art (Tab. 3).

5 Fertigung und Analyse der Sensoren

5.1 Elektroden

Für Messungen in der Gasphase können zwei 5mm große, sich überdeckende kreisförmige Goldstrukturen verwendet werden. Für Flüssigphasenmessungen wird eine der Elektroden verkleinert (3mm).



Abb. 7: Der Quarz wird für Flüssigphasenmessungen mit zwei ungleich großen gegenüberliegenden Elektroden beschichtet.

Beide größeren Elektroden werden mit dem Polymer beschichtet. Bloß eine der beiden wird geprägt. Die ungleich großen Elektroden haben einzig den Grund Frequenzänderungen, welche etwa von geänderter Ionenstärke der Lösung rühren, zu vermindern. Die Grundresonanzfrequenz reagiert empfindlich auf in der Lösung befindliche Ionen und Ladungen: Die beiden metallischen Schichten sind im Grunde wie ein Kondensator aufgebaut. Wie jeder Kondensator befinden sich zwischen den Elektroden Feldlinien. Die Linien nehmen nicht nur den direkten Weg zwischen den Elektroden, sondern biegen sich in die Flüssigkeit. Gelöste Ionen beeinflussen deren Ablenkung, das Ausmaß der Ablenkung hat wiederum Einfluss auf die Frequenz⁴³. Während einer Messung muss demnach darauf geachtet werden dass die Ionenstärke, bzw. die Dielektrizitätskonstante der Lösung möglichst konstant bleiben. Die zweite, unbehandelte Elektrode fungiert als Referenz. So kann durch Bilden des Differenzsignals der beiden Seiten ein Großteil der unselektiven Frequenzantworten ausgefiltert werden. Das beinhaltet unspezifische Adsorption des Analyten oder sonstiger Matrixkomponenten, die oben angeführten Feldlinieneffekte oder auch Temperaturschwanken. Bei einem Anstieg der Temperatur sinkt die Viskosität was eine Zunahme der Frequenz zur Folge hat (Abb. 8).

Ein Großteil des Anstiegs rührt von der verringerten Viskosität der Flüssigkeit, ein kleiner von der Temperaturabhängigkeit des Substrats selbst.

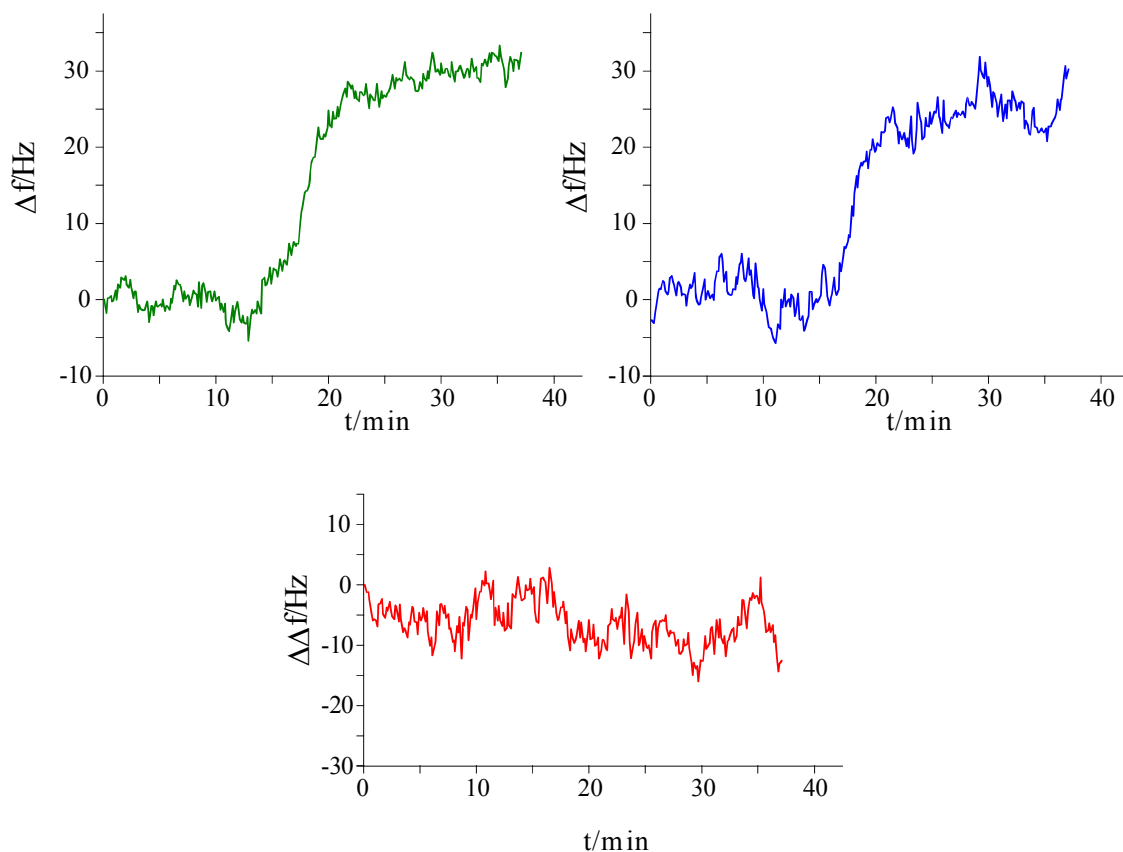


Abb. 8: Frequenzverlauf der beiden, voneinander unabhängig schwingenden Elektroden bei einem Anstieg der Temperatur von 20°C auf 35°C. Grün und Blau sind die beiden unabhängig voneinander schwingenden Seiten. Rot zeigt den Verlauf des Differenzsignals.

Zwei Elektroden auf einen Quarz zu betreiben birgt jedoch auch Nachteile praktischer Art. Durch die räumliche Nähe der beiden vibrierenden Zonen kann es während der Messung zu einem Übersprechen kommen. Die beiden Seiten, Referenz und geprägte, schwingen in diesem Fall mit derselben Frequenz. Das Auftreten hängt von der Differenz der beiden Schwingungsfrequenzen sowie von deren Dämpfung ab. Liegen die Frequenzen nahe beieinander und ist eine der beiden stärker ausgeprägt (geringere Dämpfung), so ist ein Übersprechen möglich.

5.2 Siebdruckverfahren

Die Goldelektroden können verschiedenartig auf die Oberfläche des Quarzes gebracht werden. Unter Einsatz eines Sputters kann das Gold aufgedampft werden. Man erhält äußerst homogene und dünne Schichten. Als Nachteil machen sich die geringe Haltbarkeit und der hohe Materialverbrauch bemerkbar.

Ökonomischer und auch praktischer ist das Siebdruckverfahren. Hier wird der Quarz durch ein feinporöses Sieb mit einer kolloiden Goldlösung bestrichen. Das Sieb selbst hat eine Maschenweite von etwa $30\mu\text{m}$. Das Negativ der Elektrodenstruktur erzeugt man photolithographisch: Zunächst wird die Fläche des Siebes homogen mit positivem Photolack beschichtet. Der getrocknete Film wird in einer UV-Lichtkammer mit einem Ausdruck der Struktur für ~ 15 sek. belichtet. Aus dem rundum ausgehärteten Film kann die Elektrodenvorlage mit warmem Wasser ausgespült werden. Mit einer Rakel kann die Goldpaste anschließend durch die Poren hindurch über den Quarz verteilt werden. Der Quarz selbst wird dabei durch ein von unten angelegtes Vakuum fixiert (Abb. 9).

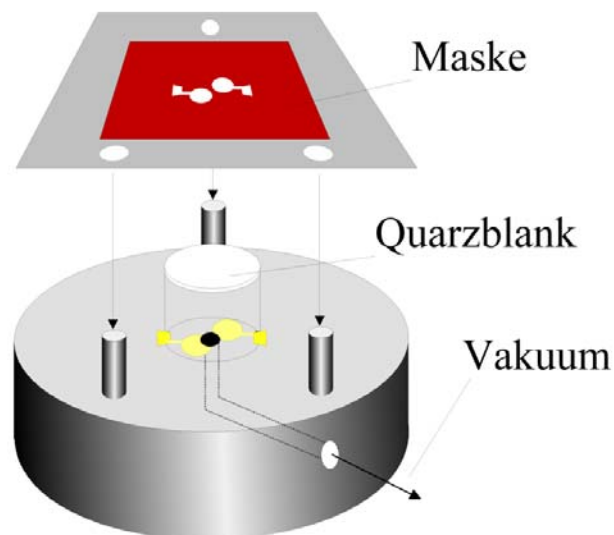


Abb. 9: Das Siebdruckverfahren im Überblick. Durch die Maske wird die Goldglanzpaste auf den Quarz aufgebracht. Angelegtes Vakuum fixiert das Quarzsubstrat.

Der bestrichene Quarz wird für mindestens 2 Stunden für 400°C im Ofen belassen. Die organischen Lösungsmittel pyrolysieren und verdampfen, das kolloidal verteilte Gold bildet eine stabile Schicht von etwa 150 nm Dicke. Die Rauheit der Oberfläche liegt bei ca. 40 nm und darunter.

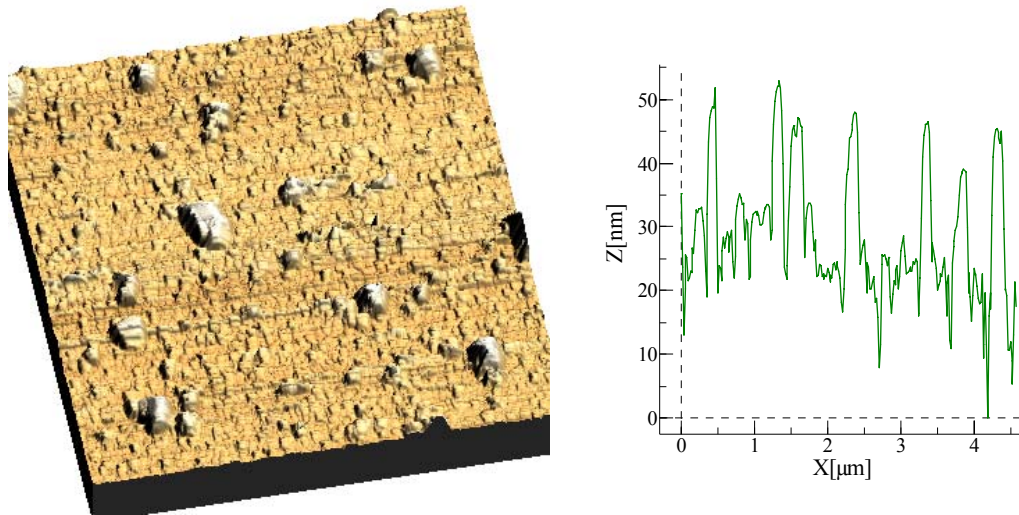


Abb. 10: AFM-Aufnahme einer unbeschichteten Goldelektrode. Eine Goldglanzpaste wurde mit Siebdruck aufgetragen und bei 400°C für 2 Stunden gebrannt. Die Oberfläche hat eine mittlere Rauigkeit von rund 40 nm.

5.3 Netzwerkanalysator

Die Qualität eines jeden Quarzes wird vor dessen Einsatz geprüft. Am besten dafür eignet sich der Netzwerkanalysator. Über Klammern werden die Elektroden des Quarzes angeschlossen. Das Gerät speist innerhalb einer bestimmten (variierbaren) Spannweite Frequenzen ein und liest die Dämpfung ($\cong$ Widerstand) aus. Man erhält demnach ein Frequenz vs. Dämpfungs-Spektrum. Zusätzlich lässt sich die Phase bzw. deren Änderung in der Nähe der Resonanzfrequenz aufzeichnen und interpretieren (Abb 11.).

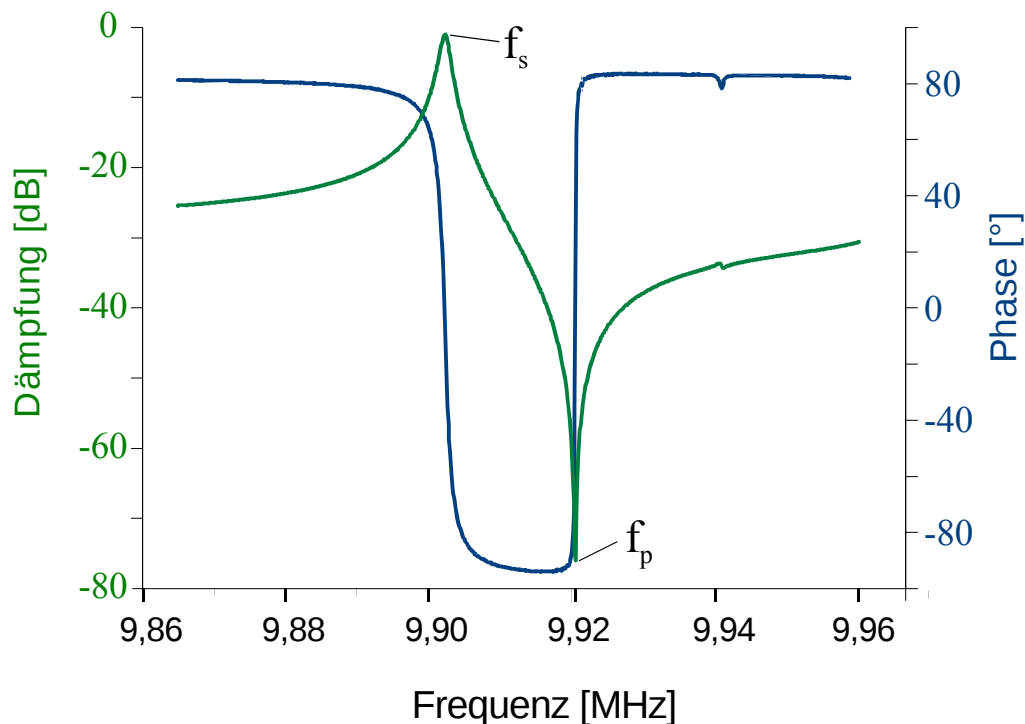


Abb. 11: Netzwerkanalysatorspektrum eines unbeschichteten 10 MHz Resonators an Luft. Zwei signifikante Frequenzen sind auszumachen. Eine minimaler (serielle Resonanzfrequenz), eine maximaler Dämpfung (parallele Resonanzfrequenz).

Die Dämpfung ist ein in der Elektronik und Akustik übliches Maß zur Erfassung der Abschwächung eines Signals mit der Einheit Dezibel:

$$dB = 20 * \log \frac{U_{in}}{U_{out}} \quad Gl. 8$$

U_{out} Ausgangsspannung

U_{in} Eingangsspannung

Eine geringe Dämpfung bedeutet demnach ein hohes Ausgangssignal, was in Bezug auf Auslesen der Frequenz und Signal/Rausch-Verhältnis wünschenswert ist, und damit ein Maß für die Güte des jeweiligen Bauteils darstellt. An der, beim Experiment zum Aufzeichnen der Frequenz verwendeten, Oszillatorschaltung können Dämpfungen bis hinab zu etwa -15dB noch verstärkt und ausgelesen werden. In Wasser nimmt das Spektrum denselben Verlauf wenngleich die beiden Extrema weniger stark ausgebildet sind. Bei Wechselspannungen fernab der Resonanzfrequenzen verhält sich der Quarz wie ein gewöhnlicher Plattenkondensator mit einer Phasenverschiebung von 90° (Abb. 11).

Ein weiterer, in der Literatur oft anzutreffender Wert ist der Q-Faktor. Definiert als

$$Q - \text{Faktor} = \frac{f_0}{\Delta f_{s-p}/2} \quad \text{Gl. 9}$$

Die Q-Faktor Werte der eingesetzten Quarze liegen im Bereich von etwa 1000, was einem Qualitätsgütesiegel gleichkommt. Aus Abb.11 werden zwei signifikante Punkte der Frequenz ersichtlich. Ein Punkt minimaler, ein Punkt maximaler Dämpfung an dem die Phase jeweils den Nullwert durchläuft. Zur Beschreibung des Sachverhalts wird das Ersatzschaltbild herangezogen.

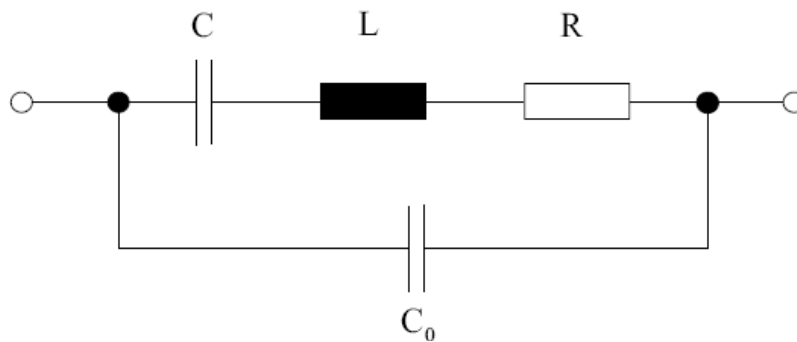


Abb. 12: Butterworth - van Dyke Modell des Resonators.

Das Butterworth - van Dyke Modell bezieht alle zu berücksichtigenden relevanten Eigenschaften des Schwingquarzes ein: Mechanische Elastizität des Materials (C); schwingende Masse (L); Widerstand, hervorgerufen durch den Quarz selbst, Viskosität des umgebenden Mediums sowie von den Zu- und Ableitungen (R); statische Kapazität der Elektroden selbst (C_0). Die zugehörige Differentialgleichung ergibt zwei Lösungen, die serielle (Gl. 11) und parallele Resonanzfrequenz (Gl. 12). Gleichung 11 geht für den Fall C_0 gegen unendlich in Gleichung 10 über.

$$v_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \quad \text{Gl. 10}$$

$$v_p = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \sqrt{1 + \frac{C}{C_0}} \quad \text{Gl. 11}$$

5.4 Oszillatorschaltung

Dämpfung, Resonanzfrequenz oder Q-Faktor können bequem aus dem Netzwerkanalysator ausgelesen werden. Zum Aufzeichnen der Frequenz während einer Messung ist es aber nicht zuletzt aus Kostengründen ungeeignet. Besonders das hohe Rauschen von etwa 100 Hz erweist sich als Nachteilig. Während der Messung kommt daher eine Oszillatorschaltung zum Einsatz. Diese wird ausgehend von einer Leiterplatine selbst hergestellt.

5.4.1 Fertigung

Die mit Photofilm beschichtete Platine wird mit einem Ausdruck der Leiterbahnen für 5 min. belichtet (UV-Kammer). Die dem Licht ausgesetzten Bereiche des Lacks werden anschließend mit 10%iger NaOH-Lösung abgelöst. Die freigesetzte Metallschicht wird nach diesem Entwicklungsschritt elektrochemisch geätzt. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (25% in Wasser) oxidiert das Kupfer ohne die, noch mit Photolack bedeckten, Leiterbahnen anzugreifen. Nach rund 45min. bei 30°C wird die Platine mit Aceton gespült. Der restliche Lack löst sich und übrig bleiben die Kupferbahnen. Nach Auftragen von Lötlack, welcher das Kupfer vor Oxidation schützt, können die Bauteile aufgelötet werden (Abb. 13)

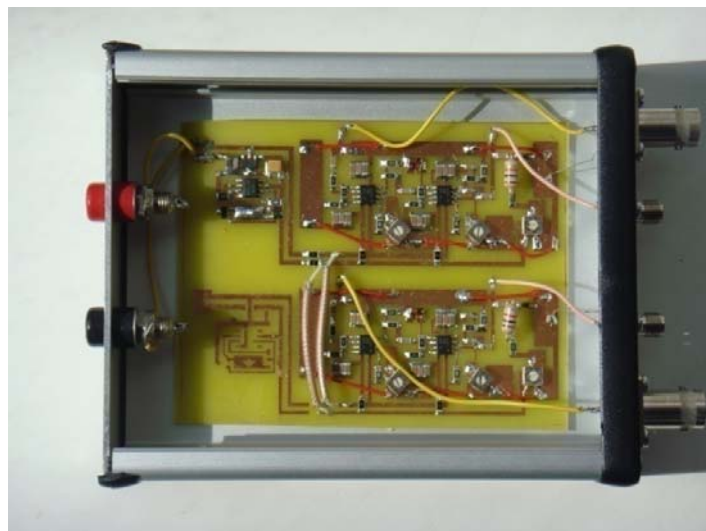


Abb. 13: Fertige Schaltung. Zur Abschirmung gegenüber äußerer Strahlung in Aluminiumummantelung.

5.5 Messzelle

Für Flüssigphasenmessungen wird eine eigens entwickelte Messzelle verwendet. Ein, aus Polyacrylat bestehendes Gehäuse fasst eine PDMS Form in welche der Quarzsensoren gespannt wird. Die Verwendung von PDMS bietet mehrere Vorteile. So kann das Flüssigkeitsvolumen der Messung angepasst werden. Stellt der Analyt keinen limitierenden Faktor dar wird mit einer 150 μL Kammer gearbeitet. Das Volumen kann je nach Gußform bis hinab zu 40 μL verringert werden. Auch können die Anschlüsse der Zu- und Ableitungen relativ einfach angebracht werden. Zuletzt vermindert das weiche Material auch einen übermäßigen Quarzverschleiß durch Brechen des Substrats.

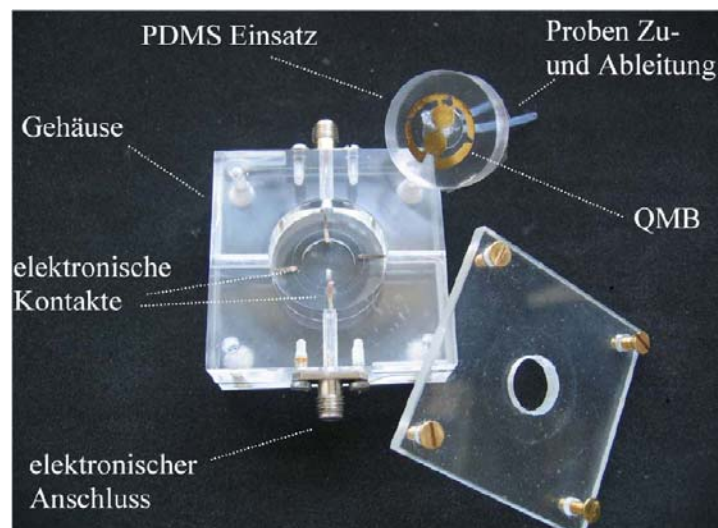


Abb. 15: Messzelle für Standardvolumina. Die innere Quarzhalterung wird aus PDMS gegossen. Fixiert wird die Form durch eine Polyacrylat-Ummantelung.

5.6 Messanordnung

Ein Überblick über den gesamten Messaufbau zeigt Abb. 15. Das Netzgerät versorgt die Oszillatorschaltung mit 12V Gleichstrom. Die Schaltung selbst ist mit dem Quarz in der Flüssigphasenmesszelle, (Signaleingang) und mit dem Frequenzzähler (Signalausgang) verknüpft. Der Frequenzzähler liefert das Signal weiter an den Computer. Unter Zuhilfenahme einer Software (WinsensXP) wird der Frequenzverlauf aufgezeichnet. Die Peristaltikpumpe sorgt für einen konstanten Fluss der Flüssigphase

durch die Messzelle. Steht nicht ausreichend Volumen zur Verfügung kann die Lösung direkt mit einer Pipette in die Zelle eingespritzt werden. Die Verbindungskabel zwischen den einzelnen elektronischen Komponenten sind in Koaxialausführung. Eine zusätzliche innere Kupferummantelung schirmt gegen störende Frequenzen der Umgebung ab. Auch die Schaltung ist in ein Aluminiumgehäuse eingepasst.

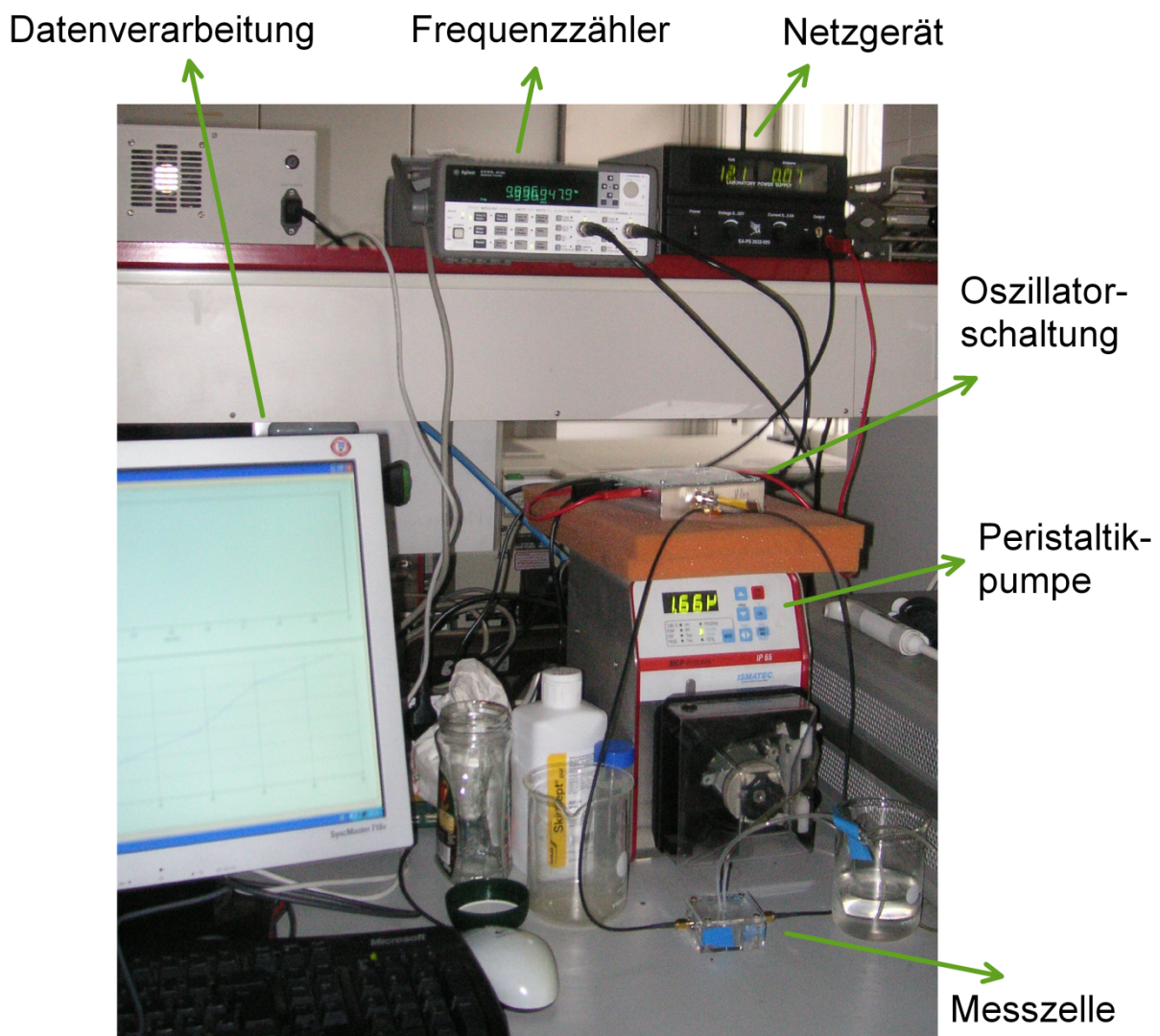


Abb. 16: Mess-Setup.

5.7 AFM

Mit der Rasterkraftmikroskopie⁴⁴ (AFM: atomic force microscopy) können Oberflächen aller Art untersucht werden. Im Zuge dieser Arbeit kommt die Methodik begleitend und ersetzend zum Licht- und Fluoreszenzlichtmikroskop zum Einsatz.

5.7.1 Funktionsweise

Die 1986 von G. Binning und C. Gerber eingeführte Rasterkraftmikroskopie gilt als Weiterentwicklung des bekannten Tunnelmikroskops (STM: scanning tunnelling microscopy). Der große Vorteil der Tunnelmikroskopie ist die hohe Auflösung, die sich aus der Beziehung zwischen Tunnelstrom (I), angelegtem Potential zwischen Spitze und Probe (V) sowie Abstand zwischen Spitze und Probe (d) ergibt:

$$I = Ve^{-kd} \quad \text{Gl. 12}$$

Die exponentielle Abhängigkeit des gemessenen Tunnelstroms vom Abstand erlaubt atomare Auflösung. Da zwischen Spitze und zu untersuchender Probe eine Spannung angelegt werden muss, ist diese Methode nur für leitfähige Oberflächen anwendbar. Bei der AFM wird hingegen die Auslenkung eines 100-150 μm langen Arms (Cantilever) gemessen. Den Kontakt zur Probe stellt eine wenige nm dicke und mehrere μm lange Spitze her.

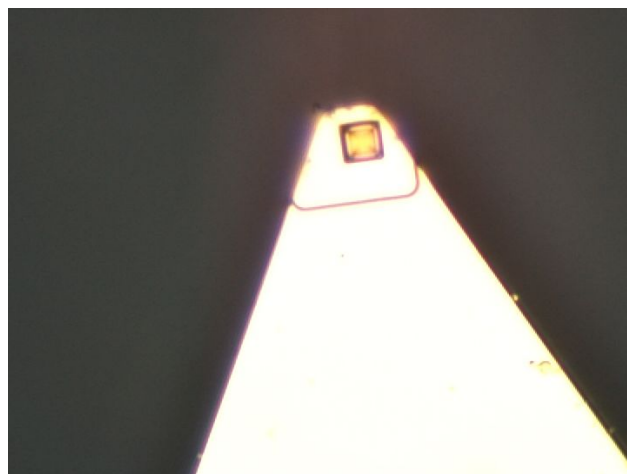


Abb. 17: 100 fache Vergrößerung eines Cantilevers mit Spitze zur Untersuchung von Oberflächen mit dem AFM. Material: Phosphor dotiertes Silizium

Auf die Rückseite des Cantilevers ist ein Photodiodenlaser fokussiert. Die Ablenkung des Lichts, und damit auch die Auslenkung des Cantilevers, wird über einen Photodetektor registriert. Da die Spitze in direktem Kontakt mit der Oberfläche steht kann so bei Bewegung der Probe deren Topographie aufgezeichnet werden. Die wirkende Kraft, das Signal, kann durch das Hook'sche Gesetz beschrieben werden:

$$F = -kx \quad \text{Gl. 13}$$

Es besteht demnach ein linearer Zusammenhang zwischen der Kraft (F) und der sich ergebenden Auslenkung (x). Die Bewegung der Probe übernimmt ein XYZ-Piezoscanner. Je nach Abstand zur Probe und Bewegungsart des Cantilevers unterscheidet man zwischen verschiedenen Messmodi.

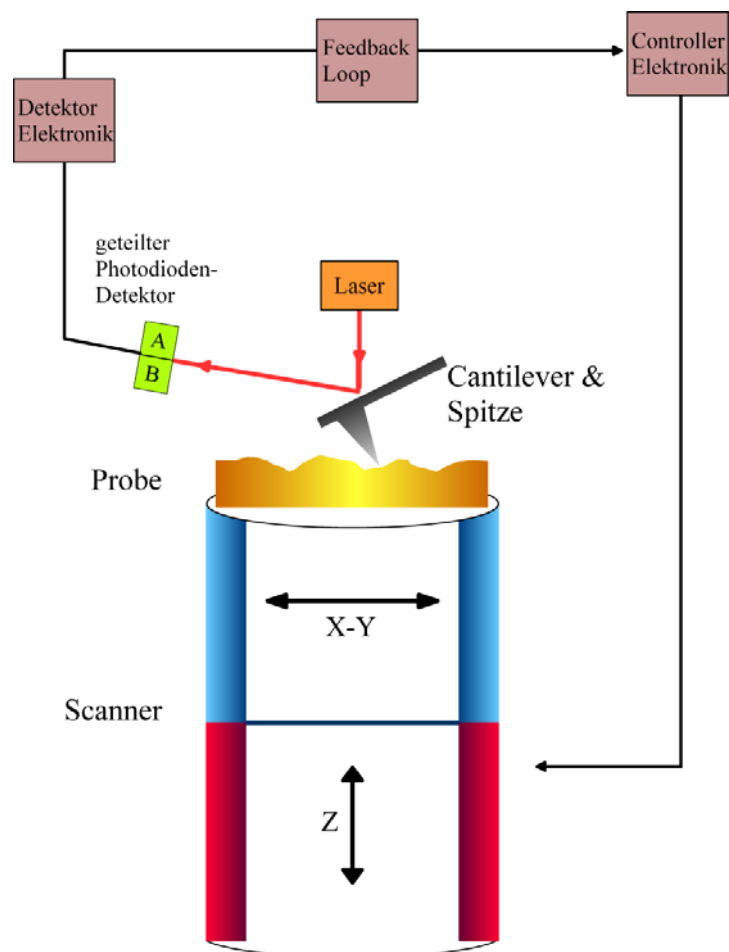


Abb. 18: Komponenten eines Rasterkraftmikroskops.

5.7.2 Contact-Mode

Wird der Cantilever vor der eigentlichen Messung so nah an die Oberfläche angenähert dass repulsive Kräfte zwischen den Atomen der Spitze und der Probe wirken, so spricht man von Contact Mode AFM⁴⁵. Zumeist wird die Kraft zwischen Cantilever und Oberfläche während der Messung konstant gehalten (constant-force): Die Z-Auslenkung des Piezoscanners wird der Oberflächenbeschaffenheit stetig angepasst. Das Signal zur Änderung der Höhe kommt von der Laserreflexion die über einen Feedbackloop mit dem Scanner in Kontakt steht. Das Signal der Z-Achse gibt somit die exakte Topographie wieder. Nachteilig können sich bei weichen oder beweglichen Oberflächenstrukturen die nicht zu vernachlässigenden Kräfte auswirken.

5.7.3 Tapping-Mode

Eine schonendere Messmethode ist die tapping-mode AFM. Hier wird der Cantilever in Schwingung (Frequenzen im kHz-Bereich) versetzt. Die Amplitude und der Abstand zur Probe werden so gewählt, dass die Oberfläche bei maximaler Auslenkung von der Spitze leicht touchiert wird. Durch Auslenkung des Piezoscanners in Z-Richtung wird die Amplitude stets dem Sollwert angepasst. Die auftretenden lateralen Kräfte sind hier minimal, wodurch auch weiche Oberflächen gescannt werden können.

6 Elektrodenbeschichtungen

6.1 Polyurethan

Für die Beschichtung der Goldelektroden kommen mehrere Polymere in Frage. Je nach Beschaffenheit des Analyten wie Methodik des Prägevorgangs werden die Polymere entsprechend ihren Eigenschaften ausgewählt. Nicht zuletzt wegen seiner Rigidität wird für Oberflächenprägungen häufig Polyurethan verwendet (Abb. 19).

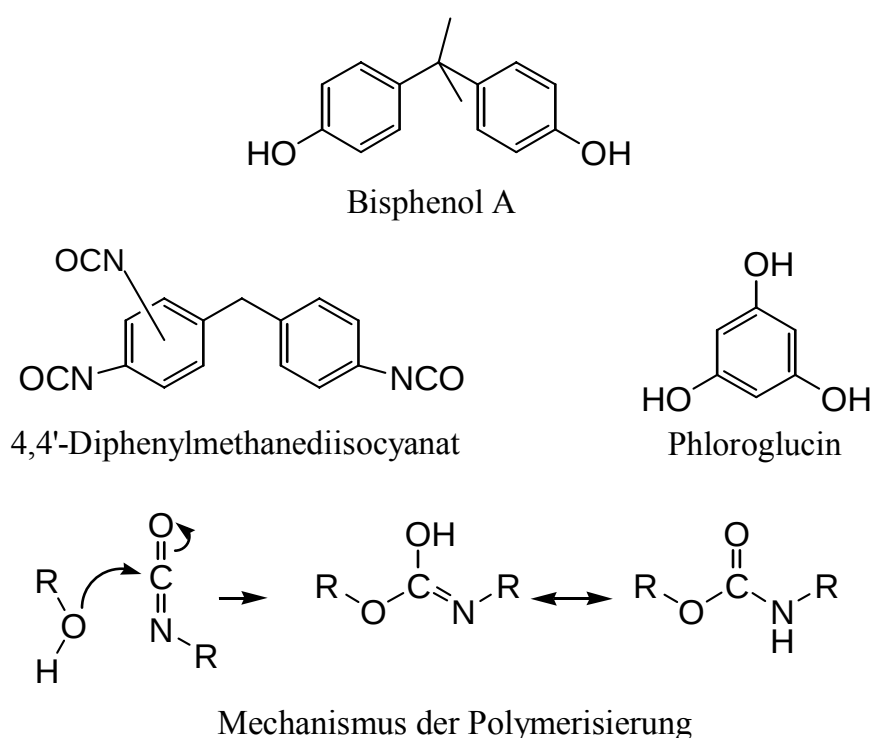


Abb. 19: Komponenten des Polyurethans mit dem zugehörigen Polyadditionsmechanismus. Phloroglucinol wird als Quervernetzer zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung kann je nach Einsatzgebiet variieren. Lösungsmittel: THF

Die gute Haftung an Gold sowie die Widerstandsfähigkeit gegenüber Wasser und anderen milden Agenzien sind besonders für Flüssigphasenmessungen willkommene Eigenschaften.

Die Komponenten werden in 200 μ L THF gelöst und unter Rühren für 20 min. auf 70°C erhitzt. Je nach gewünschter Schichtdicke wird die Lösung entsprechend weiterverdünnt. Die vorpolymerisierte Mischung kann bei 4°C über zwei bis drei Wochen gelagert werden. Die eingesetzten Mengen sind dem jeweiligen Kapitel zu

entnehmen. Phloroglucin wirkt als Quervernetzter zwischen den einzelnen Polymerketten. Die zugegebene Menge beeinflusst wesentlich die Härte und Starrheit des Polymers. So ist die eingesetzte Menge beim Oberflächenprägen mit Hefezellen höher als bei Bakterien und Sporen. Die mehreren μm großen Organismen können auch in eine starrere Oberfläche gedrückt werden. Für die ungleich kleineren Organismen ist ein etwas weiches Polymer naturgemäß zu bevorzugen.

Wie bei allen Beschichtungsmaterialien kann zur besseren Langzeitstabilität des Coatings die Elektrodenoberfläche selbst vorbehandelt werden. Eine apolare Oberfläche erhält man nachdem die Quarze mit 2-5%iger Octanthiollösung in Toluol behandelt wurden. Für Polyurethan bewährt sich besonders das Einwirken einer 2-5%igen Lösung von Dithiothreitol (Abb. 20).

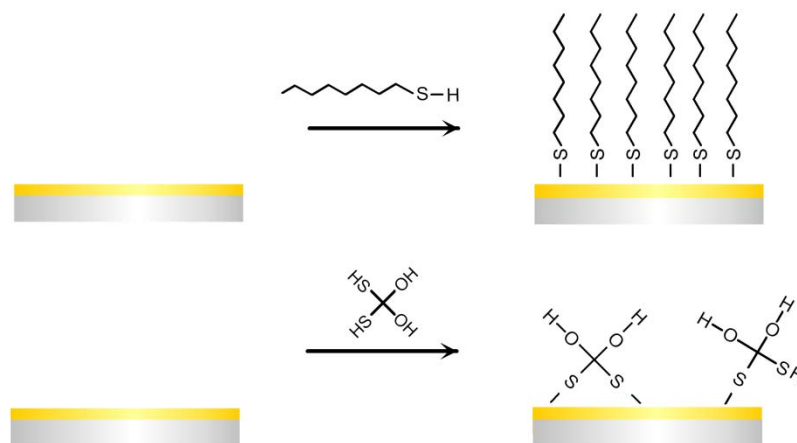


Abb. 20: Die Goldelektrode kann vor der Beschichtung mit geeigneten Reagenzien vorbehandelt werden. Das führt zu längerer Haltbarkeit der Coatings.

Oben: Die aurophile Mercaptofunktion bindet kovalent ans Gold

Unten: Die Hydroxygruppen des Dithioerythrol werden ins Urethan verankert

Die aurophile Thiolfunktion knüpft kovalent ans Gold, während die Hydroxygruppen beim Beschichten in das Urethan verankert werden. Die Oberfläche des Polyurethans ist wegen der Vielzahl an Carbonyl- und Aminofunktionen der Urethangruppe polar. Die chemische Interaktion mit dem Analyten findet demnach hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen statt.

Bei der Verwendung von Polyurethan bietet sich der Vorteil den Fortgang der Polymerisationsreaktion über die IR-Isocyanatbande bei 2300 cm^{-1} zu verfolgen. Dazu wird auf eine ATR Messzelle wenige μL des Vorpolymerisats aufgetragen und in regelmäßigen Abständen die Absorption gemessen. Die Reaktion wird am Gelpunkt abgebrochen und die Lösung entsprechend verdünnt. Es hat sich gezeigt, dass hier für die anschließende Beschichtung und Oberflächenprägung optimale Viskosität vorherrscht (Abb. 21).

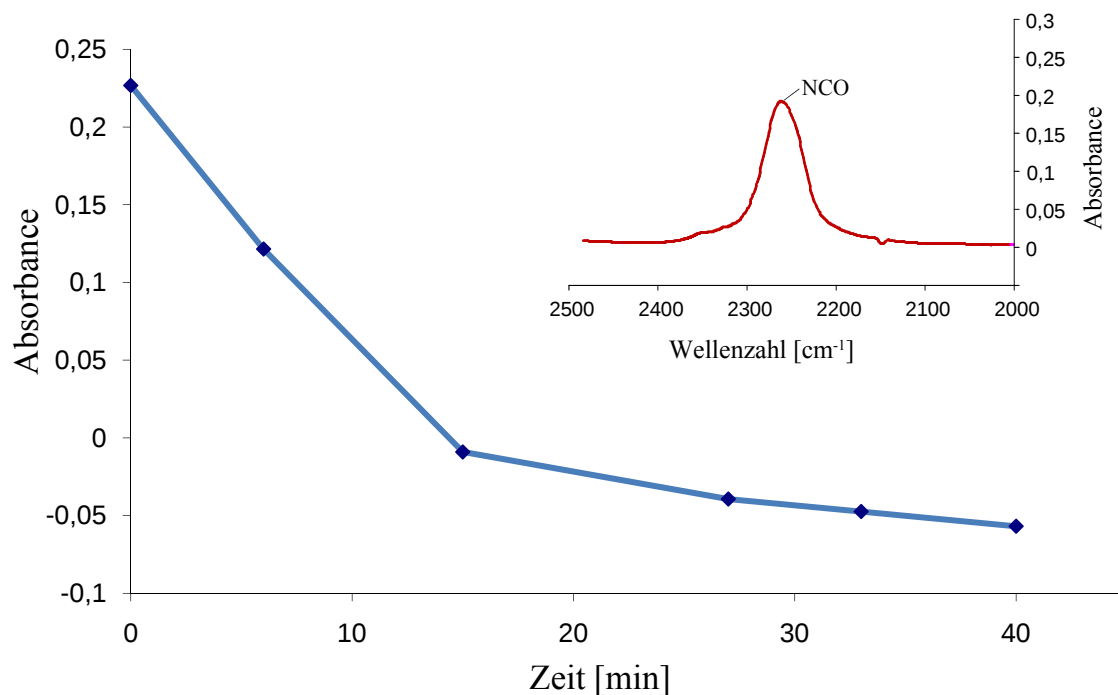


Abb. 21: Fortlauf der Polymerisierung von Polyurethan mit der Zeit.

Oben rechts: ATR Spektrum einer Isocyanatbande

Nach Abbruch der Polymerisationsreaktion wird mit dem Lösungsmittel (THF) verdünnt. Je nach Bedarf kann vor der eigentlichen Beschichtung ein weiterer Verdünnungsschritt erfolgen. Der Grad der Verdünnung hat neben der Rotationsgeschwindigkeit des Spinners den größten Einfluss auf die Dicke der Schicht. Zur routinemäßigen Ermittlung der Schichtdicke wird die Rasterkraftmikroskopie herangezogen. Abb. 22 zeigt wie sich eine 1:1 Verdünnung auf die Höhe der Beschichtung auswirkt. Die Schichtdicke sinkt bei Halbierung der Konzentration um etwa die Hälfte.

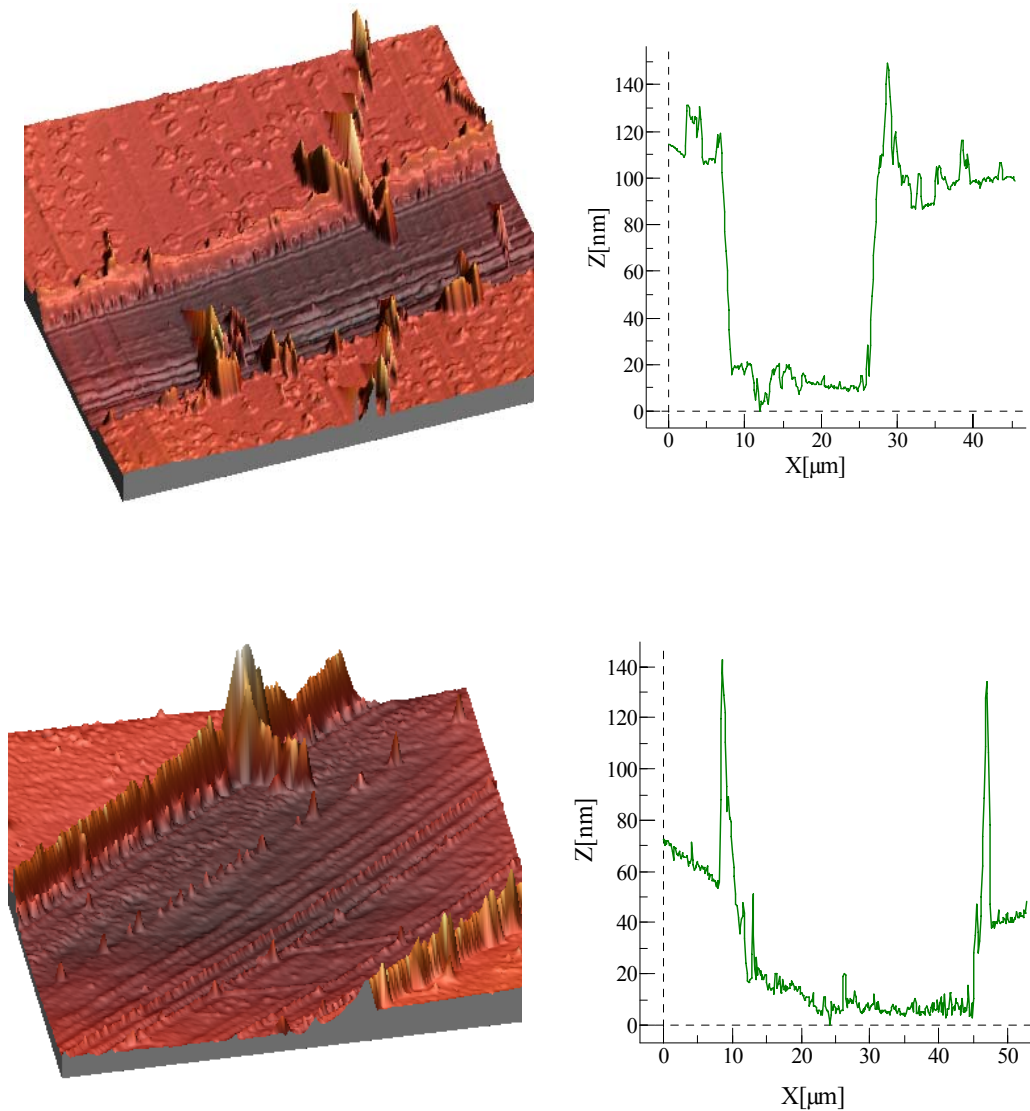


Abb. 22: Die Schichtdicke kann mit dem Rasterkraftmikroskop bestimmt werden. Bei einer Verdünnung von 1:20 (oben) auf 1:40 (unten) halbiert sich die Schichtdicke. Gekratzt wird mit einer Rasierklinge.

Unabhängig von der Art, Zusammensetzung als auch der Dicke der Beschichtung zeigt sich das Einschwingverhalten des Sensors in Wassers. Bei Messungen in flüssiger Phase, hauptsächlich Wasser, muss der Quarz vor dem Start der eigentlichen Messung für einen gewissen Zeitraum gespült werden. Innerhalb dieser Anfangsperiode sättigt sich das Polymer mit dem Lösungsmittel, was zu einem Anstieg der Masse und als Konsequenz zu einem Abfall der Frequenz führt. Gezeigt ist der Frequenzverlauf dieser Sättigungsvorgangs für eine 2 μm dicke Polyurethanschicht. Das Ausmaß der

Frequenzerniedrigung wie auch deren Dauer sind abhängig vom jeweiligen Polymer und dessen Dicke. Erst nachdem sich eine konstante Frequenz eingestellt hat wird die Aufzeichnung begonnen (Abb. 23).

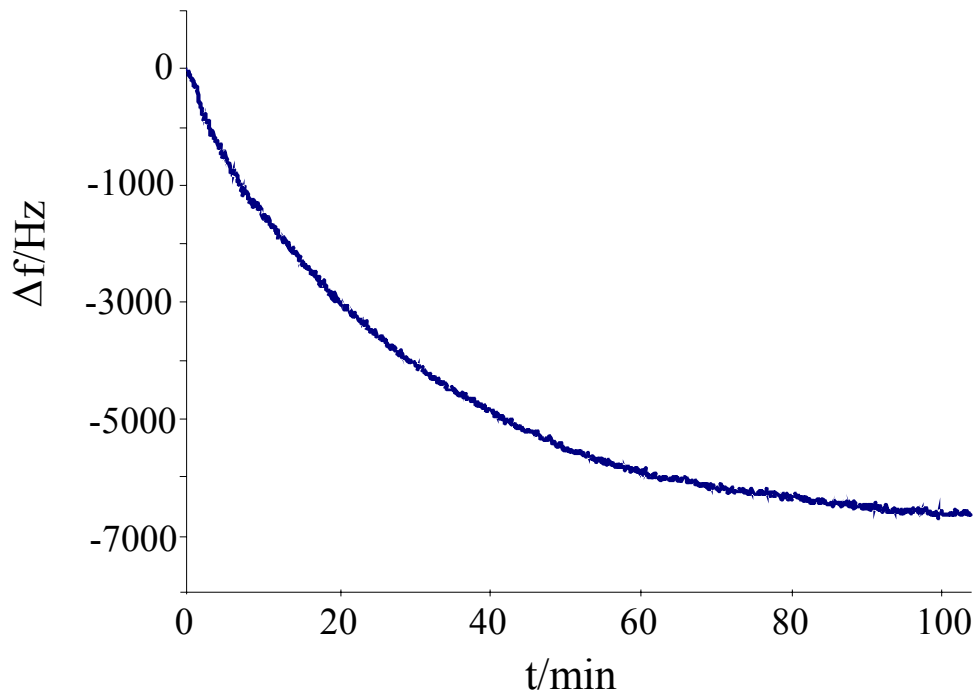
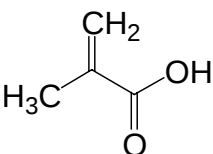


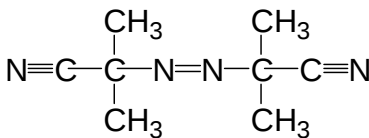
Abb. 23: Verlauf der Frequenz beim Einschwingen des Quarzes. Durch die Sättigung des Polyurethans mit Wasser kommt es zu einem Frequenzabfall. Das Ausmaß des Abfalls hängt von der Höhe der Schicht ab. Hier: Schichtdicke: 2 μm .

6.2 Polyacrylat

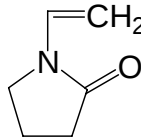
Ähnliche chemische Eigenschaften zeigt Polyacrylat. Zur Synthese werden die einzelnen Monomere im entsprechenden Verhältnis in Wasser gelöst. Die Kettenreaktion kann durch UV Licht oder erhöhte Temperatur (die Zersetzung beginnt bereits bei 25°C) initiiert werden. Das Polymer muss gleich eingesetzt werden. Um vollständiges Auspolymerisieren zu gewährleisten wird der Quarz im Anschluss an die Prägung für kurze Zeit unter UV Licht aufbewahrt. Beimengung von Dihydroxymethylenbisacrylamid erhöht die Kapazität der Bindungsstellen auf der Polymeroberfläche.

C=CC(=O)NC(O)C(O)CC(=O)C=C

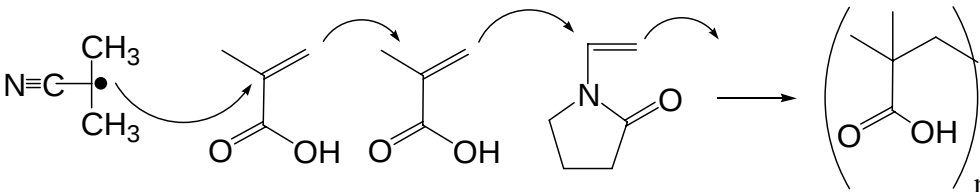
Dihydroxyethylenbisacrylamide



Azodiisobutylnitril



1-Vinyl-2-Pyrolidon



Mechanismus der Polymerisierung

Es handelt sich um eine radikalische Polymerisation zwischen terminalen Doppelbindungen (Abb. 24). Eine kovalente Verknüpfung an die Goldoberfläche ist auch hier möglich. Die einzusetzende Reaktion ist jedoch komplexer. Das Zielmolekül „Octan-8-thiol-acrylsäurethioester“ kann aber in einer ein-Schritt Reaktion problemlos

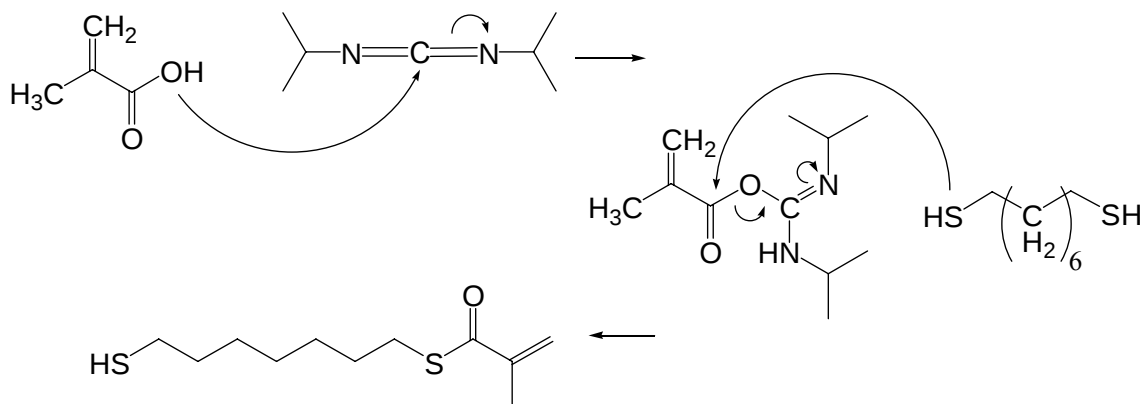


Abb. 25: Synthese des Acrylsäurethiolesters für die kovalente Bindung von Acrylat an Gold.

synthetisiert werden (Abb. 25):

Methacrylsäure, NN-Diisopropylcarbodiimid, 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) als Katalysator werden in Chloroform gelöst und für eine halbe Stunde unter Eisbadkühlung gerührt. Das Octandithiol wird langsam über einen Tropfichter zugefügt. Nach dem Einrotieren wird die Lösung mit Toluol verdünnt. Diese Mischung kann direkt zur Beschichtung der Quarze verwendet werden, da nur das Thiol kovalent an das Gold anknüpft und die restlichen Komponenten nach der Behandlung gewaschen (Wasser, 2-3min.) werden können. Die Säurefunktionalität des Polyacrylats erlaubt, wie die Ester-Amid-Gruppe des Polyurethans, eine Vielzahl von relativ starken Wechselwirkungen, hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen, mit dem Analyten.

6.3 Polyvinylpyrrolidon

Für Anwendungen bei denen eine weniger polare Oberfläche/Interaktionsfläche bevorzugt wird bietet sich Polyvinylpyrrolidon als Alternative an.

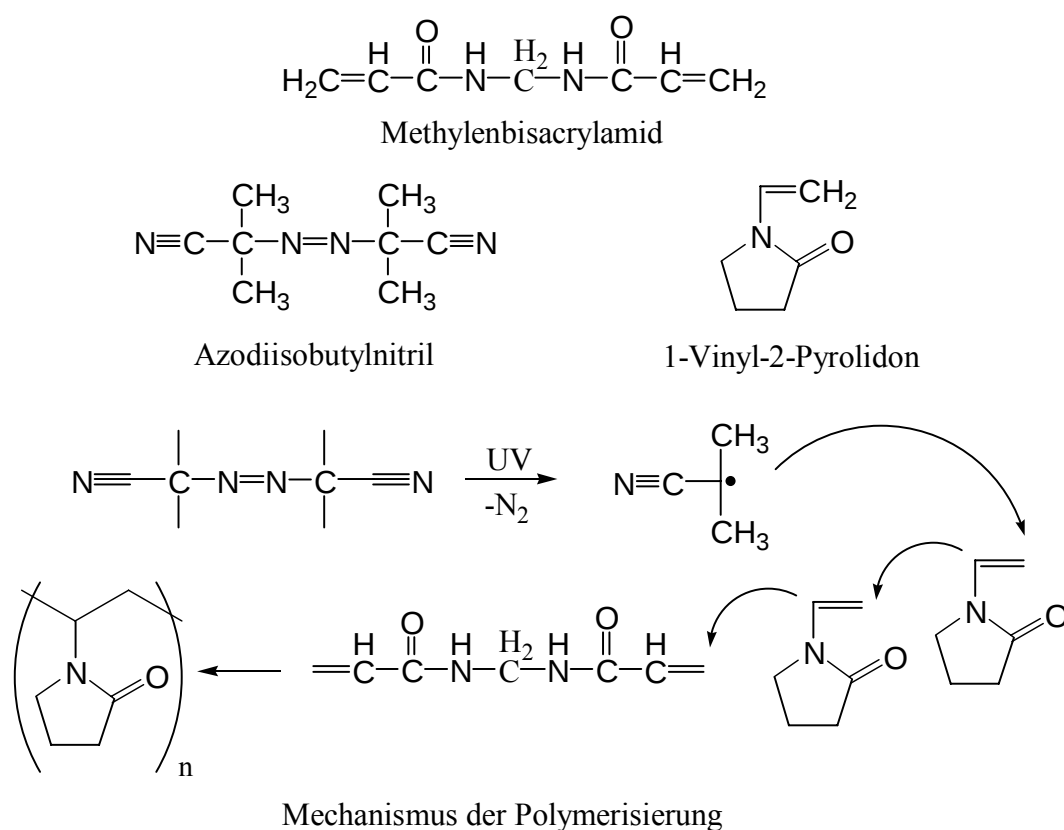


Abb. 26: Komponenten des Polyvinylpyrrolidons mit dem zugehörigen Reaktionsmechanismus. Der Radikalstarter kann alternativ auch durch Erwärmen gespalten werden.

Die Synthese erfolgt auf gleiche Weise wie beim Polyacrylat beschrieben. Das Methylenbisacrylamid wird als Quervernetzter zugegeben. Da auch hier die Reaktion über endständige Doppelbindungen führt, kann „Octan-8-thiol-acrylsäurethioester“ als kovalentes Kupplungsagenz zur Verbesserung der Haltbarkeit der Beschichtung eingesetzt werden.

Die Eigenschaften der Oberfläche können jedoch nicht nur durch die Wahl der Art des Polymers beeinflusst werden. Vielmehr kann durch variieren der Verhältnisse der Monomere Einfluss auf die Anzahl der Wechselwirkungszentren genommen werden. So haben sich etwa für das Prägen mit Hefen, Bakterien und Molekülen in Polyurethan gänzlich unterschiedliche Zusammensetzungen durchgesetzt (siehe dort).

6.4 Aufbringen der Schicht

Die vorpolymerisierten Lösungen können auf zwei Arten auf die Quarzoberfläche aufgetragen werden. Beim Drop-Coating werden etwa 10 μL des Polymerisats gleichmäßig auf die Elektroden verteilt. Im Anschluss erfolgt das Stempeln der selektiven Seite. Als Nachteil kann das Ausbilden von Konzentrationsprofilen auf der Oberfläche genannt werden. Durch die nicht vollständig gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit ist die Homogenität beeinträchtigt, was wiederum Einfluss auf die Dämpfung wie die Resonanzfrequenz hat (s. Kap. 3.5).

Homogenere Oberflächen erhält man durch Aufspinnen des Polymerisats. Nach dem Auftragen von 10 μL Lösung wird der Quarz mit voreingestellter Drehzahl (2000 – 3000 rpm) geschleudert. Das Lösungsmittel verdampft rasch, zurück bleibt die glatte Oberfläche.

7 Sauerbrey und Nicht-Sauerbrey Verhalten von Hefesensoren

7.1 Einführung

Hefen, zugehörig der Familie der einzelligen Pilze, besitzen in der Lebensmittel- und Biotechnologie große Bedeutung. Ihre Verfügbarkeit und einfache Handhabung bzw. Kultivierung prädestinieren die sphärischen Zellen mit einem Durchmesser zwischen 2 und 5 μm zu einem Modellsystem in der Bio- und Gentechnologie. Mit der vollständigen Entschlüsselung des Genoms im Jahre 1996 stieg die Bedeutung noch um ein Weiteres⁴⁶. Besonders in Europa wird überdies ihre Eigenschaft unter anaeroben Bedingungen Ethanol aus Glucose herzustellen, geschätzt. Rund 25 Mrd. € Steuereinnahmen⁴⁷ jährlich machen die Pyruvatdecarboxylase wohl zum wirtschaftlich bedeutendsten Enzym der Europäischen Union. Die kurze Reproduktionsdauer von rund 90 Minuten eignet sich für die Erzeugung von Enzymen, Polysacchariden und Nukleinsäuren.

Einsatzbereite Hefesensoren auf der Basis massenempfindlicher QCM's sind schon seit längerer Zeit bekannt⁴⁸. Im Zuge dieser Arbeit sollte das Ansprechen geprägter Sensoren auf Hefezellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht werden. Eine weitere Unterscheidung erfolgte durch Änderung der Schichtdicke sowie der Form der Templatzen.

7.2 Zellzyklus

Als Zellzyklus wird die vollständige Synthese einer (Tochter-) Zelle aus einem Vorgänger (Mutterzelle) verstanden. Vollständiges Kopieren der DNA aus den Chromosomen, Verdoppelung des Zytoplasmas wie Abtrennen des neu entstandenen Mikroorganismus sind die zu bewerkstelligenden Hauptaufgaben. Ein derartiger Zyklus läuft, in voneinander unterscheidbaren, aufeinanderfolgenden Schritten ab. Das in Abb. 27 gezeigte Schema gilt generell für eukaryotische (eu: echt; karyot: Kern) Zellen.

G1-Phase (1.Gap-Phase): Rezeptoren an der Oberfläche der Außenmembran sind in Kontakt mit der Umgebung. Bei ausreichendem Nahrungsangebot wird das Signal für die Zellvermehrung ins Innere weitergeleitet und die Zelle beginnt mit der zweiten Phase. Bei unzureichendem Angebot verharrt der Organismus in seinem Zustand.

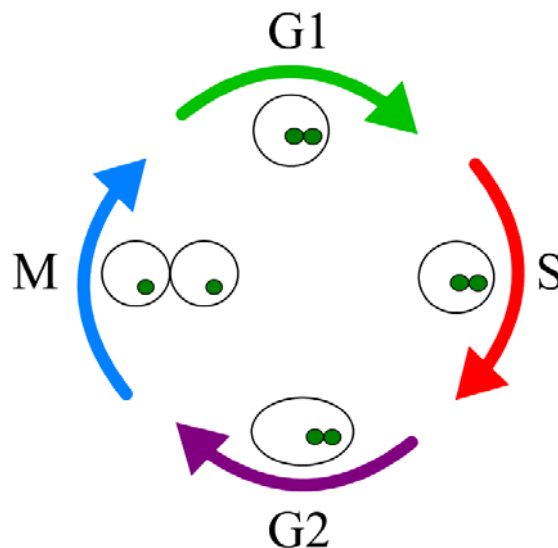


Abb. 27: Teilungszyklus einer eukaryotischen Zelle. Vier, voneinander unterscheidbare Phasen folgen aufeinander. Der Zyklus entspricht im Allgemeinen auch dem der verwendeten *Saccharomyces Cerevisiae*.

S-Phase (SyntS-Phase (Synthese-Phase): Die in den Chromosomen gespeicherte DNA wird verdoppelt. Bei den meisten Organismen beansprucht dieser Vorgang mit 10 - 12 Stunden etwa die Hälfte der Dauer des Zyklus.

G2-Phase (2.Gap-Phase): Synthese der noch ausstehenden Organellen und Proteine. Gleichzeitig tritt die Zelle abermals in Kontakt mit der Umgebung um schließlich die letzte Phase einzuleiten.

M-Phase (Mitose-Phase): Als Mitose wird die eigentliche, makroskopisch sichtbare Abkapselung der neuen Zelle verstanden.

Das angeführte Schema ist generell für alle Eukaryoten gültig. Bei genauerer Betrachtung lässt sich bei der Familie der *Saccharomyces Cerevisiae*^{49,50}, zugehörig dem Phylum der Sprosshefen, allerdings ein Unterschied erkennen. Im Laufe des Zyklus kommt es zur Ausbildung einer Knospe, welche sich bereits in der G1-Phase

zu erkennen gibt. Die Knospe wächst in weiterer Folge stetig an, was das Ausmachen einer G2-Phase unmöglich macht (Abb. 28).

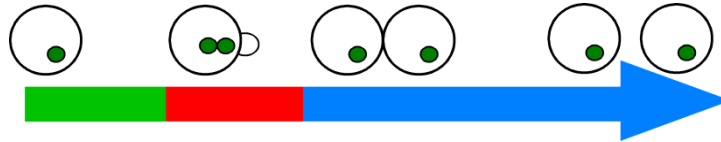
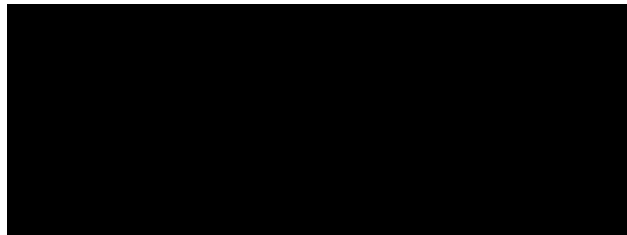


Abb. 28: Die verwendete Hefe vermehrt sich über Sprossenbildung.

Nach Erreichen der Größe der Mutterzelle, Ende M-Phase, erfolgt das bekannte Abschnüren der neu entwickelten Tochterzelle. Gearbeitet wurde mit einer kommerziell erhältlichen Backhefe. Für die Züchtung fand das in Tab. 4 zusammengefasste Nährmedium Einsatz.

Tab. 4: Zusammensetzung des zur Züchtung der Hefezellen verwendeten Nährmediums



7.3 Anti-Sauerbrey Verhalten

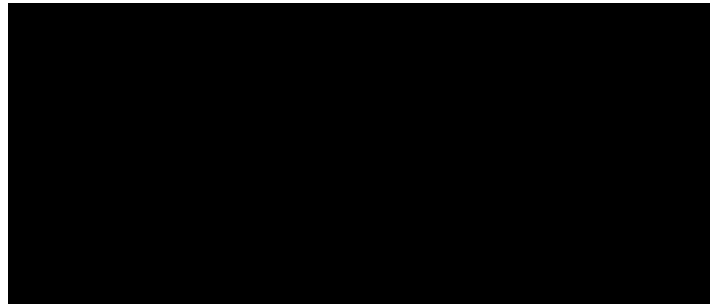
Die Erniedrigung der Schwingungsfrequenz als Antwort auf die Gegenwart des Analyten wird durch die Sauerbrey Gleichung beschrieben, rückzuführen auf attraktive Wechselwirkungen vielfältiger Art zwischen Elektrodenbeschichtung und Analyt. Beim Überwiegen andersartiger Effekte kann der Umgekehrte Fall, i. e. die Erhöhung der Frequenz beobachtet werden. Dieses, als Anti-Sauerbrey Verhalten bezeichnete Phänomen ist einer genauen Untersuchung bislang noch schuldig. Es ist bekannt, dass Frequenzerhöhungen von mehreren Faktoren abhängig sind. Darunter fallen Schichtdicke, viskoelastische Eigenschaften des Coatings sowie Größe der Imprints wie des Analyten^{51,53}. Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedenartig geprägte Hefesensoren, welche in Abhängigkeit des Analyten entweder Sauerbrey oder Anti-Sauerbrey-Verhalten zeigen, untersucht. Eine Differenzierung der Analyte erfolgt abhängig vom Entwicklungsstadium der Hefezelle.

7.4 Experimentelles

7.4.1 QMB Messungen

Wie in Kap.3 bereits ausgeführt, können auf einfache Art und Weise Abdrücke von biologischen Organismen in verschiedene Polymere erzeugt werden.

Tab. 5: Zusammensetzung des verwendeten Polyurethans



Für die Fertigung eines Hefesensors hat sich der Einsatz von Polyurethan mit der in Tab. 5 gezeigten Zusammensetzung als Coating bewährt. Nach entsprechender Verdünnung können mittels Spin Coating Schichten mit unterschiedlicher Dicke erzeugt werden. In dieses noch nicht ganz ausgehärtete Polymer wird der Hefestempel gepresst und mittels Klammer über Nacht fixiert. Der Stempel selbst ist ein etwa 5 * 5 mm großes Glasplättchen auf das eine, mit destilliertem Wasser gewaschene, hochkonzentrierte Hefesuspension aufgetragen wird. Die viskose Lösung wird für etwa 5 min. bei Raumtemperatur getrocknet. Um eine möglichst homogen Hefelage zu erhalten wird das Glas dabei mit der benetzten Seite sanft auf einen Teflonblock gepresst. Das Polymer härtet über Nacht aus und das Glas kann abgenommen werden. Nach Entfernen des Stempels erkennt man unter dem AFM Mikroskop in der Oberfläche verankert Hefezellen (Abb. 29).

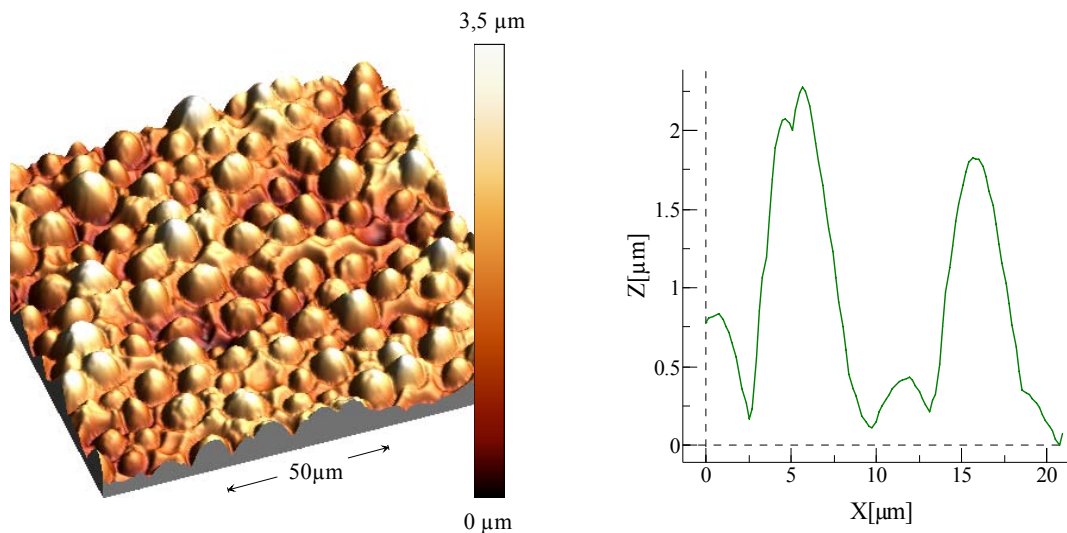


Abb. 29: AFM Aufnahme einer geprägten Oberfläche. Die Hefezellen stecken noch im Polymer. Der Sensor ist nach kurzer Behandlung im Ultraschallbad einsatzbereit. Aus der Höhenschichtlinie (rechts) erkennt man wie weit die Zellen aus dem Polymer ragen (1,5-2 μm).

Bevor der Sensor einsatzbereit ist müssen die Zellen aus der Schicht verdrängt werden. Die Methode der Wahl ist eine kurze (5-10 s) pulsartige Behandlung im Ultraschallbad. Die im Wasser entstehenden Kavitationen reichen, aus um die Hefezellen aus der Schicht zu befreien. Bei zu langer Einwirkzeit kann das Polymer beschädigt werden. Im Querschnitt erkennt man dass die Abmesser der Imprints mit den Maßen der nativen Hefezellen übereinstimmen. So reicht etwa der Durchmesser von 3 bis 5 μm. Die Abdrucktiefe liegt bei 1 bis 1,5 μm. Die Tiefe dieser Kavitäten ist maßgeblich durch das Polymer bestimmt. Je weicher die Beschichtung beim Zeitpunkt des Stempelns desto tiefer ist Naturgemäß der Abdruck.

Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer kann auf die Zahl der Zellen /μL ermittelt werden⁵². In einem mg Hefe befinden sich demnach $\sim 10^{10}$ Zellen.

Mit der Rasterkraftmikroskopie kann auch die reversible Ein und Auslagerung der Zellen verfolgt werden⁵³.

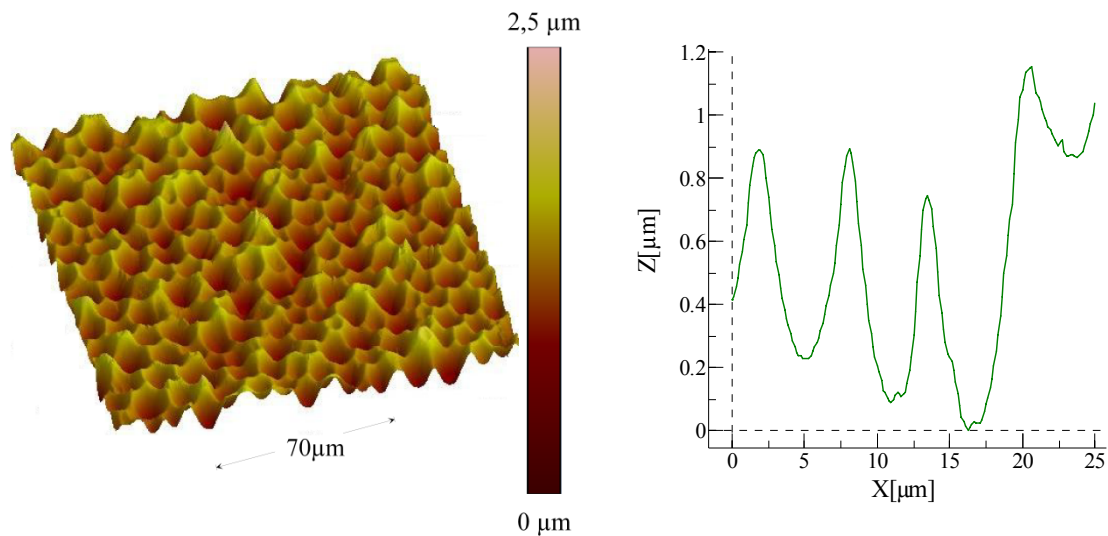


Abb. 30: AFM Aufnahme der mit Hefezellen geprägten Schicht. Die Hefe ist aus dem Polymer im Ultraschallbad verdrängt worden. Die sphärische Form und die Maße der Abdrücke stimmen mit jenen des Templats überein (rechts: Tiefe: $\sim 1\mu\text{m}$, $\varnothing$: $3\text{-}5\mu\text{m}$).

Wird ein derartiger QCM Sensor einer Hefelösung exponiert so erhält man als Antwort ein Abfallen der Schwingungsfrequenz. Wie Abb. 31 zu entnehmen, ist die Antwort von der Konzentration abhängig. Wird die Meßzelle im Anschluss wieder mit Wasser gespült, kann man die Reversibilität des Effektes beobachten. Die Frequenz erreicht binnen Sekunden sowohl auf der geprägten, wie auch auf der unbehandelten Elektrodenseite ihren Ausgangswert. Die Abnahme der Frequenz nimmt je nach Schichtdicke ein anderes Ausmaß an (Abb. 32). Zu beobachten ist eine stärkere Frequenzerniedrigung bei dünnen Schichten. Je dicker die Schicht desto weniger ist die Sauerbreygleichung gültig. Materialeigenschaften wie Elastizität müssen mehr und mehr berücksichtigt werden, was in der Folge zu einem schwächerem Effekt führt.

Die Höhe welche maximal aufgetragen werden kann ist durch die Messtechnik limitiert. Je höher die Schicht desto stärker wird die Dämpfung. Ein zu stark gedämpftes Signal kann durch den Verstärker nicht mehr kompensiert werden, deshalb keine Oszillation.

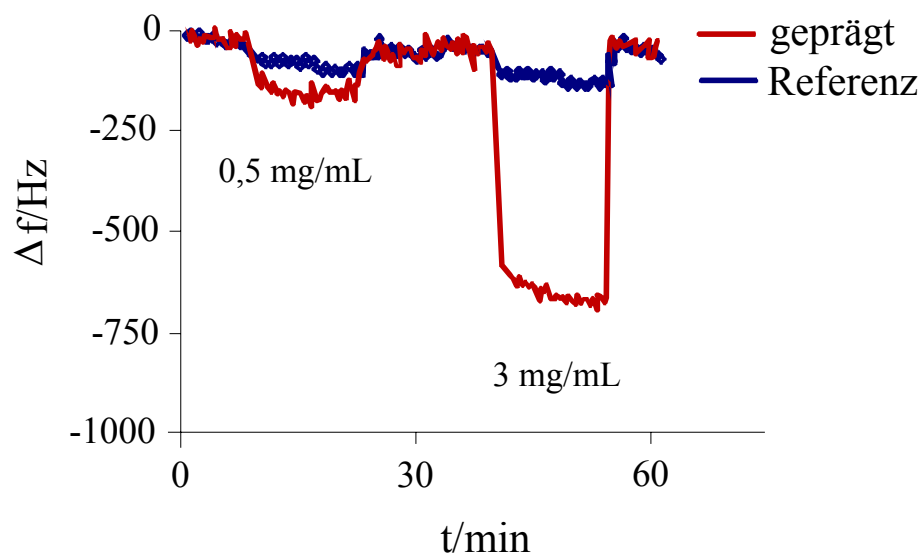


Abb. 31: Antwort eines Hefesensors mit 2 μm Schichtdicke auf eine wässrige Zellenlösung. Der Effekt ist reversibel und konzentrationsabhängig.

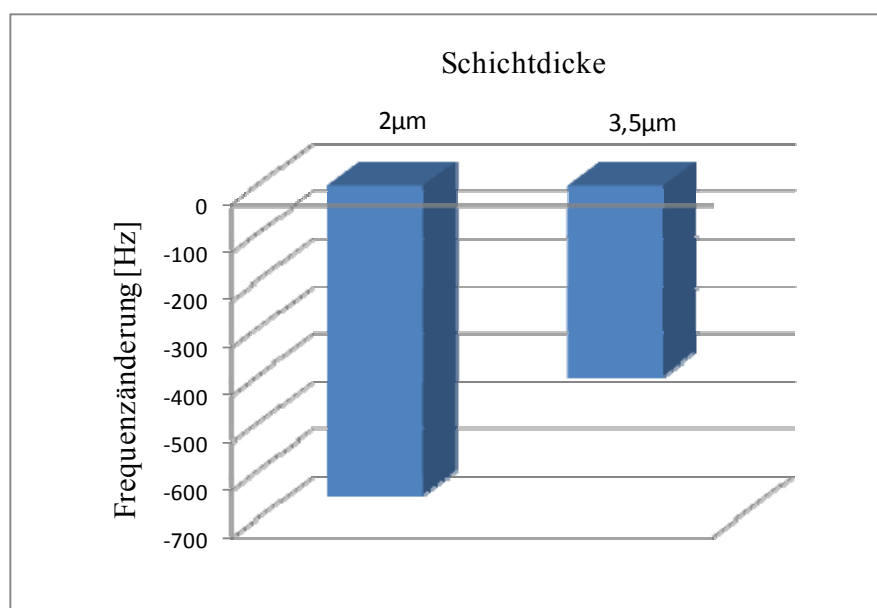


Abb. 32: Abhängigkeit des Effektes von der Schichtdicke. Prägung einzellig, Messlösung 3 mg/mL doppelzellig.

Nun kann in den oben beschriebenen Zyklus der Hefezelle eingegriffen werden. So erlaubt der Zusatz von N-Hydroxyharnstoff (304 mg/ 10^9 Zellen) im Nährmedium das Abtrennen der Tochterzelle von der Mutterzelle zu unterbinden. Die so erzeugten

„doppelzelligen“ Hefen können nach dem Aufreinigen, Abzentrifugieren und zwei bis dreimaligem Waschen als Templat für das Imprinten verwendet werden (Abb. 33).

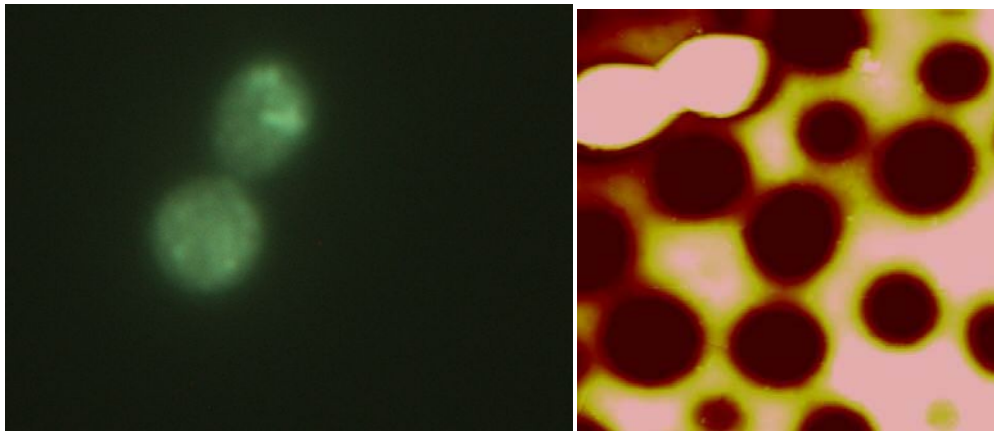


Abb. 33: Hefezellen im M-Phase Stadium.

links: Fluoreszenzaufnahme einer doppelzelligen *S. Cerevisiae*. Als Färbungsmittel wurde Bisbenzimid (100 $\mu\text{g/mL}$) verwendet.

rechts: Abdrücke und doppelzellige Hefe in Kavität unter dem AFM-Mikroskop.

Auf die gleiche Art wie bei gewöhnlichen Hefezellen wird so eine selektive Schicht erzeugt. In Abhängigkeit von der Schichtdicke und vom Analyten kann nun das Auftreten verschiedener Effekte beobachtet werden.

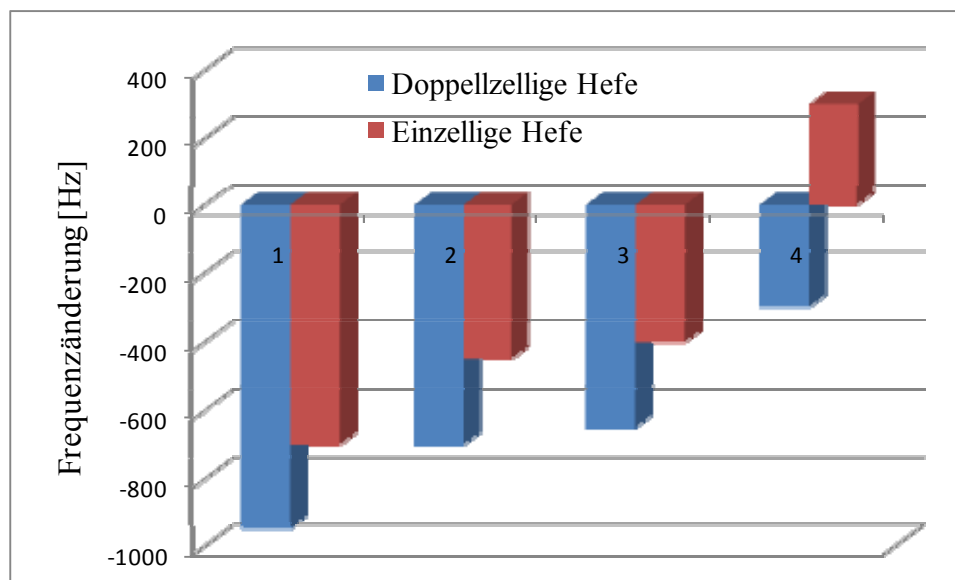


Abb. 34: Abhängigkeit der Frequenzänderung vom Templat und Dicke der Schicht, Konzentration je 3 mg/mL. Alle Effekte sind reversibel. Unabhängig vom Templat liegen die Imprinttiefen bei 1-1,5 μm .

1: 2 μm Schichtdicke, Templat einzellig 2: 3,5 μm Schichtdicke, Templat einzellig 3: 2 μm Schichtdicke, Templat doppelzellig 4: 3,5 μm Schichtdicke, Templat doppelzellig

Wie aus Abb. 34 zu entnehmen werden bei Messungen mit dünnen Schichten durchgehend negative Effekte erhalten, unabhängig vom verwendeten Templat wie der Analytlösung. Bei dickerem Coating ($\sim 3,5 \mu\text{m}$) und doppelzelliger Hefe als Templat, muss für eine Analyse bezüglich des Analyten differenziert werden. Augenscheinlich ist hier der Übergang von Sauerbrey zu nicht-Sauerbrey Verhalten beim Einsatz von einzelliger respektive doppelzelliger Hefe (Abb. 35). Eine 3 mg/mL ($\cong 3 \cdot 10^{10}$ Zellen) doppelzellige Hefelösung ergibt den zu erwartenden Frequenzabfall von etwa 300 Hz . Um etwa denselben Betrag beträgt der beobachtbare Frequenzhub beim Übergang zu einzelliger Hefe (3 mg/mL). Wiewohl ein derartiges Non-Sauerbrey Verhalten bereits in ähnlichen Zusammenhängen bekannt ist^{54,55}, wurde das Phänomen einer genaueren Untersuchung unterzogen.

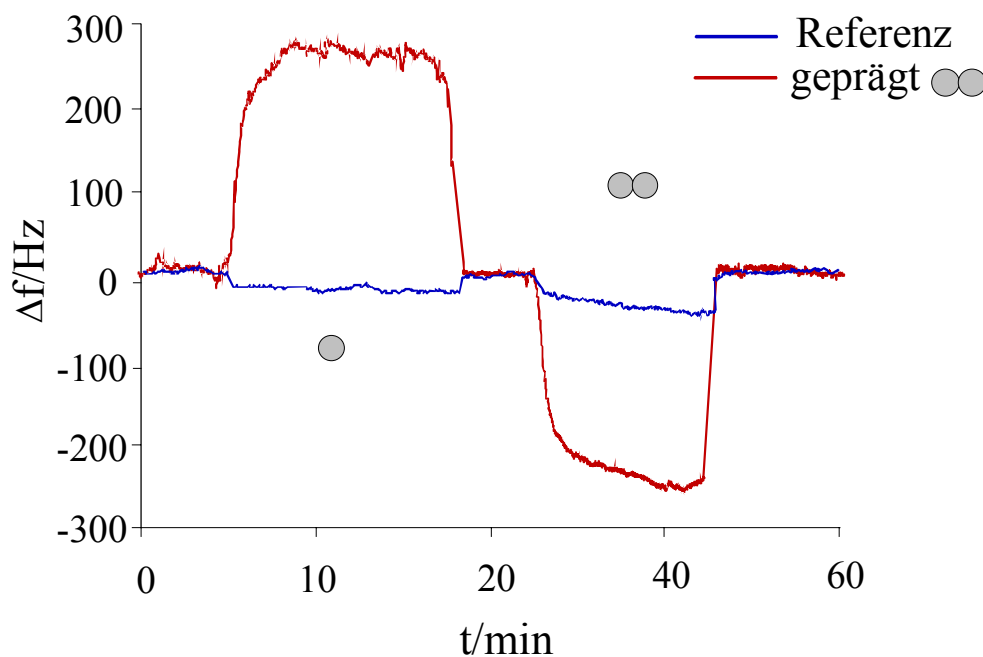


Abb. 35: Übergang von nicht-Sauerbrey zu Sauerbrey Verhalten für einen mit doppelzelligem Templat geprägten Sensor mit einer Schichtdicke von $3,5 \mu\text{m}$. Mit einzelliger Hefe beobachtet man einen anormalen Frequenzanstieg. Wird als Analyt die Templatform verwendet kehrt der Sensor zum Sauerbrey Verhalten zurück. Eingesetzte Analytmenge: je 3 mg/mL .

7.4.2 Passives Auslesen der Frequenz/Phase am Netzwerkanalysator

Die Funktionsweise der verwendeten Verstärkerschaltung zum Auslesen der Frequenz wurde in Kap. 5.4 beschrieben. Die Schaltung gewährleistet problemloses Auslesen der Resonanzfrequenz, die jedoch von der Phasenlage abhängig ist. Es könnte eine anomale Phasenverschiebung auftreten die zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz führen würde. Für detailliertere Untersuchungen bietet sich die Aufnahme der Impedanz an die durch das Dämpfungsspektrum und das Phasenspektrum charakterisiert ist.

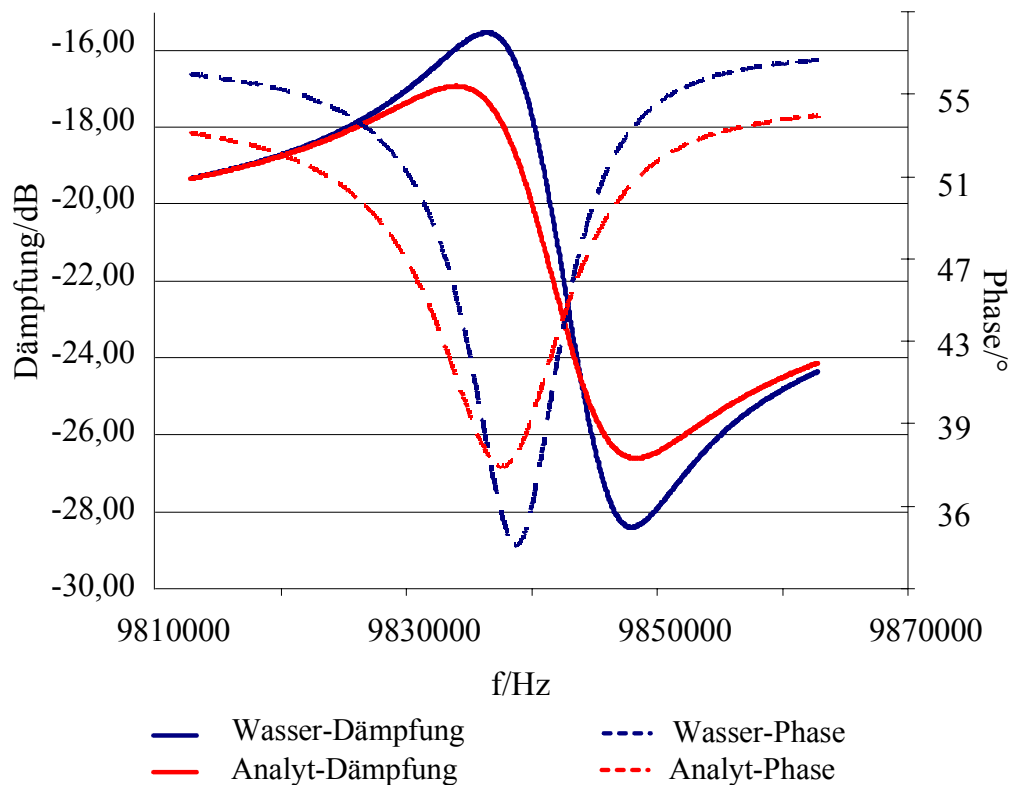


Abb. 36: Frequenz- und Phasenspektrum eines gewöhnlichen Hefesensors bei 10 MHz. Man erkennt das Verschieben der gesamten Kurve zu niederen Frequenzwerten bei Massenbeladung. Konzentration der Hefelösung: 5 mg/mL.

Die Kurven in Abb. 36 geben die Frequenz als Funktion der Dämpfung und der Phase der Elektrode ohne Analyt und mit Analyt für einen gewöhnlichen Hefesensor wieder. Man erkennt die serielle und die parallele Resonanzfrequenz. Man erkennt dass sich bei Massebeladung die Kurve als Ganzes zu niederen Frequenzwerten verschiebt.

Abb. 37 zeigt den Verlauf der Frequenz als Funktion der Dämpfung/Phase für einen Quarz mit Non-Sauerbrey Verhalten.

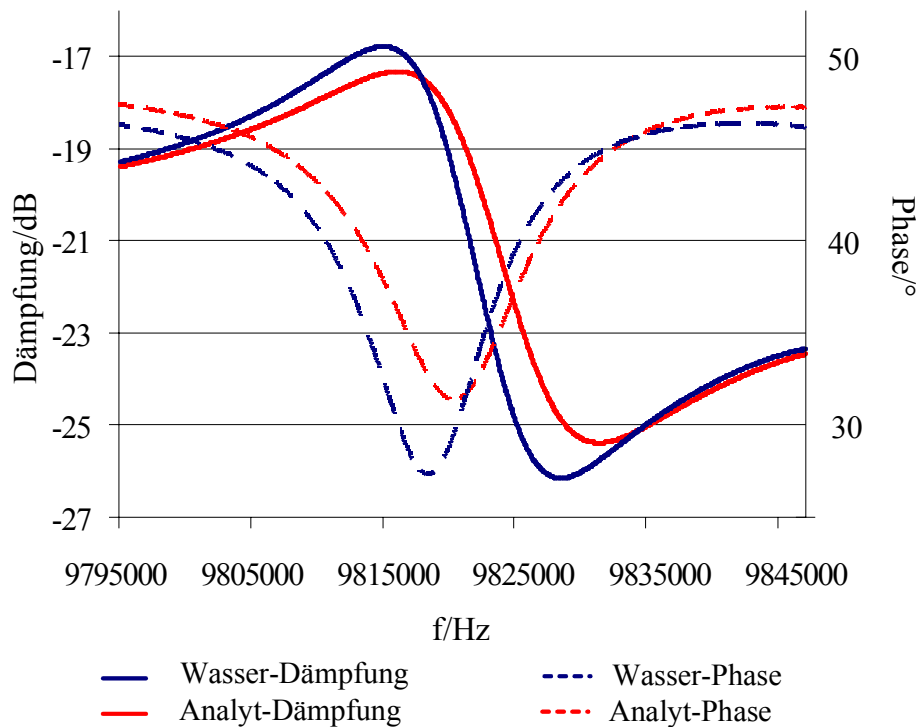


Abb. 37: Frequenzverlauf eines mit doppellzelliger Hefe geprägten Quarzes bei Massebelastung mit gewöhnlicher Hefe. Die Kurve erfährt als Ganzes einen Shift in den höheren Frequenzbereich. Gezeigt ist die Grundschiwingung bei 10 MHz. Konzentration der Hefelösung: 5 mg/mL.

Nach Zugabe der Hefesuspension erhält man abermals einen gleichartigen Kurvenverlauf, jedoch ist die Frequenz an jedem Punkt zu höheren Werten verschoben. Eine Beteiligung der Schaltung an dem beobachteten Phänomen ist somit ausgeschlossen. Der aufgezeichnete Frequenzhub hängt demnach einzig von der Art der Bewegung des Analyten bzw. der Schicht ab. Da die Schwingungsfrequenz direkten Einfluss auf die Form der Bewegung des Coatings sowie der Zelle nimmt, liegt eine Analyse des Phänomens bei höheren Frequenzen nahe. Die erste Oberschwingung liegt bei 30 MHz ($2n+1$). Abb. 38 zeigt die Frequenz und Phasenkurven in Abhängigkeit der Dämpfung.

Die serielle und parallele Frequenz ist bei der 1.Oberschwingung weitaus weniger stark ausgeprägt. Aus diesem Grund ist das Aufzeichnen der Frequenz mit der

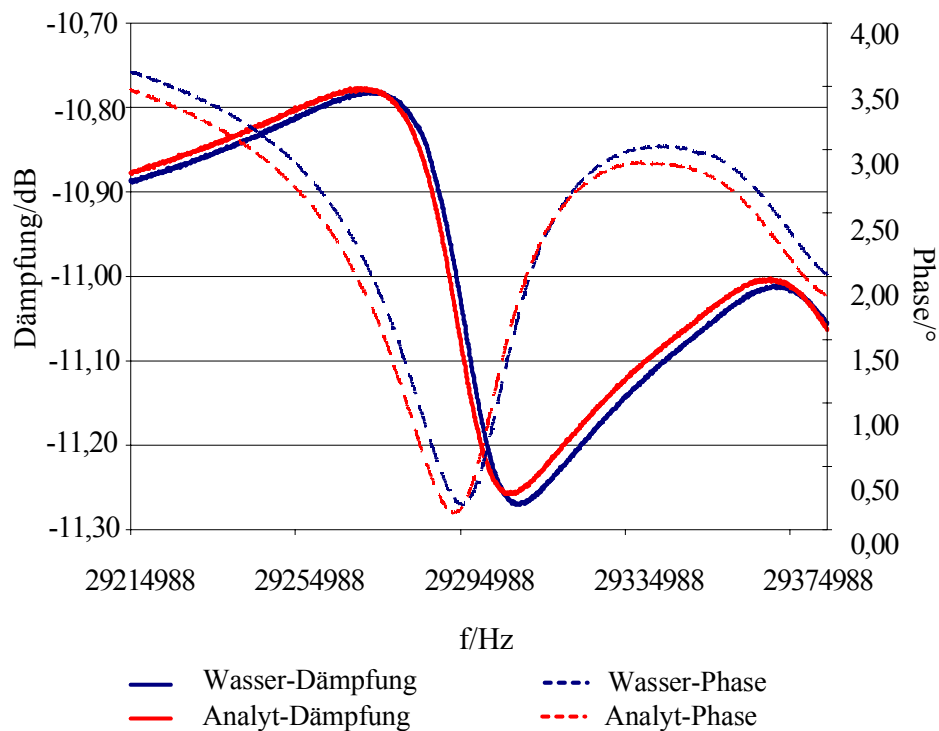


Abb. 38: Der zuvor noch non-Sauerbrey Verhalten zeigende Quarz kehrt bei 30 MHz zum normalen Frequenzabfall zurück. Konzentration der Hefelösung: 5 mg/mL.

Oszillatorschaltung nicht möglich. Der Verlauf der Kurven in Wasser gleicht demjenigen der Grundschiwingung. Bei Zugabe der Analytlösung verschiebt sich das Spektrum hin zu Werten niedrigerer Frequenz, der Sensor kehrt zum bekannten Sauerbrey Verhalten zurück. Auch hier entsprechen die Phasenkurven den Erwartungen. Augenscheinlich ist allerdings das Absinken der Phase bei Analytbesetzung. Das gegenteilige Verhalten, Anstieg der Phase, wird bei der 10 MHz Grundschiwingung beobachtet.

7.5 Zusammenfassung und Interpretation

Die Beobachtung des nicht-klassischen Verhaltens, i. e. ein Ansteigen der Frequenz, ist an einige Parameter geknüpft. Die Dicke der aufgetragenen Schicht muss ein Mindestmaß aufweisen, die Imprints der Oberfläche hat aus doppelzelligen Hefen, die Messlösung aus nativen einzelligen Hefen zu bestehen. Bei starren dünneren Schichten tritt durchgängig der zu erwartende Sauerbrey-Frequenzabfall ein, unabhängig von der Prägung wie des verwendeten Analyten. Mit Ansteigen der Schichtdicke nimmt der Einfluss der Viskoelastizität des Polymers zu. Gepaart mit der steigenden Dämpfung führt dies, für den Fall doppelzellige Hefelösung / doppelzellige Kavitäten zu einem schwächer werdenden Sauerbrey Effekt durch die angelagerte Masse an der Schicht. Für eine genaue Analyse des effektiven Ansteigens der Frequenz beim Fall Imprint doppelzellig / Hefelösung einzellig muss sowohl die Form der Bewegung des Analyten an der Oberfläche, wie auch die Abmesser der Imprints / Hefe herangezogen werden. Die doppelzellige Prägung eignet sich naturgemäß am stärksten zur Analyse von Lösungen doppelzelliger Hefen. Die höhere Selektivität der Schicht gegenüber Hefen dieses Entwicklungsstadiums als zu nativen, einzelligen, Hefen wird beim Vergleich des Ausmaßes der Frequenzerniedrigung bei dünnen Schichten erkennbar. Durch die Erhöhung der Masse ist klassisches Sauerbrey-Verhalten in beiden Fällen zu erkennen. Aufgrund der nicht optimalen Passform des Analyten in die Kavitäten ist dieses allerdings abgeschwächt. Es ist bereits bekannt, dass in solch einem Fall dem Analyten eine gewisse Beweglichkeit auf der Oberfläche zugeschrieben werden muss⁵³. Die Umkehr zum nicht-klassischen Frequenzanstieg bei Verwendung dicker Schichten ist eine Folge ebendieser Beweglichkeit. Das Absinken der Frequenz durch die Massenbelegung wird hier von ebendiesem Mobilitätseffekt übertroffen, woraus letztendendes ein Frequenzhub resultiert. Die Analyse der Frequenzspektren der 10 MHz Grundschwingung wie der 30 MHz Oberschwingung erlauben eine Beschreibung der Bewegungsart. Das Verschieben des gesamten Spektrums bei 30 MHz zu kleineren Werten zeigt dass die Art der Bewegung von der Frequenz abhängen muss. Die Vermutung liegt nahe, dass die einzelne Hefe sich in einer doppelzelligen Kavität relativ frei bewegen kann, und bei 10 MHz diese Bewegung zu

einer Resonanz führt. Den Beweis für den Resonanzfall gibt die Rückkehr zu klassischem Sauerbrey Verhalten bei 30 MHz.

Tab. 6: Zusammenfassung der Netzwerkanalysatorergebnisse. Konzentration der Hefelösung 5 mg/mL. Das Anti-Sauerbrey Verhalten (positiver Frequenzshift) wurde einzig bei Prägung mit doppelzelliger Hefe, Schichtdicke 3,5 μm und einzelliger Hefesuspension beobachtet. Bei der ersten Oberschwingung kehrt der Sensor zum normalen Sauerbreyverhalten zurück.

	10 MHz Sauerbrey 2 μm Schichtdicke Δ (Hefelösung-Wasser)	10 MHz Anti-Sauerbrey 3,5 μm Schichtdicke Δ (Hefelösung - Wasser)	30 MHz Anti-Sauerbrey 3,5 μm Schichtdicke Δ (Hefelösung - Wasser)
f_{seriell} [Hz]	-1800	700	-3300
Phasenminimum m [°]	4	4,5	0,2

8 Massensensitive Detektion von Bakterien

8.1 Einleitung

Als der Mikroskopentwickler Antonie van Leeuwenhoek^{56,57} 1676 die Beobachtung von “kleinen Tierchen“ (französisch: Animalcules) unter einem seiner Geräte dokumentierte, konnte er noch nicht ahnen, dass er soeben als erster die am weitesten verbreitete Lebensform der Erde entdeckte. Die prokaryotische Familie der Bakterien ist neben den Archaeaen und Eukaryoten einer der drei Äste im Drei-Domänen System. Als mögliche Ursache für das Auftreten von Krankheiten wurden sie von Louis Pasteur in der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts ausgemacht. Durch die große Vielzahl an Untergruppen ergibt sich naturgemäß ein breites Spektrum an Eigenschaften, von denen man heute in vielen Bereichen des Lebens Gebrauch macht. In der Biotechnologie werden sie zur Synthese von Antibiotika und Enzymen genutzt. Gentechnik und Kläranlagen sind bloß zwei weitere Einsatzfelder in denen man sich die positiven Eigenschaften verschiedenster Bakterien zunutze macht. Gleichwohl die technologische Bedeutung im Alltagsleben im Vordergrund steht, muss auch auf deren Mißbrauch, i.e. Einsatz für terroristische und kriegsrische Zwecke, hingewiesen werden. Besonders die Anschläge mit kontaminierten Briefen in den USA in den Wochen nach dem 11. 9. 2001 sorgten für Aufsehen in der Öffentlichkeit. Fünf Menschen starben damals infolge der Milzbrandentzündung, ausgelöst durch den *Bacillus Anthracis*.

Dem ausgehenden Gefahrenpotential hinken die Nachweismöglichkeiten hinterher. Die genaue Untersuchung der Probe, sprich die Möglichkeit qualitative wie quantitative Aussagen zu treffen, erfolgt nach Probennahme zumeist mit aufwendigen Analysemethoden im Labor. Für die qualitative Charakterisierung hat sich die PCR (Polymerase Kettenreaktion) als probates Mittel neben anderen, hauptsächlich optischen Tests nach Kultivierung, erwiesen. Für eine (rein) quantitative Untersuchung kommen real time PCR und Durchflußzytometrie⁵⁸ in Frage. Angesichts der Tatsache, dass ein schnelles Einschreiten die Opferzahl gegebenenfalls reduzieren kann, ist gerade in diesem Feld eine rasche Vorort-Detektion wünschenswert. Im Zuge der

vorliegenden Arbeit wurde als Testbakterium *Escherichia Coli* verwendet. Neben seiner dem *Bacillus Anthracis* ähnlichen makroskopischen Eigenschaften sind leichte Verfügbarkeit sowie Bedeutung des Vorkommens in Lebensmittel und Trinkwasser Fürsprecher dieser Entscheidung.

Da sich der Anthraxerreger über die flüssige als auch über die gasförmige Phase verbreiten kann, wurden in weiterer Folge Testsysteme für die Gasphase entwickelt. Im Zuge einer Kooperation kamen zwei weitere Sporen als Analyten zum Einsatz. Die Proben des *Bacillus Subtilis* wie des *Bacillus Thuringiensis* wurden freundlicherweise vom „Centre de Biologie Est, Laboratoire de Bacteriologie - Institut de Microbiologie“ (Bron Cedex, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

8.2 *Escherichia Coli*

*Escherichia Coli*⁵⁹ ist der am besten untersuchte Mikroorganismus. Mit einer Zellteilungsdauer von etwa 20 Minuten unter optimalen Bedingungen ist es eines der sich am schnellsten vermehrenden Organismen, was den *Bacillus* auch für vielseitige Anwendungen und Untersuchungen in der Biotechnologie und Genetik prädestiniert. Als Mitglied der Familie der fakultativ anaeroben Organismen zeigt es sich unter aeroben wie anaeroben Bedingungen überlebens- und vermehrungsfähig. Obwohl *E. Coli* einen Teil der natürlichen Darmfauna des Menschen ausmacht gibt es eine Reihe von Stämmen welche für das Auftreten von Infektionen verantwortlich sind. Besonders hervorzuheben ist die EHEC-Colitis (enterohämorrhagische Colitis) welche eine der am weitestverbreiteten Lebensmittelvergiftungen darstellt. Für eine Übersicht über den generellen Aufbau der *Escherichia Coli* Spezies wird auf allgemeine Lehrbücher⁶⁰ verwiesen.

Für den Einsatz als Templat zur Bearbeitung von Oberflächen interessiert besonders die Zusammensetzung der Oberfläche als auch die makroskopischen Größenordnungen des Organismus. Als gramnegatives Bakterium besitzt der Organismus eine schützende Doppelmembran. Aus der äußeren Hülle ragen eine Vielzahl von Lipopolysacchariden (LPS). Diese Substanzklasse setzt sich aus einem polaren Zuckerteil auf der einen und einem apolaren Fettteil auf der anderen Seite

zusammen. Da der apolare Teil in der Lipidschicht der Doppelmembran verankert ist ragen die Hydroxyfunktionen in die Umgebung. Es ist demnach mit einer durchwegs polaren Oberfläche zu rechnen.

Unter natürlichen Bedingungen sind E. Coli zusätzlich noch von einer Kapsel umgeben. Diese, ebenfalls aus Polysacchariden zusammengesetzte Hülle ist lose an die Zelloberfläche gebunden, und geht im Zuge des Aufreinigens der Mikroorganismen verloren. Abb. 39 zeigt eine AFM Aufnahme der, zuvor kultivierten und getrockneten, E. Coli auf einer Glasoberfläche. Die erfasste Größe von durchschnittlich $1,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ entspricht den Angaben der Literatur.

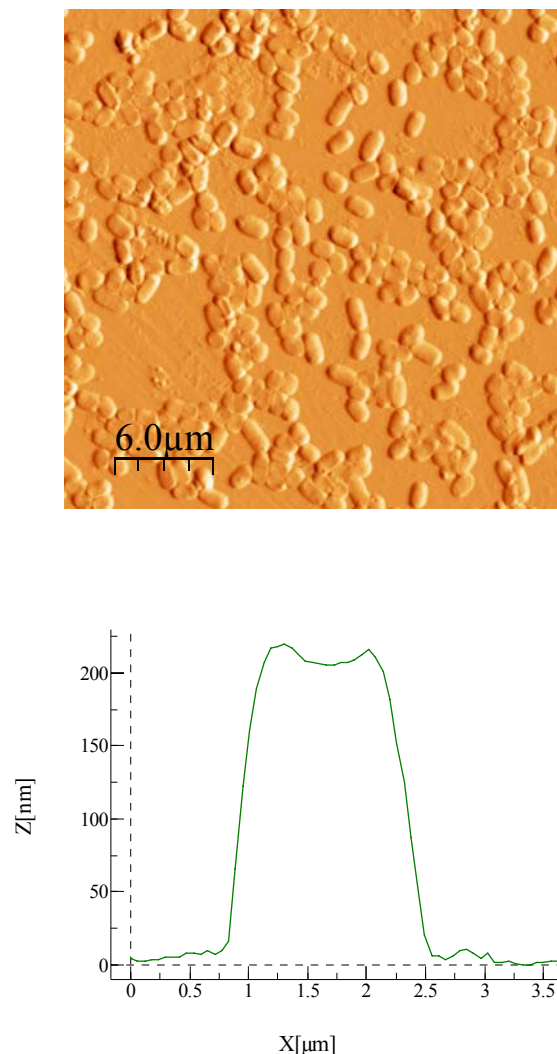
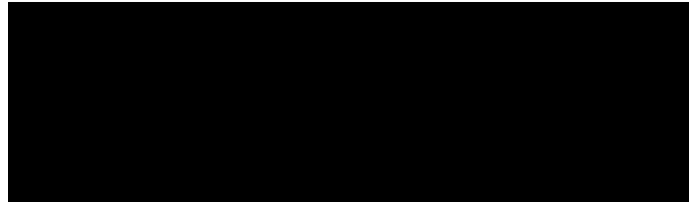


Abb. 39: Oben: E. Coli auf Glas

Unten: Querschnitt längs eines einzelnen Organismus

Die im Laborhandel erhältlichen gefriergetrockneten Proben können je nach Bedarf selbst kultiviert werden. Die Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums gibt Tab.7 wieder.

Tab. 7: Komponenten des Nährmediums für *Escherichia Coli*



8.3 *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Thurigiensis*

Bezüglich der Größenordnung näher am Anthraxerreger sind der *Bacillus Subtilis* und *Bacillus Thurigiensis*. Es wurden die Sporen des jeweiligen Typus eingesetzt.

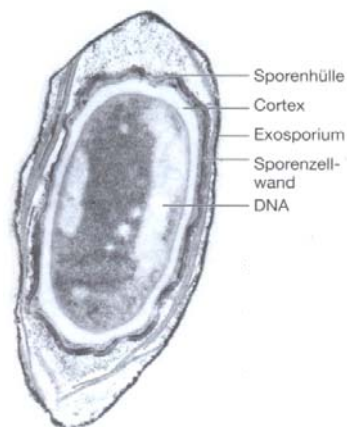


Abb. 40: Querschnitt einer Spore⁶¹. Der Kern wird durch mehrere übereinander liegende Schichten vor schädlichen Umwelteinflüssen geschützt.

Sporen⁶¹ sind differenzierte, äußerst langlebige Zellen. Sie sind das Ergebnis eines, als Sporulation bezeichneten, im Zellinneren ablaufenden Prozesses. Einige Gattungen gram positiver Bakterien reagieren mit der Bildung von Endosporen (endo: innerhalb) auf unwirtliche äußere Bedingungen. Sie versetzen sich in eine Art schlafenden Zustand, wodurch sie in der Lage sind, selbst unter den extremsten Bedingungen mehrere tausend bis hunderttausend Jahre zu überleben. Die mehrere Schichten umfassende Hülle macht die Spore resistent gegenüber aggressiven Chemikalien wie

Säuren, Laugen und chemischen Desinfektionsmittel. Die chemische Zusammensetzung des Kerns erklärt die Resistenz gegenüber Temperaturen von bis zu 150°C: CaDPA (Calziumdipicolinsäure) Komplexe dehydratisieren den Kern und interkalieren mit der DNA zur Erhöhung der Stabilität. SASPs (kleine säurelösliche Proteine) überführen die Nukleinsäure von der nativen B in die kompaktere A-Form. Wieder ist Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche unabdingbar. Abb. 40 zeigt einen Querschnitt durch die freie Spore. Der ersten Peptidoglykanschicht (Cortex) folgen aufeinanderliegend Sporenhüllen, welche hauptsächlich aus Proteinen bestehen. Den Kontakt mit der Umgebung stellt eine, als Exosporium bezeichnete, dünne, lose gebundene Proteinschicht her. Die Abb. 41 und 41 zeigen Rasterkraftmikroskopaufnahmen der beiden Organismen.

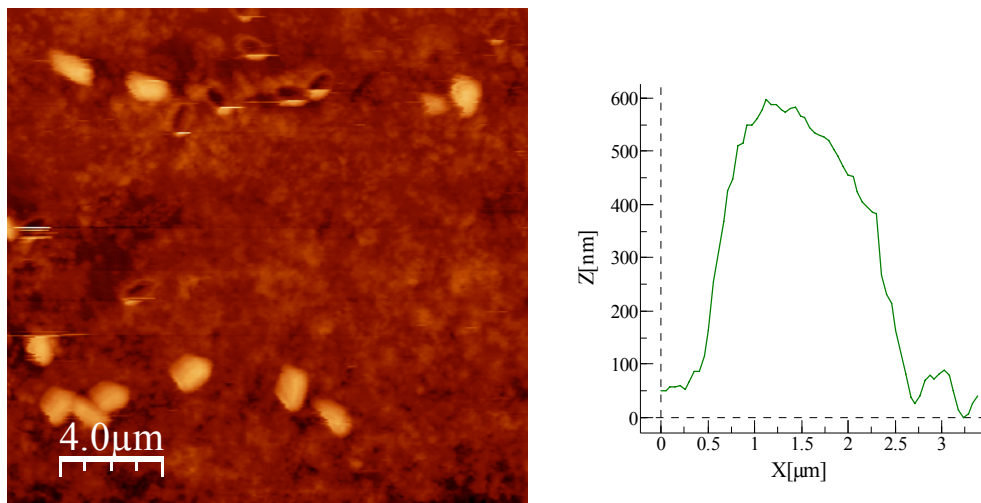


Abb. 41: AFM Aufnahme der Sporen des Bacillus Subtilis auf Glas . Rechts: Querschnitt

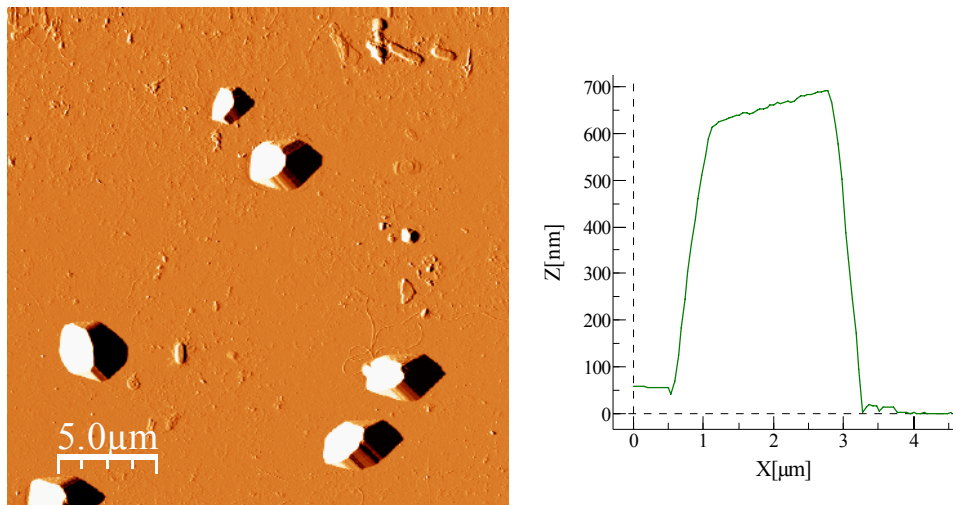


Abb. 42: AFM Aufnahme der Sporen des *Bacillus Thuringiensis*. Rechts: Querschnitt

Zu sehen sind die, zuvor aufgereinigten, Sporen auf Glas. Man erkennt die eher kugelförmige Form der beiden Bacilli. Mit Hilfe der Höhenschichtlinie können die Durchmesser bestimmt werden. Mit je rund 2-3 μm sind die Organismen um etwa 1 μm größer als Colibakterien.

8.4 QCM Sensoren *Escherichia Coli*

Die gefriergetrockneten Mikroorganismen werden in ein zur Züchtung geeignetes Nährmedium (siehe Tab.7) suspendiert. Dadurch wird einerseits das Ausbilden der nativen Form der Bakterien sichergestellt. Zugleich erhält man eine Selektion bezüglich der Mikroorganismen welche den Gefriertrocknungsprozess unbeschadet überstanden haben (laut Herstellerangaben etwa 20%). Nach Abzentrifugieren und darauf folgendem mehrmaligem Waschen kann die Suspension entsprechend weiter verdünnt werden. Die 5 μL Lösung sollte möglichst gleichmäßig auf das 5*5 mm große Glasplättchen aufgetragen werden, um einen Konzentrationsgradienten und somit in weiterer Folge ein Koagulieren der Mikroorganismen zu vermeiden. Die Verteilung der *E. Coli*s auf dem Glas kann wahlweise mit dem Lichtmikroskop oder AFM überprüft werden.

Bei vorangegangener Markierung mit Bisbenzimid (100 $\mu\text{g/mL}$) kann alternativ die Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 43).

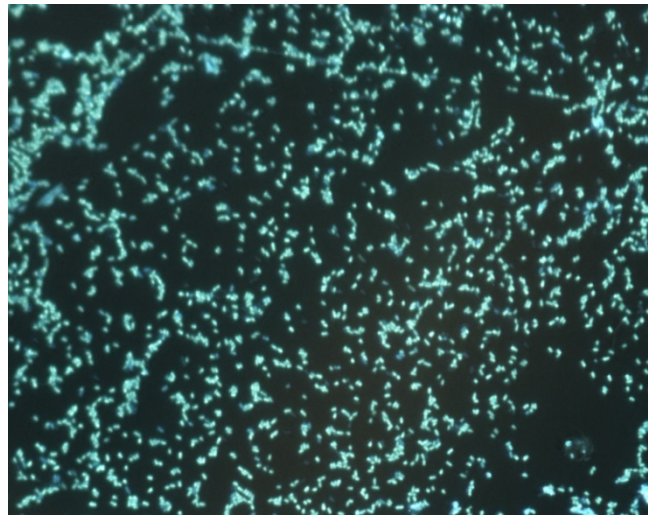


Abb. 43: Fluoreszenzaufnahme eines E.Coli Stempels bei 50-facher Vergrößerung. (Marker Bisbenzimid 100 $\mu\text{g/mL}$). Man erkennt die durchwegs homogene Verteilung der Mikroorganismen

Nach erfolgter Trocknung bei Raumtemperatur über 1-2 Stunden wird die Oberflächenprägung durchgeführt. Je nach Polymer kann Restfeuchte das Ergebnis beeinflussen. Polivinylpyrrolidon und Polyacrylat sind unempfindlich gegenüber Feuchte (das Lösungsmittel der Polymerisation ist Wasser). Die Isocyanatgruppe des Methylen-diisocyanats (MDI), eines der Monomere von Polyurethan, reagiert hingegen nach folgendem Schema unter CO_2 -Abspaltung mit Wasser:

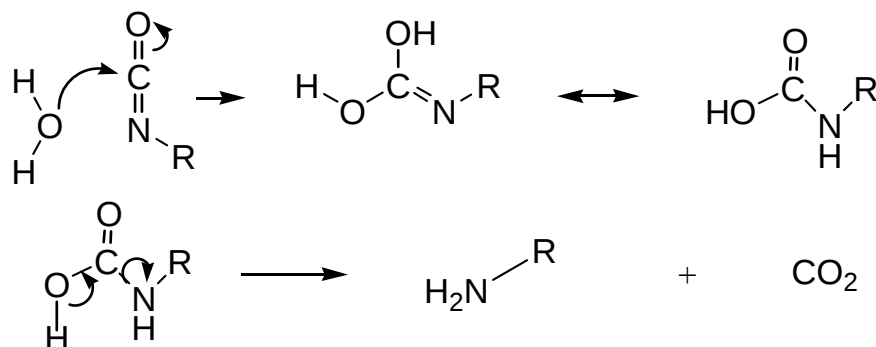


Abb. 44: Schema der Reaktion von Isocyanat mit Wasser. Das entstehende CO_2 weicht aus der Oberfläche.

Das freiwerdende CO₂ dringt aus dem noch nicht ausgehärteten weichen Polymer.

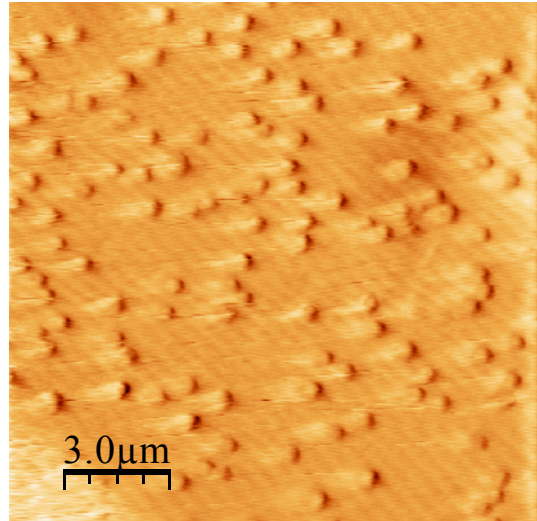


Abb. 45: Durch Einwirken von Wasser veränderte Polyurethanoberfläche. Eine derartig strukturierte Beschichtung führt zum unselektiven Absinken der Frequenz auf behandelter wie unbehandelter Elektrode.

Daraus resultieren, wie in Abb. 45 ersichtlich, Gasbläschen auf der Oberfläche. Diese können aufgrund ihrer mittleren Größe einen nicht selektiven Beitrag zur Sensorantwort leisten.

Nach dem Aushärten des Polymers muss der Stempel entfernt werden. Mit Polyurethan als Coating hat es sich bewährt den QCM in Wasser über Nacht zu belassen. Aufgrund der guten Stabilität und Haftung der Schicht an das Gold löst sich der Glasstempel ohne weiteres Zutun ab. Da Polyacrylat nur wenig an Glas bindet kann hier der Stempel nach dem Aushärten ohne Weiteres entfernt werden. Gleiches gilt bei Verwendung von Polyvinylpyrrolidon als Beschichtung. Die Oberfläche kann nun mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie untersucht werden. Bei erfolgreicher Prägung findet man meist, wie auch bei Hefezellen, in das Coating eingelagerte E. Coli Bakterien (Abb. 46).

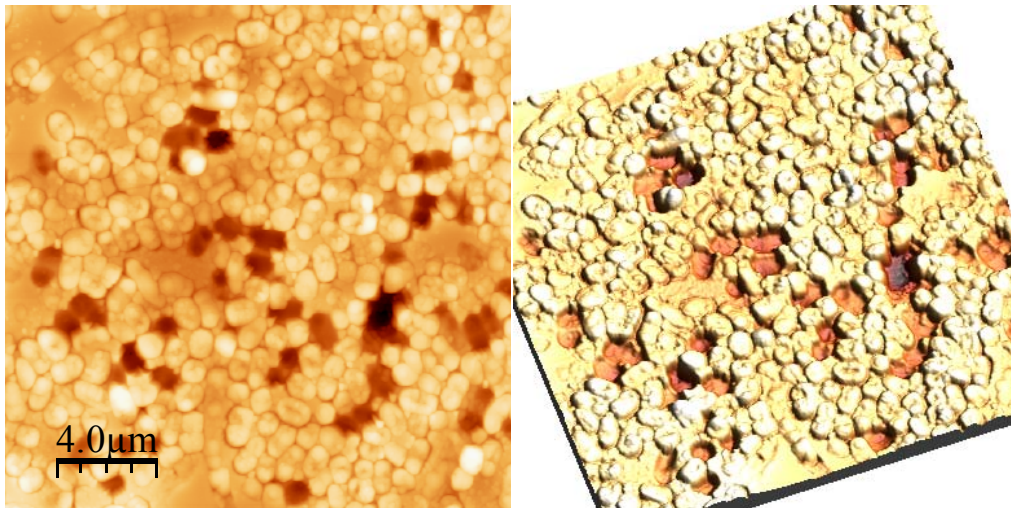
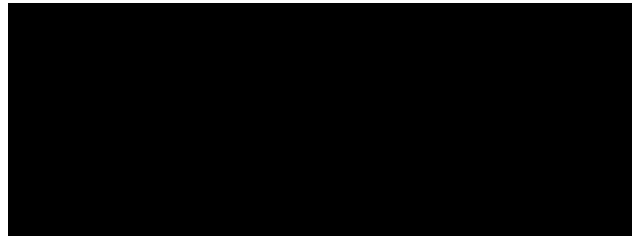


Abb. 46: 2D und 3D Bild von E.Coli Bakterien in einer Polyurethanoberfläche.

Bevor der Sensor einsatzbereit ist, müssen die Mikroorganismen aus den Kavitäten entfernt werden. Da beim Prägen die Tiefe der Abdrücke von Fall zu Fall variiert, gibt es kein Standardverfahren um die Bakterien herauszulösen. Versuche, die Mikroorganismen wie im Falle von Hefe, mit dem Ultraschallbad zu verdrängen erwiesen sich als wenig erfolgreich. Zu kurze Einwirkzeit reicht nicht aus, zu lange beschädigt das Polymer und löst es vom Quarz.

Zwei alternative Strategien erwiesen sich als wirksam. Warme 0,2%ige SDS-Lösung, über etwa eine Stunde, löst in den meisten Fällen bereits die verankerten E. Coli Bakterien aus der Oberfläche. Im Falle von Polyurethan und Polyacrylat als Beschichtung reicht dies allerdings oft nicht aus. Besonders über die reaktiven Isocyanatgruppen kann der Analyt über Hydroxybindungen der Polysaccharide kovalent verankert werden. Zum Einsatz kommt eine, aus der Biochemie bekannte, Lysozym-Lösung mit der in Tab. 7 gegebenen Zusammensetzung. Das, etwa im menschlichen Speichel und Schweiß vorkommende, Enzym ist in der Lage die Zellwand von grampositiven wie gramnegativen Bakterien zu degenerieren. Die Wirksamkeit beruht auf der Spaltung von Peptidoglykanen, einer der Bestandteile der Zellwand. Im Falle von gramnegativen Mikroorganismen, wie E. Coli, ist der Zusatz von EDTA zur Komplexierung von Magnesiumionen zwingend.

Tab. 8: Zusammensetzung der Lysozymlösung. Das Lysozym bricht Bakterienwände auf. Die Reste werden anschließend mit 0,2%iger SDS-Lösung von der Oberfläche gewaschen.



Die zweiwertigen Ionen sind im nativen Zustand der Zelle für die Stabilisierung der Membran verantwortlich. Erst nach deren Komplexierung mit dem Chelatbildner kann das Enzym seine Wirkung entfalten. Um die Zellreste zu entfernen wird nach der Lysozymlösung für rund 20 min. mit 0,2%iger SDS Lösung gespült.

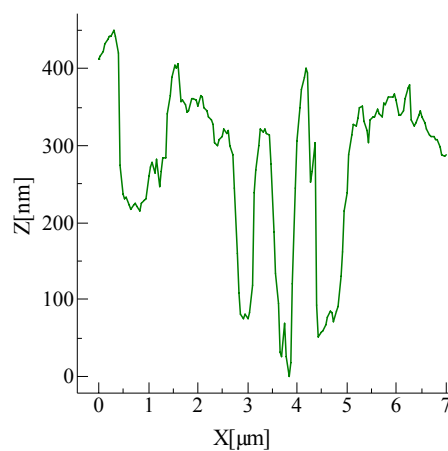
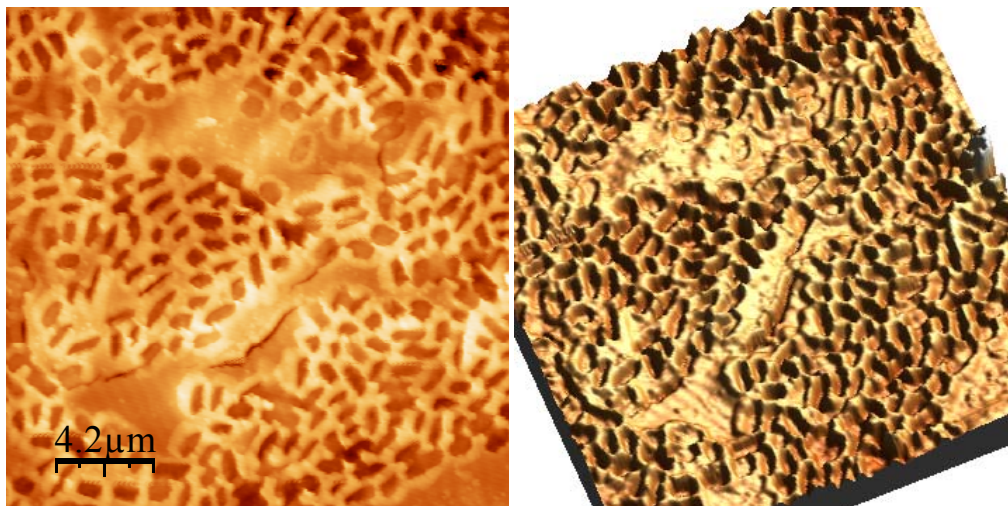


Abb. 47: 2D, 3D-AFM-Bilder der zurückbleibenden Kavitäten. Der Querschnitt (unten) gibt die Dimension und Tiefe der E.Coli-Imprints wieder.

Die erhaltenen Kavitäten können wieder mit dem AFM untersucht und ausgewertet werden (Abb. 47). Die Durchmesser der Imprints stimmen mit denen der nativen Coliorganismen überein. Die Tiefe der zurückbleibenden Abdrücke kann hingegen von Prägung zu Prägung variieren. Beim Aufspinnen der Schicht verdampft das niedersiedende Lösungsmittel (THF) rasch. Das Zeitfenster zwischen Auftragen der Schicht und Stempeln ist kurz. Wird zu lange gewartet findet man keine oder wenig tiefe Imprints auf der Oberfläche (Abb. 48).

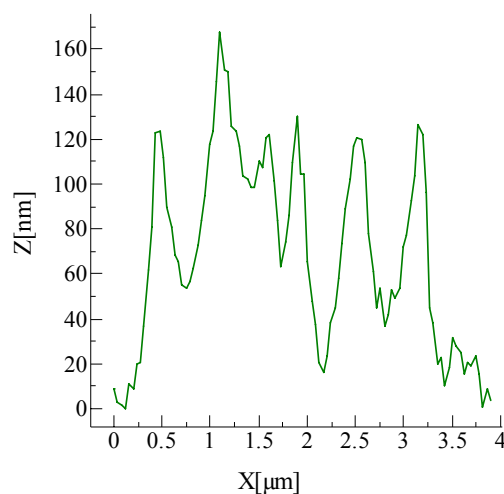
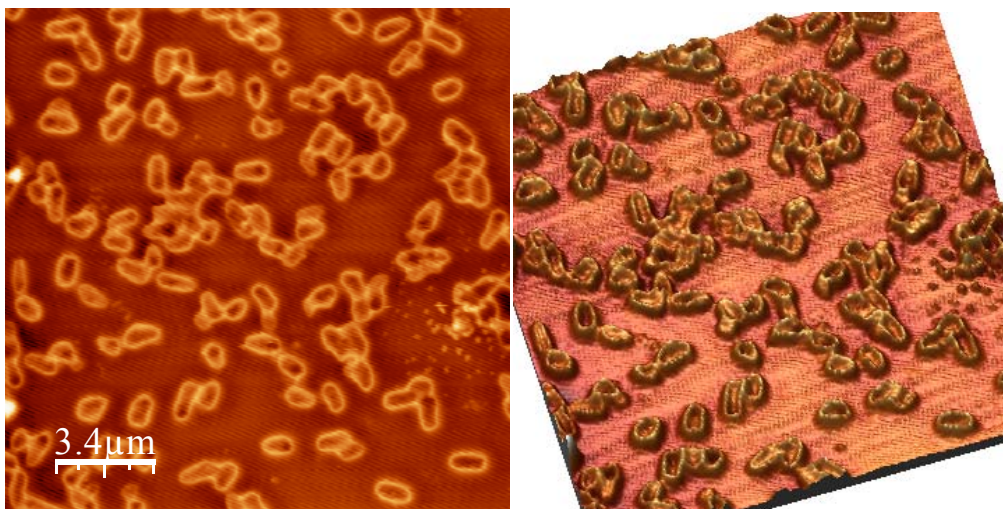


Abb. 48: Wenig tiefe Imprints von Colibakterien. Beim Zeitpunkt des Prägens ist das Polymer bereits fast ausgehärtet.

Unten. Querschnitt gibt die Dimension und Tiefe der E.Coli-Imprints wieder.

Die Imprinttiefe hat direkten Einfluss auf die Sensorantwort. Bei tieferen Abdrücken beobachtet man ein stärkeres Absinken der Frequenz bei gleichzeitiger Verminderung der Reversibilität der Sensorantwort. Beides eine Konsequenz der stärkeren Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Analyt. Wurden die Bakterien zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert können die Mikroorganismen und deren Imprints unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Hellblau leuchtende Punkte sind in den Kavitäten steckende Colibakterien. Auch die Umrisse der Imprints sind bei 50-facher Vergrößerung noch schwach zu erkennen (Abb. 49).

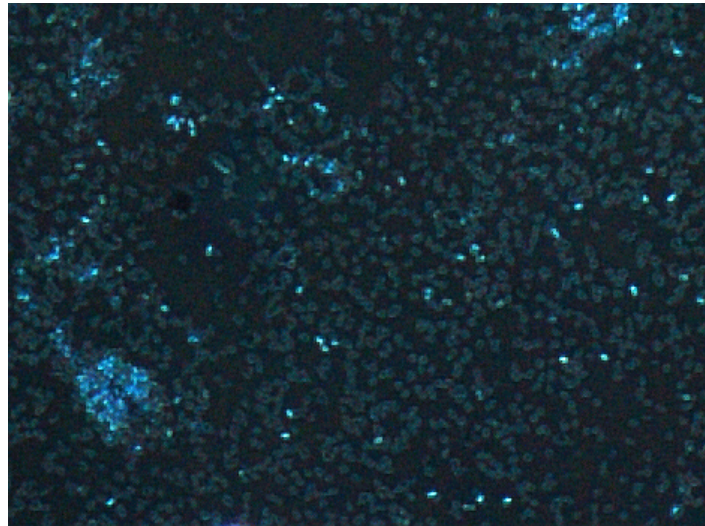


Abb. 49: 50-fache Vergrößerung einer geprägten Oberfläche unter dem Fluoreszenzmikroskop. Helle Punkte sind im Polyurethan verankerte Coliorganismen. Schwächer zu sehen sind Imprints.

8.5 QCM Messungen Escherichia Coli

8.5.1 Flüssigphasenmessungen mit unterschiedlichen Polymeren

Mit den Sensoren wurden Flüssigphasenmessungen durchgeführt. Dazu wurde der Sensor zunächst in der Messzelle mit Wasser gespült. Dadurch sättigt sich das Polymer mit Wasser, was zu einem Frequenzabfall von mehreren Kiloherz führt (s. Kap. 6.1). Nachdem die Frequenz einen stabilen Wert erreicht hat, wird durch die Messzelle eine Lösung von in Wasser gelösten E. Colis gepumpt. Die Pumpgeschwindigkeit wird bei 2 mL/min konstant gehalten.

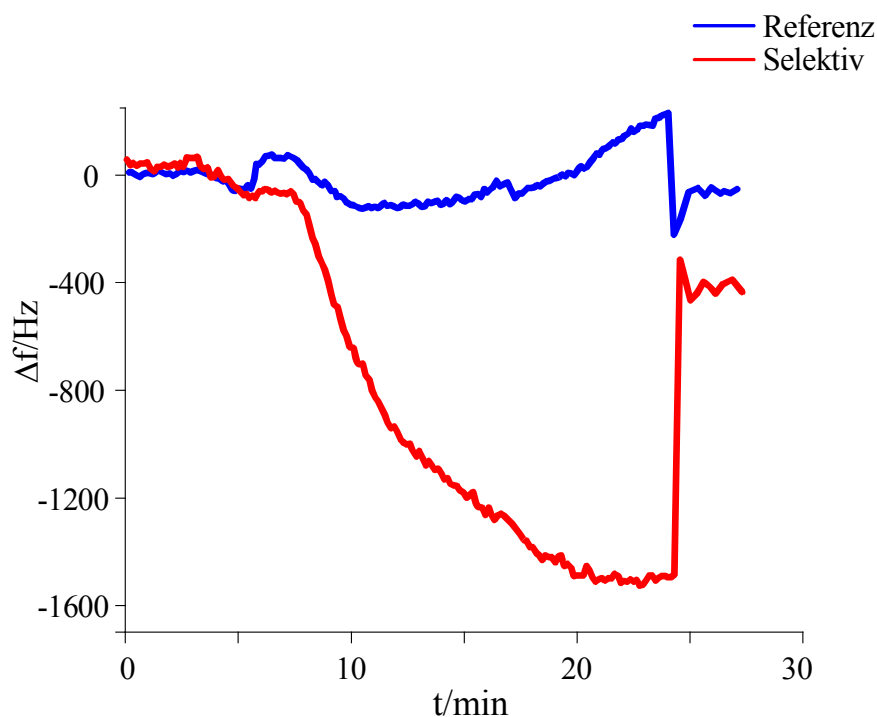


Abb. 50: Antwort eines Polyurethansensor auf eine Colilösung mit einer Konzentration von 3 mg/mL. Der Effekt ist nach Zugabe von Wasser nicht vollständig reversibel da einige der Bakterien in den Kavitäten stecken bleiben. Schichtdicke ~600 nm.

Gezeigt ist die Antwort eines Polyurethansensors auf eine 3 mg/mL E.Coli Lösung. Man erkennt die rasche Antwort des Sensors. Wird nach der Messung mit Wasser gespült kehrt die Frequenz auf der Referenz zum Ausgangswert zurück. Auf der geprägten Elektrode beobachtet man keine vollkommene Rückkehr auf das anfängliche Signal. Einige der Bakterien können nicht mehr aus den Kavitäten befreit

werden. Dass sich dieses Verhalten nicht bei jedem Quarz zeigt, ist auf die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Oberflächenprägung zurückzuführen. Eine einheitliche Tiefe der Imprints ist nicht gewährleistet, was sich in unterschiedlicher Ausprägung dieses Effekts widerspiegelt. Die Zusammensetzung des eingesetzten Polyurethans fasst Tab.8 zusammen.

Tab. 9: Genaue Zusammensetzung des zur Beschichtung verwendeten Polymers.

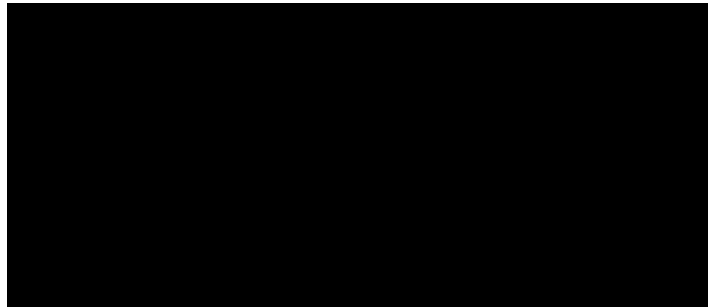


Abb. 51 zeigt den Frequenzverlauf eines mit Polyacrylat beschichteten QCMs.

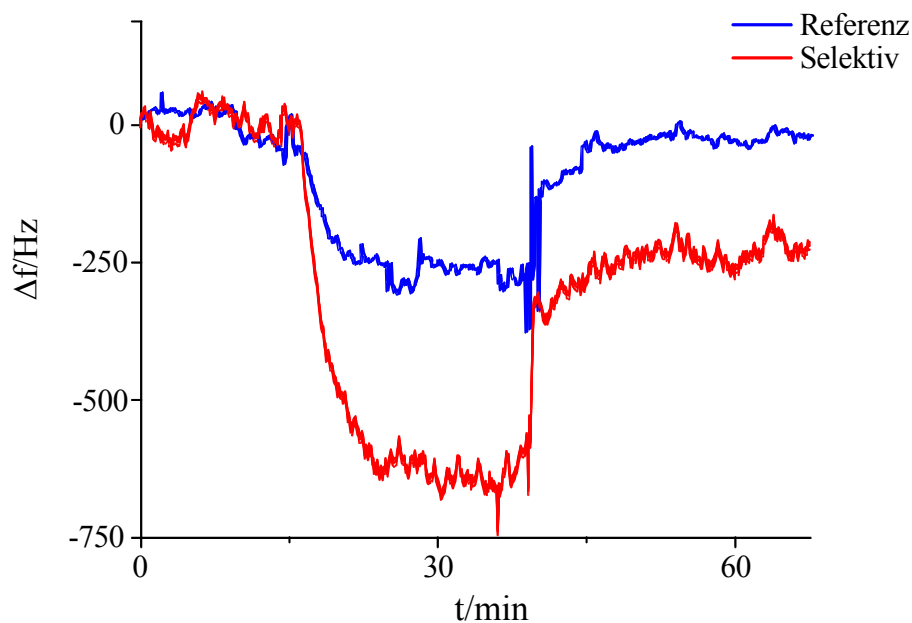


Abb. 51: Absinken der Frequenz eines Sensor auf der Basis von Polyacrylat. Bakterienkonzentration: 3 mg/mL. Schichtdicke $\sim 1 \mu\text{m}$.

Auch hier erkennt man eine selektive und weitgehend reversible Antwort des Sensors auf die Bakterienlösung. Die genaue Zusammenstellung der Komponenten ist in Tab.9 gezeigt.

Tab. 10: Rezeptur Polyacrylat.



Auch der mit Polyvinylpyrrolidon beschichtete Sensor zeigt ein ähnliches Verhalten (Abb. 52).

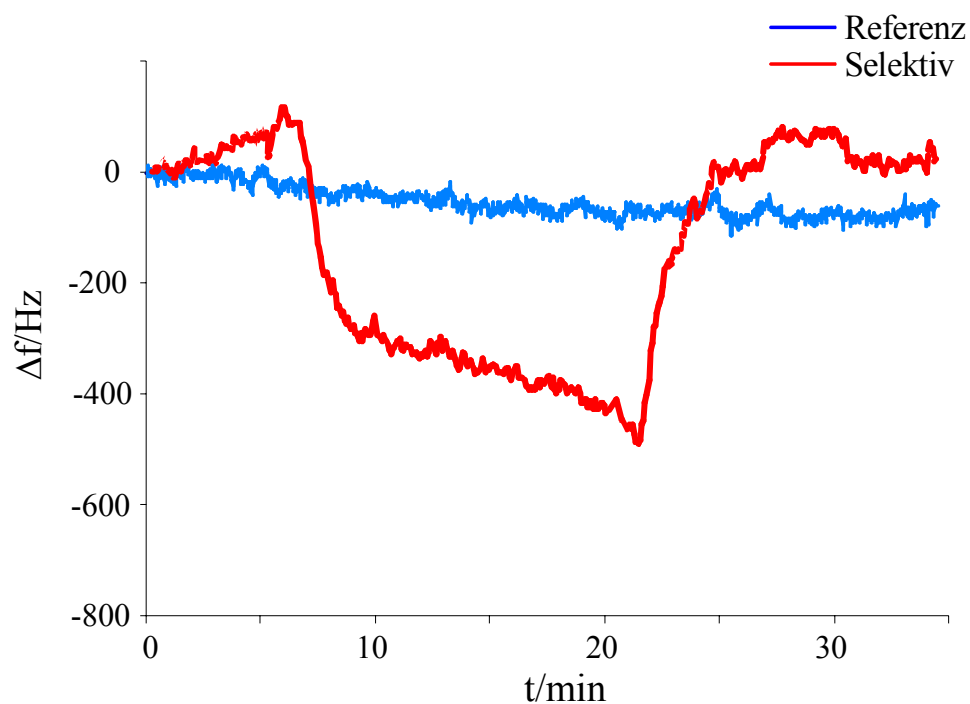


Abb. 52: Reaktion eines Polyvinylpyrrolidonsensors auf eine 3 mg/mL E.ColiLösung. Die Frequenzabnahme fällt deutlich geringer aus. Schichtdicke: $\sim 1 \mu\text{m}$.

Die Zusammensetzung des Polymers zeigt Tab. 10.

Tab. 11: Rezeptur Polyvinylpyrrolidon.



Der Nachweis von Colibakterien gelingt demnach mit allen drei eingesetzten Polymeren mit zufriedenstellender Qualität. Bei einer Gegenüberstellung der Effekte lassen sich weitere Aussagen treffen.

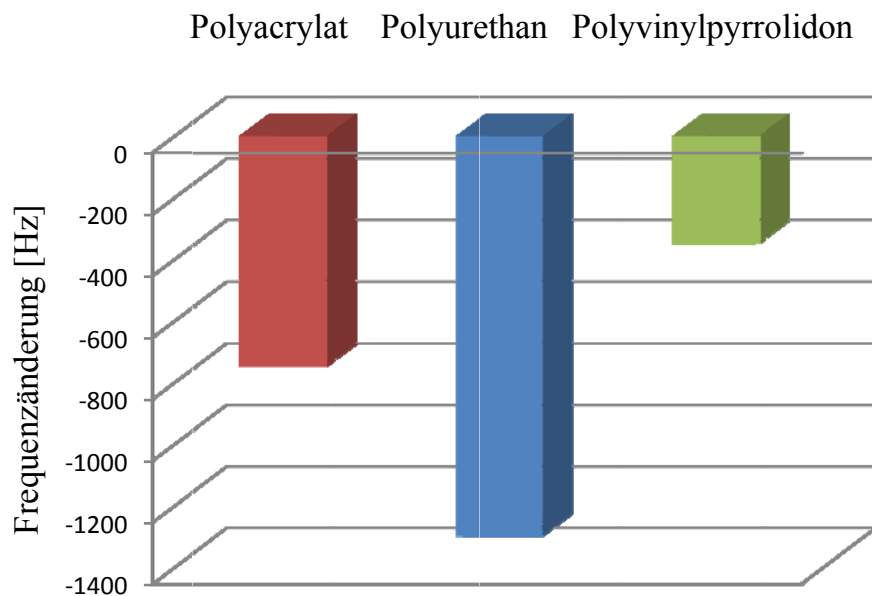


Abb. 53: Zusammengefasst sind die Antworten der unterschiedlichen Sensoren auf eine 3 mg/mL E.Coli Lösung.

Der mit Polyvinylpyrrolidon beschichtete Sensor zeigt die mit Abstand geringste Frequenzänderung. Ursache ist die wesentlich apolarere Oberfläche des Polymers. Weniger Wechselwirkungsmöglichkeiten führen zu geringerer Bindung des Analyten an die Oberfläche. Den stärksten Effekt erzielt man beim Einsatz von Polyurethan. Die Beschichtung der Wahl ist gleich aus mehreren Gründen Polyurethan. Es weißt

einerseits die beste Langzeitstabilität und Haltbarkeit auf. Das Polyvinylpyrrolidon löst sich nach einiger Zeit des Spülens vom Quarz. Auch das Polyacrylat erfüllt in diesem Punkt ohne vorherige Behandlung mit dem zu synthetisierenden Kupplungsreagenz Octan-8-thiol-acrylsäurethioester nicht die geforderten hohen Ansprüche.

8.5.2 Konzentrationsabhängigkeit

Die Abhängigkeit des Sensoreffekts von der Bakterienkonzentration gibt Abb. 54 wieder.

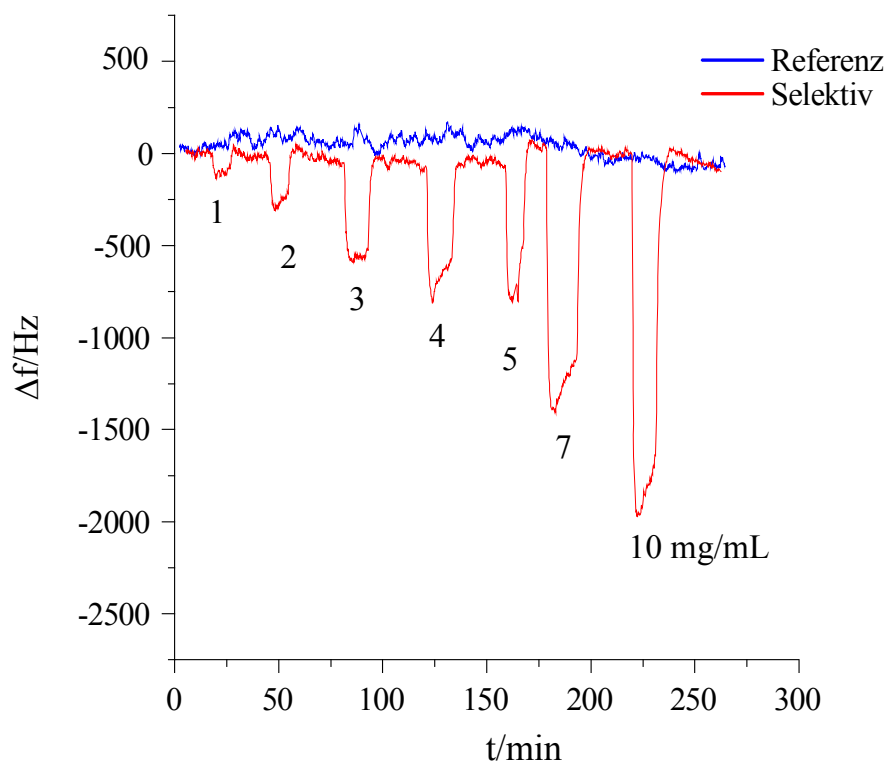


Abb. 54: Konzentrationsabhängigkeit des Sensorsignals. Polyurethan, Schichtdicke $\sim 1 \mu\text{m}$.

Wird das Ausmaß des Effektes gegen die Konzentration aufgetragen lässt sich Anhand der Kurvenform der Prozess der Adsorption interpretieren (Abb. 55).

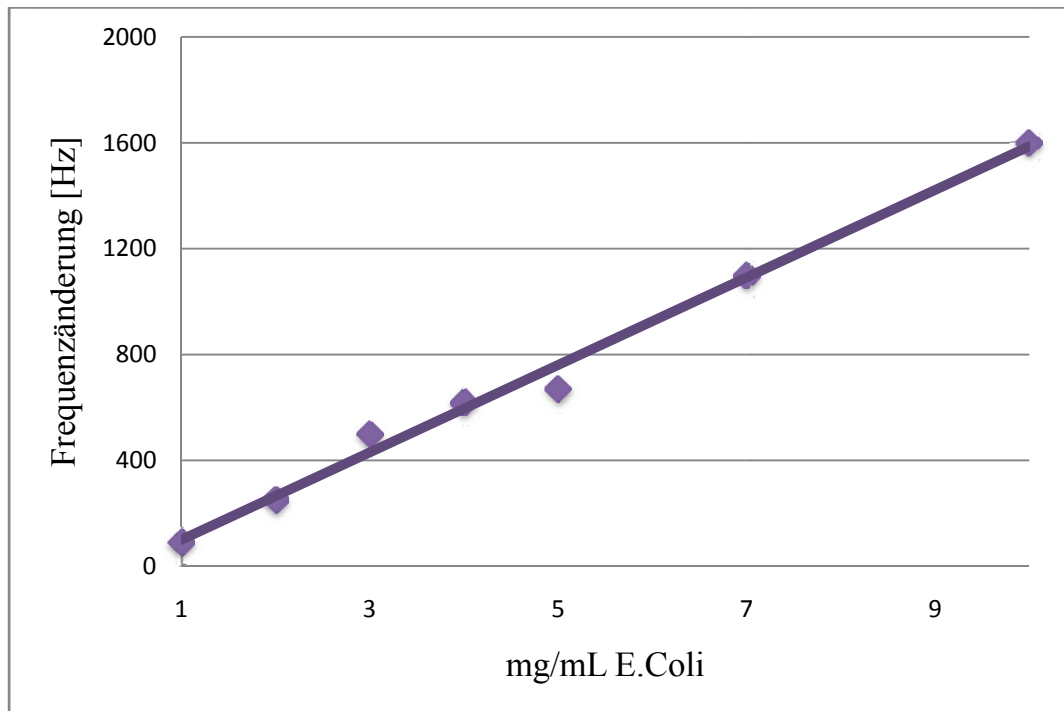


Abb. 55: Ausmaß der Frequenzerniedrigung in Abhängigkeit der zugegebenen Konzentration. Die Kurve steigt stetig mit Zunahme der Konzentration.

Die Kurve steigt stetig mit zunehmender Konzentration. Ein derartiges Verhalten kann auf zwei Weisen erklärt werden:

Die Kurve flacht erst bei noch höheren Konzentrationen ab. Wenn alle verfügbaren Plätze (Imprints) belegt sind, bleibt die Frequenz trotz steigender Bakterienzahl konstant. Der Verlauf einer solchen Kurve wird durch die langmuirsche Adsorptionsisotherme beschrieben.

Es sind schon alle verfügbaren Plätze besetzt, die Mikroorganismen bilden aber mehrere Lagen. Dadurch nimmt die Frequenz trotz steigender Bakterienkonzentration stetig ab (BET).

8.5.3 Querempfindlichkeit

Zur Ermittlung der Querempfindlichkeit innerhalb der Familie der E. Coli, wurde ein weiterer Bakterien Strang erworben. Welche Eigenschaften die W-strain (strain: Stamm) E. Coli auszeichnen war selbst auf Nachfrage beim Hersteller nicht zu erfahren. Ein AFM-Bild zeigt keine erkennbaren makroskopischen Unterschiede zum zuvor eingesetzten Mikroorganismus. Abb. 56 zeigt die Messung der Querselektivität eines nicht-W-strain Polyurethansensors.

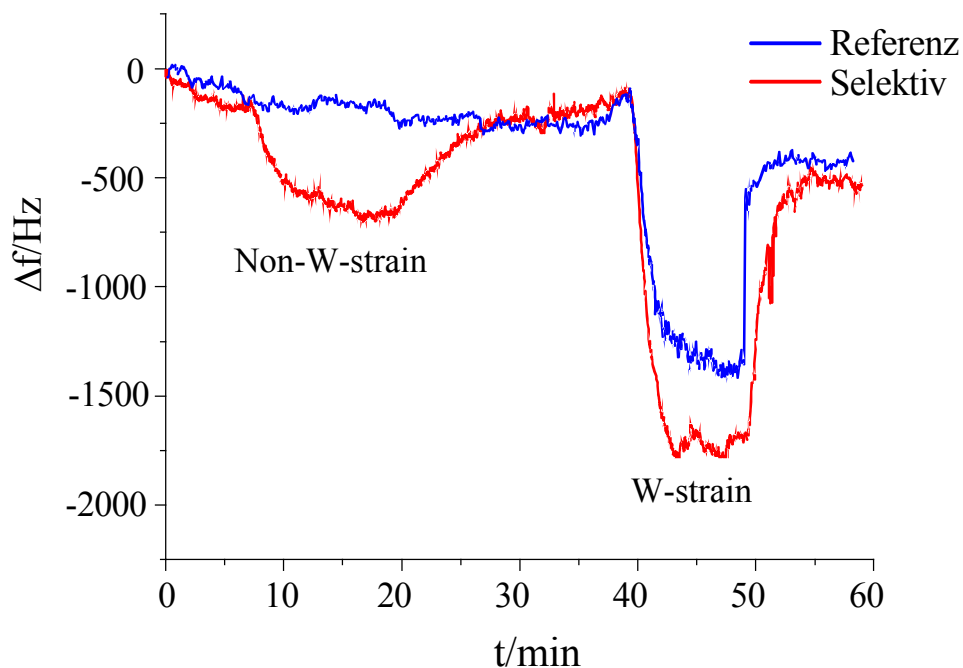


Abb. 56: Querempfindlichkeit des E.Coli Sensors gegenüber W-strain Colibakterien. Zugegeben wurden je 3 mg/mL. Polyurethan. Schichtdicke ~800 nm.

Ein, nicht-W-strain-E. Coli Sensor wird zunächst nicht-W-strain Bakterien ausgesetzt. Erkennbar ist das zu erwartende Verhalten. Die Frequenz der selektiven Seite sinkt, während die Referenz unberührt von der veränderten Umgebung scheint. Nach Rückkehr auf den Ausgangswert beim Spülen mit Wasser werden W-Strain Colibakterien derselben Konzentration zugegeben. Die geprägte Elektrode sinkt um 1500 Hz. Das entspräche einer mehr als doppelten Querempfindlichkeit. Zu beachten ist allerdings der hohe Frequenzverlust an der Referenz von etwa 1200 Hz. Der Nettoeffekt, derjenige der rein auf Wechselwirkungen mit den Kavitäten

zurückzuführen ist, beträgt demnach 300 Hz. Die Antwort Kreuzprägung ist in Abb. 57 zu sehen.

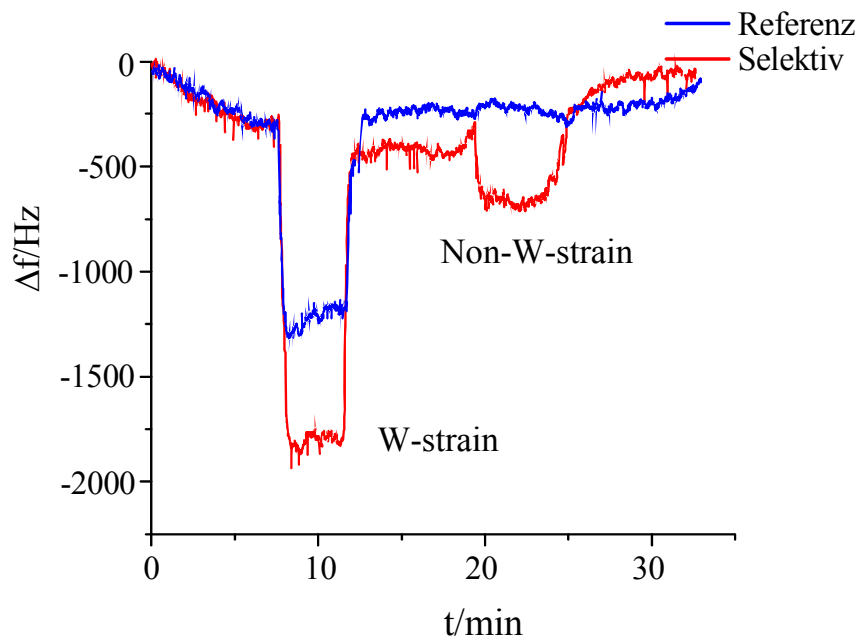


Abb. 57: W-Strain geprägter Polyurethansensor. Bakterienkonzentration: je 3 mg/mL Schichtdicke: ~800nm.

Die Zusammengefassten Ergebnisse der Kreuzprägungen mit den unterschiedlichen Colibakterien auf Basis von Polyurethan zeigt Abb. 58.

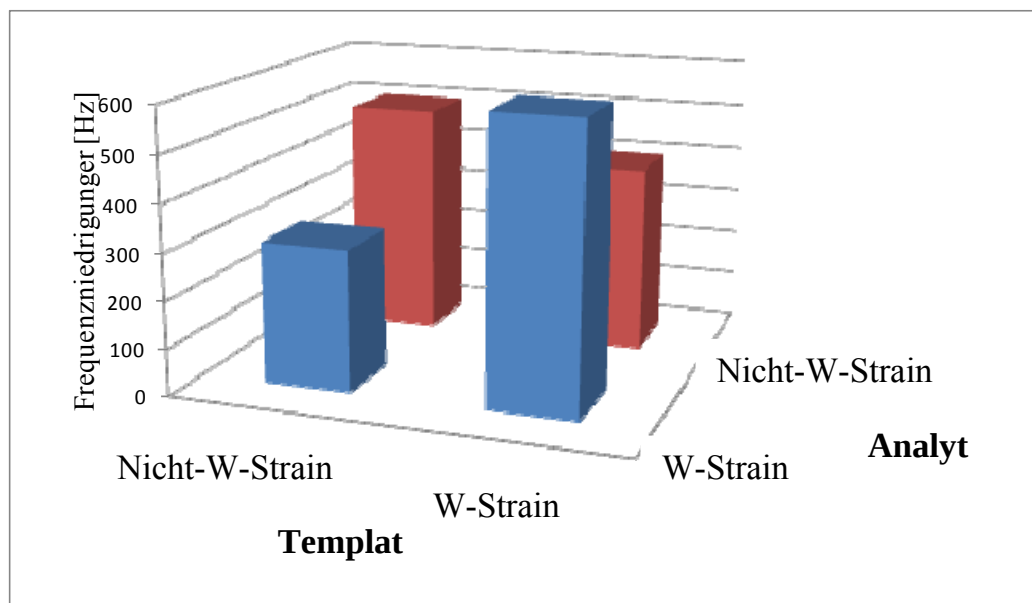


Abb. 58: Kreuzprägung der beiden unterschiedlichen Colibakterien auf Polyurethanbasis. Konzentration der eingesetzten Bakterien je 3 mg/mL. Schichtdicken des Polyurethans: ~800nm.

Die W-Strain E.Coli müssen sich demnach in ihrer äußeren Zusammensetzung von ihren Artgenossen unterscheiden. Für die stärkere Wechselwirkung mit der polaren Polyurethanoberfläche kommen nach außen gerichtete Proteine und Zuckerfunktionalitäten in Frage. Ein wenig polares Polymer sollte daher ein anderes Verhalten zeigen. Abb. 58 zeigt die Antwort eines mit Polyvinylpyrrolidon beschichteten Sensors auf 3 mg/mL non-W-strain E. Coli und W-strain E. Coli Lösung. Bei Zugabe der non-W-strain Bakterienlösung sinkt die geprägte Elektrode um 500 Hz während die Referenzfrequenz konstant bleibt. Das selbe Verhalten wie das des Polyurethansensors. Die E. Colibakterien des W Stammes führen zu einer Frequenzerniedrigung von etwa 300 Hz. Auch hier zeigt die Referenzelektrode kein Absinken der Frequenz. Eine Konsequenz der schwächeren Wechselwirkung der Organismen mit der Polymeroberfläche.

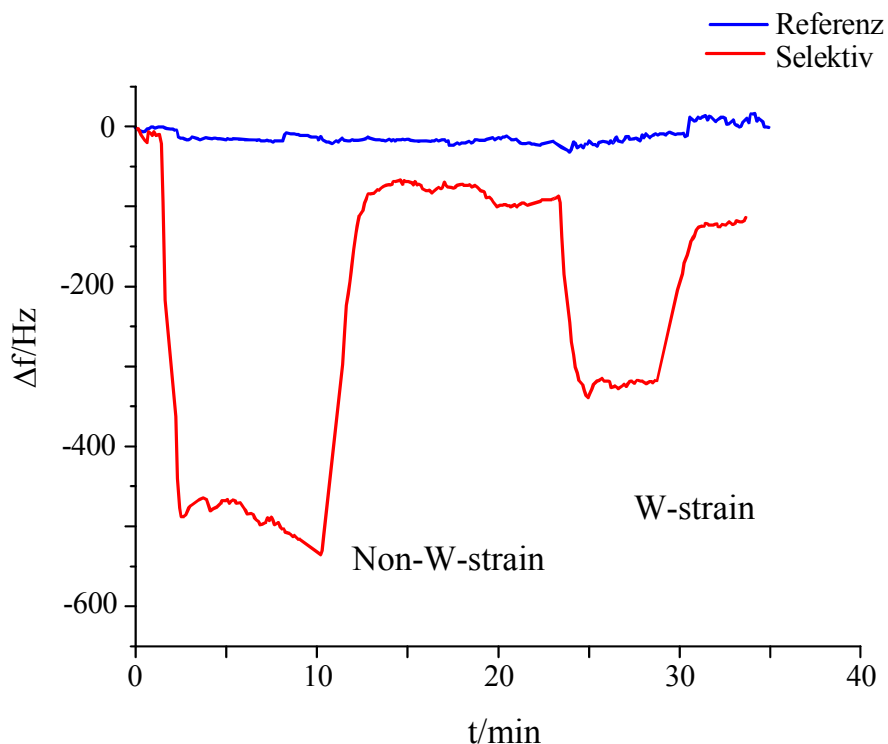


Abb. 59: Antworten eines Polyvinylpyrrolidon-Sensors, mit nicht W-Strain-Colibakterien geprägt, auf je 3 mg/mL Lösungen verschiedener Stränge von Colibakterien. Schichtdicke ~500 nm.

Ein Polyvinylpyrrolidonsensor geprägt mit W-Strain Bakterien ist in Abb. 60 gezeigt.

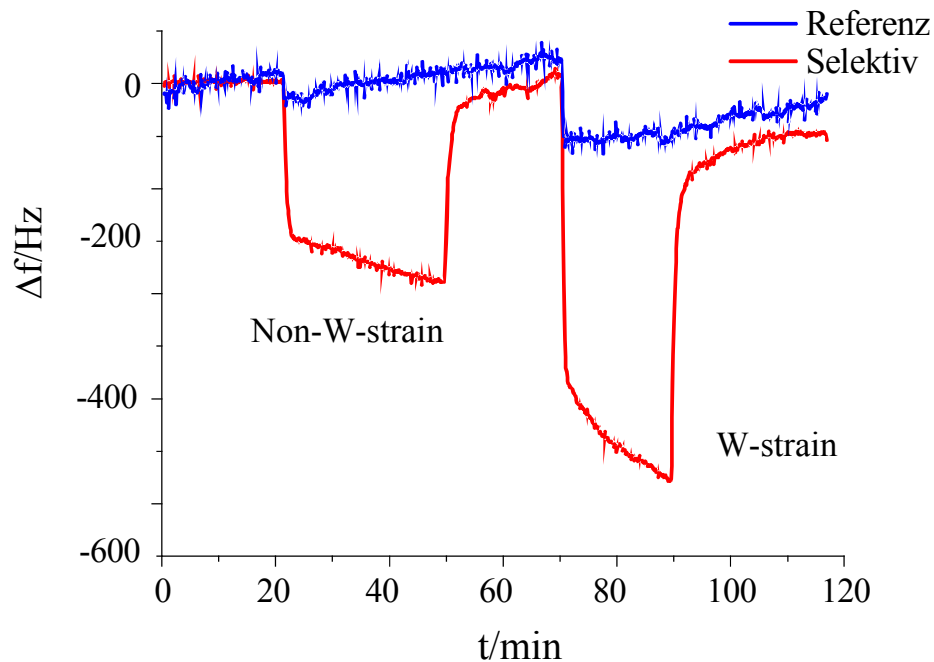


Abb. 60: Antworten eines Polyvinylpyrrolidon-Sensors, mit W-Strain-Colibakterien geprägt, auf je 3 mg/mL Lösungen verschiedener Stränge von Colibakterien. Schichtdicke ~500 nm.

Die Ergebnisse sind in Abb. 61 zusammengefasst.

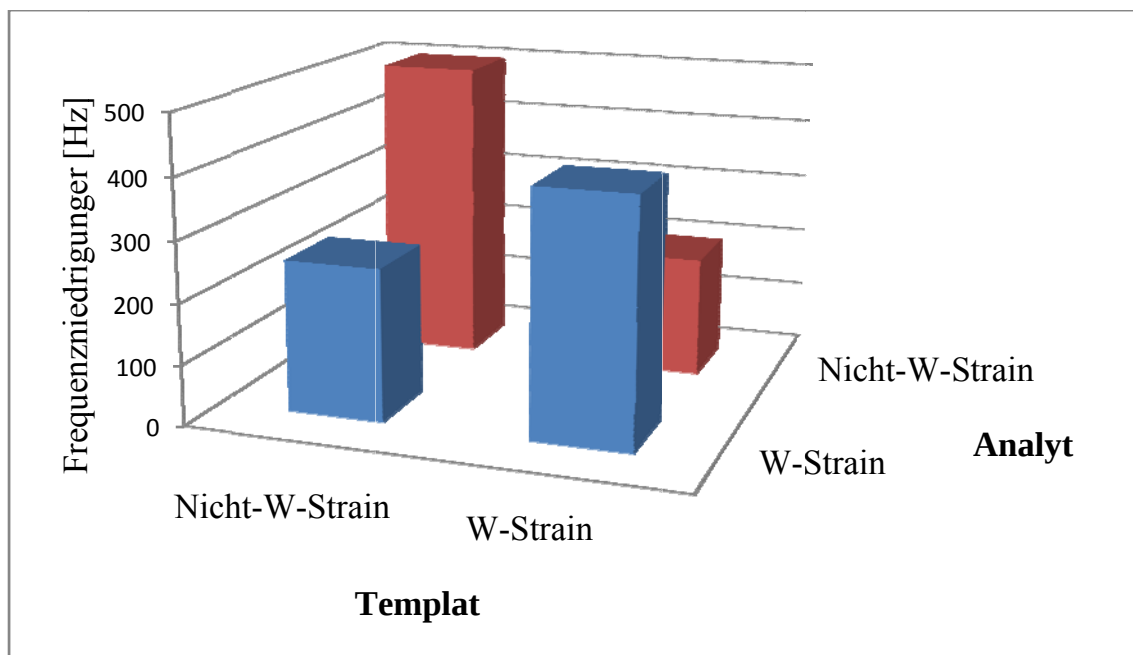


Abb. 61: Ergebnisse der Kreuzprägung mit Polyvinylpyrrolidonsensoren. Konzentrationen der Bakterien je 3mg/mL. Schichtdicke: ~500nm.

8.6 Flüssigphasenmessungen Subtilis, Thurigiensis

Mit Sporen der Bacilli Subtilis und Thurigiensis kann auf gleiche Weise wie oben beschrieben ein massenempfindlicher Sensor hergestellt werden. Die erhaltenen Sporen sind in einem Puffer (1 g Pepton und 8,5 g NaCl in 1 Liter destilliertem Wasser) gelöst und müssen vor der Verwendung zentrifugiert und gewaschen werden. Nach Aufnahme in destilliertem Wasser wird die Lösung homogen auf dem Glasstempel verteilt und bei Raumtemperatur getrocknet. Vor dem Stempeln des Polymers werden 5 μL einer 100 mM Glucoselösung auf den Stempel gespinnt. Die Glucose Schicht verhindert die irreversible Verankerung der Sporen in die Polymeroberfläche. Das Herauslösen der Sporen kann durch Behandlung mit 0,1%iger SDS-Lösung erreicht werden. SDS wird hier einzig zur Reduzierung der Oberflächenspannung und somit zur Erhöhung des Auswascheffekts beigefügt. Übrig bleiben die Abdrücke in der Oberfläche des Polymers (Abb. 62).

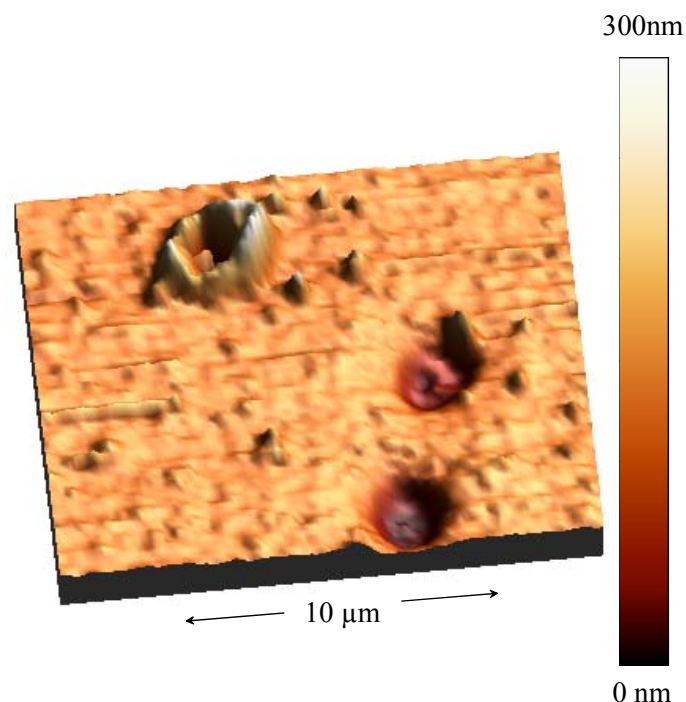


Abb. 62: AFM Aufnahme: Abdrücke von Bacillus Subtilis in Polyurethan.

Als Problem erwies sich das geringe Volumen der zur Verfügung stehenden Proben. Erhalten wurden 0,5 mL einer $1,8 \cdot 10^9$ CFU/mL (CFU: colony forming units) Lösung B. Subtilis und 0,5 mL einer $3,23 \cdot 10^8$ CFU/mL Lösung B. Thurigiensis. Da dieses

Volumen selbst bei entsprechender Verdünnung nicht für eine Durchflussmessung ausreicht musste die Messung mittels Stopped Flow Prinzip durchgeführt werden. Auch wurde das Volumen der Messzelle den Verhältnissen angepasst. Mit einer Eppendorfpipette wurden 100 μL der Meßlösung in die 40 μL fassende Zelle zugefügt und die sich ergebende Frequenzänderung aufgezeichnet. Gespült wird durch mehrmaliges Einspritzen von dest. Wasser. Ein häufig anzutreffendes Problem bei der Messung sind Gasbläschen. Wegen dem kleinen Messraum können sich leichter störende, schwer zu verdrängende Luftbläschen innerhalb der Zelle befinden. Diese verdrängen Wasser und führen somit zu einer unspezifischen Frequenzerhöhung. Für den *Bacillus Thuriensis* mit der Konzentration von etwa 10^9 CFU/mL ergibt sich der in Abb. 63 aufgezeichnete Frequenzverlauf.

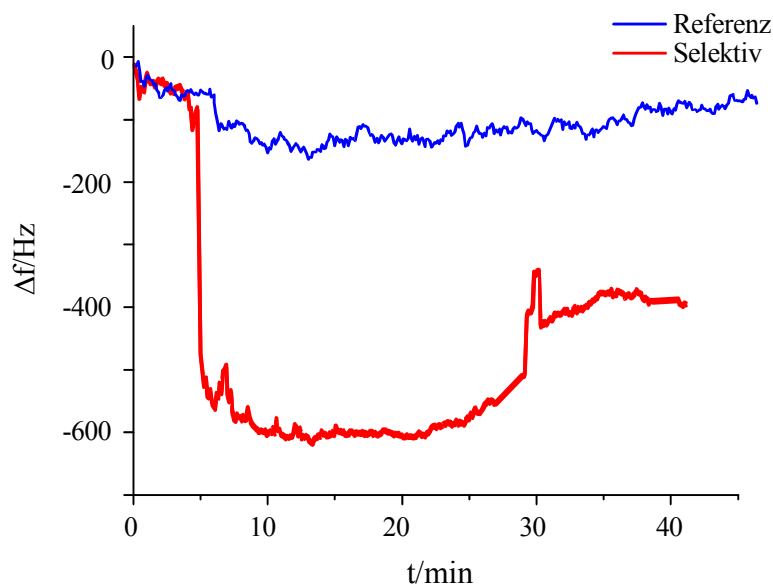


Abb. 63: *B. Thuriensis* Sensor. Beschichtung: Polyurethan, Konzentration: 10^9 CFU/mL. Schichtdicke: ~ 600 nm.

Die Frequenz auf der Elektrode sinkt um mehrer hundert Hertz, während die Referenz nahe an der Ausgangsfrequenz weiterschwingt. Auffallend ist die nicht vollständige Reversibilität des Sensorantwort, was aber wohl zumindest zum Teil auf die Messung selbst zurückzuführen ist. Das Spülen mit Wasser, und somit ein vollkommenes Verdrängen der Bakterien aus der Messzelle, ist schwierig. Die Differenz zwischen der

Frequenz vor und nach der Messung ist daher auf Restbestände der Bakterien in den Kavitäten zurückzuführen.

Einen sehr ähnlichen Frequenzverlauf zeigt der B. Subtilis Sensor.

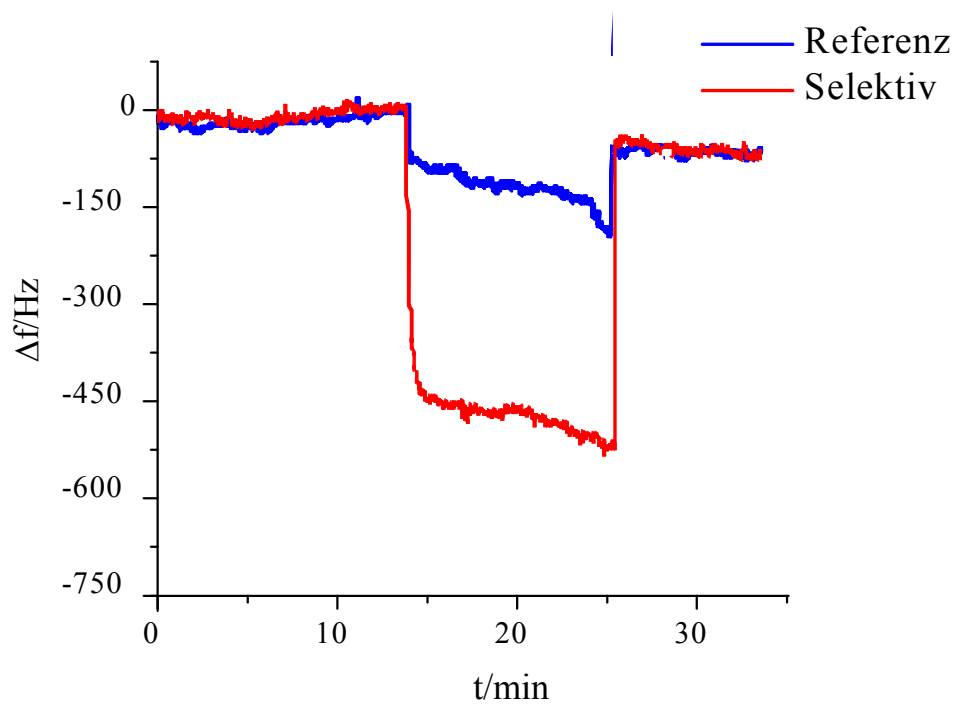


Abb. 64: Frequenzverlauf eines Bacillus Subtilis Sensors auf Polyurethanbasis. Zugegebene Konzentration: 10^9 CFU/mL. Schichtdicke ~600 nm.

8.6.1 Querempfindlichkeiten

Um weiterführende Aussagen treffen zu können wurden mit dem Subtilissensor und den E. Colisensoren Querempfindlichkeiten gemessen.

Um die verwendeten Konzentrationen miteinander vergleichen zu können, muss die eingesetzte E. Coli Menge von mg/mL auf die Zahl der Sporen (CFU/mL) gebracht werden. Unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer gelingt unter dem Mikroskop das Abzählen der Mikroorganismen einer bekannten Menge. $\sim 2\text{mg/mL}$ entsprechen demnach $\sim 10^9$ Zellen/mL. Diese Anzahl an Zellen wird den CFU der Sporen gleichgesetzt.

Abb. 65 zeigt die Querempfindlichkeiten eines B.Subtilis geprägten QCM's gegenüber E.Coli.

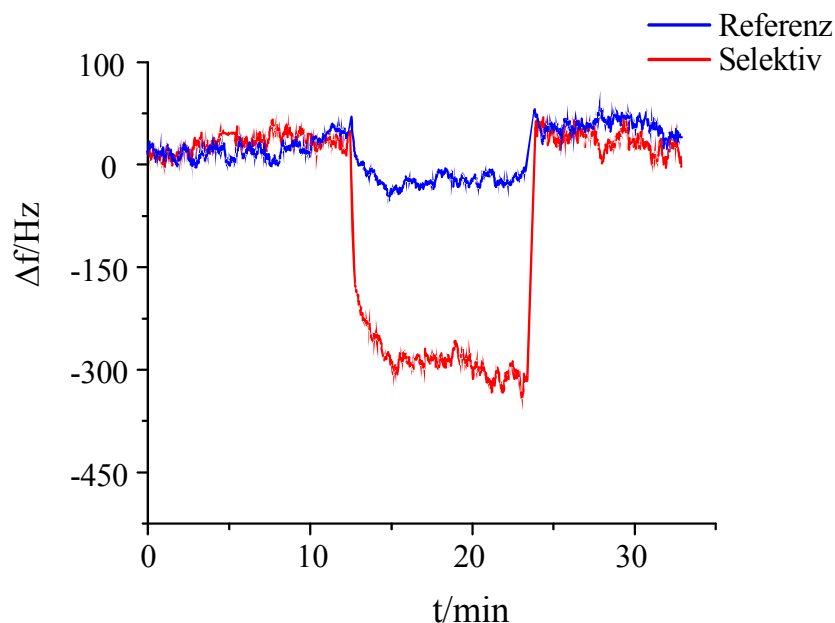


Abb. 65: Subtilissensor (Polyurethan) gegenüber Nicht-W-strain E. Coli Lösung. Konzentration entspricht $\sim 10^9$ CFU/mL. Schichtdicke ~ 600 nm.

Die Querempfindlichkeit gegenüber den Colibakterien ist demnach um etwa 200 Hz geringer. Die Querempfindlichkeit eines Colisensor gegenüber Sporen der B. Subtilis ist um ein vielfaches geringer.

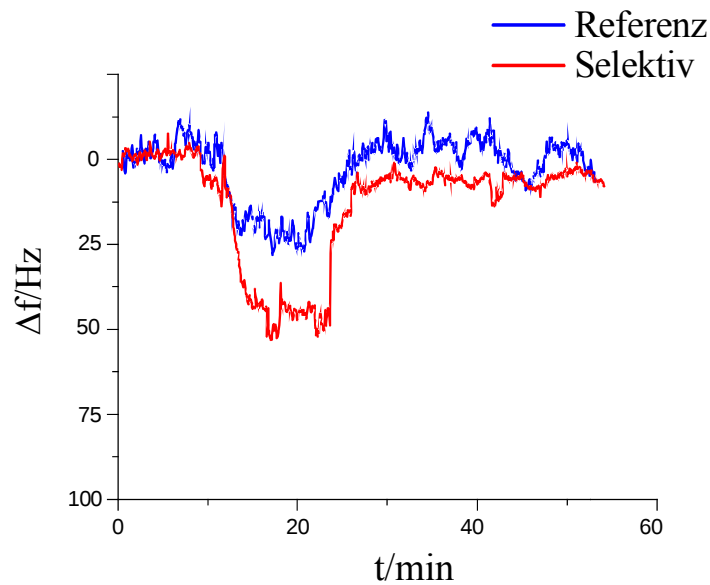


Abb. 67: Polyurethansensor mit Colibakterien als Templat. Analyt Subtilissporen der Konzentration $\sim 10^9$ CFU/mL

Die selektive Frequenzantwort, die Differenz zwischen der geprägten und ungeprägten Elektrode beträgt gerade 25 Hz. Die Querempfindlichkeit eines Subtilis Sensor gegenüber Coli Bakterien ist ungleich höher.

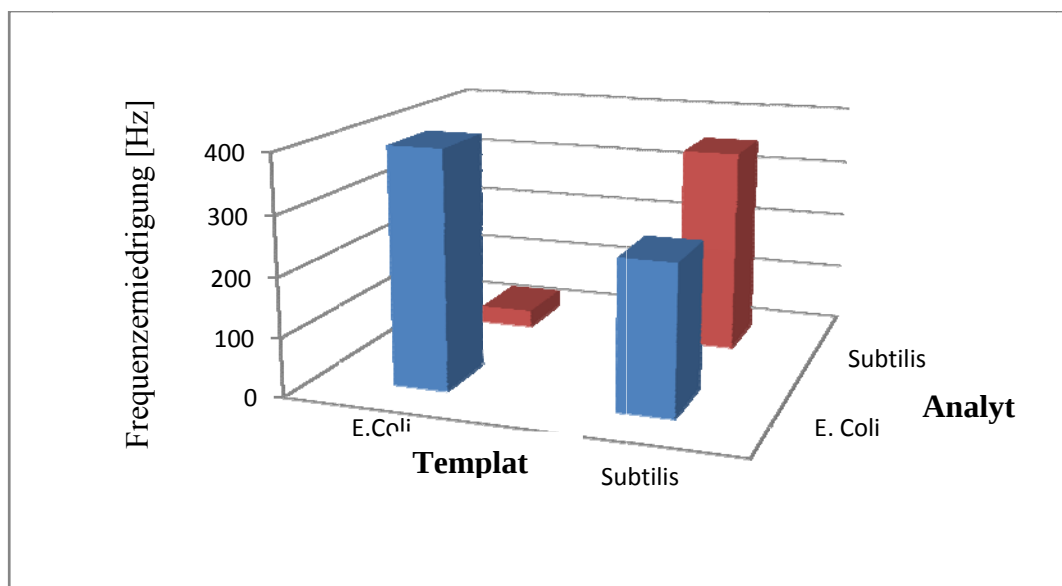


Abb. 66: Querempfindlichkeiten der Subtilis und E.Colisensoren eines Polyurethansensors. Konzentration je 10^9 CFU/mL.

Der Blick auf die Größenverhältnisse der beiden Analyte liefert eine Erklärung für dieses Verhalten. Die Durchmesser der Subtilis-Sporen sind mit etwa $3\text{ }\mu\text{m}$ größer als jene der Coli-Bakterien (aus Abb. 47 ergibt sich eine mittlerer Coliimprintgröße von $1\text{--}1,5\text{ }\mu\text{m}$). In die Kavitäten der Sporen können sich demnach vereinzelt Mikroorganismen einlagern und so zur beobachteten Frequenzabnahme beitragen.

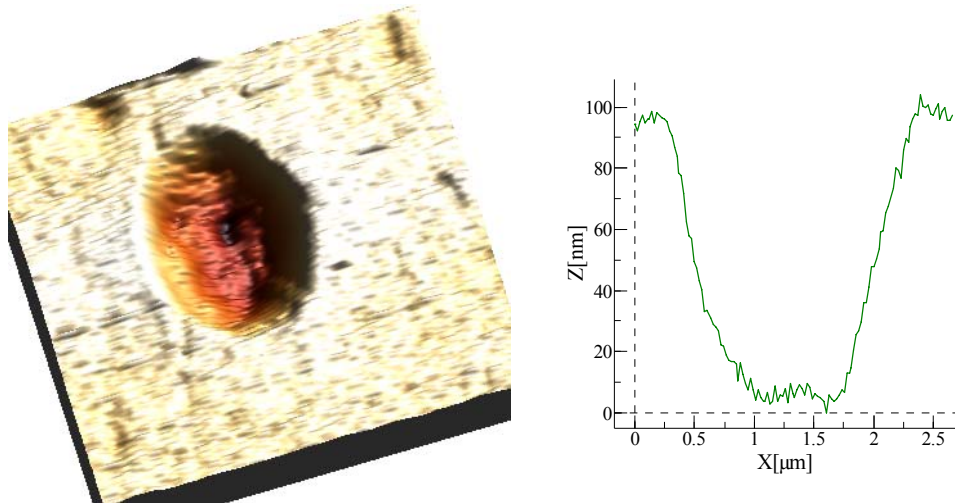


Abb. 68: Abmessung eines Subtilissporenabdrucks. Der wenig tiefe Abdruck hat bereits eine Länge von über $2\text{ }\mu\text{m}$ und ist damit größer als ein Coliabdruck.

Umgekehrt ist die Einlagerung von Subtilis Sporen in die kleineren Kavitäten der Colibakterien nicht möglich.

8.7 Gasphasenmessungen Escherichia Coli

Ein großes Gefahrenpotential stellt eine Übertragung mit gefährlichen Mikroorganismen wie Anthrax über die Luft dar. Der Versuch die Detektionssysteme von der flüssigen Phase auf die gasförmige zu übersetzen ist daher naheliegend. Als Testorganismus kommen abermals Coli-Bakterien zum Einsatz. Die QCMs, sind ohne Weiteres auch für Messungen in der Gasphase tauglich. Die größte zu überwindende Hürde ist das Überführen der Bakterien vom festen bzw. flüssigen Zustand in die Gasphase. Eine möglichst gleichmäßige, homogene Verteilung der Probe in der Messkammer muss gewährleistet sein. Auch sollte der Prozess zerstörungsfrei ablaufen um die native Struktur der Bakterien in der Gasphase sicherzustellen. Zwei unterschiedliche Methoden kamen im Zuge dieser Arbeit zum Einsatz. Zunächst

wurde versucht mittels eines piezoelektrisch anregbaren schwingenden Bauteils (Piezosummer) trockene Bakterien in die Gasphase zu überführen. Zweitens kam ein Mainhard Zerstäuber, bekannt aus der Atomspektroskopie (AAS, AES), als verteilendes Element für eine flüssige Colilösung zur Anwendung. Der stattfindende Übergang in die Gasphase wurde jeweils mit der Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen.

8.7.1 Piezoschwingendes Element

Ein, aus piezoelektrischem Material bestehender Schwingkörper kann über einen angeschlossenen Frequenzgenerator zum Oszillieren gebracht werden. Am Generator kann die Amplitude, Schwingungsform und Frequenz nach Belieben variiert werden. Werden auf dem Piezosummer die Mikroorganismen in fester, fein verteilter Form aufgebracht, kann bei angelegter Spannung ein Übergang in den darüberliegenden Raum beobachtet werden. Der schematische Aufbau der eingesetzten Gasphasenmesszelle ist in Abb. 69 zu sehen. Das Volumen in dem sich der Sensor befindet wird zur besseren Durchmischung stetig mit trockener Luft gespült.

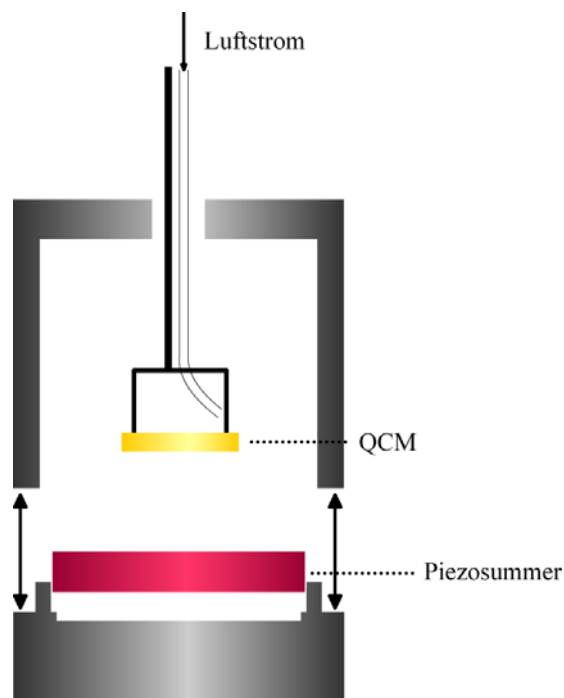


Abb. 69: Schema der eingesetzten Messzelle zur Gasphasenmessung von Colibakterien⁵⁴. Der Piezosummer wird durch Anlegen einer Spannung in Schwingung versetzt. Die aufliegende Probe verteilt sich in dem Volumen. Der Lufteinlass sorgt für zusätzliche Durchmischung.

Die Messzelle selbst besteht aus Teflon. Die elektronische Kontaktierung der Mikrowaage übernimmt ein Kabel in das der Quarz mit Klammern fixiert wird. Die geprägte Seite zeigt nach oben. Um sicherzustellen ob, und in welchem Ausmaß, der Übergang stattfindet wurde ein Glasplättchen in der Höhe des Sensors fixiert und der Piezosummer bei unterschiedlichen Frequenzen und Amplituden betrieben. Das Glasplättchen wurde nach einigen Minuten unter dem AFM vermessen. Derartige Tests lassen einen optimalen Übergang der Mikroorganismen bei einer Frequenz von 100 Hz bei maximaler Amplitude erkennen (Abb. 70).

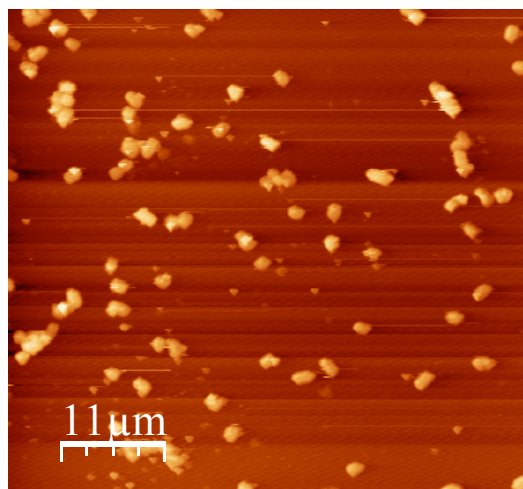


Abb. 70: Auf einem Glasplättchen abgeschiedene Colibakterien. Die Form der Mikroorganismen weicht von der nativen ab. Der Zusatz eines Stabilisators in der Probenvorbereitung bringt keine Verbesserung.

Auch kann aus der AFM-Aufnahme abgeschätzt werden inwieweit die Probenvorbereitung den nativen Zustand beeinträchtigt. Zu erkennen ist eine leichte Abweichung von der natürlichen Form. Ursache ist die Konsistenz der Bakterien beim Auftragen auf den Piezosummer. Die Probe wird für kurze Zeit in einen Puffer gelöst, zentrifugiert und gewaschen. Anschließend müssen die Mikroorganismen getrocknet werden. Restfeuchte verhindert wegen Koagulation den Übergang in die Luft. Je trockener der Analyt, desto besser der Übergang bei gleichzeitig ansteigender Abweichung von der nativen Form. Auch der Zusatz eines Stabilizers zum Puffer zeigt keine Verbesserung. Der in Abb. 71 aufgezeichnete Frequenzverlauf beweist jedoch die Möglichkeit des Nachweises in der Gasphase.

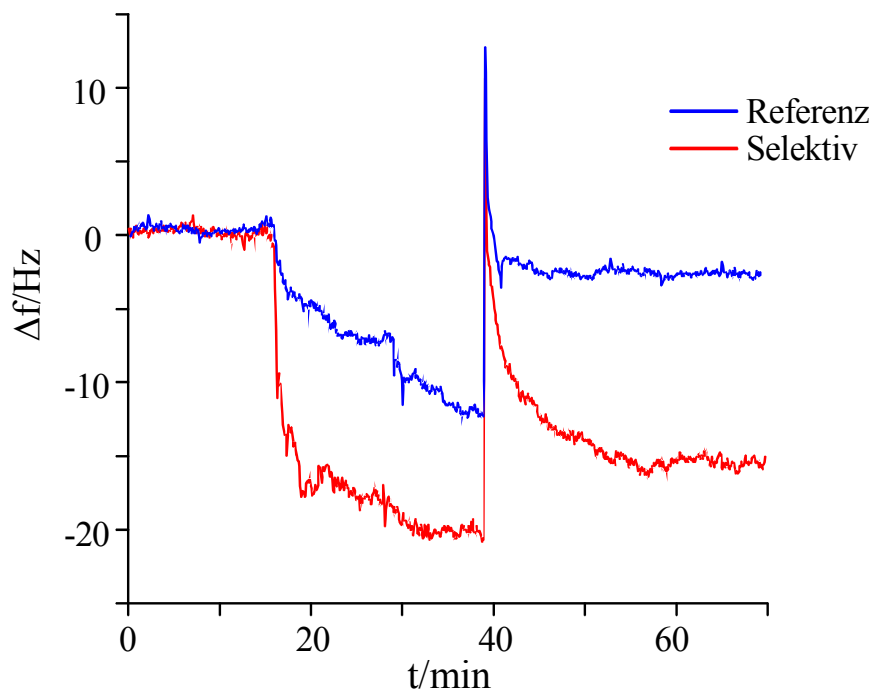


Abb. 71: Gasphasenmessung Colibakterien. Die Organismen wurden gleichmäßig auf dem Piezosommer verteilt. Die geprägte Elektrode kehrt nach der Messung nicht vollständig zur Ausgangsfrequenz zurück. Der Luftstrom reicht zum Verdrängen des Analyten nicht aus.

Die Frequenz sinkt auf der geprägten Seite um 20 Hz, die Referenzelektrode reagiert mit einem Absinken der Frequenz um 10 Hz. Nach etwa 40 min wurde der Luftstrom direkt über die Quarzoberfläche positioniert. Die Referenz kehrt daraufhin nach einem kurzen Sprung auf die Ausgangsfrequenz zurück. Die unselektiv auf der Oberfläche abgelagerten Bakterien werden vollständig verdrängt. Bei der geprägten Oberfläche findet man keine vollständige Rückkehr auf die ursprüngliche Resonanzfrequenz. Der Luftstrom reicht anscheinend nicht aus um die Colibakterien aus ihren Kavitäten zu befreien. Da die Reproduzierbarkeit dieses Experiments nicht optimal ist, wurden die Gasphasenmessungen mit verändertem Versuchsaufbau durchgeführt.

8.7.2 Mainhard Zerstäuber

Mit Hilfe eines Mainhard Zerstäubers gelingt eine feine Verteilung einer flüssigen Probe. Bekannt ist der Zerstäuber aus den unterschiedlichsten Varianten der Atomspektroskopie. Wie aus Abb. 72 hervorgeht kann das Bauteil auch für die Verteilung einer E.Coli Lösung in die Luft verwendet werden.

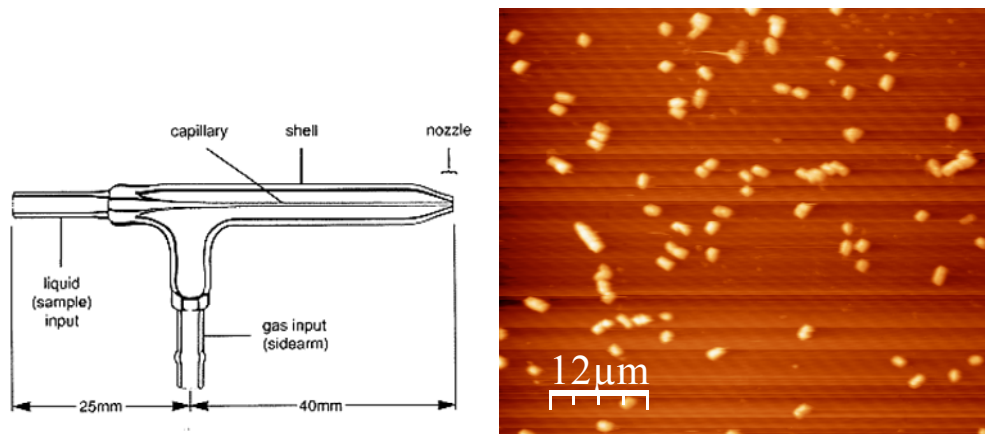


Abb. 72: links: Schematischer Aufbau des Mainhard Zerstäubers⁶². rechts: Glasblättchen aus etwa 10cm Entfernung mit 1mg/mL Colilösung besprüht. Die Bakterien behalten ihre native Form (links: AFM-Aufnahme).

Gezeigt ist eine AFM Aufnahme eines besprühten Glasplättchens. Man erkennt die abgelagerten einzelnen E. Colis in ihrem nativen Zustand.

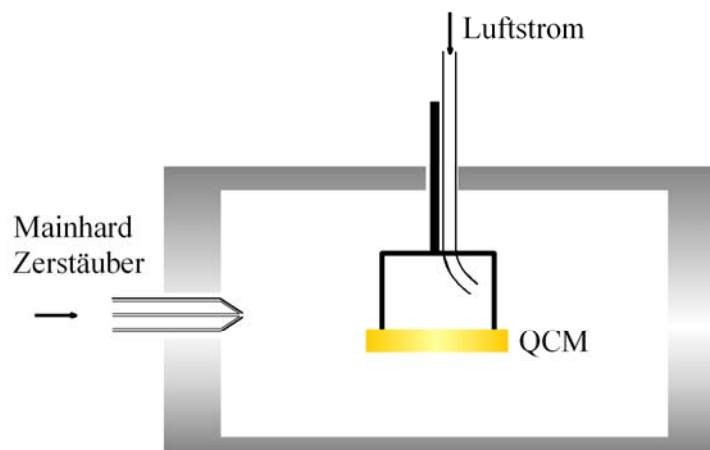


Abb. 73: Über den Mainhard Zerstäuber wird die Bakterienlösung in die Messkammer versprüht. Der Luftstrom sorgt für Homogenisierung. Der Quarz ist vor der Messung bereits angefeuchtet.

Auch zu erkennen ist, dass die Mikroorganismen nicht koagulieren, was bei der Stempelpräparation zuweilen ein Problem sein kann. Für die Messung wird der schon angefeuchtete Sensor in die Messkammer (Abb. 73) gebracht. Wieder wird zur Homogenisierung ein Luftstrom während der Messung aufrechterhalten. Die Frequenz sinkt auf der geprägten Elektrode um etwa 80 Hz. Bei Minute 20 Wird der Luftaußlass für kurze Zeit direkt über den Quarz platziert. Die Bakterien werden verdrängt und die

Frequenz kehrt auf den Ausgangswert zurück. Auch bei diesem Versuchsaufbau ist die Reproduzierbarkeit der Messung nicht optimal.

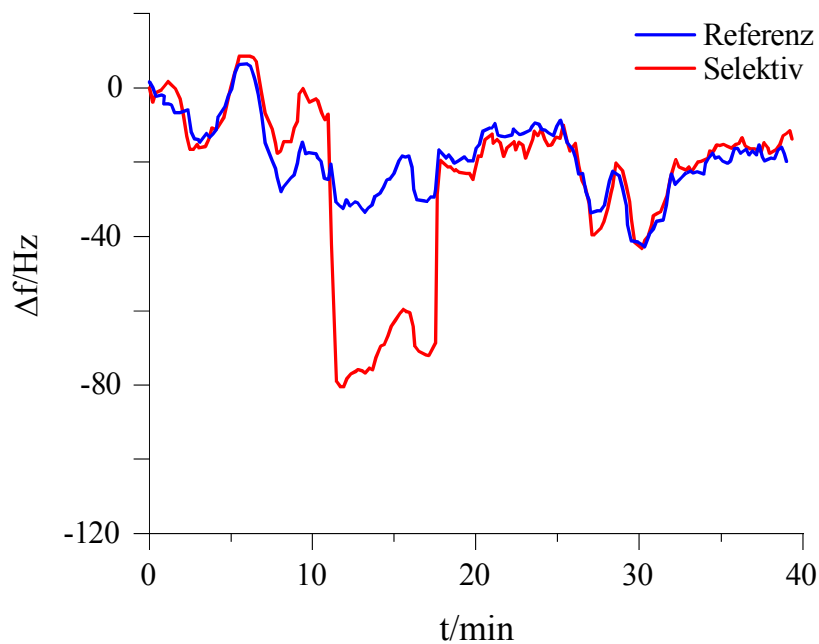


Abb. 74: Bei Minute 20 wird der Luftauslass zum Verdrängen des Analyten direkt über die Elektroden platziert. Die Frequenz kehrt auf den Ausgangswert zurück.

8.8 Zusammenfassung und Interpretation

Es wurde gezeigt, dass der Nachweis von Escherichia Coli Bakterien in wässrigen Lösungen auf der Basis massenspezifischer Sensoren möglich ist. Die Detektion gelingt mit unterschiedlichen Polymere, konkret Polyurethan, Polyacrylat und Polyvinylpyrrolidon. Die Effekte sind bei allen eingesetzten Beschichtungen durchwegs reversibel. Wegen seiner bereits erwähnten überlegenen Eigenschaften ist es sinnvoll sich auf Polyurethan als Coating zu konzentrieren. Die Kennlinie eines derartigen Sensors entspricht der Form nach einer BET Isotherme. Der Analyt bildet demnach mehrere Lagen auf der Oberfläche. Es konnte weiters gezeigt werden, dass die Querempfindlichkeit gegenüber anderen E.Coli Stämmen geringer ist. Das

Messprinzip ist ohne größere Adaptierung auf Sporen übertragbar. Auch sind derartige Sensoren für Messungen in der Gasphase geeignet. Die größte Herausforderung findet man hier in der homogenen Verteilung der nativen Mikroorganismen.

9 Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit dem Einsatz von massensensitiven Chemosensoren in der Bioanalytik. An piezoelektrischem α -Quarz können auf einfache Weise durch das Siebdruck-oder Schichtdickenverfahren dünne Goldelektroden aufgebracht werden. Angelegte Wechselspannung kann zur Ausbildung einer stehenden Welle innerhalb des Quarzes führen. Die anzulegende Frequenz hängt von der Dicke des Quarzsubstrats ab. Der genaue Zusammenhang ist durch die Sauerbrey Gleichung gegeben. Aus ihr ergibt sich, dass die auftretende Frequenzänderung bei Massenbelegung proportional zum Quadrat der Grundresonanzfrequenz ist. Die eingesetzten Quarze mit einer Dicke von $168\mu\text{m}$ haben eine Resonanzfrequenz von 10 Mhz, ein Kompromiss aus Handhabbarkeit und Nachweisgrenze. Wird auf eine Seite der Elektroden eine selektive Schicht angebracht, so kann bei Einlagerung des Analyten dessen An/Abwesenheit sowie dessen Konzentration erfasst werden. Zum Einsatz kommen molekular geprägte Polymere (MIPs). Wird bei molekularen Substanzen das gesamte Polymer geprägt (bulk imprinting), so hat sich bei Zellen und Mikroorganismen die Oberflächenprägung bewährt: Es wird ein noch nicht ausgehärtetes Polymer mit einem Stempel des Organismus geprägt. Nach dem Aushärten kann der Analyt aus der Schicht verdrängt werden. Zurück bleiben Kavitäten auf der Oberfläche welche die Geometrie des Analyten wiedergeben. Die chemische Information wird durch das Ausbilden einer Vielzahl von schwachen Wechselwirkungen zwischen Polymer und Oberfläche des Analyten übertragen. Das eingesetzte Polymer hat demnach wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß und die Reversibilität der Sensorantwort.

Im ersten Teil wird die Fertigung von Sensoren für Hefezellen beschrieben. In aufgespinntes Polyurethan können verschieden weit entwickelte Hefezellen gestempelt werden. Je nach Schichtdicke, Entwicklungsstadium des Templats und des Analyten ist das Ausmaß des auftretenden Sauerbrey-Effektes unterschiedlich. Ein Spezialfall wird bei $3,5\mu\text{m}$ dicken, mit doppelten S-Phase-Hefezellen beobachtet. Wird als Analyt ebenfalls Hefe dieses Stadiums verwendet so sinkt die Resonanzfrequenz gemäß Sauerbrey. Wird hingegen eine Lösung einzelliger Hefe verwendet so erhält

man als Antwort ein Ansteigen der Frequenz. Bekannt ist, dass die viskoelastischen Eigenschaften der Polymerschicht Einfluss auf die Antwort des Signals haben. Bei Belegung der Schicht mit einzelliger Hefe kommt es zum Resonanzfall zwischen Bewegung der Schicht und Bewegung des Analyten. Beweis für das Vorliegen einer Resonanz ist die Rückkehr zum Sauerbrey Verhalten bei der 1.Oberschwingung (30 MHz).

Das Prinzip der Oberflächenprägung wird im zweiten Teil der Arbeit auch für die Entwicklung von Sensoren für Bakterien und Sporen angewandt. Die Form der Kurve Konzentration gegen Effektstärke zeigt das Ausbilden von Polylagen. Auch Sporen der Gattung *B. Subtilis* und *B. Thuriensis* können auf diese Art nachgewiesen werden. Hintergrund der Experimente ist die Entwicklung eines Detektionssystems für Sporen, welche ein Gefahrenpotential darstellen können. Die eingesetzten Modellsysteme ähneln makroskopisch dem *Bacillus Anthracis* welcher als Milzbranderreger der breiten Öffentlichkeit bekannt ist. Die entwickelten Sensoren können ohne Weiteres für die Gasphase verwendet werden. Als Problem erweist sich hier die homogene Verteilung der Probe in der Messkammer. Experimente mit zwei unterschiedlichen Ansätzen sind durchgeführt worden: Verteilung der festen Probe mit Piezoschwinger; Verteilung der flüssigen Probe mittels Mainhardt Zerstäuber. Wiewohl beide Versuche die Möglichkeit des Nachweises auch in der Gasphase zeigen, ist die Reproduzierbarkeit der Experimente nicht für einen tatsächlichen Einsatz tauglich.

10 Summary

Chemical Sensors supply a useful tool for the detection of various bioanalytes. This paper deals with mass-sensitive devices based on quartz. The α -modification of quartz shows piezoelectrical properties. Gold electrodes can easily be printed on the surface of the quartz substrate. By application of alternating voltage, the reversal of the piezoelectrical effect can be observed. At a distinct frequency the propagation of the wave throughout the material results in a resonance phenomenon. The correlation between the frequency and the thickness (mass) of the material is given by the Sauerbrey equation: The decrease of frequency by increase of mass is directly proportional to the square of the basic resonance frequency. An applied coating on top of one electrode can serve as recognition layer. The increase of mass by selective and reversible incorporation of the analyte leads to a decrease in frequency. Molecularly imprinted polymers (MIPs) as deployed layers can be used for the detection of molecules and small analytes in gaseous and liquid phases. However, the common bulk imprinting strategy of MIPs is not applicable for cells and microorganisms. Selective layers for detection of larger bioanalytes can be generated via a process called surface imprinting procedure: Treatment of the surface with a stamp covered with analyte material results in marks. These cavities incorporate analytes in a reversible and selective manner. Selectivity is gained by both geometrical and chemical information of the generated imprints. The deployed 168 μm thick quartz shows a resonance frequency of 10 MHz. A compromise between achievable limit of detection and handling.

The first part deals with polymere layer imprinted sensors for yeast cells. Experiments were performed for cells in different stadiums with varying coating thicknesses. Depending on the imprinted template, the analyte solution and the thickness of the layer, different sensor responses were observed. The known Sauerbrey behavior, i.e. frequency decreases at exposure to analyte solution, was observed with varying magnitudes throughout most of the experiments. With increasing layer height the frequency decreases as a result of more pronounced viscoelastic effects. However, in one case the reversion of the common phenomena, an increase in frequency, could be

recorded. A 3,5 μm thick polyurethane coating imprinted with double budded yeast cells exposed to a single yeast cell solution results in a positive effect. A resonance phenomena occurs between the movement of the layer and the yeast cells. The type of motion leads to the observed frequency enhancement. At the first harmonic vibration at 30 MHz the common Sauerbrey behavior reappears. This behavior verifies the resonance phenomena at 10 MHz.

In a very similar way sensitive devices for detection of *Escherichia Coli* can be manufactured. Since *E. Coli* may cause various diseases, monitoring of the concentration in liquid samples is of importance. Experiments with different kinds of polymers were performed, all of which showed satisfying results. Further experiments nevertheless focused on polyurethane as coating. Sensors based on polyurethane exhibit the highest stability and reproducibility. Furthermore, mass-sensitive devices for two different kinds of spores were developed. In case of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* liquid phase detection was successful. Monitoring of the surrounding air for pathogenic or even lethal microorganisms is of even more interest. Therefore *Escherichia Coli* experiments in the gas phase were performed. Major problem turned out to be the homogeneous distribution of the sample inside the cell. Although the possibility of detecting microorganisms in gas phase is shown, problems, including sample preparation and reproducibility, have yet to be surmounted.

11 Anhang

11.1 Geräte

Frequenzzähler (HP 53131A)

Netzwerkanalysator (HP 8752C; 300 kHz bis 1,3 GHz)

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

AFM Nanoscope IIIa, Extended Multimode (Digital Instruments)

AFM Nanoscope IVa, Extended Multimode (Digital Instruments)

AFM CPM (Digital Instruments)

Auflichtmikroskop (Wild Heerbrugg M3Z)

Fluoreszenzmikroskop

Peristaltikpumpe (ISMATEC IP 65, MCP-Process, 100W Leistung)

Software Winsens XP

11.2 Abkürzungen

AAS Atomabsorptionsspektroskopie

AES Atomemissionsspektroskopie

AFM Atomic Force Microscopy

AIBN Azoisobutyronitril

CaDPA Calciumdipicolinic acid

CD Cyclodextrin

CFU colony forming units

dB Dezibel

DNA	Desoxyribonucleinsäure
Hz	Hertz
IDT	Interdigitaltransducer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
M	molar, molare Masse
MDI	Methylen(diphenylisocyanat)
MIP	molecularly imprinted polymer
PCA	Principal Component Analysis
PCR	polymerase chain reaction
ppm	parts per million
PU	Polyurethan
QCM	Quartz Crystal Micro balance
SASP	Small Acid Soluble Proteins
SAW	Surface Acoustic Wavelength
SPM	scanning probe microscopy
SPR	Surface Plasmon Resonance
STM	Scanning Tunneling Microscopy
THF	Tetrahydrofuran
TSM	Thickness Shear Mode Resonator

12 Lebenslauf

Name: Mag. Paul Grillberger
Adresse: Witzelsbergergasse 5/10
1150 Wien
Telefon: 0650/ 231 324 3
e-mail: paul.grillberger@univie.ac.at
Geburt: 27.01.1981 in Linz
Staatsbürgerschaft: Österreich
Stand: ledig

Ausbildung:

1987 - 1991	Volksschule Salzburg
1991 - 1999	Bundesrealgymnasium Salzburg, Akademiestrasse 19
Juni 1999	Matura
1999 - 2001	Studium der Physik (LA) und Chemie (LA) an der Karl Franzens Universität in Graz
2001 - 2006	Diplomstudium Chemie an der Universität Wien
Jan 06 - Mai 06	Auslandssemester an der Universite de Sciences et Technologie de Lille in der Arbeitsgruppe von Pr. Didier Barbry am Institut für Organische Chemie (Synthese von Isothioflavonoiden)
Okt 06 - Mai 07	Diplomarbeit mit dem Titel „Sauerbrey und nicht Sauerbrey Verhalten bei der massensensitiven Detektion von synchronisierten Hefezellen“ am Institut für Analytische und Lebensmittelchemie bei O. Prof. Dr. F. L. Dickert
Mai 2007	Abschluss des Diplomstudiums Chemie mit ausgezeichneten Erfolg
Seit Mai 2007	Dissertation „Massensensitive Detektion von Hefen, Bakterien und Sporen – Antisauerbrey bei Biopartikel“ bei O. Prof. Dr. F. L. Dickert am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien

13 Literatur

-
- ¹ Nießner R.: Chemische Sensoren - Prinzipien und Anwendung, Analytiker Taschenbuch (Hrsg. Borsdorf), Akademie Verlag, 55-87, Berlin 1987.
- ² Hulanicki A., Glab S., Ingmann F.: IUPAC Discussion Paper, Commission V.I., 1989.
- ³ F. L. Dickert, A. Haunschild: Advanced Materials 12, 887-895, 1993.
- ⁴ F. L. Dickert, O. Schuster: Chemie in unserer Zeit 28, 147-152, 1994.
- ⁵ Niewenhuizen M., Venema A.: Mass-sensitive Devices, Sensors - A Comprehensive Survey Vol. 2, VCH-Verlag (Hrsg. W. Göpel, J. Hesse, J. N. Zemel), 647-680, Weinheim 1991.
- ⁶ P. Hauptmann: Sensoren – Prinzipien und Anwendungen, 1. Auflage, Hanser Verlag, 101-131, München 1990.
- ⁷ F. Oehme: Chemische Sensoren heute und morgen, 1. Auflage, Expert Verlag, Renningen-Mannheim 1994.
- ⁸ Dickert F. L., Hayden O., Zenkel M. E.: Detection of Volatile Compounds with Mass Sensitive Sensor Arrays in the Presence of Variable Ambient Humidity, Anal. Chem. 71, 1338, 1999.
- ⁹ Otto M.: Chemometrie, 1. Auflage Wiley-VCH, Weinheim 1997.
- ¹⁰ Vaihinger S., Göpel W.: Multi-Component Analysis in Chemical Sensing, Sensors - A Comprehensive Survey, Vol. 2, VCH-Verlag (Hrsg. W. Göpel, J. Hesse, J. N. Zemel), 191-297, Weinheim 1991.
- ¹¹ Logothetis E. M: Automotive Oxygen Sensors, Chemical Sensor Technology, Vol. 3 Elsevier Science Publishers (Hrsg. N. Yamazoe), 89-104, Amsterdam 1991.
- ¹² Buchberger W.: Elektrochemische Analyseverfahren, Spektrum Akademischer Verlag, 12 - 35, Berlin 1998.
- ¹³ Stöcklein W.: Biosensoren – Moleküldetektive, Chemie in unserer Zeit, 40, 32 - 40, 2006.
- ¹⁴ Smith A., Corn M.: Surface Plasmon Resonance Imaging as a Tool to Monitor Biomolecular Interactions in an Array Based Format, Appl. Spectroscopy, 57, 320A-332A, 2003.

- ¹⁵ <http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/bioanalytik/biochips/articles/121077>
- ¹⁶ Otto M.: Analytische Chemie 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim 2000.
- ¹⁷ Nanjo M., Guilbault G.: Analytical Chemistry, 46, 1769, 1974.
- ¹⁸ Briese W.: Schwingquarze, ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik, Vistas Verlag, 5-108, Berlin 1985.
- ¹⁹ Holler F. J., Skoog, D. A., Crouch, Stanley R. Chapter 1. Principles of Instrumental Analysis (6th ed.). Cengage Learning. 2007.
- ²⁰ CD Römpp Chemielexikon, 9. Auflage auf CD-Rom, Version 1.0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart . New York.
- ²¹ Weigel, R.; Morgan, D.P.; Owens, J.M.; Ballato, A.; Lakin, K.M.; Hashimoto, K.; Ruppel, C.C.W.: Microwave acoustic materials, devices, and applications, IEEE Transactions on Volume 50, Issue 3, 738 - 749, March 2002.
- ²² G.Sauerbrey, Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, Z. Physik 155, 206-222, 1959.
- ²³ http://www.uni-mainz.de/FB/Chemie/fbhome/physc/Dateien/PCF_QCM_skript_060105.pdf
- ²⁴ Kanazawa K. K., Gordon J.G.: The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid, Anal. Chim. Acta, Vol. 175, 99-105, 1985.
- ²⁵ Bunde R. L., Jarvi E. J., Rosentreter J. J.: Piezoelectric quartz crystal biosensors, Talanta, 46, 1223–1236, 1998.
- ²⁶ Vögtle F.: Supramolecular Chemistry, Wiley, New York 1991.
- ²⁷ Dickert F.L., Tortschanoff M., Weber K., Zenkel M.: Process Control with Mass-Sensitive Chemical Sensors - Cyclodextrine Modified Polymers as Coatings, Fresenius J. Anal. Chem., 362, 21, 1998.
- ²⁸ Dickert F.L., Geiger U., Weber K., Modified cyclodextrines as masssensitive coatings for solvent vapour detection, Fresenius J. Anal. Chem. , 364, 128, 1999.
- ²⁹ Borchardt-Ott W.: Kristallographie, 3. Aufl., Springer-Verlag, 128-129, 1990.
- ³⁰ West A. R.: Grundlagen der Festkörperchemie, 1. Aufl., VCH-Verlag, 371-372, 1992.
- ³¹ Polyakov M. V.: Adsorption properties and structure of silica gel, Zhur. Fiz. Khim 2, 799, 1931.

-
- ³² Polyakov M. V., Kuleshina LP., Neimark I.: On the dependence of silica gel adsorption properties on the character of its porosity, *Zhur, Fiz. Khim.*, 10, 100-112, 1937.
- ³³ Polyakov M. V., Stadnik PM., Paryckij MW.: On the structure of silica, *Zhur. Fiz. Khim.* 4, 454, 1933.
- ³⁴ Pauling L.: A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies, *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2643-2657, 1940.
- ³⁵ Pauling L., Campbell D. H.: The manufacture of antibodies in vitro, *J. Exptl. Med.* 76, 211-220, 1942.
- ³⁶ Wulff G., Sarhan A.: *Angew. Chem.*, 84, 364-381, 1972.
- ³⁷ Mosbach K.: *Trends Biochem. Sci.*, 19, 9, 1994.
- ³⁸ Toshifumi T., Haginaka J.: Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 728, 1, 1-20, 1999.
- ³⁹ Dickert F.L., Reif M., Reif H.: Molecular Modelling of Host-Guest Interactions for Mass Sensitive Chemical Sensors, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352, 620, 1995.
- ⁴⁰ Alexander C. , Vulfson E. N.: Spatially Functionalized Polymer Surfaces Produced via Cell-Mediated Lithography, *Advamced Materials*, 9, 751-75, 1997.
- ⁴¹ Aherne A., Alexander C., Payne M. J., Perez N., Vulfson E. N.: Bacteria-Mediated Lithography of Polymer Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 8771-8772, 1996.
- ⁴² Dickert F. L., Hayden O.: Bioimprinting of Polymers and Sol-gel Phasesm, Selective detection of yeast with imprinted Polymers, *Anal. Chem.* 74, 1303 - 1306, 2002.
- ⁴³ Dickert F.L., Halikias K.: Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials, *Sensors and Actuators B* 3768, 1-4, 2001.
- ⁴⁴ Oesterschulze E.: The potential of the scanning probe microscopy for thin film characterization, *Surface and Coatings Technology*, 97, 1-3, 694-706, 1997.
- ⁴⁵ Myshkin N. K., Grigoriev A. Ya., Chizhik S. A., Choi K. Y., Petrokovets M. I.: Surface roughness and texture analysis in microscale, 254, 10, 1001-1009, 2003.
- ⁴⁶ Hall M. N., Linder P.: *The Early Days of Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1992.

- ⁴⁷ Anderson P., Baumberg B.: Alkohol in Europa – Ein Bericht für die Europäische Kommission, Institute for Alcohol Studies, UK, Juni 2006.
- ⁴⁸ Dickert F. L., Hayden O.: Selective microorganism detection with cell surface imprinted polymers, *Adv. Mat.*, 13, 1480-1483, 2001.
- ⁴⁹ Alberts, Bruce, Lewis, Raff, Roberts, Walter: Molekularbiologie der Zelle (Übersetzung von L. Jaenicke) 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim 2004.
- ⁵⁰ Madigan M.T., Martinko J. M.: Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, Pearson Studium, München 2006.
- ⁵¹ Lucklum R., Behling C., Hauptmann P.: Role of Mass Accumulation and Viscoelastic Film Properties for the Response of Acoustic-Wave-Based Chemical Sensors, *Anal. Chem.*, 71, 2488-2496, 1999.
- ⁵² http://www.zaehlkammer.de/pdf/info_zaehlkammern.pdf
- ⁵³ Dickert F.L., Hayden O., Bindeus R.: Combining atomic force microscope and quartz crystal microbalance studies for cell detection, *Meas. Sci. Technol.* 14, 1876–1881, 2003.
- ⁵⁴ Jenik M., AFM und Sensoruntersuchungen an strukturierten Oberflächen – Viren, Hefen, Pollen, Dissertation Universität Wien, Dezember 2007.
- ⁵⁵ Shirk C.: Selektive Detektion von Viren und Mikroorganismen mit biomimetischen Sensoren, Dissertation Universität Wien, Februar 2005.
- ⁵⁶ Dobell C.: Antony van Leeuwenhoek and his “Little Animals”, John Bale, Sons and Danielsson, London 1932; Nachdruck: Dover, New York 1960.
- ⁵⁷ Meyer K.: Geheimnisse des Antoni van Leeuwenhoek, Pabst Science Publishers, Lenerich 1998
- ⁵⁸ Givan A. L.: Flow Cytometry – First Principles, Wiley & Sons, 2001.
- ⁵⁹ Zimmer C.: Microcosm: E-coli and the New Science of Life, Arrow Bks., Juli 2009.
- ⁶⁰ Madigan M., Martinko J.: Brock Mikrobiologie, Pearson Studium, 2006.
- ⁶¹ Madigan M., Martinko J.: Brock Mikrobiologie, Pearson Studium, 94 – 99, 2006.
- ⁶² www.meinhard.com