

DISSERTATION

Titel der Dissertation

Massensensitive Untersuchungen über Sporen,
Bakterien und Hefen
- Medieneffekte und Mechanismus der Inklusion -

Verfasserin

Serpil Can, MSc

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl It. Studienblatt: A 791 419

Dissertationsgebiet It. Studienblatt: Chemie

Betreuer: o.Univ.-Prof. Dr. Franz L. Dickert

Vorwort

Diese Arbeit entstand in der Zeit von August 2009 bis September 2012 im Lehrstuhl Chemosensoren und optische Molekülspektroskopie unter der Leitung von o.Univ.-Prof. Dr. Franz L. Dickert am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Währingerstraße 38, 1090 Wien.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Herrn o. Univ. Prof. F. Dickert für die interessante Themenstellung meiner Arbeit, die wertvollen Anregungen und die Diskussionsbereitschaft, wie auch seine Unterstützung und Betreuung im Verlauf meiner Dissertation.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung bedanken, für die Hilfsbereitschaft in allen Bereichen und umfangreiche Unterstützung bei Fragen aller Art.

Ganz besonders danke ich meinem Ehegatten Hasan und meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	3
Danksagung.....	3
Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1. Einleitung	7
2. Theorie	9
2.1. Funktionsprinzipien von Chemosensoren	9
2.2. Anforderungsprofil von Chemosensoren	10
2.3. Zielsetzung	11
3. Massensensitive Sensoren.....	13
3.1. Der piezoelektrische Effekt.....	13
3.2. Der Schwingquarz (QCM) als piezoelektrisches Material.....	14
3.3. Die Sauerbrey-Gleichung und das Prinzip der massensensitiven Detektion ..	17
3.4. Herstellung der Goldelektroden mittels Siebdruckverfahrens	18
3.5. Elektrodendesign	19
4. Erkennungsprinzipien	21
4.1. Mechanismen der Inklusion	21
4.2. Molekulares Prägen und Selbstorganisation während des Polymerisationsprozesses	22
5. Atomic Force Microscopy (AFM)	27
5.1. Contact-Mode AFM	28
5.2. Non-Contact-Mode AFM	29
5.3. Tapping-Mode AFM	30
6. Messtechnik und Instrumentation	31
6.1. Netzwerkanalysator	32
6.2. Oszillatorschaltung.....	33
6.3. Messzelle	34
6.4. Messprogramm.....	35

7. Experimenteller Teil.....	37
7.1. Untersuchungen an Hefesensor	37
7.1.1. Hefezellen.....	37
7.1.2. Bestimmung der Zellzahlen bzw. Zellkonzentration	43
7.1.3. Erzeugung der Hefeimprints.....	44
7.1.4. Messergebnisse	46
7.1.5. Resümee	63
7.2. Massensensitive Detektion von Bakteriensporen.....	65
7.2.1. Bakteriensporen.....	65
7.2.2. Erzeugung der Imprints	67
7.2.3. Messergebnisse	69
7.2.4. Resümee	84
7.3. Untersuchungen an 5 MHz Quarz	85
7.3.1. Messergebnisse	85
7.3.2. Resümee	99
8. Zusammenfassung.....	101
9. Summary	103
10. Anhang.....	105
10.1. Nährmedien und Pufferlösungen	105
10.2. Geräte	106
10.3. Chemikalien	106
11. Lebenslauf.....	107
12. Literaturverzeichnis	109

1. Einleitung

1.1. Einleitung

Das Hauptaufgabengebiet der analytischen Chemie befasst sich mit der Entwicklung von Methoden, Geräten und Strategien zur Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung von Molekülen und Substanzklassen jeglicher Art. Untersuchungsgegenstand des Analytikers ist die sogenannte Probe. Der Analyt, der nachzuweisende Stoff in der Probe, ist umgeben von der Matrix. In den meisten Fällen muss eine Auftrennung oder Aufreinigung vor dem Einsatz einer instrumentellen Analysenmethode erfolgen. Die anspruchsvollen Verfahren der instrumentellen Analytik wie Massenspektroskopie, Chromatographie, GC, HPLC, MS, IR, NMR usw. benötigen meistens eine Probenvorbereitung. Die bedingt einen signifikanten Verbrauch an organischen Lösungsmitteln, hohe Kosten, Betrieb und Wartung durch gut ausgebildetes Personal sowie einen großen Zeitaufwand. Die hohen Anforderungen an die Analytik für einen schnellen und zuverlässigen Nachweis führen zu neuen Strategien. Heutzutage sind chemische Sensoren unverzichtbare Bestandteile der modernen Analytik, wobei jede analytische Methode Vor- und Nachteile aufweist.

Chemosensoren sind modernste Überwachungssysteme in großen Anlagen und haben ein sehr breites Einsatzspektrum. Besonders wichtig ist der Einsatz von chemischen Sensoren in den Bereichen Umweltmonitoring^[1], Biotechnologie und Medizin, wo schnelle, kostengünstige und zuverlässiger Detektion benötigt wird. Der bekannteste chemische Sensor ist die Lambda-Sonde^{[2][3]}, welche in Autos eingesetzt wird, um das Verhältnis von Treibstoff zu Luft zu regulieren. Ein weiteres Beispiel ist der Taguchi-Sensor, mit dem aus beschädigten Gasleitungen ausströmendes Methan detektiert werden kann. Zu den weiteren kommerziell erhältlichen Systemen zählen auch z.B. die pH-Elektrode, die Clark-Elektrode^[4] und die ionenselektiven Elektroden.

Die Entwicklung biomimetischer Oberflächen^[5] mittels molekularer Prägung ist ein wichtiger Aspekt in der Sensorik. Diese Methode ermöglicht einen selektiven und sensitiven Erkennungsprozess. Mittels dieser supramolekularen Strategie können eine Vielzahl von Analyten^{[6][7][8]} in der Größenordnung von wenigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern nachgewiesen werden. Durch molekulares Prägen synthe-

tisierte biomimetische Rezeptoren^{[9][10]} sind eine interessante Alternative zu natürlichen Antikörpern, da sie diese an chemischer und physikalischer Stabilität übertreffen. Aus diesem Grund sind derartige synthetische Erkennungssysteme^{[11][12]} von zunehmendem Interesse als sensitive Schicht von Sensoren.

2. Theorie

2.1. Funktionsprinzipien von Chemosensoren

Ein chemischer Sensor^[13] wird als ein miniaturisierter Messwertfühler definiert. Die Beschreibung der International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) für einen Chemosensor lautet, „small devices capable of continuously recognizing concentration of chemical constituents in liquids or gases and converting this information in real-time to an electrical or optical signal“^[14].

Die wesentlichen Einheiten^[15] eines chemischen Sensors^[16] sind in der *Abb. 1* schematisch dargestellt. Diese sind Rezeptor, Transducer und Messelektronik. Der Rezeptor im direkten Kontakt mit den Analyten ist die sensitive Schicht d.h. das Erkennungssystem des Sensors. Die sensitive Schicht bewirkt auch eine Anreicherung des Analyten. Durch Wechselwirken mit den Analyten ändern sich die physikalischen Eigenschaften wie z.B. Absorption^[17], Masse^[18], Widerstand oder Potential. Als wichtige Interaktion zwischen dem Analyten und der sensitiven Schicht sollten insbesondere hydrophoben Wechselwirkungen, Dipol-Dipol Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erwähnt werden.

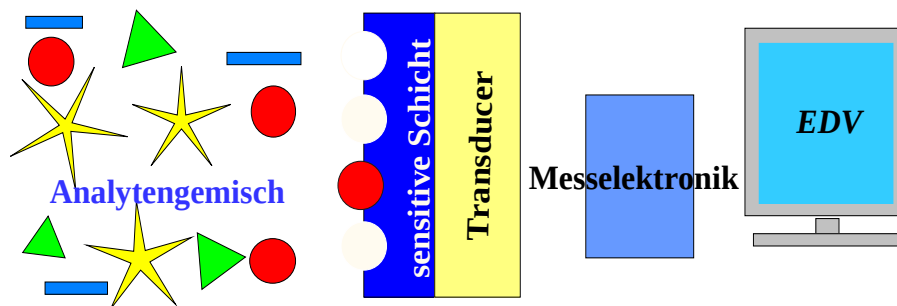


Abb. 1: Die wesentlichen Einheiten eines chemischen Sensors

Im nächsten Schritt wird die Information aus der sensitiven Schicht durch Transducer in ein elektrisches Signal umgewandelt. Anschließend werden die Daten über die Messelektronik in einem Computersystem transferiert und verarbeitet. Es handelt sich hier um ein miniaturisiertes Messsystem, welches eine selektive und sensitive Erkennung von Analyten ermöglicht.

2.2. Anforderungsprofil von Chemosensoren

Im Allgemeinen werden Sensoren auf die jeweilige Fragestellung gezielt angepasst. Für die Entwicklung von neuen Sensorsystemen ist ein interdisziplinäres Zusammenwirken verschiedener Fachrichtungen erforderlich. Insbesondere ist das Zusammenspiel von Chemie und Elektronik von entscheidender Bedeutung. Die hohen Anforderungen^[19] an chemische Sensoren sind am Beispiel einer Quarzmikrowaage (QMB: Quartz Micro Balance, oder Quartz Crystall Balance) aufgelistet. Der Sensor kann je nach Analyseproblem entsprechend den Anforderungen modifiziert werden.

- Schnelles Ansprechverhalten: kann im Sekundenbereich liegen
- Miniaturisierbarkeit
- Langlebigkeit: je nach verwendeter Beschichtung von Stunden bis zu Jahren
- Reversibilität: durch die Stärke der Wechselwirkungen des Analyten mit der chemisch sensitiven Schicht bestimmt
- Reproduzierbarkeit: hängt von der sensitiven Schicht ab, Reversibilität
- Sensitivität: Nachweisgrenze bis hinab zu 1ng Masse
- Selektivität: hohe Selektivität durch molekulare Erkennung, z.B. Prägen möglich
- Stabilität: durch Verwendung einer robusten Schicht möglich
- Integrierbarkeit in EDV: Kontinuierliche und automatische Messungen über digitale Datenerfassung und Auswertung möglich
- Driftreduktion: Anwendung von Differenzmessungen, Temperatur- und Druckkompensation möglich
- Messprinzip: universell
- Bedienbarkeit: unkompliziert
- Kosten: Produktion, Betrieb und Wartung mit geringem Aufwand

2.3. Zielsetzung

Die Bedrohung des Menschen, der (Nutz-)Tiere sowie der Landwirtschaft durch Pathogene^{[20][21]} ist eine Herausforderung für die moderne Analytik, schnelle und zuverlässige Detektionsmethoden zu entwickeln. Pathogene für den Menschen umfassen indirekt die Vergiftung durch verdorbene Lebensmittel oder kontaminiertes Trinkwasser bzw. direkt durch bakterielle oder virale Infektionen. Nicht zuletzt gab es in der Vergangenheit auch Fälle vom Einsatz biologischer Kampfstoffe wie Anthrax^[22] (*Bacillus anthracis*) und Vermutungen, dass eine ernstzunehmende Bedrohung auch durch andere Biowaffen besteht. Daher ist die Früherkennung durch dauerhafte Überwachung die einzige Möglichkeit, einen Seuchenausbruch zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit werden Bakteriensporen, Hefezellen und Bakterien untersucht und Spurennachweise durchgeführt. Hierbei erfolgt die Extraktion der Analyten aus der wässrigen Phase mittels einer geprägten Oberfläche, wodurch eine Anreicherung stattfindet. Besonders zielführend sind hierbei labelfreie Detektionsverfahren, wie die Quarz-Mikrowaage. Die Verwendung ganzer Zellen als Prägetemplate erlaubt deren Detektion in komplexer Matrix^[23]. So ist ein empfindlicher Analytnachweis möglich, da die detektierbaren Massen bis in den unteren Nanogrammbereich reichen. Weitere Empfindlichkeitssteigerungen lassen sich mit Oberflächenwellenbauteilen erzielen. Mit Lithiumtantalat^[24] als piezoelektrisches Medium kann man auch in wässriger Phase arbeiten, da die Wellen durch das Substrat geführt werden. Dies wird durch die hohe Dielektrizitätskonstante des Materials ermöglicht. Die jeweiligen Bauteile haben wir von der Firma EPCOS, einer Siemens Tochter, bereit gestellt bekommen. Auf diese Weise sind Massendetektionen bis hinab zu einigen Femtogramm möglich.

Eine Fragestellung zur Detektion von Biopartikeln^{[25][26]} soll mit Hefen durchgeführt werden. Von prinzipiellem Interesse sind die Mechanismen der Wechselwirkung der Biopartikel mit strukturierten Oberflächen. Hier spielen konvexchemische Interaktionen über die Größe der Kavität eine bedeutende Rolle. Konvex- und konkavchemische Aspekte sind vor allem bei geometrischen Anpassungen und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen auf der molekularen Ebene von Bedeutung. Hierzu soll mit synchronen Zellen gearbeitet werden, damit die geometrischen Beiträge gezielt analysiert werden können. Durch Variation der Hohlräume relativ zum Biopartikel

lassen sich auch über ein Sauerbrey- bzw. Antisauerbrey-Verhalten wesentliche mechanistische Informationen gewinnen.

Weiterhin soll eine Untersuchung der Sporen von *Bacillus thuringiensis*^[27] und *Bacillus subtilis* sowohl mit Sensoren als auch mit AFM (Atomic Force Microscopy) erfolgen. Im Sinne der Entwicklung eines Sporensensors sollen verschiedene Polymere für die Optimierung der sensitiven Schicht optimiert werden. Neben der Sensitivität soll auch die Selektivität des Sensors durch Kreuzreaktivitätsmessungen bestimmt werden.

Ein anderes wichtiges Thema dieser Arbeit ist die Messungen mit 5 MHz Quarz als Transducer. Dafür soll zuerst ein Elektrodendesign optimiert werden. Für diesen Zweck soll eine Reihe von Messungen mit unterschiedlicher Elektrodenstruktur, Elektrodenzahl und Elektrodenstichtdicke durchgeführt werden. So werden über die Messfrequenz die Eigenschaften der Sensorschichten mit inkludierten Biopartikeln untersucht.

3. Massensensitive Sensoren

Geeignete Massensensitive mikroelektronische Bauteile auf der Grundlage piezoelektrischer Schichten werden in diesem Kapitel beschrieben. Das Grundprinzip, dass jede Ad- bzw. Absorption von Analytmolekülen in der sensitiven Schicht bei der Quarz-Mikrowaage^[28] oder dem SAW-Oszillator^[29] zu einem Signal führt, weist auf die universelle Einsetzbarkeit von massensensitive piezoelektrische Chemosensoren^[30] hin.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen mit Hilfe von Schwingquarze^[31], mit Resonanzfrequenzen von 5 MHz und 10 MHz als massensensitiver Transducer, durchgeführt. Unter Schwingquarz wird ein dünnes Quarzplättchen verstanden, das unter dem Einfluss von elektrischen Wechselfeldern mechanische Schwingungen ausführt. Die Resonanzfrequenzen werden durch Masseänderungen beeinflusst und die Analyte so über eine geeignete chemisch sensitive Schicht selektiv detektiert.

3.1. Der piezoelektrische Effekt

Bestimmte Kristalle, wie Quarz (SiO_2), die eine oder mehrere polare Achsen aber kein Symmetriezentrum besitzen, lassen sich rein mechanisch durch eine Druck-, Zug- oder Schubspannung (ohne ein äußeres elektrisches Feld) Spannungen über Polarisierungseffekte erzeugen. Im Jahr 1880 haben die Brüder Pierre und Jaques Curie diesen piezoelektrischen Effekt^[32] nachgewiesen. Infolge einer mechanischen Kraft auf ein piezoelektrisches Material entsteht durch Ladungsverschiebung der Ladungsschwerpunkte des piezoelektrischen Kristalls eine Polarisation. Das daraus resultierende Dipolmoment in Richtung der polaren Achse (entlang der x-Achse) ist proportional zu der ausgeübten Kraft entlang der y-Achse. Auch umgekehrt, wenn eine Spannung an dieses Material gelegt wird, erfährt der Kristall je nach Polung eine Komprimierung oder Dehnung. Einwirken einer Wechselspannung wird das piezoelektrische Material im Falle der mechanischen Resonanzbedingung zu mechanischen Schwingungen anregen. Solche piezoelektrischen Materialien, wie Quarzkristalle, besitzen eine sogenannte Eigenfrequenz mit der sie nach Anlegen einer Spannung mit einer gewissen Dämpfung weiterschwingen. Da diese Eigenfrequenz bei einer geeigneten Fixierung nur von der Schichtdicke abhängt, sind diese sehr gut als

präzise Oszillatoren geeignet. Es bestehen nur gewisse Druck- und Temperaturabhängigkeiten, die sich kompensieren lassen.

3.2. Der Schwingquarz (QCM) als piezoelektrisches Material

Quarz (SiO_2) Kristalle haben eine stabile Form und kristallisieren aus dem SiO_2 -Sol/Gel-System bei Temperaturen zwischen $70\text{-}200^\circ\text{C}$ aus. Dieses Gemisch wird α -Quarz genannt und ist bis zu einer Temperatur von 570°C stabil. Der α -Quarz geht in β -Quarz, sobald er über 570°C erhitzt wird. Der Querschnitt des sechseckigen Quarzkristalls ist in der *Abb. 2* veranschaulicht. In Richtung der x-Achse, welche senkrecht zur z-Achse steht, tritt durch Deformation des Kristalls eine elektrische Ladung auf.

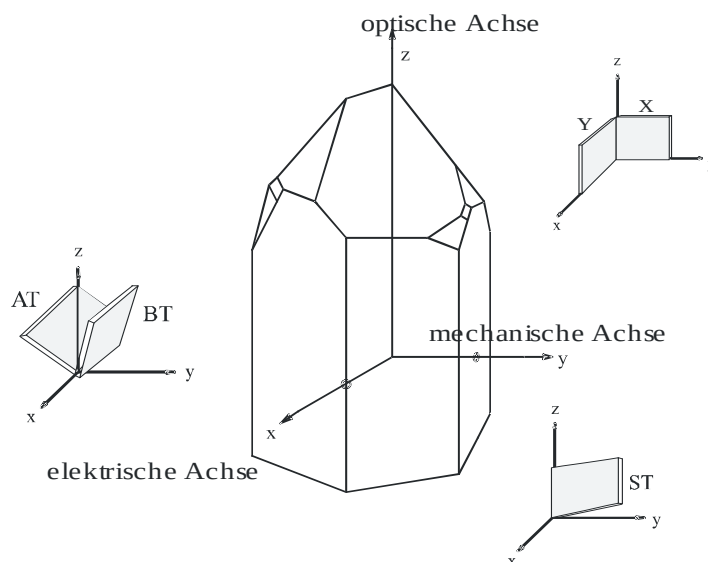


Abb. 2: Der natürliche, im Querschnitt sechseckige Quarzkristall hat 3 Achsen: optische Achse (z-Achse), mechanische Achse (y-Achse), elektrische Achse (x-Achse)

Durch Anlegen einer Wechselspannung treten verschiedene Schwingungsformen von tiefen bis hohen Frequenzen auf. Diese Formen sind in der *Abb. 3* dargestellt. Ein als Sensormaterial eingesetzter Quarz muss eine minimale Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz und gute elektrische Anregbarkeit aufweisen^[33]. Da die AT-Schnitt Quarze diese Voraussetzung erfüllen, werden diese bei Dickenschwingungen für mikrogravimetrische Sensoren herangezogen. Auf gegenüberliegende Flächen eines Schwingquarzes (fein geschliffene Quarzplättchen) werden zwei Elektroden aufgebracht. Wenn an diese zwei Elektroden eine Spannung angelegt wird, ergibt sich eine

Mechanische Deformation des Quarzes auf Grund der Elektrostriktion. Wenn diese eine Wechselspannung ist, können sich stehende Wellen ausbilden.

Biegungsschwinger

Dickenschwinger

Längenschwinger

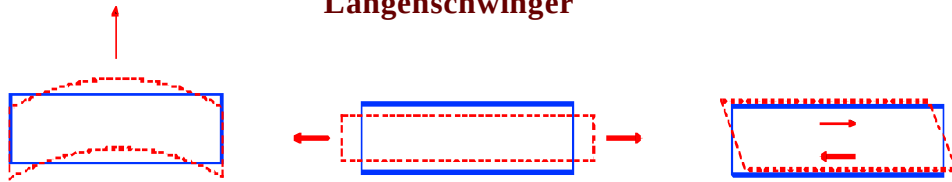


Abb. 3: Durch Anlegen einer Wechselspannung treten von tiefen bis hohen Frequenzen Schwingungsformen wie Biege-, Dehnung-, Flächenscher- und Dickenschwinger auf

Die Resonanzfrequenz der Dickenschwinger und die Dicke des Quarzplättchens sind im Idealfall umgekehrt proportional zu einander. Bei geringer Dämpfung wird das Butterworth van Dyke Model^[34] (BVB) (Abb. 4) für ein Ersatzschaltbild herangezogen, um zu simulieren, wie die mechanischen und akustischen Phänomene in einem Oszillatorschaltkreis durch Ersatzschaltbild dargestellt werden können. Hierbei entspricht die dynamische Kapazität C_q der elastischen Nachgiebigkeit des Quarzes, die

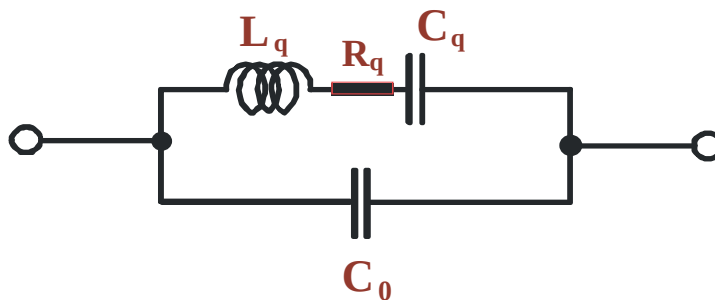


Abb. 4: Butterworth van Dyke Model (BVB); wobei C_q (dynamische Kapazität) mechanische Elastizität des Quarzes, L_q (Induktivität) schwingende Masse, R_q (Widerstand) die Dämpfung und C_0 die statische Kapazität beschreiben

Induktivität L_q der trägen Masse des Quarzes. Der Widerstand R_q beschreibt dann die Dämpfung und C_0 charakterisiert die statische Kapazität, welche hauptsächlich durch die Goldelektroden bedingt ist. Aus dem Ersatzschaltbild ergeben sich zwei Eigenfrequenzen, die serielle (f_s) und die parallele Resonanz (f_p), die in der Abb. 5 zu sehen sind. Der mathematische Zusammenhang ist in der Gleichung 1 zusammengefasst.

Außer diesen Resonanzen treten auch weitere Nebenresonanzen (Twist und die asymmetrische Schwingungen) auf, die bei höheren Frequenzen auftreten.

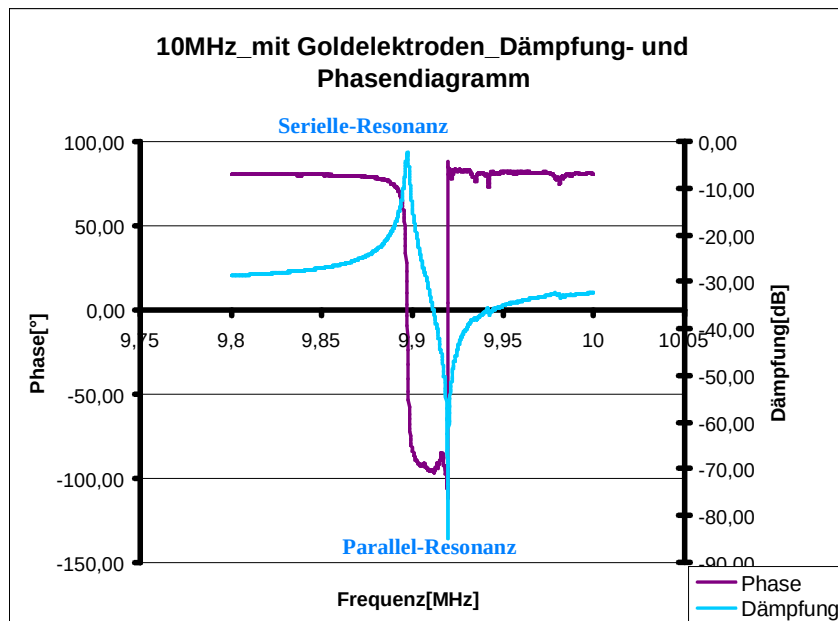


Abb. 5: Dämpfungsspektrum; Aus dem Ersatzschaltbild ergeben sich zwei Eigenfrequenzen, die serielle- (f_s) und parallele- Resonanz(f_p)

$$f_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}$$

$$f_p = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \sqrt{1 + \frac{C}{C_0}}$$

Gleichung 1: Serielle und parallele Resonanz aus dem Ersatzschaltbild

3.3. Die Sauerbrey-Gleichung und das Prinzip der massensensitiven Detektion

Die Sauerbrey-Gleichung^[35] beschreibt den Zusammenhang zwischen der Resonanz-

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

ΔfFrequenzänderung

f_0Eigenfrequenz

dDicke des Quarzes

Δmadsorbierte Masse

ρDichte von Schicht

AFläche der Elektroden

Gleichung 3: Die Sauerbrey - Gleichung

absorbierten Masse aufgezeigt^[36].

Durch die Adsorption oder Absorption des Analyten an die Oberfläche des Schwingquarzes wird die Resonanzfrequenz erniedrigt und daher schwingt der Quarz bei niedrigeren Frequenzen. Die Sauerbrey-Gleichung besagt, dass die Frequenzänderung des Schwingquarzes linear von der Massenänderung und quadratisch von der Eigenfrequenz abhängt.

Das heißt eine Erhöhung der Grundfrequenz führt zu einer Steigerung der Empfindlichkeit. Dies bedeutet, dass höhere Eigenfrequenzen zu niedrigeren Nachweisgrenzen führen.

frequenz und der Masse der angelagerten Analyten auf dem Sensor. Die einfache Formulierung der Sauerbrey-Gleichung ist aus Gleichung 3 zu ersehen. Diese Gleichung gilt nur für sehr dünne und starre Schichten und wurde ursprünglich zur Berechnung der Massenbelastung der Elektrodenoberflächen des Sensors im Vakuum oder Luft herangezogen. Mit der Sauerbrey-Gleichung wird die direkte Proportionalität zwischen der Änderung der Resonanzfrequenz und der ad- bzw.

$$\Delta v = -cv_0^2 \Delta m - cv_0^{\frac{3}{2}} (\Delta \eta \Delta \rho)^{\frac{1}{2}}$$

Δv Frequenzänderung

ρ Dichte der Flüssigkeit

η Viskosität der Flüssigkeit

Δm ..Massenänderung

v_0Resonanzfrequenz

c $-2,26 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{Hz.g}$

Gleichung 2: Sauerbrey-Gleichung für die Flüssigphase mit dem Korrekturterm

Wenn die Messungen in der Flüssigphase durchgeführt werden, braucht die Sauerbrey-Gleichung zusätzlich einen Korrekturterm, der die Viskosität und die Dichte der benetzenden Flüssigkeit berücksichtigt^{[37][38]}. Dies trifft bei Messungen von Hefen, Bakterienzellen und Sporen zu, da die biologischen Untersuchungen^[39] normalerweise

in Flüssigphase ablaufen. Die *Gleichung 2* beschreibt die Sauerbrey- Gleichung mit dem Korrekturterm^[40] für die Flüssigphase.

3.4. Herstellung der Goldelektroden mittels Siebdruckverfahrens

Die Elektroden werden mit Hilfe des Siebdruckverfahrens auf den Schwingquarz aufgebracht. Die Siebe werden für ihr jeweiliges Elektrodendesign, das im Programm „Designer 9“ optimiert wird, mittels Photolithographie individuell angefertigt.

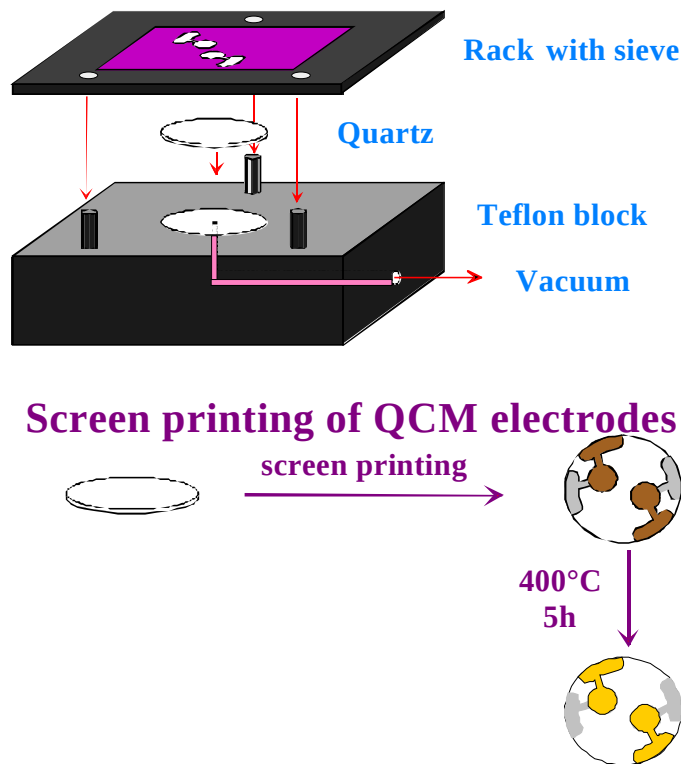


Abb. 6: Siebdruckverfahren zum Auftragen der Goldelektroden auf dem Quarzplättchen

Dabei wird ein zurechtgeschnittenes Gewebesieb mit einer Maschenweite von 21µm auf einen polierten Rahmen (Maßen 10x10 cm) mittels Superkleber aufgeklebt und dann mit UV-Photolack (Nativlack Azocol Poly-Plus S von KIWO) dünn bestrichen und glatt abgezogen. Diese Photolackschicht wird unter Lichtausschluss ca. eine Stunde getrocknet. Anschließend wird es für 30 Sekunden über eine Elektrodenmaske

mit einem UV-Quelle belichtet. Schließlich werden die nicht vernetzten, ungehärteten Lackstellen mit lauwarmem Wasser ausgewaschen.

Für die Goldelektroden wird eine Glanzgoldpaste (GGP 2093, 12% der Fa. Heraeus) mittels der Siebschablone unter Hilfe einer Ansaugvorrichtung auf den Quarz aufgetragen (siehe Abb. 6). Ein Quarzplättchen wird auf der Ansaugvorrichtung platziert und mittels Vakuum fixiert. Dann positioniert man das Sieb mittels Führungsschienen über dem Quarzplättchen. Anschließend wird die Goldpaste (kolloidales Gold) mit einer Rakel aufgetragen und glatt abgezogen. Die eigens angefertigten Siebvorlagen sind größer als das Quarzplättchen, damit auch die Ränder des Plättchens beschichtet werden können. Im Anschluss brennt man die aufgetragenen Elektroden im Muffelofen bei 400° C drei bis vier Stunden lang auf dem Quarzplättchen ein. So lassen sich die organischen Reste der Paste rückstandsfrei verbrennen. Die Dicke der Goldelektroden können durch Messungen am Netzwerkanalysator oder mittels AFM Messungen exakt bestimmt werden. Die Quarzplättchen lassen sich leicht regenerieren, indem man die Goldelektroden mit Königswasser entfernt (Gemisch aus konzentrierter Salpetersäure und konzentrierter Salzsäure im Verhältnis 1:3).

3.5. Elektrodendesign

Da die Untersuchungen mit biologischen Analyten in der Flüssigphase durchgeführt werden, verwendet man zwei unterschiedlich große Elektroden, um Leitfähigkeitseffekte in der Flüssigphase^{[41][42]} zu eliminieren (siehe



Abb. 7: Dualelektroden für die Messung in der Flüssigphase

Abb. 7). Dadurch wird die Feldlinieneindringtiefe in die Analytlösung herabgesetzt und eine Minimierung der ionischen Effekte erzielt. Über eine Referenzelektrode ist mit dem Dual-Elektrodendesign eine Differenzmessung möglich, die unabhängig von unspezifischen Frequenzänderungen ist. Dabei

sind die Elektroden auf der oberen Seite des Schwingquarzes größer (Durchmesser: 5 mm) als die Elektroden auf der unteren Seite (Durchmesser: 4 mm).

4. Erkennungsprinzipien

Bei der Entwicklung von massensensitiven Sensoren spielt das Prinzip der molekularen Erkennung eine entscheidende Rolle. Herstellung synthetischer Rezeptoren^[43] in Form von sensitiven Schichten ist ein wesentlicher Schritt bei der Weiterentwicklung der massensensitiven Sensoren. Die sensitive Schicht muss unabhängig von der nötigen Selektivität eine Reihe von physikalischen Ansprüchen erfüllen, wie z.B. thermische Stabilität und Resistenz gegenüber chemische Einwirkungen. Die Auswahl der sensitiven Schicht wird an den jeweiligen, nachzuweisenden Analyten angepasst.

4.1. Mechanismen der Inklusion

An der Rezeptorschicht tritt vor der eigentlichen molekularen Erkennung in der Regel eine Sorption (Ad-, Ab-, Physi- und Chemisorption) des Analyten auf. Eine Voraussetzung für die hohe Selektivität ist die Ausbildung von starken Wechselwirkungen, jedoch nicht kovalenter Art, um irreversible Bindungen zwischen Analyt und Sensoroberfläche (sensitive Schicht) zu vermeiden. Die sogenannte Wirt-Gast (Host-Guest) auch supramolekulare Chemie^{[44][45]} ist die Grundstrategie für die Entwicklung synthetischer Rezeptoren und liefert eine optimale Lösung dieser Fragestellung. Dabei werden die gewünschten Analyten nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip in die sensitive Schicht eingelagert. Für sensorische Zwecke ermöglichen die schwachen Wechselwirkungen, wie z.B. Van-der-Waals Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen, dass die sensitive Schicht den gewünschten Analyten reversibel einlagert. Wenn die aufgetretenen Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der Sensoroberfläche zu stark sind, so wird der Analyt nicht mehr abgespalten und die Schicht sättigt sich. Ein wesentlicher Punkt in der Supramolekularen Chemie^[46] auf Grundlage des Host-Guest Prinzips, ist die Herstellung von geeigneten Kavitäten, die vorzugsweise in eine polymere Struktur eingebettet sind. Von den monomeren Verbindungen existieren zahlreiche Beispiele, bei denen der Hohlraum eine zum Analyten adaptierten Hohlraum aufweist. Effektive Inklusion basiert auf einer optimierten Geometrie und ausgeprägten intermolekularen, enthalpischen Wechselwirkungen. Bestens bekannt sind die hohlraumbildenden Verbindungen, wie z.B. Cyclodextrine^[47], Calixarene^[48] und Cyclophane^[49]. Molekular geprägte Polymere (MIPs) stellen eine Möglichkeit dar, robuste Materialien mit diesen Eigenschaften zu entwickeln.

4.2. Molekulares Prägen und Selbstorganisation während des Polymerisationsprozesses

Für die molekulare Erkennung bzw. die Herstellung von Rezeptoren spielt das molekulare Prägen^[50], Herstellung von MIPs (Molecularly Imprinted Polymers), eine entscheidende Rolle.

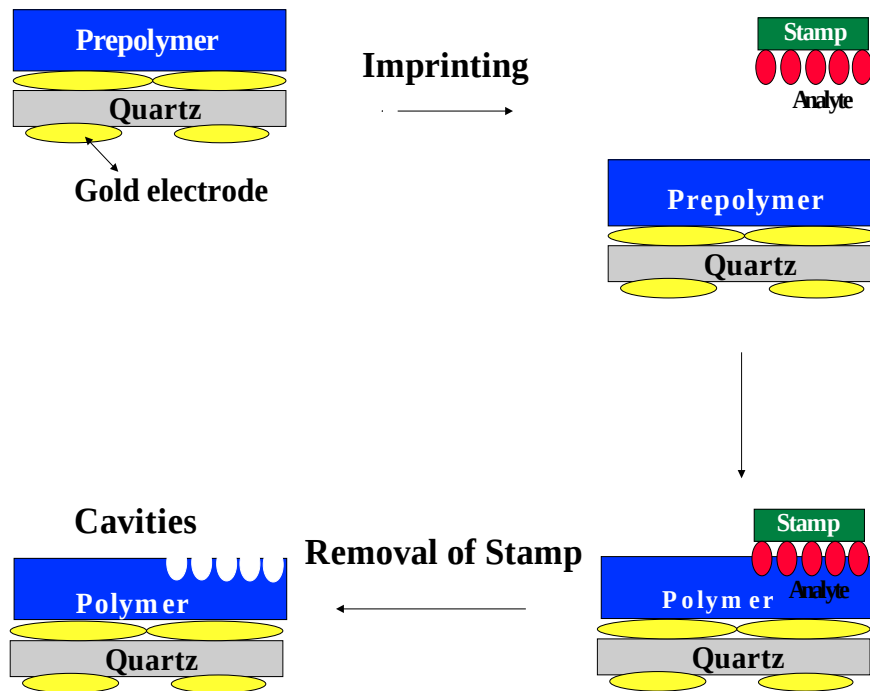


Abb. 8: Schematische Darstellung der Oberflächen Prägung

Das Prinzip ist die Herstellung sensibler Schichten durch Selbstorganisation von Monomereinheiten während des Polymerisationsprozesses. Auf Basis der Selbstorganisation wird ein Vorpolymer in Gegenwart eines Templates^[51], üblicherweise die Analytmoleküle, auspolymerisiert. In der *Abb. 8* ist das Prinzip des molekularen Prägens schematisch dargestellt. Ein Vorpolymer wird mit Hilfe von Spin-Coating auf die gesamte Oberfläche des Quarzes aufgetragen. In der *Abb. 9* wurde ein Spin-Coater schematisch dargestellt. Anschließend wird das Templat (in den meisten Fällen der Analyt auf einen Stempel assembliert und das noch nicht ausgehärtete Vorpolymer der Elektrode hineingedrückt. Es ist dabei zu beachten, dass das Templat (Analyt) trocken

vorliegt, da das in der vorliegenden Arbeit als Polymer verwendete Polyurethan mit Wasser abreagieren kann.

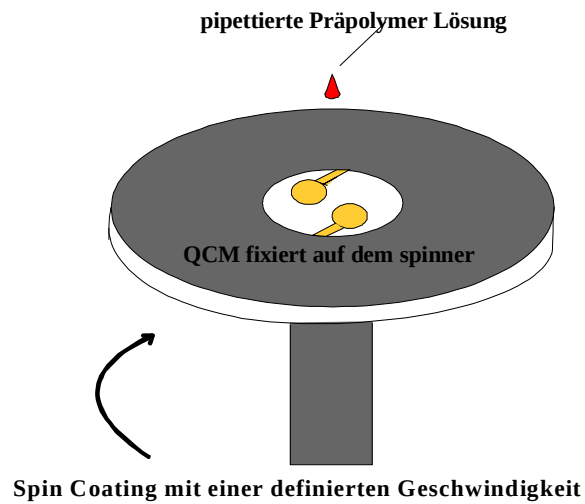


Abb. 9 : Spin Coater

Durch die Reaktion mit Wasser können Isocyanate zu Aminen und Kohlendioxid zersetzt werden – siehe *Abb. 10*. Nach vollständiger Polymerisation in Gegenwart der Analyten wird das Templat entfernt.

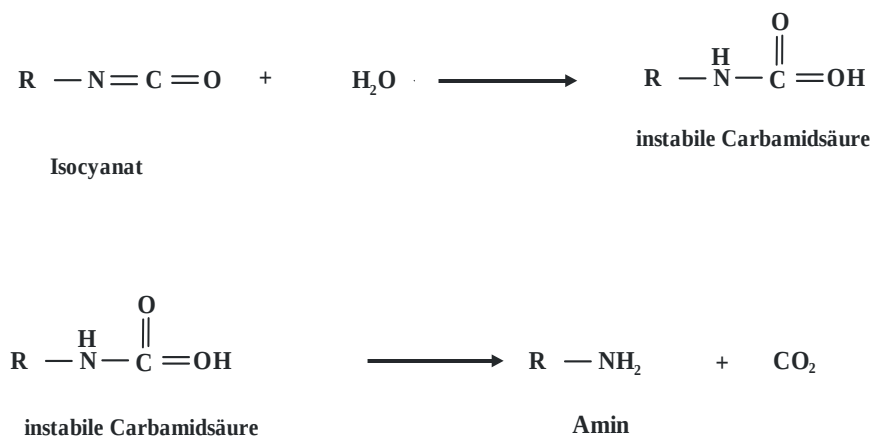


Abb. 10: Reaktion des Isocyanats mit Wasser

In das Polymer zurückgebliebene Kavitäten werden durch starke Quervernetzung starr und kollabieren nicht, nachdem das Templat ausgewaschen wird. Auf diese Weise entstandene Abdrücke sind selektiv und können Analyte derselben Art wieder aufnehmen. Der größte Vorteil liegt darin, dass die Struktur des Analyten nicht bekannt sein muss, weil sich die Polymerisation selbst organisiert.

Die Optimierung der Polymerschicht als chemisch sensitive Schicht ist von einer Reihe von Parametern abhängig, darunter der Auswahl der geeigneten Monomere und deren Verhältnis zueinander, dem Quervernetzeranteil und der dadurch bedingten Po-

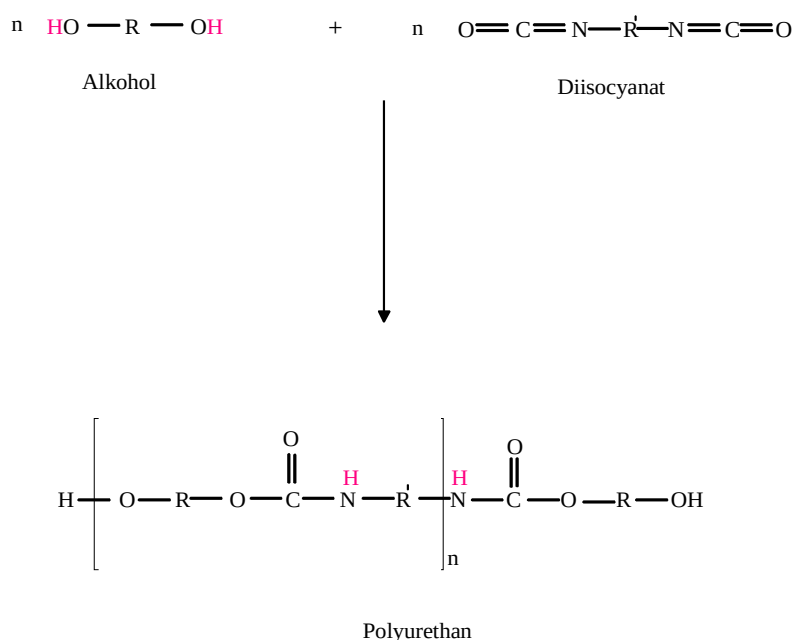


Abb. 11: Polyurethan aus Diisocyanat und Dialkohol in einer Polyadditionsreaktion

rosität sowie der Stabilität des Polymers. Für die Beschichtung der Goldelektroden des Sensors kommen mehrere Polymere in Frage. Die Eigenschaften eines solchen Polymers beziehen sich auf die Beschaffenheit des Analyten sowie Methodik des Prägevorgangs. In diesem Fall handelt es sich um Mikroorganismen. Die Rigidität, die gute Haftung an Gold sowie die Widerstandsfähigkeit gegenüber Wasser und anderen milden Agenzien macht das Polyurethan^[52] ein sehr gut geeignetes Polymer für die Erkognition von Bioanalyten. Eine Alternative zu Polyurethan könnte Polyacrylat sein, welches aber eine geringe Haftung an Goldelektroden als Polyurethan zeigt und somit einen Nachteil aufweist. Im Zuge dieser Arbeit kommen zwei verschiedene Ansätze

für die Herstellung eines Polyurethans zur Anwendung. Für jeden Analyt, je nach

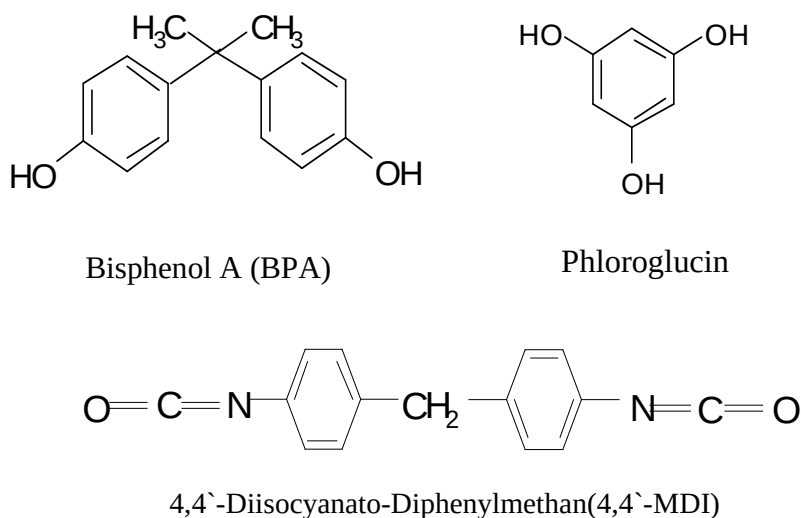


Abb. 12 Monomere des Polyurethans für den Hefesensor

deren Größe, sowie deren Oberflächeneigenschaften, werden unterschiedliche Schichtdicken und Porosität benötigt. Hauptsächlich wird Polyurethan aus den Monomeren Bisphenol A und Diisocyanat über eine Polyadditionsreaktion synthetisiert. In der *Abb. 11* wurde diese Herstellung des Polyurethans über eine Polyadditionsreaktion von Diisocyanat und Bisphenol A veranschaulicht, wobei Phloroglucin als Vernetzer fungiert.

Da die untersuchende Analyte in dieser Arbeit Bioanalyte sind, nämlich Hefezellen, Sporen bzw. Bakterien, eignet sich das Polyurethan als Polymer für die Rezeptorschichten der Sensoren durch seine hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften sehr gut. Hierbei wurden zwei verschiedene Polyurethane aus unterschiedlichen Monomeren synthetisiert. Diese unterscheiden sich nicht nur in Art der Monomere sondern auch die Prozent der Monomere sind unterschiedlich für die jeweiligen Analyten. Ein Polyphenol dient zu einer zusätzlichen Vernetzung. Die Monomere des Polyurethans für den Hefesensor sind in der *Abb. 12* und für den Sporen- bzw. Bakteriensensor in der *Abb. 13* zu sehen. Die eingesetzten Mengen des Polyurethans für die Hefezellen, Bakterien sowie die Sporen sind dem jeweiligen Kapitel zu entnehmen.

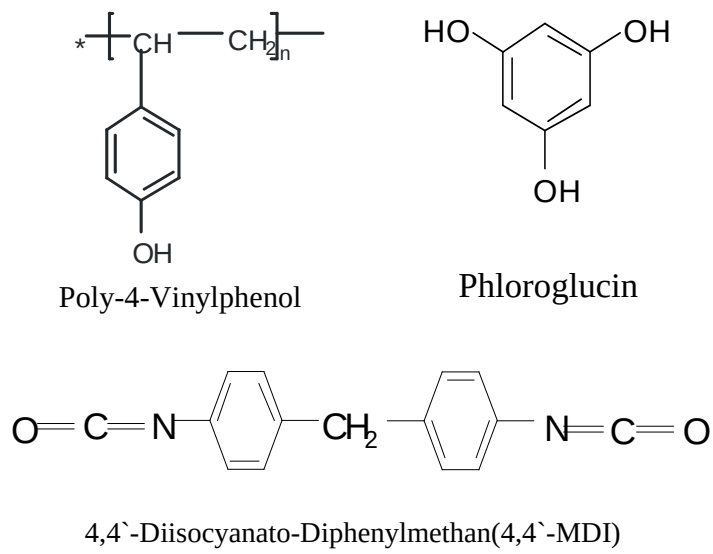


Abb. 13: Monomere des Polyurethans für den Sporen- bzw. Bakteriensensor

5. Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic Force Microscope (Rasterkraftfeldmikroskop) ist eine sehr wichtige Untersuchungsmethode der Oberflächenchemie und gehört zu den SPM^[53] (Scanning Probe Microscopy) Methoden. Zur Charakterisierung der strukturierten Polymere



Abb. 14: Bildliche Darstellung der Nanoscope IIIa Multimode AFM

(MIP) und vor allem um Korrelationen zwischen den erhaltenen Messergebnissen herstellen zu können, wird das AFM zur Oberflächenanalyse angewendet. Das Grundprinzip aller SPM-Techniken ist die Abtastung der Probenoberfläche (Punkt für Punkt) mit einer Spitze, die sich auf einem Cantilever befindet. Daraus wird ein Bild der Oberfläche der Probe erzeugt. Die zuvor entwickelte SPM-Technik ist die Rastertunnelmikroskopie STM^[54] (Scanning Tunnelling Microscope) im Jahre 1982 bei IBM in Zürich von H. Rohrer^[55] und G. Binnig. Bei STM wird der

quantenmechanische Tunneleffekt zwischen Probe und einer sehr feinen Metallspitze ausgenutzt. Der Tunnelstrom zwischen Probe und Sondenspitze wird konstant gehalten indem der Abstand entsprechend variiert und dadurch die Topographie der Probe erhalten wird. Wenn die Spitze beispielsweise zu einer Erhebung kommt, steigt der Tunnelstrom an. Die Piezoelemente regulieren den Abstand zwischen Spitze und der Oberfläche, in dem die Spitze hochgezogen wird, bis der erwünschte (ursprüngliche) Strom wieder erreicht ist. Die Spitze folgt so der Probenoberfläche, wobei die Bewegungen der Sondenspitze aufgezeichnet und am Computer dargestellt werden. Der Tunnelstrom ist exponentiell von der Elektrodendistanz abhängig, d.h. je näher die

Sondenspitze an der Probenoberfläche ist, desto höher wird die Auflösung. Ein Bild des AF-Mikroskops ist in der *Abb. 14* zu sehen.

Die Weiterentwicklung der Scanning Tunneling Microscopy (STM) ist die Atomic Force Microscopy (AFM) und wurde im Jahre 1986 von Binning, Quate und Gerber vorgestellt. Diese Technik nutzt die Wechselwirkungskräfte zwischen Probe und einer Spitze auf einem Federbalken aus. Das Signal wird über einen Laserstrahl erzeugt, der auf der Oberseite des Cantilever reflektiert und auf eine Photodiode gelenkt wird. Mit der Atomic Force Microscopy können strukturelle Eigenschaften der Probe, bis zum atomaren Bereich abgebildet und vermessen werden. Ein großer Vorteil des AFM besteht darin, dass die Proben im Gegensatz der STM nicht leitend sein müssen. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit in wässriger Phase zu messen. Damit gehört das AFM in der Biologie, Biochemie und Medizin zu den am häufigsten angewandten Techniken zur Oberflächenuntersuchungen von Proteinen und Zellen^[56] unter physiologischen Bedingungen. Beim AFM sind drei unterschiedliche Mess-Modus möglich: Contact-Mode AFM, Non-Contact-Mode AFM und Tapping-Mode AFM.

5.1. Contact-Mode AFM

Beim Contact-Mode^[57] AFM rastert die Spitze die Probenoberfläche und steht im Kontakt mit dieser. Die Spitze befindet sich auf einem flexiblen Cantilever, einem

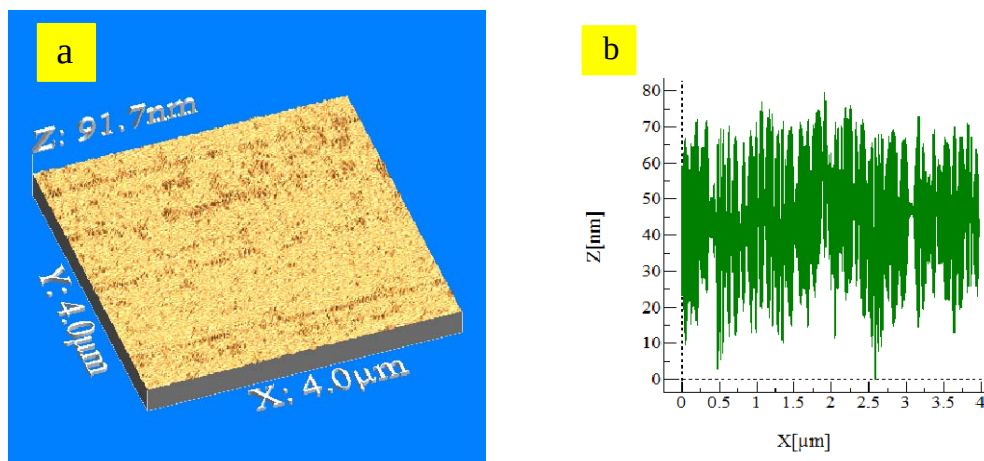


Abb. 15: a) 3D-AFM Bild der mit goldbeschichteten Elektrode eines Sensors. Bildgröße: 4x4 μm . AFM Contact Mode. b) Das Profilbild der Oberfläche: Oberflächenrauigkeit ca. 40nm.

Balken aus mit Siliziumnitrid beschichteten Silizium mit einer Länge von 100-500 μm und eine Dicke von 0,5-5 μm . Die Auslenkung des Cantilevers wird mittels des Lasers und einen 4 Segment-Photodiode (siehe Abb. 16) überwacht. Da die Spitze und die Oberfläche im Kontakt sind, treten dabei sowohl anziehende Van-der-Waals Kräfte und Kapillarkräfte sowie abstoßende Coulomb-Kräfte aufgrund der Atomkerne auf. Hierfür wird mittels feedback loop die Auslenkung Cantilevers durch eine vertikale Ausgleichsbewegung entsprechend korrigiert um den Laser stets im Zentrum der vier Dioden zu halten und somit die Kraft zwischen Probe und Spitze konstant gehalten. Die AFM-Bilder, die in der vorliegenden Arbeit abgebildet sind, wurden alle mittels Contact-Mode-AFM aufgenommen. Die 3D-Darstellungen wurden mittels Programm WSxM^[58] erstellt. Ein Beispiel ist in der Abb. 15 für eine mit goldbeschichteter Elektrode eines Sensors zu sehen. Aus dem Profilbild dieser AFM-Messung ist es zu erkennen, dass die Oberfläche eine mittlere Rauigkeit von rund 40 nm hat.

5.2. Non-Contact-Mode AFM

In dem Modus oszilliert der Cantilever bei einer Frequenz, die etwas über der Resonanzfrequenz des Cantilevers liegt mit einer typischen Amplitude von einigen Nanometern. Bei der

Messung kontaktiert die Spitze die Oberfläche der Probe nicht, sondern oszilliert über der Oberfläche. Mittels feedback loop wird die Oszillationsamplitude oder Frequenz durch eine vertikale Bewegung des Scanners konstant gehalten, bis

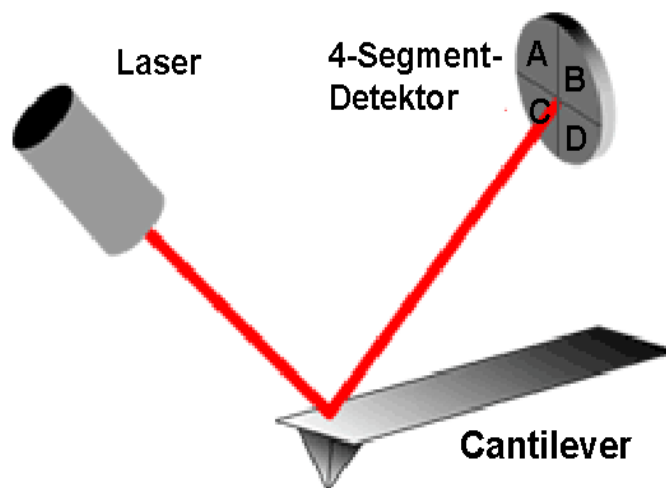


Abb. 16: Überwachung der Oberflächentopographie mittels 4 Segment Detektor

die Amplitude bzw. Frequenz erreicht wird (der "setpoint"). Der Abstand der Spitze von der Probe wird an jedem Datenpunkt gespeichert um ein topographisches Bild der Probenoberfläche zu erstellen. Dieser Modus wird oft für weiche und extrem hydrophobe Proben (wie z.B. biologische^{[59][60]} Proben) angewandt.

5.3. Tapping-Mode AFM

Diese Methode ist vorteilhaft für weiche und elastische Proben und dieser Technik ist sowohl für die Gasphase als auch für Flüssigphase Messungen geeignet. Das liegt daran, dass die Spitze die Oberfläche nur leicht berührt und deshalb im Gegensatz zum Contact-Mode AFM keine lateralen Scherkräfte auftreten. Hierbei oszilliert die Spitze mit einer Amplitude von 20 nm bis 100 nm über die Probenoberfläche, tippt aber während des Scannens leicht auf die Probenoberfläche. Ein Nachteil des Tapping-Mode AFM ist die etwas niedrigere Scanngeschwindigkeit im Vergleich zu Contact-Mode AFM. In der *Abb. 17* ist die allgemeine schematische Darstellung der AF-Mikroskopie zusehen.

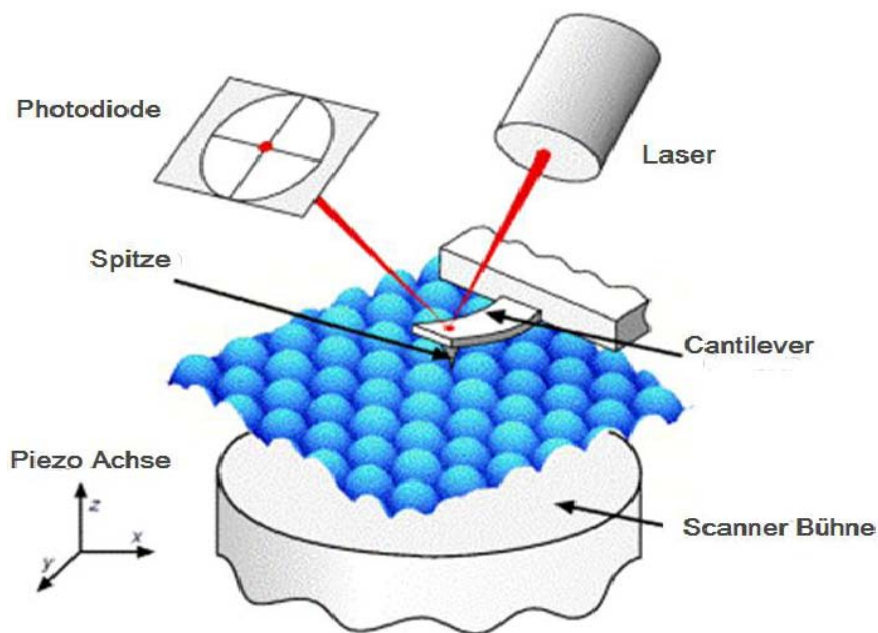


Abb. 17: Schematische Darstellung der AF-Mikroskopie

6. Messtechnik und Instrumentation

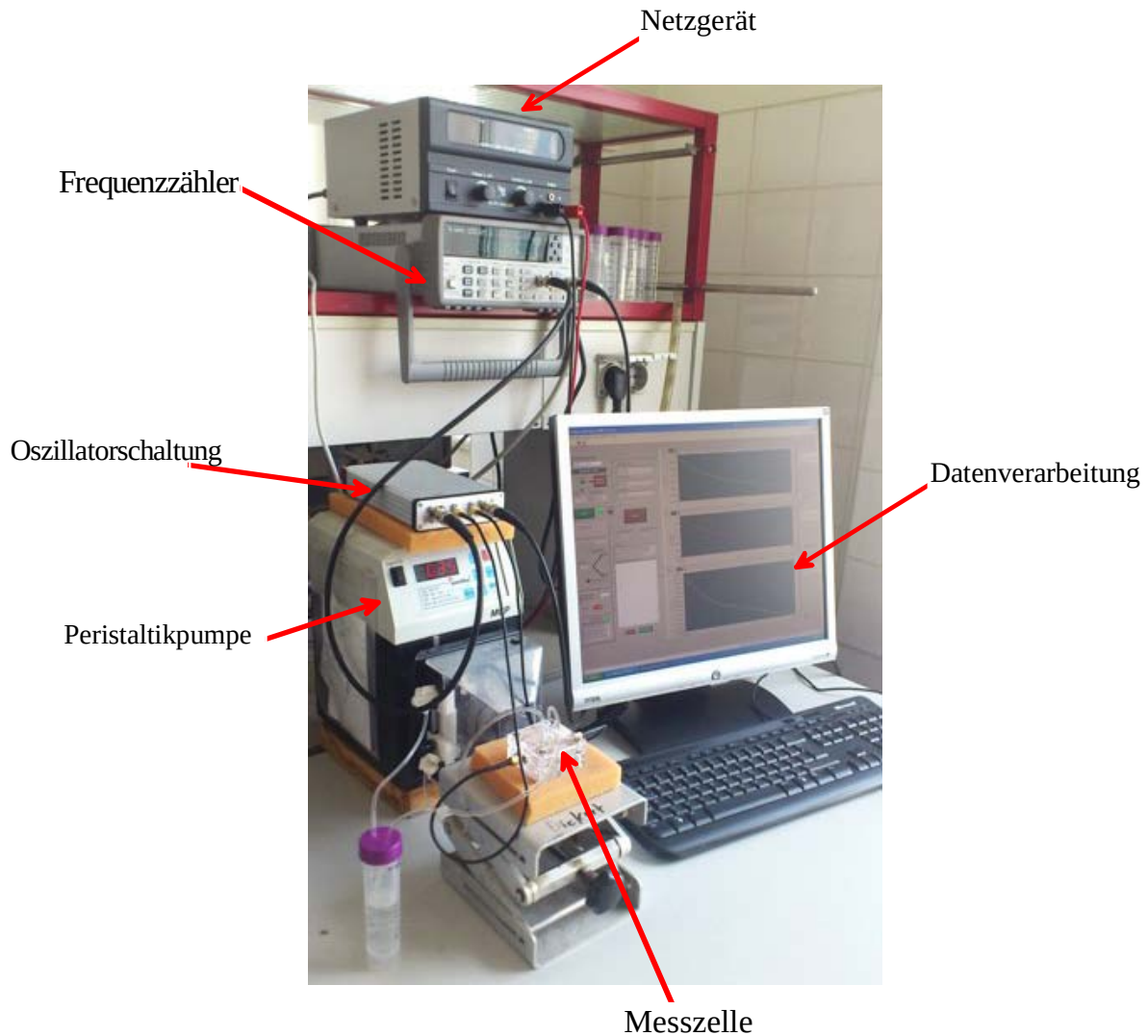


Abb. 18: Die Messanordnung für die Messungen in der Flüssigphase

Die spezielle Messanordnung für die Messungen in der Flüssigphase mit massensensitiven Sensoren ist in der Abb. 18 zu sehen. Die Ozillatorschaltung ist in Verbindung mit der Messzelle und wird von einem Netzgerät mit 12V Gleichstrom versorgt. Das Signal der Quarze wird mittels Frequenzzähler an den Computer transferiert. Mithilfe einer in der Arbeitsgruppe selbst entwickelte Software (auf der Basis von Lab View) wird der Frequenzverlauf "on-line" aufgezeichnet. Eine Peristaltikpumpe liefert einen konstanten Fluss der Analytlösungen durch die Messzelle. Die Pumpe wird nicht angewendet, wenn nicht ausreichend Volumen an Analytlösung zur Verfügung steht. In dem Fall wird der Analyt direkt mit einer Pipette in die Zelle injiziert.

6.1. Netzwerkanalysator

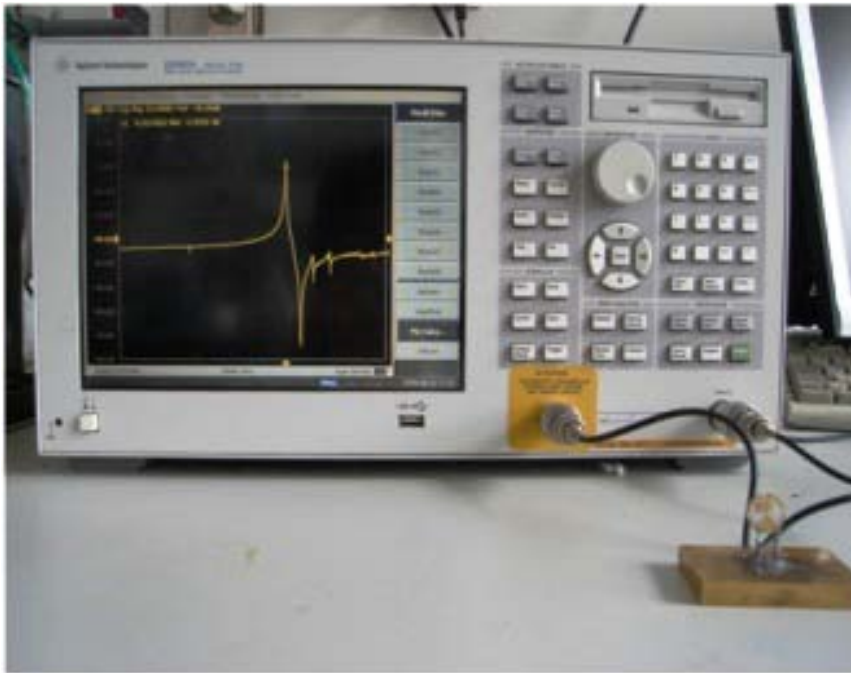


Abb. 19: Netzwerkanalysator Agilent Technologies E5062A: Auf dem Display ist das Dämpfungsspektrum eines 10MHz-QCMs zu sehen

Für die Dickenserschwinger-Resonatoren, gibt es auch wie bei generellen elektronischen Anwendungen zwei verschiedene Messprinzipien, sogenannte aktive und passive Messungen. Bei der passiven Messung kommt ein Netzwerkanalysator zum Einsatz (HP Agilent E5062A Technologies), der über einen Frequenzbereich von 300 kHz bis 3 MHz scannt und so das Dämpfungsspektrum und Phasenspektrum ermittelt. Im Dämpfungsspektrum sieht man auf dem Display ein Dämpfungsminimum (serielle Resonanz) und ein Dämpfungsmaximum (parallele Resonanz) für einen 10 MHz-Schwingquarz im Frequenzbereich um 10 MHz, sowie mitunter einige Nebenresonanzen, die auf antisymmetrische und Twist-Schwingungen zurückzuführen sind. Die Dämpfungsskala ist eine logarithmische Skalierung, die in der Elektrotechnik üblich ist:

dB = 20 x log [U_{out} / U_{in}] , wobei U_{out} und U_{in} die Spannung des Aus- bzw. Eingangssignals darstellt.

Die Resonanzfrequenz des QCM-Sensors wurde mittels Netzwerkanalysators (siehe Abb. 19) festgestellt. Dieses Gerät kann auch verwendet werden, um die Frequenzverschiebungen und Änderungen im Dämpfungsverhalten des Sensors bei Massenbeladung zu verfolgen. Diese Eigenschaft wird vor allem zur Abschätzung der

Schichtdicke von auf den Quarz aufgetragenen Polymerfilmen genutzt. Ein Vorteil der passiven Messung gegenüber der aktiven Messung ist die universellere Anwendung, auch dann wenn ein Oszillator nicht schwingt. Der Nachteil ist ein hohes systemimmanentes Rauschen bei hohen Dämpfungen.

6.2. Oszillatorschaltung

Zum Aufzeichnen der Frequenz während einer Messung kommt eine

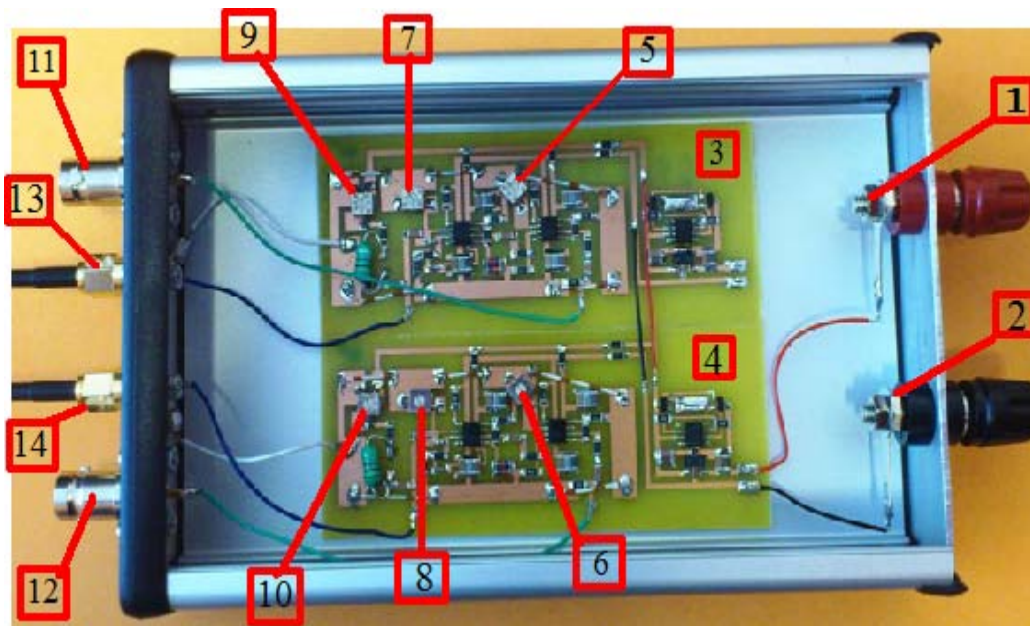


Abb. 20: Aluminiumgehäuse mit zwei getrennten Verstärkerschaltungen(Oszillatoren) für Referenz- und Messkanal: (1) und (2) Eingang für die Stromversorgung; (11) Ausgang zum Frequenzzähler –Kanal A; (12) Ausgang zum Frequenzzähler-Kanal B; (13) Eingang zum QCM-Kanal A; (14) Eingang zum QCM-Kanal B; (3) und (4) Spannungsregler; (9) Phasenregelung-Kanal A; (10) Phasenregelung-Kanal B; (7) Frequenzregelung-Kanal A; (8) Frequenzregelung-Kanal B; (5) Verstärkungsregelung-Kanal A; (6) Verstärkungsregelung-Kanal-B

Oszillatorschaltung (Abb. 20) zum Einsatz. Diese wurde für den Eigengebrauch in unserer Arbeitsgruppe mit einer Leiterplatten-Auflösung in Eigenregie hergestellt. Für die Herstellung werden die entsprechenden Schaltungsentwürfe auf eine Transparentfolie spiegelverkehrt ausgedruckt, auf den UV-Belichtungstisch aufgeklebt. Die Kupfer-Platine mit positiver Photolackschicht wird für fünf Minuten bestrahlt und in einer 10% NaOH-Lösung entwickelt. Anschließend wird die gewaschene Kupfer-Platine zum Ätzen der Leiterbahnen in ein 50°C warmes Bad mit einer 25% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ -Lösung gelegt und mit Luft umströmt. Dann wird die fertige Platine mit Wasser und Aceton gereinigt und mit Lötlack, welcher das Kupfer vor Oxidation schützt, besprüht.

Die Bauteile der Schaltung werden in „surface mounted device“-Bauweise aufgelötet. Die Platine mit der Elektronik wird in ein Aluminiumgehäuse eingebracht, um sie vor äußeren mechanischen Einflüssen zu schützen.

6.3. Messzelle

Für das Messen in der Flüssigphase wird eine selbstentwickelte Messzelle, die aus einer Kombination aus Silikon (Innengehäuse) und Plexiglas (Außengehäuse) besteht,

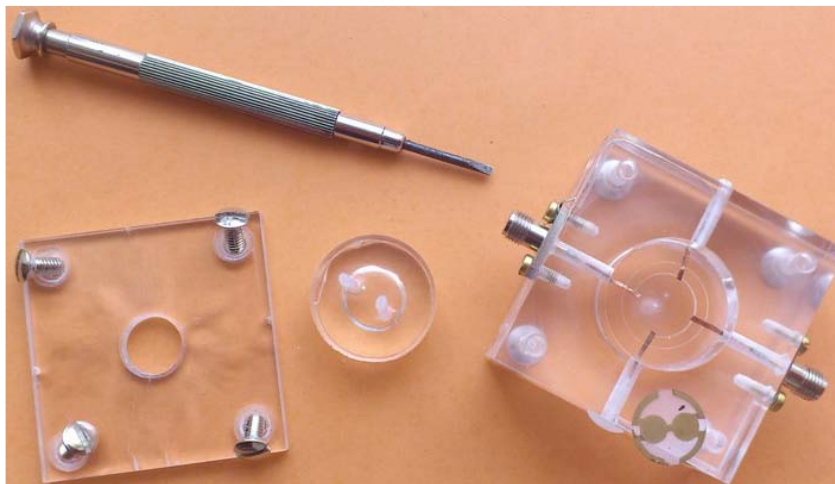


Abb. 21: Die bei Flüssigphasenmessungen verwendete Messzelle

verwendet. Ein Bild der verwendeten Messzelle ist in der Abb. 21 zu sehen. Die verwendeten Materialien müssen einfache Bearbeitung der Materialien bei der Herstellung, mechanische Robustheit sowie gute thermische Isolation aufweisen.

Die Innengehäuse werden mittels Gussverfahren hergestellt. Das SYLGARD® 184 Silikonelastomer Kit wird mit dem beiliegenden Starterreagens 1:10 vermischt. Anschließend wird das Gemisch zur Entfernung der Luftblasen für eine Stunde im Exsikkator entgast. Dann wird diese viskose Silikonmasse für das Gießen des Innengehäuses verwendet und 48 Stunden aushärten^[61] gelassen. Die Gussformen für die Silikonteile (PDMS) der Messzelle sind in der Abb. 22 veranschaulicht.



Abb. 22: Gussformen für die Silikonteile (PDMS) der Messzelle

6.4. Messprogramm

Die verwendete Software ist Lab View (siehe Abb. 23), die für die Datenerfassung und Visualisierung auf unsere Bedürfnisse angepasst wurde. Das Messprogramm zeigt gleichzeitig beide eingeschalteten Messkanäle, die den beiden Frequenzsignalen der mit Polymerfilm beschichteten Goldelektroden des QCMs (Messelektrode und

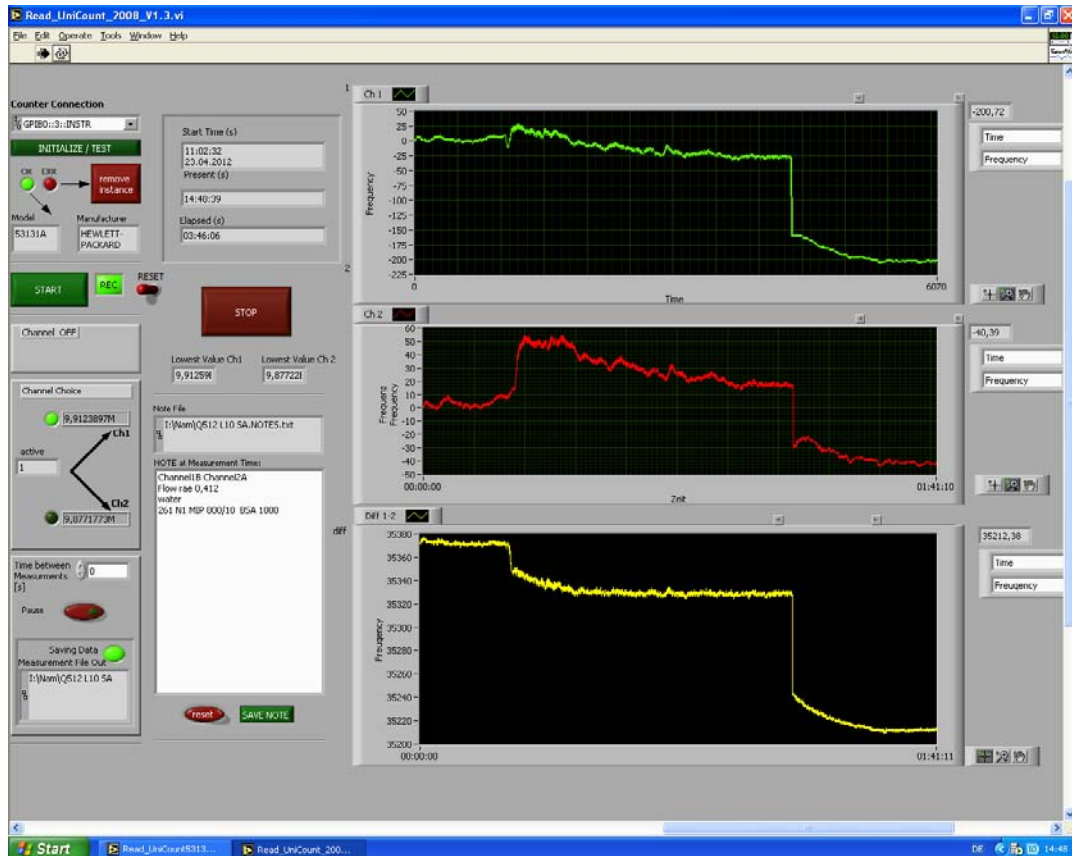


Abb. 23: Messprogramm für die Verfolgung von Frequenzänderung des QCMs

Referenzelektrode) entsprechen. In dem Programmfenster werden drei Frequenzänderungen abgebildet: Frequenzänderung an der Messelektrode, Frequenzänderung an der Referenzelektrode und die Differenz der beiden Kanäle.

7. Experimenteller Teil

7.1. Untersuchungen an Hefesensor

Das breite Anwendungsspektrum der Hefen in der Biotechnologie, Medizin und Lebensmitteltechnologie steigert das Interesse an Untersuchungen dieser Zellen. Allein anhand der weltweit produzierten Menge lässt sich die Bedeutung von Hefe erahnen: pro Jahr werden mehrere Millionen Tonnen Hefe gewonnen, wobei davon ca. 2 Millionen Tonnen jährlich auf die wichtige *Saccharomyces cerevisiae* entfallen. Die Bedeutung der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) hat in der Pharmaindustrie stark zugenommen, da ihr Genom bereits als erstes der Eukaryoten komplett sequenziert wurde. So konnten gezielt genetische Modifizierungen erfolgen. Die geringe Verdopplungszeit von ca. 90 Minuten ist zusätzlich vorteilhaft bezüglich der Bedeutung von *S. cerevisiae* zur Produktion von Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren sowie Polysacchariden.

Bei den Untersuchungen wurde ein Hefesensor mit speziellen Aspekten untersucht, um weitere Informationen über Eigenschaften und Verhalten der Hefezellen zu erhalten. Das Hauptziel war die Untersuchung des Mechanismus der Inklusion in Abhängigkeit der Schichtdicke des Polymers, sowie der Form der Templatzellen. Dafür wurden Messungen mit unterschiedlichen ausgewählten Dicken der sensitiven Schichten durchgeführt. So werden enthalpische Effekte der Inklusion analysiert.

7.1.1. Hefezellen

In der Molekularbiologie wird als Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*^{[62][63]}, der zu den am besten beschriebenen Hefestämmen gehört, verwendet. Hefen^[64] sind einzellige Pilze, die zu den eukaryotischen Mikroorganismen der Abteilung Ascomycota (Sprosshefen) und zur Klasse Saccharomycetes (zuckerabbauende Pilze) gehören und sich durch Sprossung oder Teilung vermehren. Als niedere Eukaryoten verfügen Hefezellen über vergleichbare Mechanismen für zelluläre Grundfunktionen wie höhere Eukaryoten.

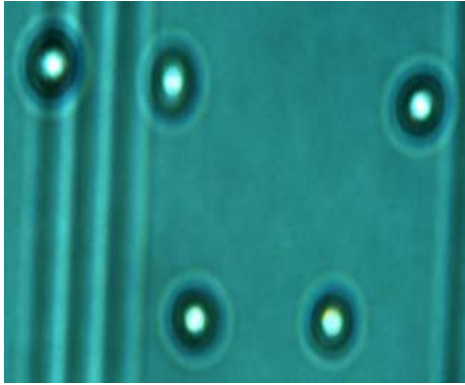


Abb. 24: Einzellige Hefe, unter dem Auflichtmikroskop: 100fache Vergrößerung

Kohlenhydrate betreiben können. Entsprechend dem Pasteur Effekt, der im Jahr 1873 von Louis Pasteur erkannt wurde, wird die Gärung in Gegenwart von Sauerstoff gehemmt, während gleichzeitig das Hefewachstum zunimmt. Der biochemische Abbau von Kohlenhydraten läuft über mehrere Zwischenschritte durch Glykolyse von der Glucose zum Pyruvat. Im nächsten Schritt kann entweder die Atmung (bei Sauerstoffanwesenheit) oder die Gärung (bei Sauerstoffabwesenheit) einsetzen. Bei der Gärung wird das Pyruvat, wie in der *Tabelle 1* beschrieben, zu Ethanol und Kohlendioxid

In der *Abb. 24* ist ein Bild von einzelligen Hefezellen und in der *Abb. 25* von mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen (Doppelzellen), die mit Auflichtmikroskop aufgenommen worden sind, zu sehen. Die Zellen haben eine Größe von ca. 5-6 µm. Die Hefezellen sind fakultativ anaerob, das bedeutet, dass sie sowohl bei Sauerstoffanwesenheit als auch bei Abwesenheit von Sauerstoff Katabolismus der

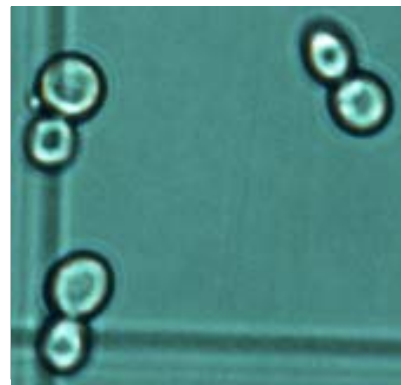
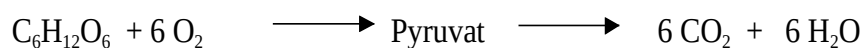


Abb. 25 : Doppelzellige Hefe, synchronisiert mit *N*-Hydroxyharnstoff, unter dem Auflichtmikroskop: 100fache Vergrößerung

1. Bei Sauerstoffanwesenheit : Atmung:



2. Bei Sauerstoffabwesenheit : Gärung:



Tabelle 1: Atmung und Gärung beim Katabolismus der Kohlenhydrate

zersetzt. Unter aeroben Bedingungen gelangt das Pyruvat ins Mitochondrium, wo es

zunächst zum Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgesetzt und anschließend in den Citratcyclus eingeschleust wird (siehe *Tabelle 1*). Für die vorliegende Arbeit sind der Vermehrungsprozess und die Aufbau der Zellenwand von Hefezellen von Interesse.

Die Zellen wachsen und teilen sich permanent, solange genügend Nahrung vorhanden ist. Die Vermehrung der Hefezellen erfolgt sowohl vegetativ, das heißt asexuell durch Sprossung (Knospung), als auch geschlechtlich bzw. sexuell über Bildung eines Ascus mit haploiden Ascosporen^{[65][66][67]}.

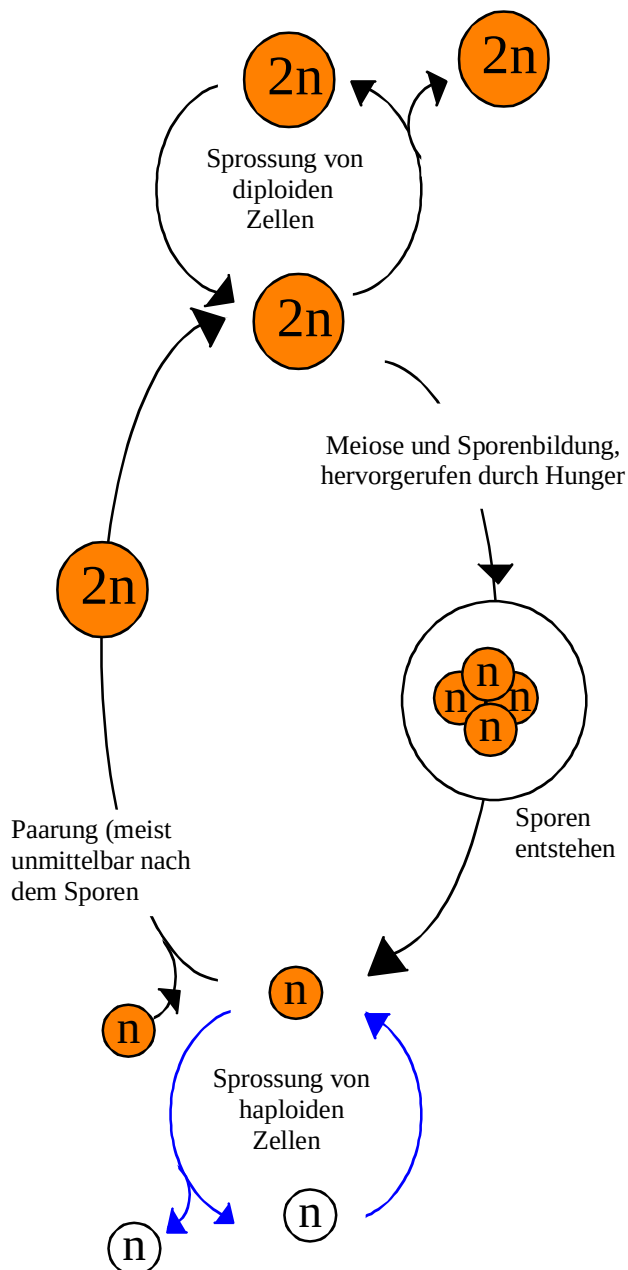


Abb. 26: Haploider und diploider Lebenszyklus von einer Sprosshefe

Abhängig von Umweltbedingungen und Einzelheiten des Genotyps können Zellen dieser Spezies im haploiden Zustand mit einem einfachen Chromosomensatz oder im diploiden Zustand mit einem doppelten Chromosomensatz vorkommen^{[68][69]} (Abb. 26).

Die diploide Zelle kann sich entweder durch gewöhnliche Zellteilungszyklen vermehren oder die Meiose durchlaufen, um haploide Formen zu erzeugen. Die haploide Zelle kann sich gleichfalls durch Zellteilungszyklen vermehren, oder sie verschmilzt sexuell mit einer anderen haploiden Zelle, wodurch wieder eine diploide

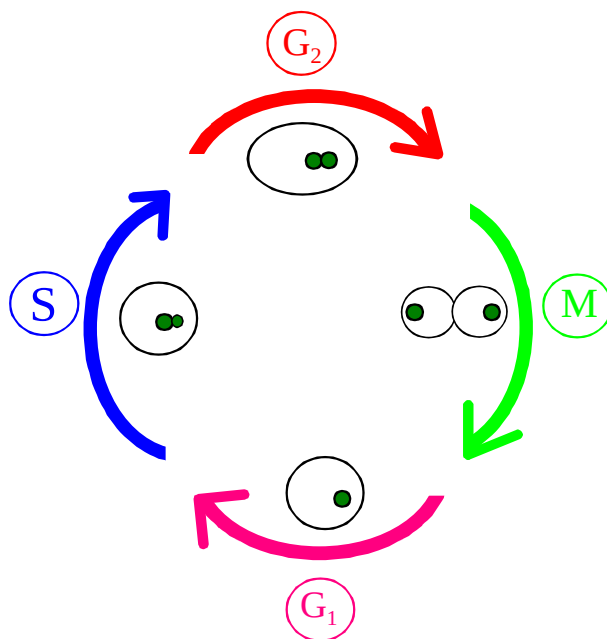


Abb. 27: Vier aufeinander folgende Phasen beim eukaryotischen Zellzyklus: Dieser Zyklus entspricht im Allgemeinen auch dem den verwendeten *Saccharomyces Cerevisiae*. S-Phase: DNA-Replikation, G₁: Lücke zwischen M-Phase und S-Phase, G₂: Lücke zwischen S-Phase und M-Phase, M-Phase: Mitose und Cytokinese

Zelle entsteht. Meiose wird unter Hungerbedingungen ausgelöst und lässt Sporen entstehen. Sporen sind haploide Zellen, die sich in einem Ruhestand befinden und widerstandsfähig gegen ungünstige Milieubedingungen sind. Der Fortpflanzungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Abb. 26 schematisch dargestellt. Ein Teilungszyklus der Zellen läuft, in voneinander unterscheidbaren, aufeinanderfolgenden Schritten ab: G₁, S, G₂ und M. In der Abb. 27 ist der eukaryotische Zellzyklus schematisch dargestellt. Die meisten Zellen benötigen viel mehr Zeit für Wachstum und Verdopplung ihrer Proteine und Organelle als für DNA-Replikation und Teilung. Um den Zeitbedarf für Wachstum zu decken, sind in den meisten Zellzyklen zusätzliche Lücken eingeschoben, nämlich G- oder Gap-Phasen (engl:

gap=Lücke): eine G_1 -Phase zwischen M-Phase und S-Phase sowie eine G_2 -Phase zwischen S-Phase und Mitose. G_1 , S und G_2 stellen gemeinsam eine Phase dar, die als Interphase bezeichnet wird. Die Interphase würde 23 Stunden eines 24-Stunden-Zellzyklus einnehmen, während für die M-Phase eine Stunde bleibt. In der G_1 -Phase sind die Rezeptoren an der Oberfläche der Außenmembran in Kontakt mit der Umgebung und bei ausreichendem Nahrungsangebot wird das Signal für die Zellvermehrung ins Innere weitergeleitet. In der S-Phase (Synthese-Phase) wird die in den Chromosomen gespeicherte DNA verdoppelt. In der G_2 -Phase werden die noch außenstehende Organelle und Proteine synthetisiert und gleichzeitig tritt die Zelle in Kontakt mit der Umgebung, um die letzte Phase einzuleiten. In der M-Phase (Mitose-Phase) findet die eigentliche, makroskopisch sichtbare Abkapselung der neuen Zelle statt.

Für die Untersuchungen wurden die Hefezellen, die sich in der M-Phase (doppelzellig) befinden, verwendet. Dafür werden die Hefezellen in die M-Phase geeignet synchronisiert. Zwei verschiedene Inhibitoren eignen sich für die Synchronisierung der Hefezellen, wobei diese an verschiedenen Blockierungsstellen arretieren. In der Abb. 28 sind die zwei Blockierungsstellen schematisch dargestellt.

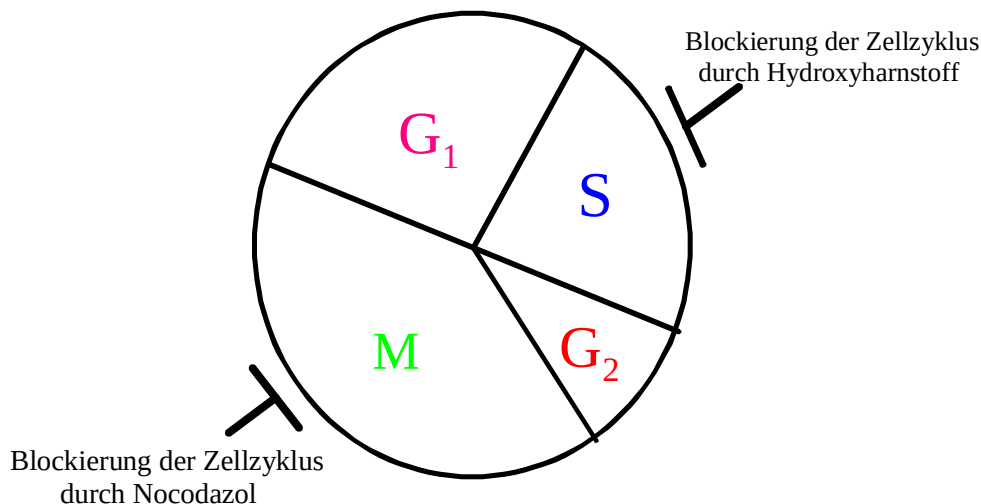


Abb. 28: Blockierungsstellen für Inhibitoren bei der Zellzyklus der Hefezellen

Die eine ist *N*-Hydroxyharnstoff, welche Inhibitor von Enzym Ribonukleotid Reduktase ist und den Zellzyklus in S-Phase blockiert. Dadurch ist das Wachsen der Hefezellen möglich aber die DNA-Replikation wird verhindert. Durch Einwirkung von Nocodazol wird der Zellzyklus in der M-Phase blockiert, bevor die Zellteilung

abgeschlossen werden kann. Nocodazol verhindert den Aufbau und die Polymerisation der Mikrotubuli und dadurch auch des Ausrichten und Trennen der Chromosomen während der Mitose. Beide Methoden sind reversibel, jedoch ist die Ausbeute an synchronisierten Hefezellen bei der Verwendung von *N*-Hydroxyharnstoff gegenüber Nocodazol mit 95% aller Hefezellen viel höher. Die niedrige Ausbeute liegt bei etwa 60% aller Zellen bei der Blockierung des Zellzyklus mit Nocodazol.

Die Zellwand^[70] der für die Untersuchungen verwendeten Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) besteht aus einem komplexen Netzwerk an Zuckerpolymeren und umschließt die eigentliche Zelle wie eine Schale. Diese Schale ist sehr robust und bringt der Zelle eine hohe mechanische Stabilität. Bausteine der Zellwand von Hefezellen sind hauptsächlich drei Arten von Zuckern, nämlich Glucose (Ketten aus β -1,6- und β -1,3-Bindungen), Mannose und *N*-Acetylglucoseamin (Ketten aus β -1,4-Bindungen), die kovalent miteinander verbunden sind (siehe Abb. 29). Die Glucane sind verantwortlich für die Struktur der Zellen und die Mannoproteine kontrollieren die Durchlässigkeit der Wand. Die hydrophile Oberfläche der Hefezellen begünstigen das Erzeugen der Kavitäten für einen Sensor durch die Wechselwirkungen zwischen hydrophile Polymer (in dem Fall Polyurethan) und den Zellen.

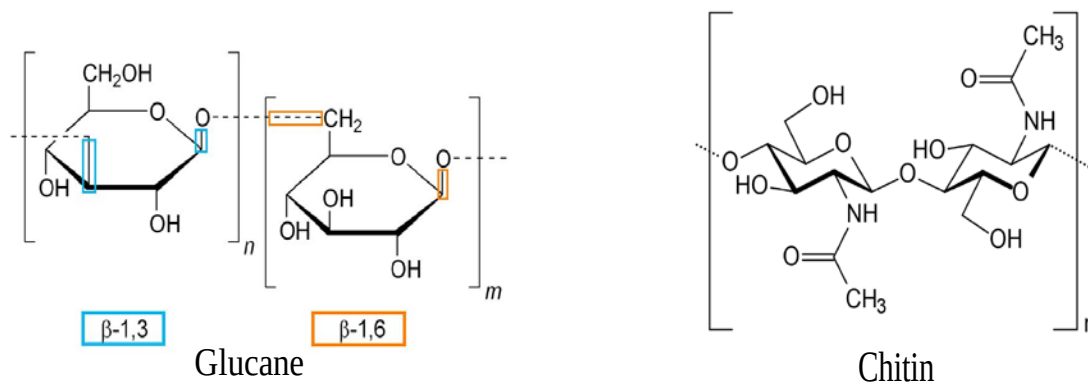


Abb. 29: Die Hauptbestandteile der Zellwand von Hefezellen: Glucan-Ketten aus β -1,3- und β -1,6-Bindungen und Chitin-Ketten aus *N*-Acetylglucoseamin (β -1,4-Bindung)

7.1.2. Bestimmung der Zellzahlen bzw. Zellkonzentration

Zur quantitative Bestimmung von Zellzahlen und somit des Wachstums der Hefezellen bzw. der Bakterien werden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer^[71] (Abb. 30) ausgezählt. Es handelt sich hierbei um ein Präzisionsgerät aus optischem Spezialglas, das ca. 30x80 mm groß und 5 mm dick ist, mit eingetragenen Quadraten von definiertem Volumen (1 μl). Dieses ermöglicht die Bestimmung der Teilchenzahl pro

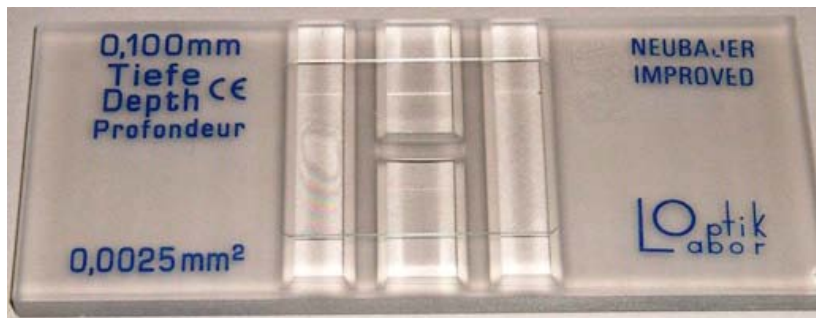


Abb. 30: Neubauer Zellkammer

Volumeneinheit einer Flüssigkeit. Das Zählgitter hat 3x3 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge und somit eine Fläche von je 1 mm^2 . Das zentrale Großquadrat bei der Neubauer improved-Zählkammer teilt sich in 5x5 kleineren Gruppenquadraten mit je 0,2 mm Kantenlänge. Damit ist die Fläche eines Gruppenquadrats 0,04 mm^2 . Die Höhe der Kammer wird durch ein Deckglas festgelegt (0,1 mm). Durch Kapillarkräfte wird die am Glasrand aufpipettierte Zellsuspension ins Innere der Kammer transportiert. Dadurch füllt sich der Spalt zwischen dem Deckglas und Kammerboden. Die einzelnen Zellen innerhalb des 5x5 -Gitters können dann gezählt werden. Dann wird die Konzentration (Zellen/ μl) mit Hilfe einer Formel (Gleichung 4) berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl der ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen pro } \mu\text{l}$$

Gleichung 4: Bestimmung der Zellkonzentration

7.1.3. Erzeugung der Hefeimprints

Die verwendete Hefe wird in Form üblicher Backhefe im Lebensmittelgeschäft als komprimierter Würfel mit 70% Feuchtigkeit gekauft. Die Imprints wurden alle mit synchronisierten Hefezellen (Doppelzellen) erzeugt. Zur Synchronisation der Zellen



Abb. 32: 3D-AFM-Aufnahme eines Templat mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen (Doppelzellen).

werden 250 mg Hefe in destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Zentrifuge dreimal für zehn Minuten bei 4400 rpm zentrifugiert. Anschließend wird die mit Wasser gewaschene Hefe in ein YPD (Yeast Extract/ Peptone Hydrolysate/ Dextrose) Nährmedium (100 ml) überführt und die Lösung zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach sind 760 mg N-Hydroxyharnstoff zugesetzt. Nach circa fünf Stunden lassen sich die Hefezellen abzentrifugieren und anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Diese Hefesuspension enthält etwa 95% synchronisierte Hefezellen. Die auf diese Weise erhaltenen Hefezellen werden mittels eines Spatels auf Silikonplättchen mit der Dimension 1 x 1 cm aufgetragen. In der Abb. 32 ist ein Silikonstempel mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen (Doppelzellen) zu sehen. In der Abb. 31 ist das Profilbild des Templat, das zum Abmessen der Zellen dient, dargestellt. Die Hefezellen haben einen Durchmesser von ca. 6 μm und eine Höhe von 2 μm. Da beim Trockenvorgang Risse in aufgetragenem Hefefilm entstehen können, ist darauf zu achten, dass im Hefekonzentrat eine gewisse Restfeuchte verbleibt. Das Prägen mit Hefezellen erfolgt mittels Stempelprägetechnik. Der Silikonstempel mit synchronisierten Hefezellen

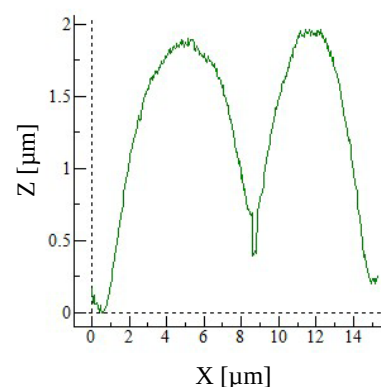


Abb. 31: Das Profilbild des Templat mit synchronisierten Hefezellen (Doppelzellen); Die Zellen sind etwa 6 μm Groß und 2 μm Hoch

(Doppelzellen) wird in das noch weiche Polymer exakt auf nur eine Elektrode (auf

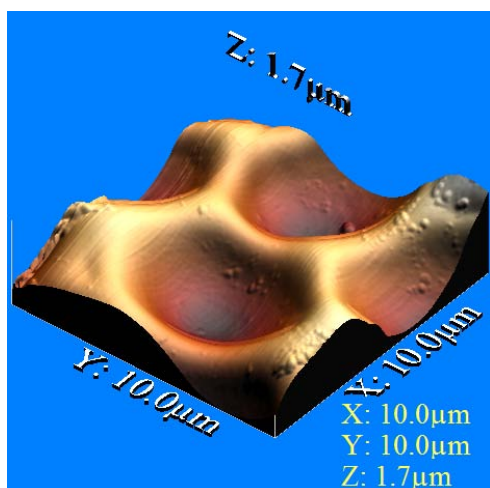


Abb. 33: Durch das Prägen mit der synchronisierten Hefezellen (Doppelzellen) entstandene Kavitäten im Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI)

jene der niedrigeren Frequenz) gepresst und mit einer Klammer fixiert. Die andere Elektrode bleibt dabei ungeprägt und dient als Referenzelektrode bei der Messung. Nachdem das Polymer vollständig ausgehärtet ist (etwa ein bis zwei Tage) wird der Stempel mit Hilfe von 0,05%iger SDS-Lösung abgelöst. Auf diese Weise bleiben in der Polyurethan-Schicht Kavitäten zurück, die in Größe und Form den synchronisierten Hefezellen (Dop-

pelzellen) entsprechen. Eine 3D-Aufnahme der entstandenen Hohlräume (Imprints) ist in der Abb. 33 zu sehen. Die Größe (ca. 5 µm) und Form der Kavitäten entsprechen der Größe und der Form der synchronisierten Hefezellen (Doppelzellen).

Die Zusammensetzung des Polymers muss entsprechend dem jeweiligen Analyten

Monomer	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage
Phloroglucin	126,11	12mg
Bisphenol A (BPA)	228,28	47,8mg
4,4`-MDI	250,26	40,2mg

Tabelle 2: Polyurethan Polymer-Zusammensetzung für den Hefesensor

verändert werden, da die Eigenschaften des Polymers, wie z.B. Schichtdicke, Porosität, Stabilität, bei der Erzeugung der Kavitäten entscheidend sind. Die entsprechende Polymer-Zusammensetzung für den Hefesensor ist in der *Tabelle 2* beschrieben. Dieses Gemisch an Vorpolymer lässt sich durch Verdünnen mit THF (Tetrahydrofuran) an die gewünschte Schichtdicke anpassen.

7.1.4. Messergebnisse

Eine Reihe von Messungen mit unterschiedlichen Schichtdicken der sensitiven Schicht des Sensors wurden durchgeführt und die Messergebnisse präsentiert.

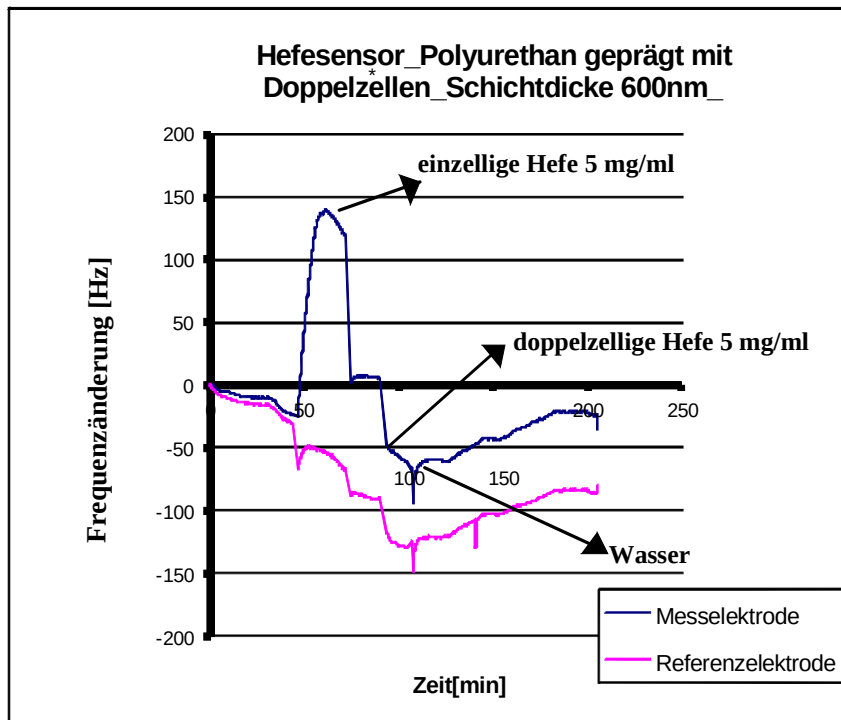


Abb. 34: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 600 nm, Templat: Doppelzellen (mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen); Messung: Zugabe der Hefesuspension (5mg/ml) der einzelligen Hefe, dann Zwischenspülen der Messzelle mit destilliertem Wasser, anschließend Zugabe der Hefesuspension (5mg/ml) der synchronisierten Hefe (Doppelzellen), schließlich nochmals Spülen mit destilliertem Wasser; Ergebnis: für beide Zellarten unselektive Wechselwirkungen mit der Oberfläche des Sensors

Die Variation eines geprägten Polymerfilms führt bei der Messung von synchronisierten Hefezellen, je nach Schichtdicke des Films, zu einem Sauerbrey- oder Anti-Sauerbrey- Effekt. Dieses Phänomen lässt sich durch die Imprinttiefe steuern. Der Einfluss der Dicke der Schicht auf die Tiefe des Imprints soll mit diesen Messungen gezeigt werden. Die erhaltenen Messergebnisse haben ergeben, dass für das reversible Ein- und Auslagern der Hefezellen eine optimale Schichtdicke erforderlich ist. Der Grund ist die veränderte Wechselwirkungsfläche zwischen Analyt und Rezeptor. Je

Größer der Kontakt zu den Zellen ist, desto stärker sind die Wechselwirkungen und dadurch erfolgt eine zunehmende Bindung an die Sensorschicht.

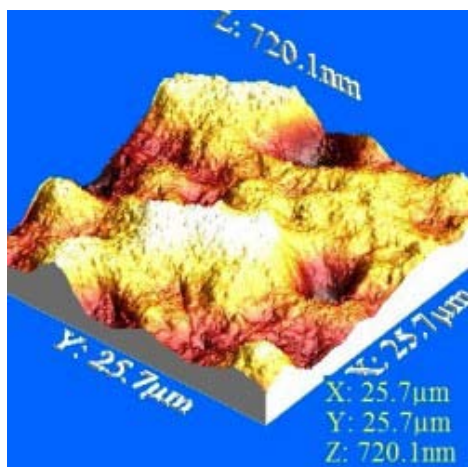


Abb. 35: 3D-AFM Aufnahme der Oberfläche des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen(synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymerfilms: 600 nm; keine signifikante Abdrücke der Hefezellen sind zu sehen.

Die Versuche wurden mit einer Polymerschichtdicke von 600 nm begonnen (Abb. 34). Aufgrund der Größe der Zellen relativ zur Schichtdicke ließen sich keine signifikanten Abdrücke der Hefezellen erzeugen. Es hat sich herausgestellt, dass die Hefezellen zu groß (ca. 5 µm) sind, um in so einer dünnen Schicht wesentliche Imprints zu erzeugen. Für die Messung wird nach dem Einschwingen des Quarzes in Wasser jeweils Hefesuspensionen mit einer Konzentration von 5 mg/ml in die Messzelle gepumpt. Nach jeder Zugabe der Messlösungen wird die Messzelle mit

destilliertem Wasser durchgespült. Da der Analyt, also Hefe, in praktisch unbegrenztem Ausmaß zur Verfügung steht, werden die Messlösungen ausschließlich mittels Pumpe und nicht mit volumensparender Spritze in die Messzelle injiziert.

Der Messeffekt für 5 mg/ml Einzelzellen ist ein Anti-Sauerbrey-Verhalten mit einer eindeutigen Frequenzerhöhung von ca. 150 Hz. Die Sensorantwort auf Doppelzellen mit einer Konzentration von 5 mg/ml liefert dagegen ein Sauerbrey-Verhalten mit einer Frequenzerniedrigung von ca. 50 Hz. Bei Doppelzellen kehrt die Frequenz jedoch durch das Spülen mit Wasser aufgrund der starken Wechselwirkungen mit der Oberfläche nicht wieder zurück zur Basislinie. In Abb. 35 ist eine 3D-AFM-Aufnahme der Oberfläche der geprägten Elektrode des Sensors zu sehen, wobei

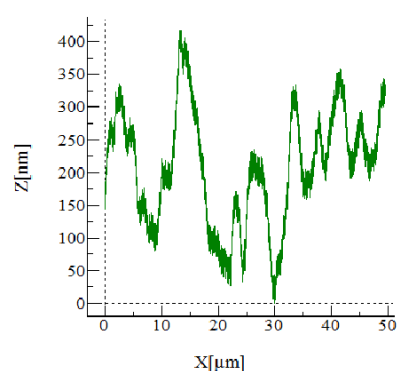


Abb. 36: Das Profilbild von 3D-AFM Aufnahme der Oberfläche des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymerfilms: 600 nm, Imprinttiefe: ca. 250 nm

keine signifikanten Abdrücke der Hefezellen erkennbar sind. In der Abb. 36 ist das Profil Bild dieser Aufnahme zu sehen, wobei eine Kavitätstiefe von 250 nm erkennbar ist.

Desweiteres wurde eine Messung mit einer Polymer-Schichtdicke von 650 nm durchgeführt, wobei auch hier die erzeugten Abdrücke in der sensitiven Schicht nicht signifikanter als bei der Schichtdicke 600nm sind. Jedoch ergeben sich wiederum bemerkenswerte Ergebnisse bei den QCM Messungen.

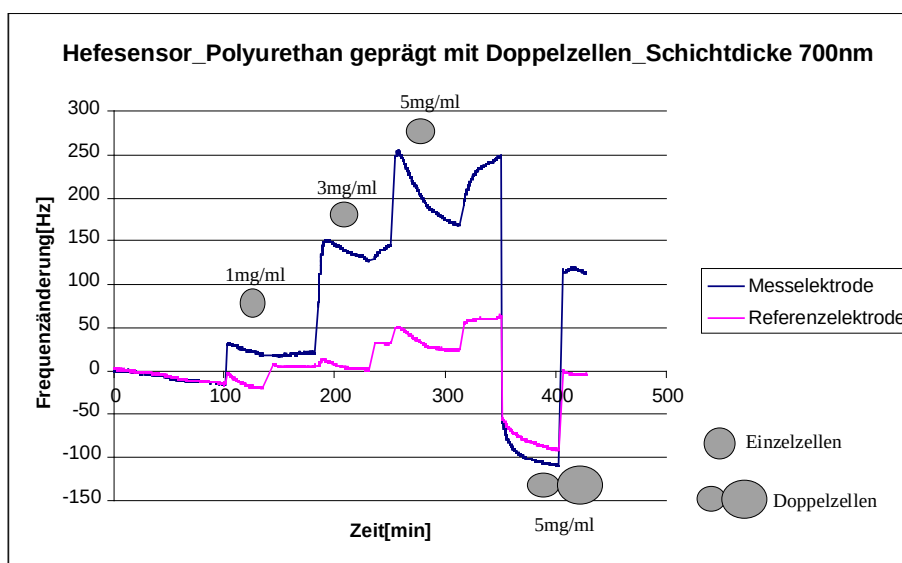


Abb. 37: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 700 nm, Templat: Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Ergebnis: Anti-Sauerbrey Effekt für Einzelzellen und Sauerbrey Effekt für synchronisierte Zellen (Doppelzellen), gemessen wurde ohne Durchspülen mit Wasser zwischen der Zugabe der Messlösungen.

Die zunächst gemessene Polymer-Schichtdicke ist eine Schichtdicke von 700 nm. In der Abb. 37 ist die dazu gehörige QCM Messung zu sehen. Für die Messung wird der mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) beschichtete und auf einer Elektrode mit den Doppelzellen (synchronisierten Hefezellen) geprägte Schwingquarz in die Messzelle eingebracht und ca. vier bis fünf Stunden mit destilliertem Wasser gespült. Nachdem die sensitive Schicht in Wasser eingeschwungen ist (Sättigung mit Wasser), wird eine stabile Frequenz und dadurch eine signifikante Grundlinie erreicht. Danach erfolgt die eigentliche Messung über die Zugabe der einzelligen Hefesuspensionen mit den Konzentrationen von 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5mg/ml und Hefesuspension mit Doppelzellen (synchronisierten Hefezellen) mit einer Konzentration von 5mg/ml.

Die Peristaltikpumpe sorgt für einen konstanten Fluss der Messlösung in die Messzelle. In diesem Fall ist die Flussgeschwindigkeit 2 ml/min. Die Messzelle wurde nicht mit Wasser zwischen den Zugaben der Hefesuspensionen gespült. Einzelligen Hefesuspensionen liefern Anti-Sauerbrey- und die Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen) ein Sauerbrey-Verhalten. Da die einzelnen Zellen bei dieser dünnen Schicht nicht durch die Kavitäten fixiert sind finden Bewegungsabläufe auf der Oberfläche statt, die eine Zunahme der Frequenz bedingen.

Aufgrund der Koagulation der Hefezellen bei höheren Konzentrationen ist bei einer Konzentration von 5 mg/ml der einzelligen Hefesuspension eine Abnahme der Frequenz gleich nach dem Frequenzanstieg zu beobachten. Im Gegensatz zu den Einzelzellen ist bei Doppelzellen aufgrund der stärkeren Wechselwirkungen durch

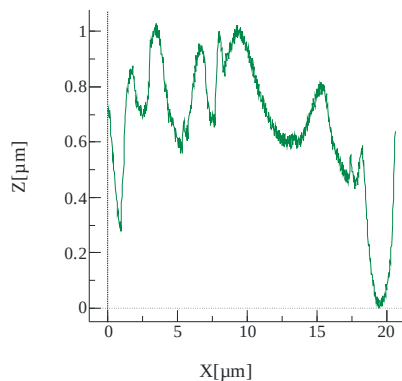


Abb. 38: Das Profilbild von AFM Aufnahme der Oberfläche des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymerfilms : 700 nm, Imprinttiefe: ca. 600 nm

Schichtdicke zu sehen, wobei die Kavitäten ca. 600 nm tief sind. Dieses wurde mit einer Sectionsanalyse (ein Messprogramm des AFM) vermessen und ist in der Abb. 40 dargestellt.

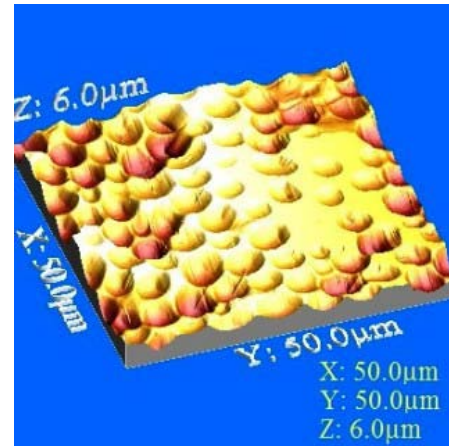


Abb. 39: 3D-AFM Aufnahme der Oberfläche des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymerfilms: 700 nm

eine optimale geometrische Adaption eine Frequenzabnahme zu sehen. Frequenzänderungen bei der nicht geprägten (kein Imprint) Referenzelektrode durch unspezifische Adsorption der Zellen können vernachlässigt werden. Die Abb. 39 zeigt die 3D-AFM-Aufnahme der Oberfläche der geprägten Elektrode des Sensors. Die Tiefe der Kavitäten wurden sowohl mittels Netzwerkanalysator als auch mit AFM Messungen festgestellt. In der Abb. 38 ist das Profilbild der 3D-AFM-Aufnahme der Oberfläche der geprägten Elektrode von 700 nm

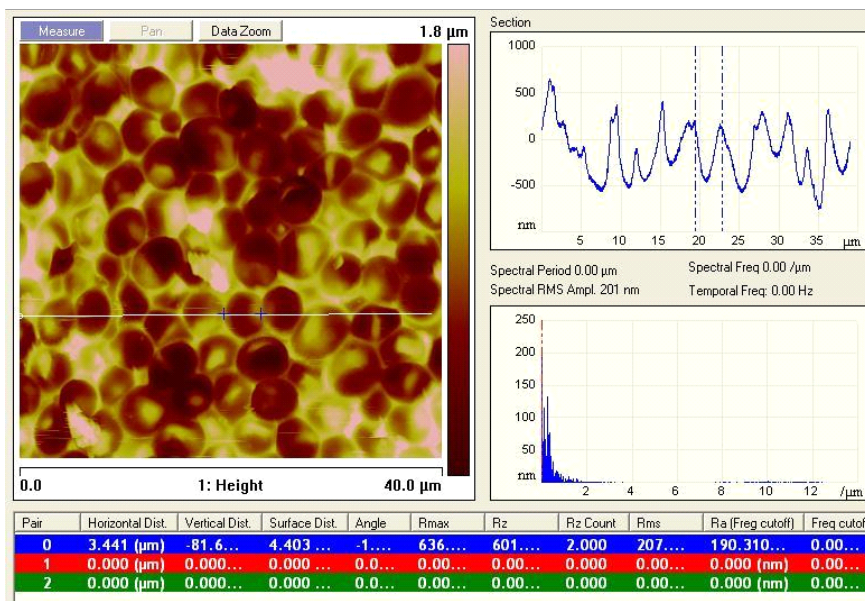


Abb. 40: Die Sectionanalyse von AFM Aufnahme der Oberfläche des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymerfilms: 700 nm, Imprinttiefe: ca. 600 nm

Derselbe Anti-Sauerbrey Effekt für die Einzelzellen ist auch bei einer sensitiven Schicht aus Polyurethan (geprägt mit Doppelzellen) mit einer Schichtdicke von 750 nm zu beobachten. Die dazu gehörige Messkurve ist in der *Abb. 41* zu sehen.

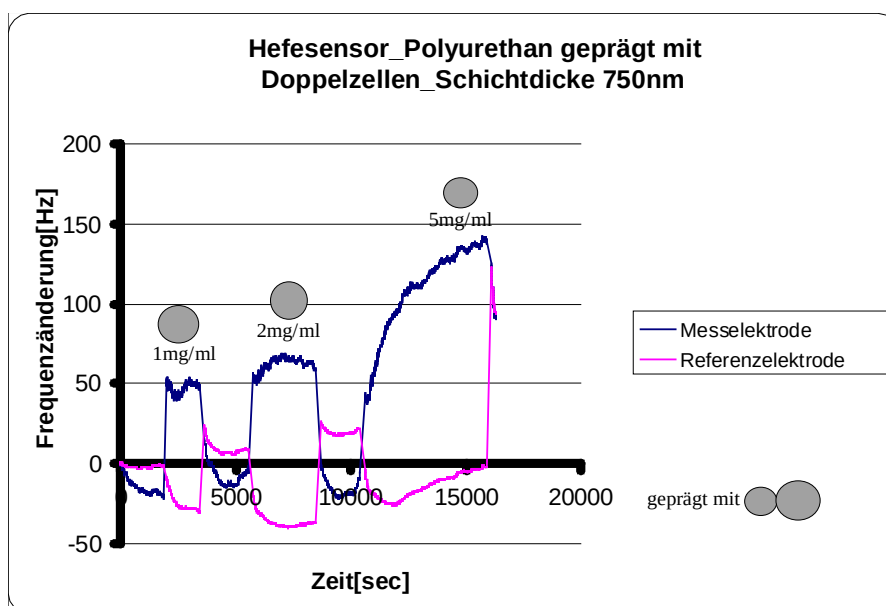


Abb. 41: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 750 nm, Templat: Doppelzellen (mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Ergebnis: Anti-Sauerbrey Effekt für Einzelzellen

Nach der Sättigung der sensitiven Schicht mit Wasser werden die Probelösungen vermessen. Zwischen jeder Zugabe der Hefesuspension wird die Messzelle mit Wasser gespült.

Die QCM Messung der zunächst gemessenen Schichtdicke von 900 nm ist in der Abb. 42 zu sehen. Hier wurde ein Sauerbrey-Effekt für Einzel- und Doppelzellen erhalten.

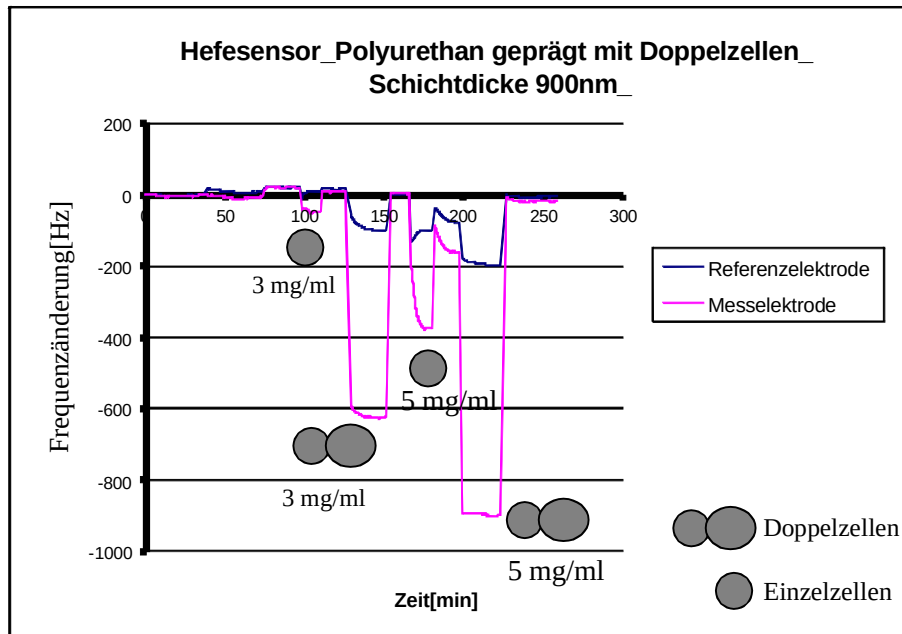


Abb. 42: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 900 nm, Templat: Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Sauerbrey-Effekt für Einzelzellen und Doppelzellen (synchronisierte Zellen)

Da das Templat aus Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen) hergestellt ist, passen die Doppelzellen besser in die Kavitäten ein und dadurch ist der Messeffekt für die jeweiligen Konzentrationen größer als jener mit Einzelzellen. Während der Messeffekt für 3 mg/ml Einzelzellen ca. 50 Hz ist, ist der Effekt für die gleiche Konzentration an Doppelzellen ca. 600 Hz. Die 3D-AFM-Aufnahme der Oberfläche der geprägten Elektrode des Sensors ist in der Abb. 44 zu sehen. Das Profilbild für den Sensor ist in der Abb. 43 veranschaulicht. Auch eine Sectionanalyse (Abb. 45) wurde durchgeführt und eine Kavitätstiefe von ca. 800 nm festgestellt.

Ein weitere Polymer-Schichtdicke, die für die Untersuchungen herangezogen wurde betrug 1 µm. Die entsprechende Messkurve der QCM Messung ist in der Abb. 46 zu sehen.

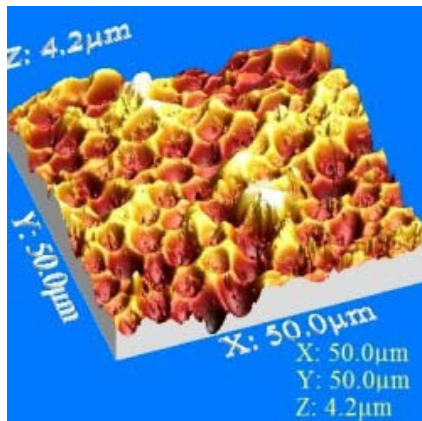


Abb. 44: 3D-AFM-Aufnahme der Oberfläche der geprägten Elektrode des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Polymerschichtdicke 900 nm

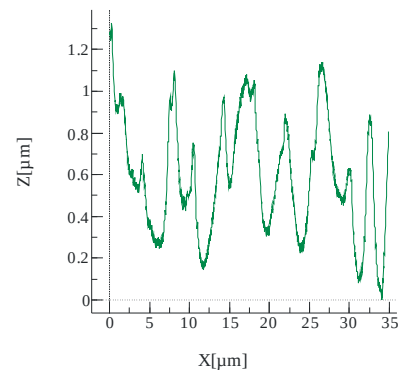


Abb. 43: Das Profilbild der AFM-Aufnahme des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Polymerschichtdicke 900 nm, Imprittiefe: 800 nm

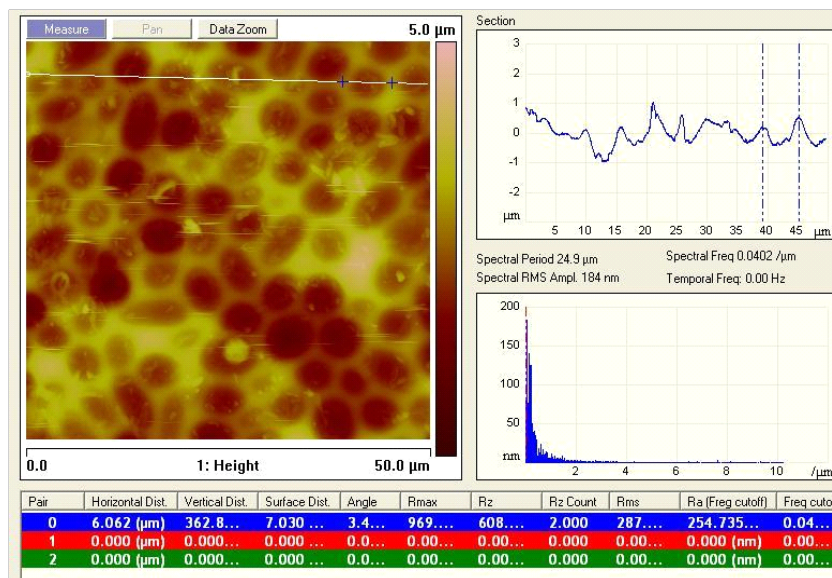


Abb. 45: Die Sectionanalyse von AFM-Aufnahme des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers 900nm, Imprittiefe: 800nm

Der Messeffekt für Einzel- und Doppelzellen folgt der Sauerbrey-Gleichung. Durch die höhere Polymer-Schichtdicke sind Geometrie, insbesondere Tiefe der erzeugten Kavitäten ausgeprägter. Dies ermöglicht eine bessere Adaption an die Kavitäten und dadurch das reversible Ein- und Auslagern der Zellen.

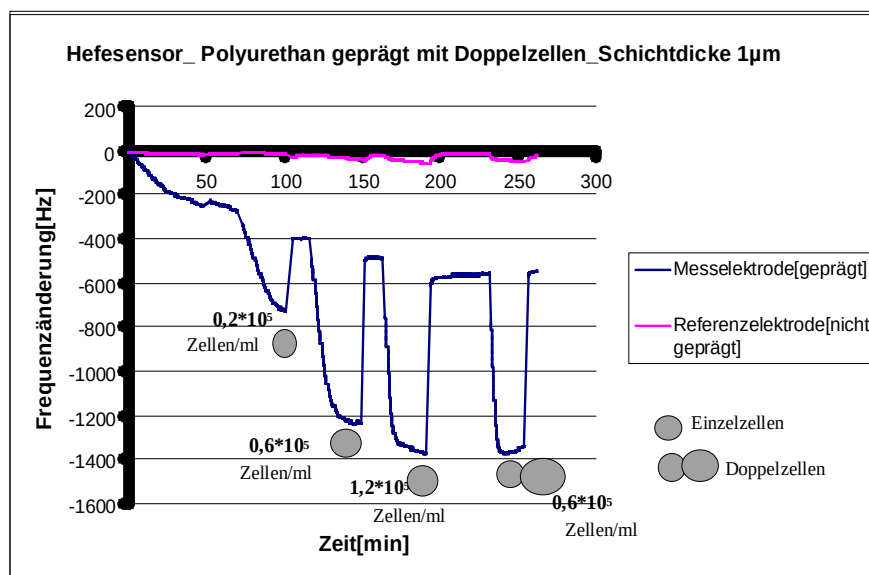


Abb. 46: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 1 µm, Templat: Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Sauerbrey Effekt für Einzelzellen und Doppelzellen (synchronisierte Zellen)

Die Konzentrationen der Hefesuspensionen bei der Messung sind als Zellzahl angegeben. 1mg/ml Hefesuspension mit Einzelzellen hat entsprechend ca. $2 \cdot 10^4$ Zellen/ml und 1 mg/ml Hefesuspension mit Doppelzellen hat ca. $1 \cdot 10^4$ Doppelzellen/ml. Die Zellzahl wird quantitativ mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer) bestimmt. Der Sensor weist eine Konzentrationsabhängigkeit auf, das heißt der Messeffekt nimmt mit steigender Konzentration der Hefesuspensionen entsprechend zu. Als Beispiel für die Querselektivität sei erwähnt, dass man etwa den gleichen Sensoreffekt für eine halb so stark konzentrierte Hefesuspension aus Doppelzellen wie mit Einzelzellen erhält.

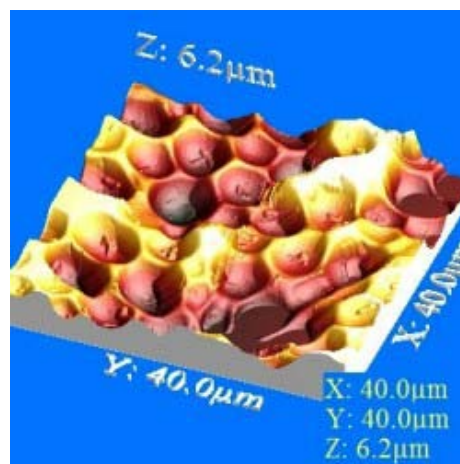
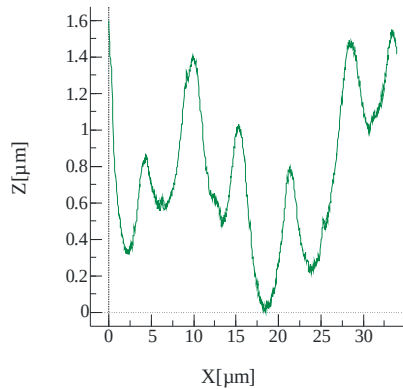


Abb. 47: 3D-AFM-Aufnahme des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers 1 µm



Die 3D-AFM-Aufnahme der Oberfläche der geprägten Elektrode eines Sensors ist in der Abb. 47 und das dazu gehörige Profilbild in der Abb. 48 dargestellt. Auch ein Schnittbild, wobei eine Kavitätstiefe von ca. 950 nm abzulesen ist, ist in der Abb. 49 zu sehen.

Abb. 48: Das Profilbild von AFM-Aufnahme des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers :1 μm , Imprinttiefe: ca. 950 nm

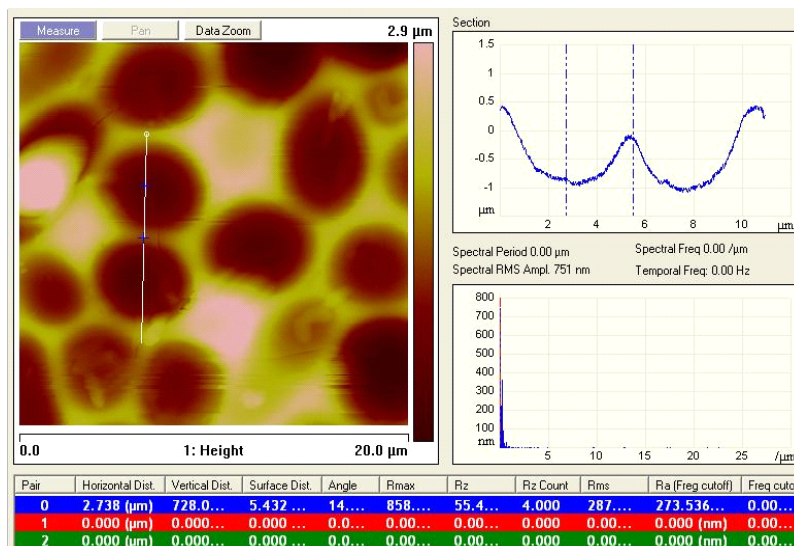


Abb. 49: Eine AFM-Aufnahme des Sensors mit Querschnittbild; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers 1 μm , Imprinttiefe: ca. 950 nm

Ein zweiter Sensor mit ähnlichen Eigenschaften und derselben Polymer-Schichtdicke (1 μm) zeigt den gleichen Messeffekt. In der Abb. 50 ist die Messkurve für diese Messung abgebildet. Aufgrund der besseren Adaption zu den Kavitäten, zeigt dieselbe Konzentration von Doppelzellen eine höhere Frequenzerniedrigung als bei Einzelzellen. Während die Sensorantwort für die einzelnen Zellen mit einer

Konzentration von $1,2 \times 10^5$ Zellen/ml ca. 400 Hz ist, ist die Sensorantwort für halb so stark konzentrierte Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen) ca. 500 Hz.

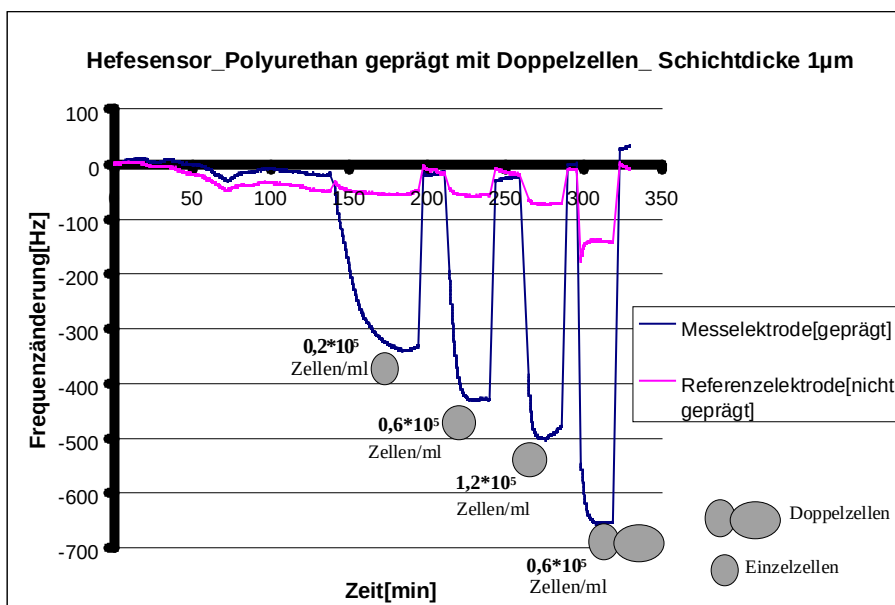


Abb. 50: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 1 µm, Templat: Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Sauerbrey Effekt für Einzelzellen und Doppelzellen (synchronisierte Zellen)

In der Abb. 51 ist eine andere Messkurve mit einer Schichtdicke von 1 µm zu sehen. Die Reproduzierbarkeit des Messeffekts wurde mit dieser Messung verifiziert. Bei einer Wiederholung der Zugabe der gleichen Messlösungen wurden dieselben Effekte für die jeweiligen Konzentrationen erhalten. Entsprechend den Schichtdicken folgt der Messeffekt für Einzel- und Doppelzellen einem Sauerbrey-Verhalten. Die Frequenzabnahme bei der Zugabe von Einzelzellen mit einer Konzentration von $1,2 \times 10^5$ Zellen/ml ist ca. 400 Hz, wobei diese für die halb so stark konzentrierte Doppelzellen ca. 500 Hz ist.

Die Abb. 52 veranschaulicht die Selektivität des Sensors und die Reproduzierbarkeit des Messeffekts des Hefesensor mit einer Schichtdicke von 1 µm. Der Sensoreffekt für die gleichen Konzentrationen (6×10^6 Zellen/ml) ist bei allen dreien Sensoren für Doppel- und Einzelzellen nahezu identisch, wobei immer eine größere Frequenzantwort für Doppelzellen resultiert. Aus der QCM Messung ist ersichtlich, dass bei diesem Sensor die Frequenzerniedrigung proportional zu Konzentration ist: je höher die Konzentration, desto größer der Messeffekt.

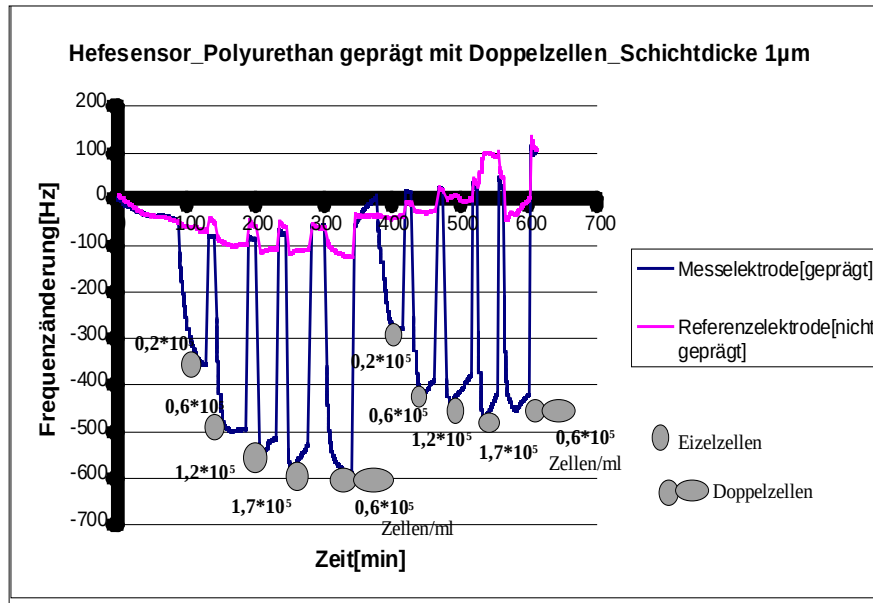


Abb. 51: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 1 µm, Templat: Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Ergebnis: Reproduzierbarkeit der Messeffekte

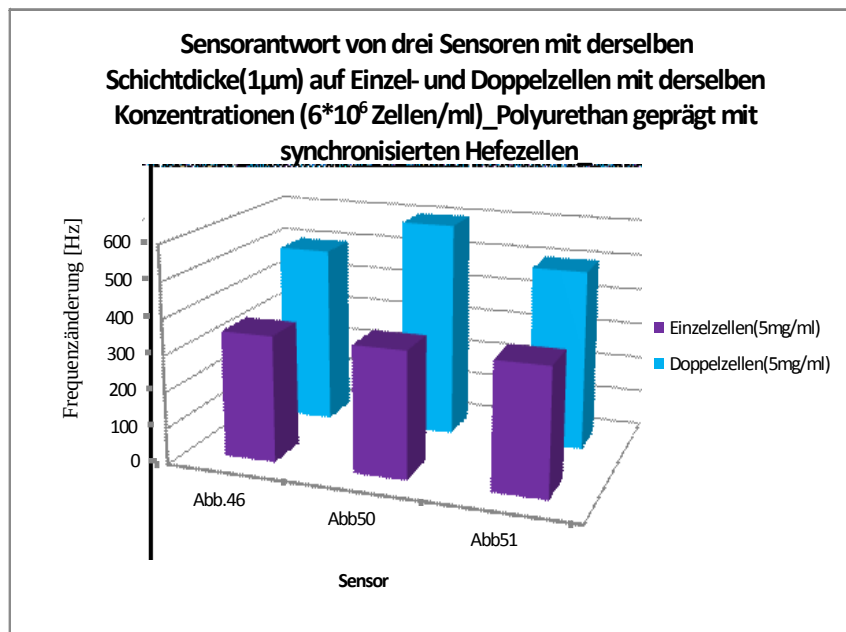


Abb. 52: Selektivität des Sensors sowie die Reproduzierbarkeit des Messeffekts; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 1µm, Templat: Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen)

Die Messkurve von einer weiteren Messung mit einer Schichtdicke von $1,7\ \mu\text{m}$ ist in Abb. 53 gezeigt. Die Zugabe der Hefesuspensionen erfolgt nacheinander, wobei einmal die Einzelzellen und einmal die Doppelzellen mit jeweils gleicher Konzentration vermessen werden. Weiteres ist eine Zwischenspülung mit destilliertem Wasser erforderlich. Dem erhaltenen Messeffekt für Einzel- und Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen) entspricht ein Sauerbrey-Verhalten. Der Sensor reagiert selektiv auf die Templatzellen (Doppelzellen).

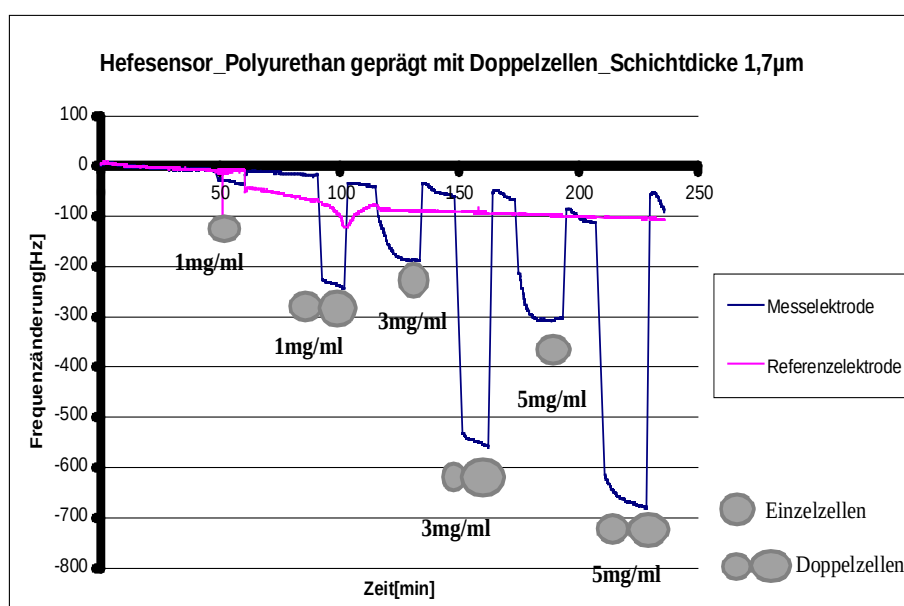


Abb. 53: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von $1,7\ \mu\text{m}$, Templat: Doppelzellen (mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Ergebnis: Sauerbrey Effekt für Einzelzellen und Doppelzellen

Die Sensorantwort liegt bei einer Konzentration von $5\ \text{mg/ml}$ der Einzelzellen bei ca. $200\ \text{Hz}$ und für gleich konzentrierte Doppelzellen (mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen) bei ca. $600\ \text{Hz}$. Der Referenzelektrode ist stabil und zeigt keine Änderung der Frequenz durch die Zugabe verschiedener Messlösungen. Durch die höhere Schichtdicke können die Hefezellen beim Erzeugen der Kavitäten viel besser in das Polymer gedrückt werden. Die verbesserte Form und Tiefe des Imprints ergibt optimierte Wechselwirkungen zwischen Analyt und Rezeptor und ermöglicht eine reversible Ein- und Auslagerung. Die 3D-AFM-Aufnahme von Oberfläche der geprägten Elektrode des Sensors ist in der Abb. 55 zu sehen, wobei die Abdrücke der Hefezellen schön abgebildet sind. Das dazu gehörige Profilbild ist in der Abb. 54 veranschaulicht, wobei eine Imprinttiefe von ca. $1,5\ \mu\text{m}$ festgestellt wurde.

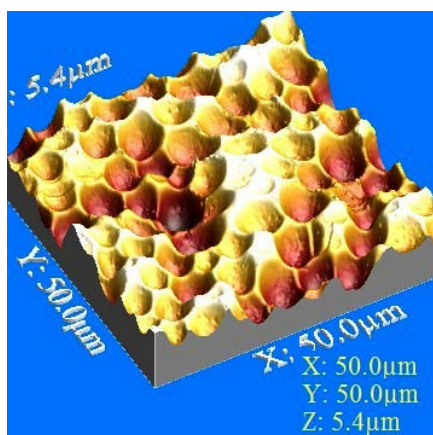


Abb. 55 3D-AFM-Aufnahme von Oberfläche der geprägten Elektrode des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers 1,7 µm

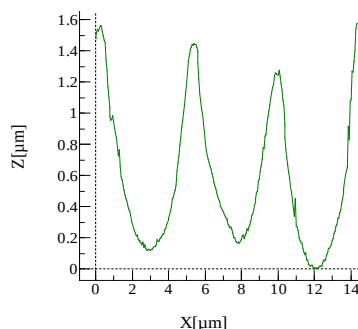


Abb. 54: Das Profilbild von AFM-Aufnahme des Sensors; Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers: 1,7 µm, Imprinttiefe: ca. 1,6 µm

Die Messkurve von der Messung mit einer weiter erhöhten Schichtdicke (2,3 µm), ist in der Abb. 57 zu sehen. Entsprechend dem Anti-Sauerbrey Effekt ist eine Zunahme der Frequenz für Einzel- und Doppelzellen zu beobachten. Eine Schichtdicke von ca. 2,3 µm verursacht bei der Erzeugung der Kavitäten zu tiefe Imprints und führt so zu höheren Affinitäten sowie zur irreversiblen Verankerungen in der Schicht. Dadurch sitzen die Zellen nachdem Prägevorgang immer noch fest in den Kavitäten und

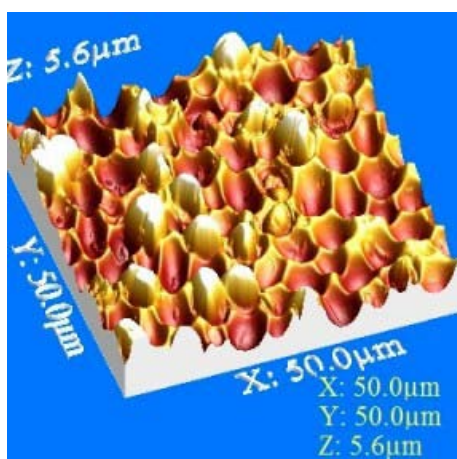


Abb. 56: 3D-AFM-Aufnahme des Sensors mit einer Schichtdicke von 2,3 µm geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen); Einige Zellen sind noch in den Kavitäten verankert

verbleiben dort auch während der Messung bei Zugabe von Analytlösungen. Dieses Verhalten führt zu einer Frequenzerhöhung (Anti-Sauerbrey Effekt) beim Messen. Da die sensitive Schicht des Sensors bei einigen Stellen mit den Zellen besetzt ist, ist auch bei Doppelzellen eine kleine Frequenzerhöhung zu sehen. Die 3D-AFM-Aufnahme von Oberfläche der geprägten Elektrode des Sensors ist in Abb. 56 zu sehen.

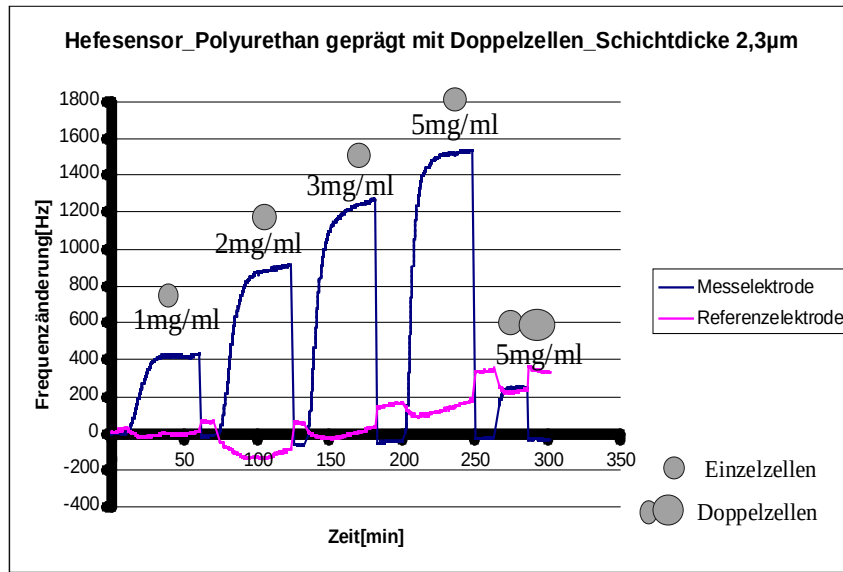


Abb. 57: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 2,3 µm, Templat: Doppelzellen (mit N-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Ergebnis: Anti-Sauerbrey Effekt für Einzelzellen und Doppelzellen

Eine Sectionsanalyse dieser AFM-Aufnahme ist in der Abb. 58 veranschaulicht, wobei die Höhe einigen noch in den Kavitäten sitzenden Hefezellen von ca. 2,5 µm abgemessen wurde.

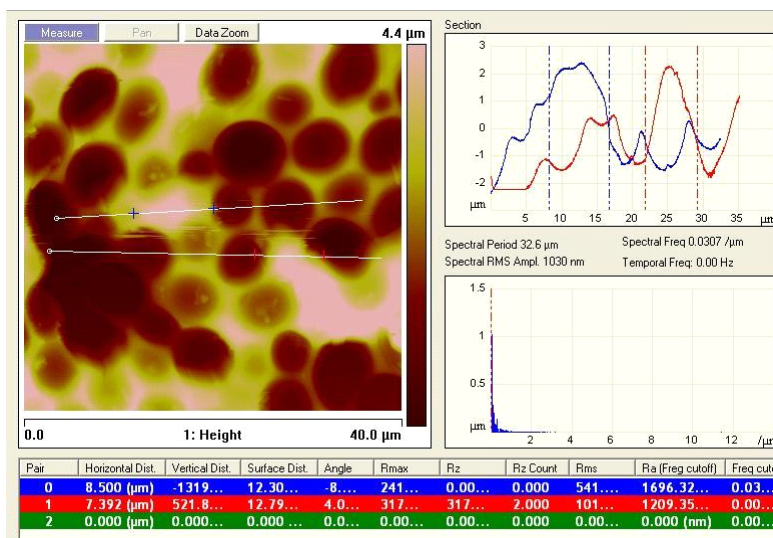


Abb. 58: Das Höhenschnittbild von AFM-Aufnahme des Sensors, Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers 2,3 µm

Die zuletzt herangezogene Schichtdicke des Polymerfilms ist die Schichtdicke von 3 μm (Abb. 59).

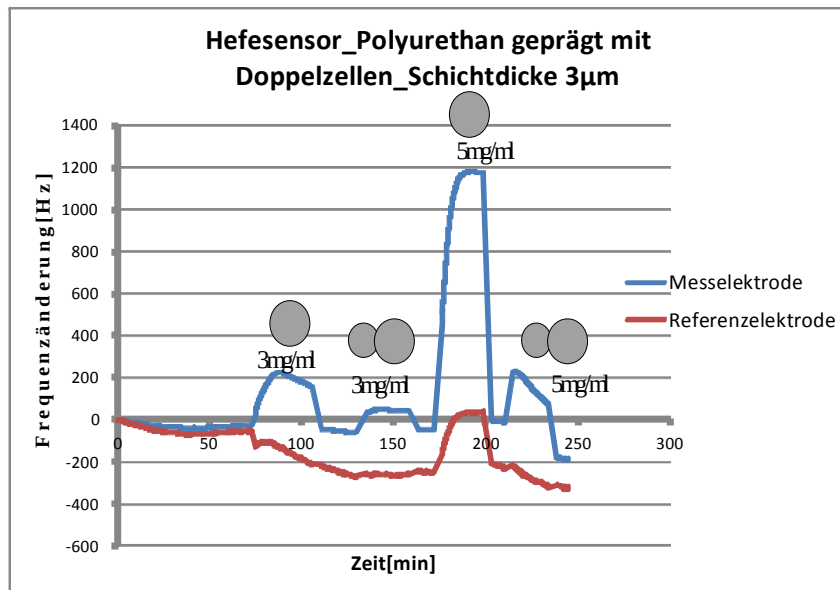


Abb. 59: Hefesensor; sensitive Schicht: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit einer Schichtdicke von 3 μm , Templat: Doppelzellen (mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen), Ergebnis: Anti-Sauerbrey Effekt für Einzelzellen und Doppelzellen

In dieser Messung wurden Sensorantworten auf zwei unterschiedlichen Konzentrationen vom jeweiligen Zelltyp (Doppel- und Einzelzellen) untersucht. Die erhaltene Sensorantwort ist für beide Zellarten (Doppel- und Einzelzellen) ein Anti-Sauerbrey-Verhalten. Eine markante Frequenzerhöhung ist für eine Konzentration von 3 mg/ml der einzelnen Hefezellen erhalten. Für die Doppelzellen ist die Zunahme der Frequenz für eine Konzentration von 3mg/ml niedriger als jene für Einzelzellen. Die erhaltene Frequenzerhöhung hängt demnach einzig von der Art der Bewegung des Analyten bzw. der Schicht ab. Mit Ansteigen der Schichtdicke nimmt auch der Einfluss der Viskoelastizität des Polymers sowie der Dämpfung zu. Dies bedingt offenbar die Frequenzerhöhung bei der Doppelzellendetektion. Da die Imprints mit Doppelzellen generiert wurden, ist die Zunahme der Frequenz für die Einzelzellen größer. Die Änderung der Frequenz für eine Konzentration von 5 mg/ml der Doppelzellen ist eine Zunahme der Frequenz, die nach einer bestimmten Zeit (ca. 1 Stunde) wieder in eine Abnahme der Resonanzfrequenz resultiert. Dies ist aufgrund der Mobilitätsverlust der Zellen zurückzuführen, welche durch die Koagulation der Zellen bedingt ist. Die 3D-AFM Aufnahme von Sensoroberfläche ist in der Abb. 60 und ein dazu gehöriges

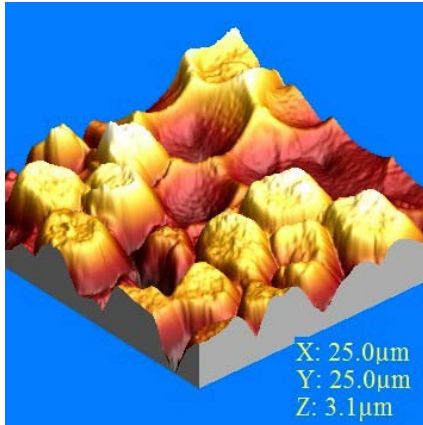


Abb. 60: 3D-AFM-Aufnahme des Sensors mit einer Schichtdicke von 3 µm geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen); mehrere Zellen sind noch in den Kavitäten verankert

Profilbild in der Abb. 61 zu sehen. Dieses Phänomen, dass die Sensorantwort nach einem bestimmten Zeitpunkt der Messung für eine hohe Konzentration der Doppelzellen von einem Anti-Sauerbrey-Verhalten zu einem Sauerbrey-Verhalten zurückkehrt, wurde auch mit einer passiven Messung am Netzwerkanalysator beobachtet. Für die passive Messung am Netzwerkanalysator wird zuerst die Polymer-Schicht mit Wasser gespült bis die Schicht gesättigt ist (ca. 4-5 Stunden). Dann wird

die Hefesuspension der Doppelzellen mit der Konzentration von 5mg/ml in die Messzelle pipettiert und ca. 1 Stunde auf den eigentlichen Effekt gewartet (genauso wie bei

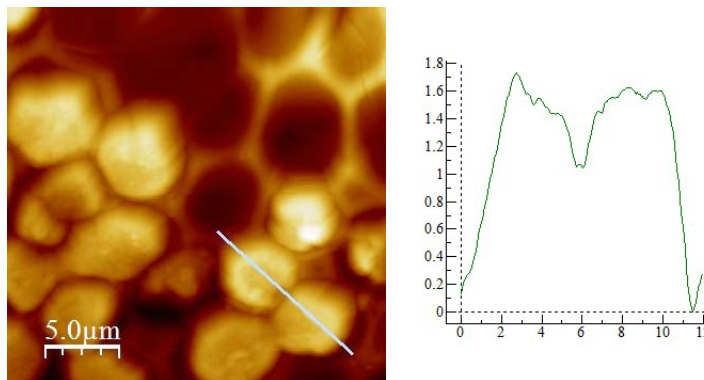


Abb. 61 Das Profilbild von AFM-Aufnahme des Sensors, Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Doppelzellen (synchronisierte Hefezellen), Schichtdicke des Polymers 3 µm

der QCM Messung desselben Sensors).

Das Dämpfungsspektrum in der Abb. 62 gibt die Frequenz als Funktion der Dämpfung der Elektrode ohne Analyt und mit Analyt für den Hefesensor mit einer Polymer-Schichtdicke von 3 µm wieder. Es ist zu erkennen, dass sich bei Massenbeladung die Kurve als Ganzes zu niedrigeren Frequenzen verschiebt. Der anfängliche Frequenzschub durch Zugabe der Hefesuspension ist nicht mehr zu erkennen. Dies hängt demnach von der Art der Beweglichkeit des Analyten ab. In dem Fall führt die höhere Konzentration (5 mg/ml) der Hefesuspension zur Sedimentation. Bei solchen

hohen Konzentrationen koagulieren die Zellen und verlieren somit ihre Mobilität und

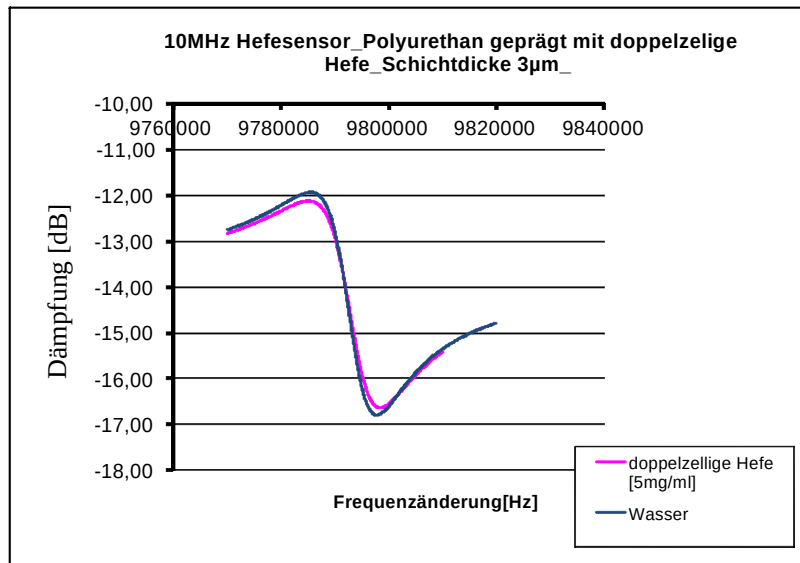


Abb. 62: Dämpfungsspektrum von Hefesensor mit einer Schichtdicke von 3 µm

verursachen ein Sauerbrey-Verhalten.

Das nächste Dämpfungsspektrum veranschaulicht die ersten Oberschwingungen (30 MHz) dieses Sensors (Abb. 63). Nach Zugabe der Hefesuspension wurde ein ähnlicher Kurvenverlauf erhalten. Bei der 1. Oberschwingung ist das serielle und parallele Resonanzverhalten weitaus geringer ausgeprägt. Aus diesem Grund kann die Resonanzfrequenz nicht mit einer Oszillatorschaltung zufriedenstellen charakterisiert werden. Es

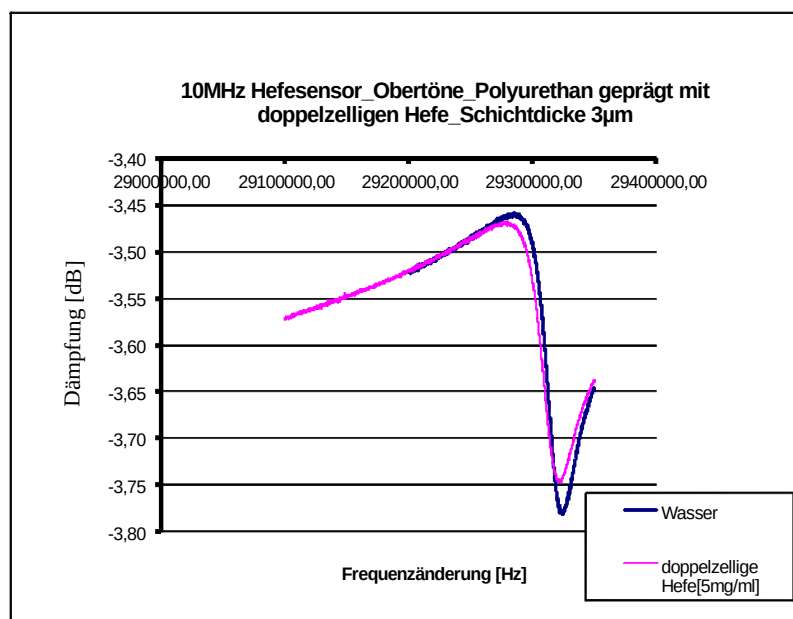


Abb. 63: Aufnahme der Dämpfungsspektrum von Hefesensor mit der Schichtdicke 3 µm, die erste Oberschwingung (30 MHz).

ist hier wiederum zu erkennen, dass sich nach Zugabe der Hefesuspension das Spektrum hin zu Werten niedriger Frequenzen verschiebt. Sowohl bei der QCM Messungen als auch mit dem Netzwerkanalysator kann das Resonanzverhalten eindeutig charakterisiert werden.

7.1.5. Resümee

Die Hefesensoren können zur selektiven Detektion von Hefezellen sowie zum Monitoring des Zellwachstums in Flüssigphase eingesetzt werden. Für die Herstellung dieser Sensoren werden kommerziell erhältliche Schwingquarze (AT cut) mit einer Grundfrequenz von 10 MHz verwendet und mit Goldelektroden in dualer Geometrie versehen. Das Polymer (in dem Fall Polyurethan: 47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) wird mittels Spin-Coating auf dem Transducer aufgebracht. Diese sensitive Polymer-Schicht wird mit Hefezellen über Stempelmethode geprägt. Die Sensorantworten dieser Sensoren auf eine Konzentration von 5 mg/ml der Hefezellen (Doppel- und Einzelzellen) sind in Abhängigkeit der Dicke der Schicht sowie dem Templat in einem Excel-Diagramm dargestellt (Abb. 64).

Beim Erzeugen der Kavitäten auf der Sensoroberfläche wurden Doppelzellen (mit *N*-

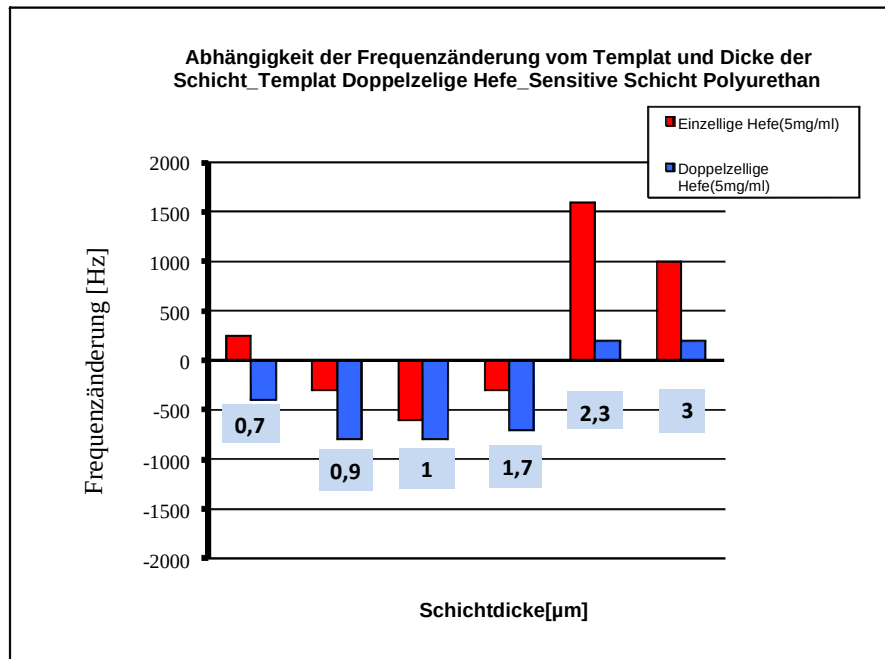


Abb. 64: Sauerbrey- und Anti-Sauerbrey-Verhalten in Abhängigkeit der Dicke der Schicht und Templat

Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen) als Templat verwendet. Da die Zellen

eine enorm große Oberfläche haben, die aus einer großen Anzahl von Hydroxygruppen besteht, hinterlassen sie auf der Oberfläche des ausgehärteten Polymers maßgeschneiderte chemisch definierte Kavitäten.

Bei den Untersuchungen wurde die Schichtdicke des Polymers systematisch variiert. Die niedrigste Schichtdicke des Polymers bei der eine gute Prägung möglich war, beträgt 0,7 μm . Das Problem bei solchen dünnen Schichten war eine effiziente Prägung durch das Templat im Bulk-Polymer. Die dickste Rezeptorschicht, die eine besonders gute Prägung ermöglicht hat und mit der eine Messung durchgeführt werden konnte, war 3 μm hoch. In dem Fall ist die Limitation bezüglich der Sensorstabilität das Haften der Schicht auf den Goldelektroden. Bei der Schichtdicken 0,9 μm , 1 μm und 1,7 μm hat die Sensorantwort für die beiden Zellarten (Doppel- und Einzelzellen) ein Sauerbrey-Verhalten gezeigt. Die Ergebnisse bezüglich dieser drei Schichtdicken (0,9 μm , 1 μm , 1,7 μm) zeigen, dass die Sensorantworten bei gleicher Konzentration bei Doppelzellen (mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen) mehr als doppelt so groß als bei den Einzelzellen sind. Daher ist die Schlussfolgerung naheliegend, sich im Laufe des Lebenszyklus von *S.cerevisiae* nicht nur die Form, sondern auch die Oberfläche der Zellen ändert. Die optimale Schichtdicken und die Schichtstabilität sowie ein gutes Haftvermögen des Polymers an Goldelektroden ergeben klare Aussagen zur Selektivität und Sensitivität des Sensors. Bei höheren Schichtdicken, wie 2,3 μm und 3 μm , haben die Sensorantworten für beide Zellarten (Doppel- und Einzelzellen) einen Anti-Sauerbrey-Verhalten ergeben. Die doppelzellige Prägung eignet sich naturgemäß am stärksten zur Analyse von Lösungen doppelzelliger Hefen. Aus diesem Grund ist die Zunahme des Anti-Sauerbrey-Effekts für Einzelzellen bei hohen Schichtdicken stärker ausgeprägt. Durch die höhere Schichtdicke sind hierbei die Imprints zu tief, dass sich beim Prägen und Messen einlagernde Zellen in der sensitiven Schicht verankert bleiben. Dies ist der Grund des Anti-Sauerbrey-Verhaltens für Doppelzellen. Bemerkenswert ist der durch Mobilität bedingte Übergang des Anti-Sauerbrey-Verhaltens in ein Sauerbrey-Verhalten für die Doppelzellen bei der Messung mit einer Schichtdicke von 3 μm . Wegen der hohen Konzentrationen kommt eine Koagulation der Zellen vor, somit auch einen Mobilitätsverlust, der ein Sauerbrey-Verhalten hervorruft.

7.2. Massensensitive Detektion von Bakteriensporen

Pathogene Bakterien zählen zu den wichtigsten und bekanntesten biologischen Waffen, wobei sie sehr billig herzustellen sind. Neben dem erfolgreichen Einsatz von Bakterien in der Biotechnologie (z.B. Synthese von Antibiotika), Gentechnik oder Kläranlagen ist auch deren Missbrauch, z.B. bei terroristischen und kriegerischen Zwecken ein wichtiges Forschungsthema für Biologen und Chemiker. Die Herstellung eines Sensors für *Bacillus anthracis* Sporen, die zu den bekanntesten Krankheitserregern zählen, ist auch ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Da die Untersuchungen mit *Bacillus anthracis* (Milzbrand auslösende Bakterien) wegen des hohen Gefahrenpotentials nicht möglich sind, werden *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus subtilis* Sporen, die sich nur in den Plasmiden von der *Bacillus anthracis* unterscheiden und aus derselben Gattung sind, als Modellorganismen^[72] verwendet. Im Zuge dieser Arbeit wurden Sensoren für *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus subtilis* Sporen entwickelt. Die Proben der *Bacillus thuringiensis* Sporen für Messungen wurden freundlicherweise vom „Centre de Biologie Est, Laboratoire de Bacteriologie-Institut de Microbiologie“ (Bron Cedex, Frankreich) zur Verfügung gestellt und Proben der *Bacillus subtilis* Sporen wurden bei der Firma VWR (*Bacillus subtilis* (BGA) Sporensuspension; MERCK) käuflich erworben.

7.2.1. Bakteriensporen

Bacillus thuringiensis und *Bacillus subtilis* Bakterien gehören zu den Prokaryoten, welche keinen echten Zellkern besitzen und ausschließlich einzellige Organismen

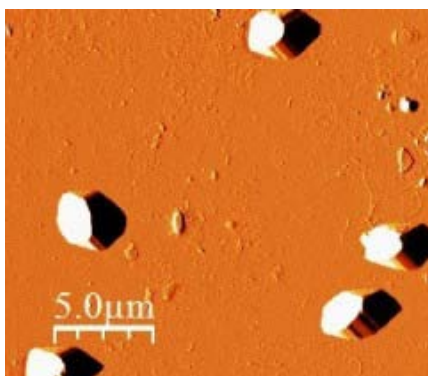


Abb. 65: 2D-AFM-Aufnahme der *Bacillus thuringiensis* Sporen

bilden. Sie sind aerob und bilden, wie alle anderen *Bacillus*-Arten, Endosporen. *Thuringiensis* produziert verschiedene sogenannte Bt-Toxine (kristalline Proteine), die spezifisch bei bestimmten Insekten tödlich wirken. In der Abb. 65 ist eine AFM-Aufnahme von *Bacillus thuringiensis* Bakteriensporen zu sehen. *Bacillus subtilis* produziert im Gegensatz dazu VOCs (flüchtige or-

ganische Verbindungen), welche fungizid wirken. Bt-Toxine werden in Land- und Forstwirtschaft eingesetzt und sind für Menschen vollkommen harmlos. Die Sporen von diesem grampositiven, stäbchenförmigen Bakterium wurden mittels AFM vermessen, wobei eine Länge von 2 bis 3 μm sowie einen Durchmesser von 1 μm

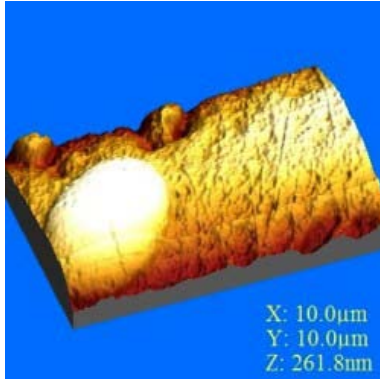


Abb. 66: 3D-AFM-Aufnahme einer *Bacillus subtilis* Spore

festgestellt wurde. In der Abb. 66 ist eine 3D-AFM-Aufnahme einer einzelnen *Bacillus subtilis* Spore im Detail abgebildet.

Der Aufbau der Außenschicht von Endosporen der *Bacillus* Bakterien ist bezüglich der Generierung von Kavitäten für die Biopartikel Inklusion von Interesse. Deshalb muss man ein geeignetes Polymer mit optimaler Wechselwirkung zwischen Analyt und Sensorschicht entwickeln. Wie sich die grampositiven Bakterien von den Gramnegativen im Aufbau ihrer Zellwand unterscheiden ist in Abb. 67 aufgezeigt. Die erste Peptidoglykanschicht (Cortex) ist von aufeinanderliegenden Sporenhüllen umgeben, welche die Spore gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen resistent machen. Die Endosporen sind über eine als Exosporium bezeichnete, dünne, lose gebundene Proteinschicht, in Kontakt mit der Umgebung.

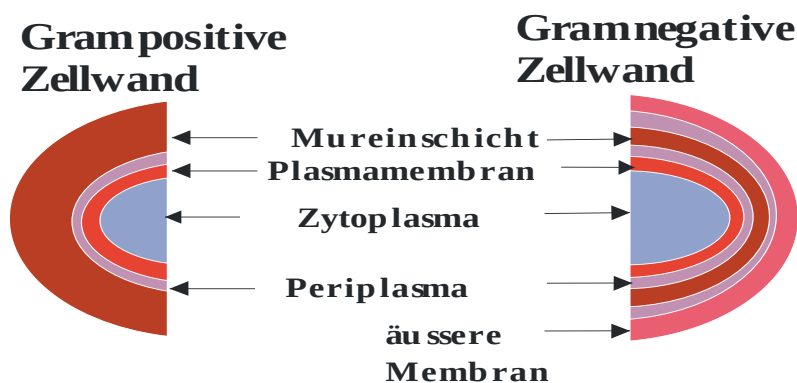


Abb. 67: Vergleich der Zellwandaufbau; links: grampositive Bakterien (Dicke der Mureinschicht: 20 nm) ; rechts: gramnegative Bakterien (Dicke der Mureinschicht: 10 nm)

7.2.2. Erzeugung der Imprints

Die Kavitäten für den Sporensensor werden durch molekulare Prägens erzeugt. Im Prinzip beruht der Vorgang wiederum auf dem Verfahren der Templatsynthese. Ein

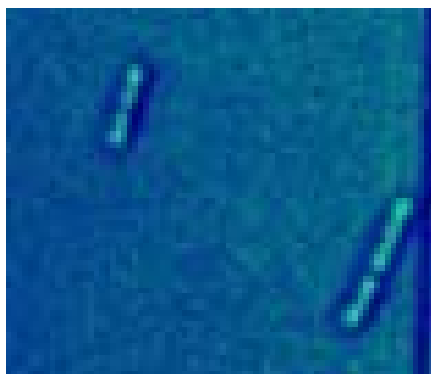


Abb. 68: Bacillus Subtilis Bakterien unter dem Lichtmikroskop 100x Vergrößerung

Vorpolymer wird in Gegenwart eines Templats auspolymerisiert und nach der Entfernung des Templats bleiben die gewünschten Kavitäten im Polymer zurück. Die Hohlräume entsprechen in Größe und Form dem verwendeten Templats bzw. dem Analyten. Das Templat für den Bacillus subtilis Bakteriensensor ist in der Abb. 68 zu sehen.

Um die erwünschten Imprints zu erzeugen, wurde nach mehreren Versuchen ein Polyurethan-Vorpolymer entwickelt. Wie schon erwähnt eignet sich Polyurethan besonders gut für Bioanalyte. Da die zu messenden Analyten (Bakteriensporen) eine Größe im unteren Mikrobereich aufweisen, muss die Polymer-Zusammensetzung so gestaltet werden, dass die Kavitäten optimal angepasst werden.

Monomer	Molekulargewicht (g/mol)	Einwaage
Phloroglucin	126,11	44mg
Poly-4-vinylphenol	≈ 11000	25mg
4,4'-MDI	250,26	32mg

Tabelle 3: Polymer-Zusammensetzung für Bakteriensensor bzw. Sporensensor

Die Polymer-Zusammensetzung ist in Tabelle 3 angegeben. Als Lösungsmittel für das Polymer wird Tetrahydrofuran (THF) verwendet. Für die Herstellung des Polyurethans sind 25 mg Poly(4-Vinylphenol) und 44 mg Phloroglucin in 200 µl THF in einem Eppendorfgefäß gelöst. Dann fügt man 32 mg 4,4'-MDI zu dieser Lösung hinzu und homogenisiert mittels eines Vortex. Diese Mischung wird unter Rühren über einem Wasserbad bei 70°C vorpolymerisiert. Es wird bis zum Gelpunkt polymerisiert, der nach etwa 25 min. erreicht ist. Letztendlich wird das Gemisch mit dem Lösungsmittel

THF auf 1ml verdünnt. Der nächste Schritt dabei ist die Vorbereitung des Templats. Dafür werden die Bakterien bzw. Bakteriensporen auf einen glatten Stempel aufgebracht. Ein sehr geeignetes Stempelmateriale ist Glas, das eine Rauigkeit im unteren Nanobereich aufweist und von wässrigen Lösungen gut benetzt wird. Glasplättchen in der Größe einer Elektrode werden mit einem Glasschneider zu Recht geschnitten. Zunächst werden 8 µl der Lösung mit Bakterien bzw. Bakteriensporen mit einer Gilsonpipette aufgebracht und eine Stunde unter dem Abzug trocknen gelassen. Beim letzten Schritt bringt man das Vorpolymer mittels Spin-Coating-Verfahren auf die Goldelektroden auf. Die aufgetragenen Polymerschichten auf den Schwingquarzen sind sehr homogen. Das Vorpolymer ist 1:2 mit THF verdünnt, um die entsprechende Schichtdicke (600 nm) zu erhalten. 10 µl von diesem weiter verdünnten Vorpolymer werden mit einer Gilsonpipette auf den Schwingquarz aufgebracht, der in der Mitte des Spinners befestigt ist. Dann wird 30 Sekunden lang bei 2500-3000 rpm abgespinn, um das Lösungsmittel verdampfen zu lassen. Damit bleibt ein sehr dünner Polymerfilm auf den Goldelektroden zurück, wobei die optimale Schichtdicke für die Prägung mit kleinen Analyte, wie Bakteriensporen, 500-600 nm sinnvoll ist.

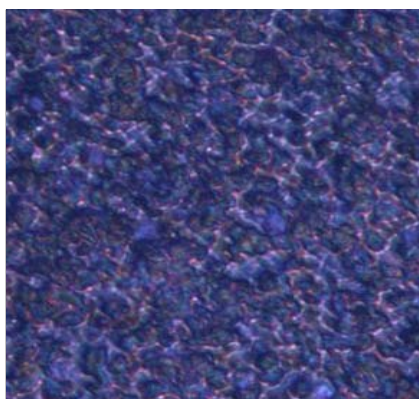


Abb. 69: Die Oberfläche des Bacillus subtilis Bakteriensensor; Polyurethan geprägt mit Bacillus subtilis Bakterien; unter dem Auflichtmikroskop 100 fache Vergrößerung

Anschließend werden Stempel für die drei unterschiedlichen Analyten vorbereitet: Bacillus subtilis Bakterien, Bacillus subtilis Sporen und Bacillus thuringiensis Sporen. Dann wird der Stempel in das noch nicht ausgehärtete Polymer genau auf eine Elektrode gedrückt und damit geprägt. Die andere Elektrode bleibt ungeprägt und dient als Referenz. Nach dem das Vorpolymer vollständig auspolymerisiert ist (ca. 1-2

Tage), werden die Stempel durch Rühren in lauwarmen Wasser (2-3 Stunden) entfernt. Dadurch bleiben die Kavitäten erhalten, in welche sich die Bakteriensporen bei den Messungen reversibel einlagern können. Ein mit dem Auflichtmikroskop aufgenommenes Bild der Oberfläche des Sensors ist in der Abb. 69 zu sehen.

7.2.3. Messergebnisse

Zu Beginn wird das Auskeimen der Sporen der *Bacillus subtilis* Bakterien mittels QCM Sensor verfolgt. Dafür wurden unter verschiedenen Konditionen Messungen durchgeführt, bei denen die Sporen auskeimen können und ob geringe Interferenzen, wie z.B. die unspezifische Adsorption von einzelnen Komponenten des Nährmediums, bei den Frequenzmessungen zu beobachten sind. Damit die Sporen auskeimen, brauchen sie genügend Nährstoffe, eine bestimmte Temperatur und pH-Wert. Die Grundzusammensetzung eines Nährmediums besteht zum Großteil aus Wasser, einer für den jeweiligen Organismus verwertbaren Energiequelle, wie z.B. organische Stoffe oder Schwefel und von ihm speziell benötigte Nährstoffe (organische oder anorganische Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Phosphatquellen sowie andere essentielle Nährstoffe). Die Nährstoffe sind in den Nährmedien für Bakterien meistens Zucker, Proteinhydrolysate und Fettsäuren. Zusätzlich liefern anorganische Salze dem Organismus lebenswichtige Ionen und Moleküle, beispielsweise Ammonium, Kalium, Natrium, Phosphat, Sulfat sowie Spurenelemente.

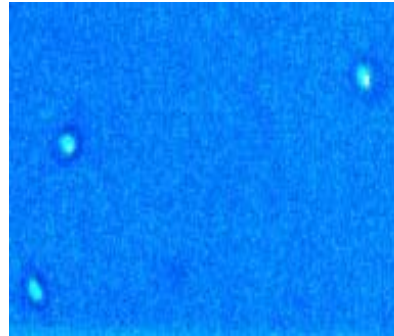


Abb. 70: Ein Bild der Sporen; am Anfang der Behandlung in Nährmedium (PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 2% Glucose);unter dem Auflichtmikroskop 50 fache Vergrößerung; nur Sporen und keine Bakterien

Vor den eigentlichen QCM-Messungen wurde der Verlauf der Auskeimung mittels Auflichtmikroskop verfolgt. Dafür werden zu den *Bacillus subtilis* Sporen eine PBS-Lösung mit 2% Ammoniumsulfat und 2% Glucose als Nährmedium eingesetzt. Das Auskeimen wird bei einer Temperatur von 42°C und bei einem pH Wert von 7,2 eingeleitet. Die Anfangskonzentration der Sporen ist 7×10^6 Partikel/ml. In der Abb. 70 ist ein Bild von Sporen (mit dem Auflichtmikroskop aufgenommen) zu sehen. Bei 2% Glucosegehalt ändert sich die Sporenzahl in den ersten fünf bis sieben Stunden nicht und somit treten auch keine Bakterien auf.

Nach sechs Stunden sind erste Bakterien zu sehen (siehe Abb. 71). In 24 Stunden sind 10-mal so viel Bakterien in der Sporensuspension (Abb. 72).

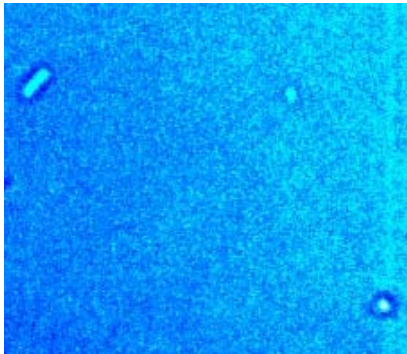


Abb. 71: Ein Bild der Sporen nach 6 Stunden in Nährmedium (PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 2% Glucose); unter dem Auflichtmikroskop 50fache Vergrößerung; Die ersten Bakterien sind aufgetreten

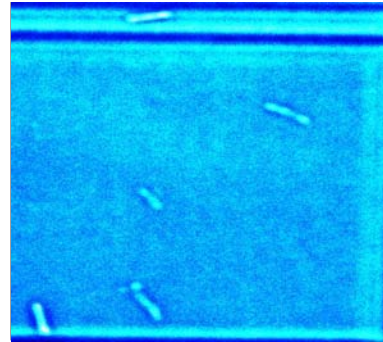


Abb. 72: Ein Bild der Bakterien nach 24 Stunden in Nährmedium (PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 2% Glucose); Auflichtmikroskop 50 fache Vergrößerung; 10 fach mehr Bakterien

Dabei hat sich die Sporenzahl in den ersten Stunden nicht geändert und nach sieben Stunden sind 40% weniger Sporen in der Suspension. Nach 24 Stunden sind 40% mehr Sporen im Vergleich zur Anfangskonzentration vorhanden. Da der Nährstoffgehalt begrenzt ist, wird nach 24 Stunden ein Gleichgewicht zwischen Sporen und Bakterien erreicht. Ein Teil der Bakterien ist wegen Nährstoffmangel wieder in Sporen übergegangen. In *Tabelle 4* ist die Änderung der Partikelzahl der Sporen und der Bakterien im Laufe der Keimung mit der Zeit veranschaulicht. In der *Abb. 73* sind die erhaltenen Daten grafisch dargestellt.

Zeit (Std)	Sporen $\times 10^7$ (Zellen/ml)	Bakterien $\times 10^7$ (Zellen/ml)
0	0,7	0
1,5	0,7	0
2	0,5	0
3	0,4	0
4	0,6	0
5	0,4	0,2
6	0,4	1
24	1	8

Tabelle 4: Anzahl der Sporen und Bakterien in Abhängigkeit der Zeit

Weiteres wurde der Glucosegehalt des Nährmediums variiert und das Auskeimen der Sporen wurden mittels QCM-Messungen über die jeweiligen Sensorantworten charakterisiert.

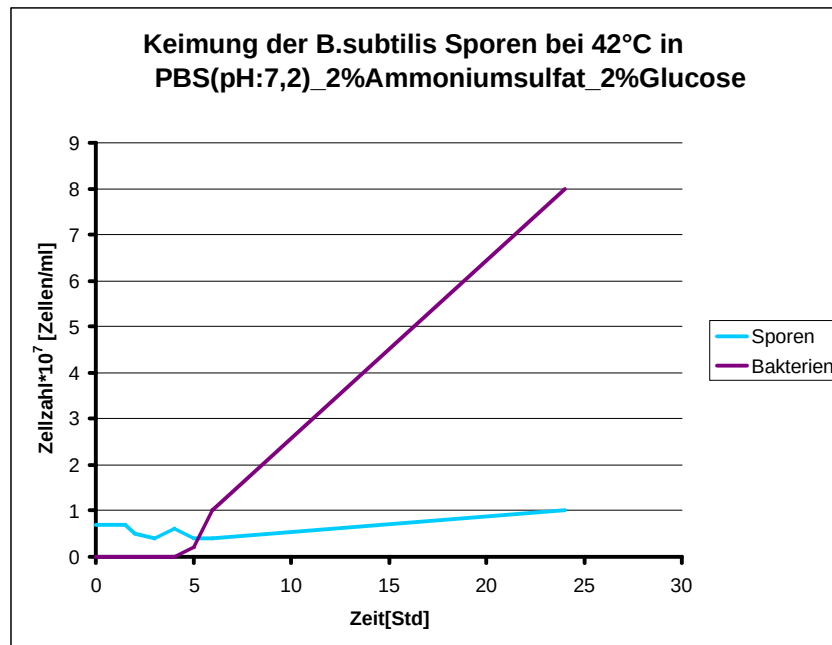


Abb. 73: Auskeimen der Sporen in Abhängigkeit der Zeit; Temperatur: 42°C; pH: 7,2; in PBS Lösung mit 2% Ammoniumsulfat und 2% Glucose

Der wie zuvor beschrieben hergestellte B.subtilis Sporensensor wird in der Messzelle fixiert und bis zum Erreichen der Sättigung der Polymer-Schicht mit Wasser gespült. Da die Bacillus subtilis Sporen unbeschränkt zur Verfügung standen, wurden die Versuche mittels Durchflussmessung mit Hilfe einer Pumpe durchgeführt. Die erste Messung ist der Nachweis der B.subtilis Sporen. Der Sensor wird bis zur Sättigung der sensitiven Schicht (Polyurethan geprägt mit B.subtilis Sporen) mit destilliertem Wasser gespült und anschließend die Sporensuspension in die Messzelle gepumpt. Nach der entsprechenden Frequenzsenkung wird die Messzelle nochmals mit destilliertem Wasser gespült. Da die Frequenz wieder zur Basislinie zurückkehrt, lässt sich sagen, dass die Sensorantwort reversibel ist. Die dazu gehörige Messkurve ist in der Abb. 74 zu sehen. Die Sensorantwort für Bacillus subtilis Sporen mit einer Konzentration von $7,5 \times 10^7$ Partikel/ml ist eine Frequenzabnahme von ca. 750 Hz.

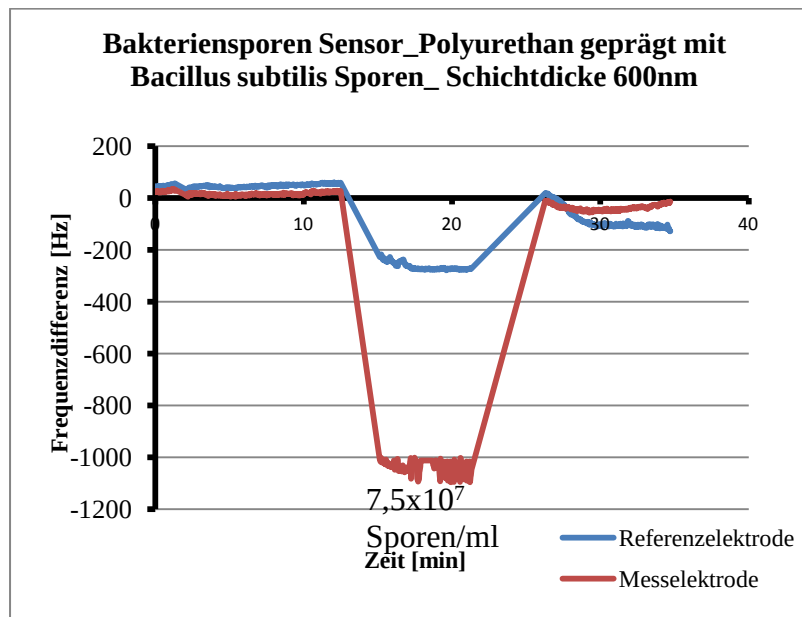


Abb. 74: Bakteriensporen Sensor; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600nm, Templat: B.subtilis Sporen; eine Abnahme der Frequenz von etwa 750 Hz für $7,5 \times 10^7$ Sporen/ml

Ein weiterer durchgeführter Versuch ist die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des Sensors (Abb. 75). Dafür sind drei verschiedene Konzentrationen von

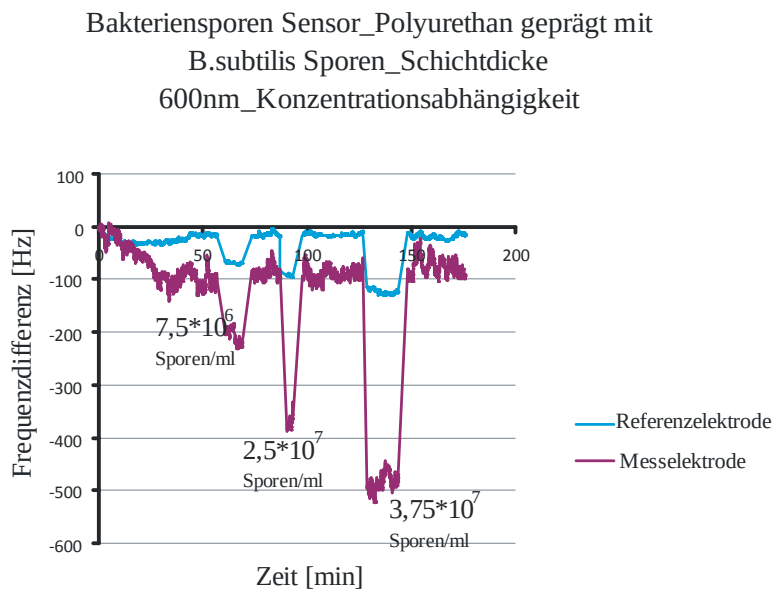


Abb. 75: Bakteriensporen Sensor; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600 nm, Templat: B.subtilis Sporen; Konzentrationsabhängigkeit des Sensors

Bacillus subtilis Sporensuspension für die Messung herangezogen. Die Sensorantworten auf die Konzentrationen $7,5 \cdot 10^6$, $2,5 \cdot 10^7$ und $3,75 \cdot 10^7$ Partikel/ml sind bzw. 50, 200 und 300 Hz, so dass eine beträchtliche Konzentrationsabhängigkeit sich beobachten lässt.

Für die Messungen der Überwachung des Auskeimens der Sporen wurde ein Sensor mit einem Templat aus Bacillus subtilis Bakterien hergestellt. Der Bakteriensensor wird in die Messzelle eingebaut und mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur (25°C) gespült. Nachdem die Sensorschicht mit Wasser gesättigt und die Grundlinie

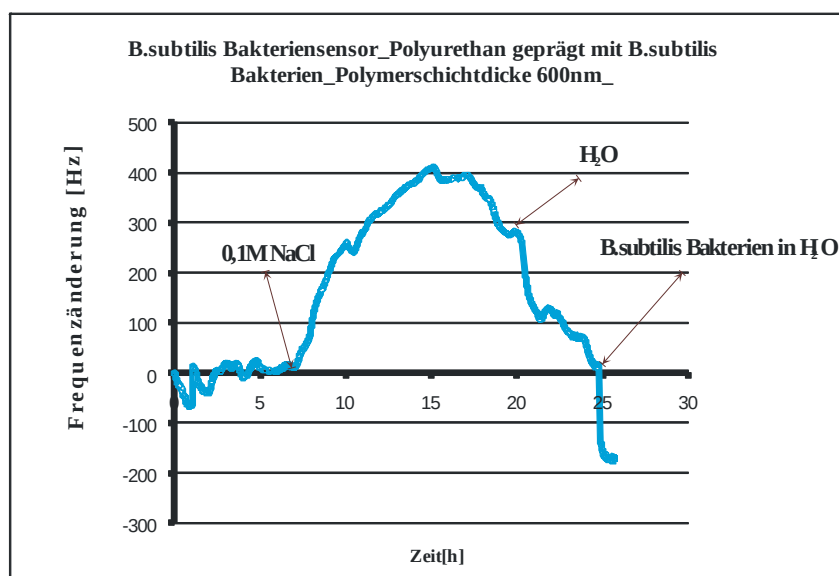


Abb. 76: Wasserentzug durch Osmose eines bakterienbeladenen Sensors; Polyurethan geprägt mit B.subtilis Bakterien, Schichtdicke 600nm: Quellen mit destilliertem Wasser, nach Erreichen der Sättigung Wechsel auf 0,1 M NaCl-Lösung, anschließend wieder Spülen mit destilliertem Wasser und Zugabe einer B.subtilis Bakteriensuspension in die Messzelle

stabil geworden ist, wird der Sensor mit 0,1M Salzlösung (NaCl) gewaschen. Durch veränderten osmotischen Druck werden den Bakterienzellen Wasser entzogen, die beim Prägen der Schicht in die Kavitäten verankert geblieben sind. Der Masseverlust durch Wasserentzug ist in der Abb. 76 veranschaulicht, der sich deutlich mit einem Frequenzanstieg zeigt. Nach dem Spülen mit Wasser wird eine Bakteriensuspension in die Messzelle gepumpt. Dies ergibt, wie erwartet, eine Abnahme der Frequenz. Da die Sensorantwort auf Bacillus subtilis Bakterien nach der Sauerbrey-Gleichung eine Frequenzabnahme bedingt, kann der Sensor für die Messung dieser Bakterien eingesetzt werden. Mit demselben Sensor wurden mehrere Messungen für die

Überwachung der Auskeimung und des Vermehrungsprozesses der Bakterien in unterschiedlichen Nährmedien (PBS mit 2% Ammoniumsulfat und variierter Glucosegehalt) durchgeführt.

Die erste QCM Messung mit dem B.subtilis Bakteriensensor für die Überwachung des Auskeimens der Sporen bzw. das Wachstum der Bakterien wurde in einem Nährmedium mit 2% Ammoniumsulfat- und 2% Glucosegehalt durchgeführt. Die Temperatur von 42°C und einen pH-Wert des Nährmediums von 7,2 wurden für jede Messung konstant gehalten, weil diese schon bei der Überwachungen des Auskeimens mit

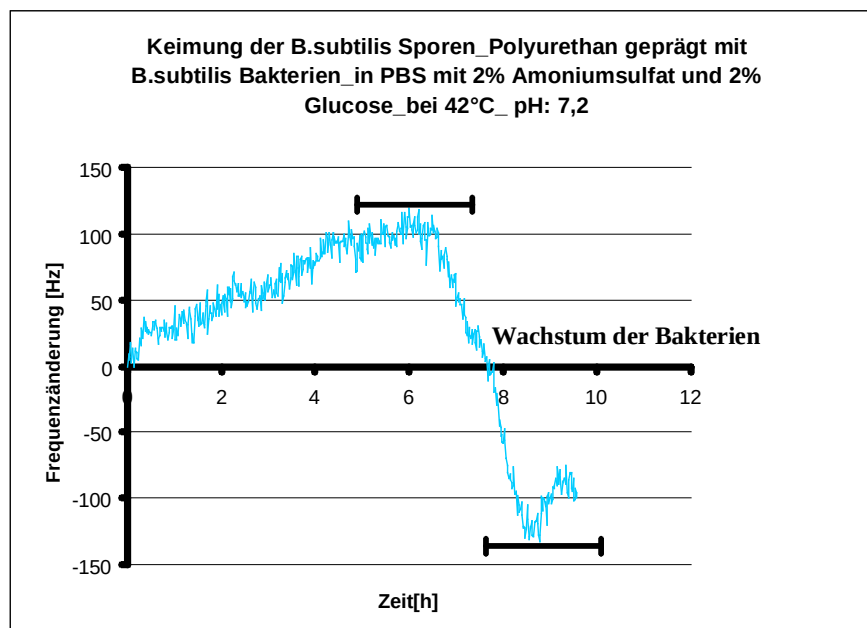


Abb. 77: Keimung der B.subtilis Sporen; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600 nm; Templat: B.subtilis Bakterien; Nährmedium: PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 2% Glucose; Temperatur: 42°C; pH: 7,2

dem Auflichtmikroskop optimiert worden sind. Die Messlösung lässt sich mit Hilfe einer Pumpe kontinuierlich mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min in die Messzelle einbringen. Um eine Durchflussmessung zu ermöglichen, wird die Sporensuspension 1:3 verdünnt um das Volumen der Messlösung zu erhöhen, da bei einer Durchflussmessung größere Volumen benötigt werden. Damit ist die Anfangskonzentration der Sporen ca. 2×10^6 Partikel/ml. Entsprechend der Sauerbrey-Gleichung ist eine Erniedrigung der Frequenz durch Massenbeladung (durch Bakterien) beobachtet. Die Frequenzabnahme fängt ab ca. 6 Stunden an und hört etwa nach etwa in 1,5 Stunden wieder auf.

Die Sensorantwort für das Wachstum der Bakterien ist eine Frequenzabnahme von ca. 400 Hz. Die entsprechende Messkurve ist in der Abb. 77 zu sehen. Für den Sensor-effekt, der aus der Messkurve abgelesen ist, lässt die entsprechende Konzentration be-

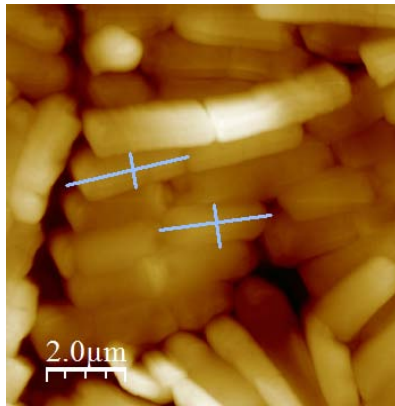


Abb. 78: AFM Aufnahme der B.subtilis Sporen, Abmessungen der Bakterien:
r: 0,04µm; h: 2,5µm

rechnen. Für diesen Zweck wurden die Bakterien mit Hilfe einer AFM-Messung abgebildet und die Volumen der Bakterien bzw. die Masse der Bakterien bestimmt. Die 3D-AFM Aufnahme der Bakterien ist in der Abb. 78 zu sehen. Da die Bakterien im wesentlichen Form eines Zylinders haben;

Zylindervolumen: $\pi \times r^2 \times h$,

wobei π : 3,1415, r: 0,04µm und h:2,5µm

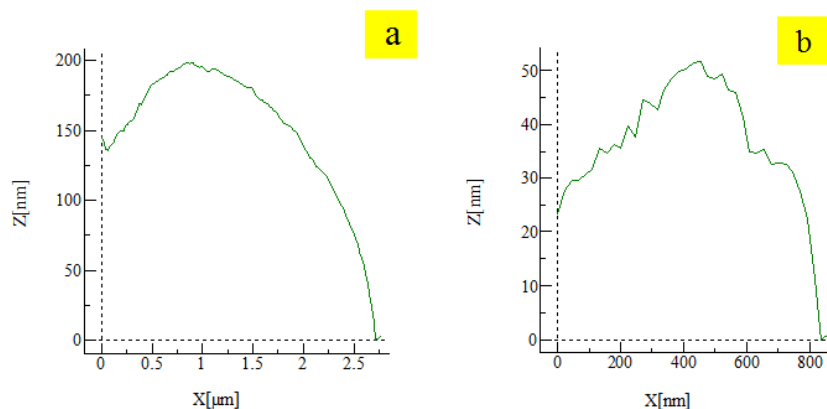


Abb. 79: a) Länge der B.subtilis Bakterien (h): ca. 2,5 µm

b) Breite der B.subtilis Bakterien (2r): ca. 800 nm

beträgt. Die geometrischen Daten sind der entsprechenden AFM-Aufnahme entnommen (Abb. 79). Die Bakterien haben im Durchschnitt ein Volumen von ca. $1,26 \times 10^{-14} \text{ cm}^3$ und die Dichte der Bakterien ist wie bei fast allen Lebewesen nahezu 1 g/cm^3 . Dies ergibt für ein Bakterium eine Masse von ca. $1,26 \times 10^{-5} \text{ ng}$. 1 ng Massenänderung entspricht 1 Hz Frequenzänderung. Die Sensorantwort ist eine Frequenzabnahme von 400 Hz, welche auf eine Massezunahme 400 ng zurückzuführen ist. Diese Masse entspricht 3×10^5 Zellen, dass bedeutet dass sich $3,17 \times 10^7$ Zellen auf dem Sensor bzw. auf der sensitiven Schicht befinden.

Der Glucosegehalt des Nährmediums wurde bei der nächsten Messung auf 4% erhöht. Derselbe Sensor wurde nochmals für diese Messung eingesetzt, das heißt dass die Sensoreigenschaften gleich bleiben. Die Konditionen wie Temperatur (42°C), pH Wert (7,2), Zusammensetzung des Nährmediums (PBS mit 2% Ammoniumsulfat) und die Anfangskonzentration der Sporensuspension sind auch konstant gehalten. Wie

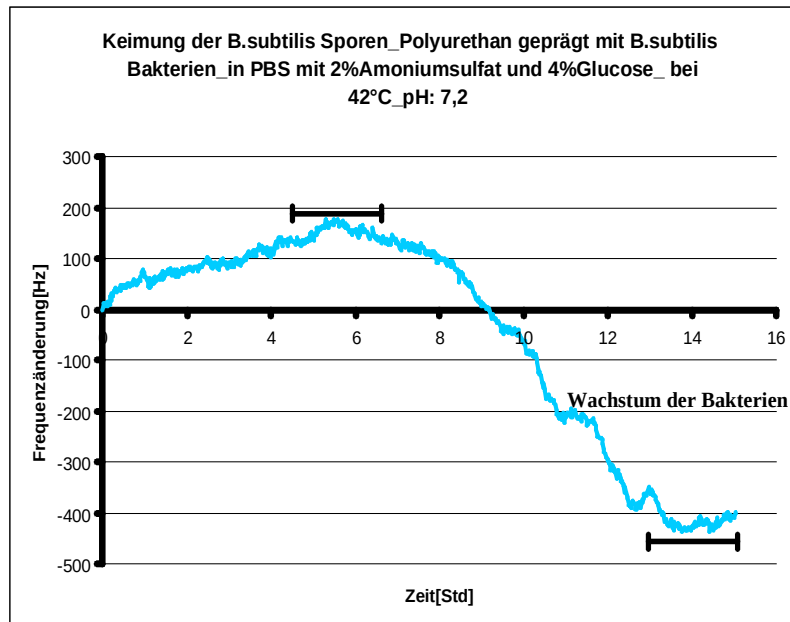


Abb. 80 Keimung der B.subtilis Sporen; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600 nm; Templat: B.subtilis Bakterien; Nährmedium: PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 4% Glucose; Temperatur: 42°C; pH: 7,2

erwartet beginnen die Zellen sich nach ca. 6 Stunden zu vermehren. Die aus der Messkurve (Abb. 80) erhaltene Dauer der Vermehrungszyklus der Bakterien beträgt ca. 6 Stunden. Für diesen Ablauf ist die Sensorantwort eine Abnahme der Frequenz von ca. 600 Hz. Aus der Annahme, dass 1 Hz gleich 1 ng ist, entspricht die Frequenzänderung von 600 Hz etwa 600 ng. Zurückgerechnet entsprechen die 600 ng Masse ca. $4,76 \times 10^7$ Zellen, die sich auf dem Sensor bzw. der sensitiven Schicht befinden.

Die nächste Messung erfolgt unter denselben Bedingungen mit Ausnahme des Glucosegehalts des Nährmediums von 6%. Die dazu gehörige Messkurve ist in der Abb. 81 zu sehen. Nach ca. 6 Stunden sind abermals die ersten Bakterien aufgetreten und die Frequenz beginnt zu sinken. Es lässt sich aus der Messkurve auslesen, dass das Wachstum der Bakterien ca. 9 Stunden anhielt. Die Frequenzänderung beträgt für das Wachstum der Bakterien ca. 900 Hz, was auf einen Massenanstieg von 900 ng

zurückzuführen ist. Dies entspricht $7,14 \times 10^7$ Zellen, die sich auf der sensitiven Schicht (Rezeptor) des Sensors befinden.

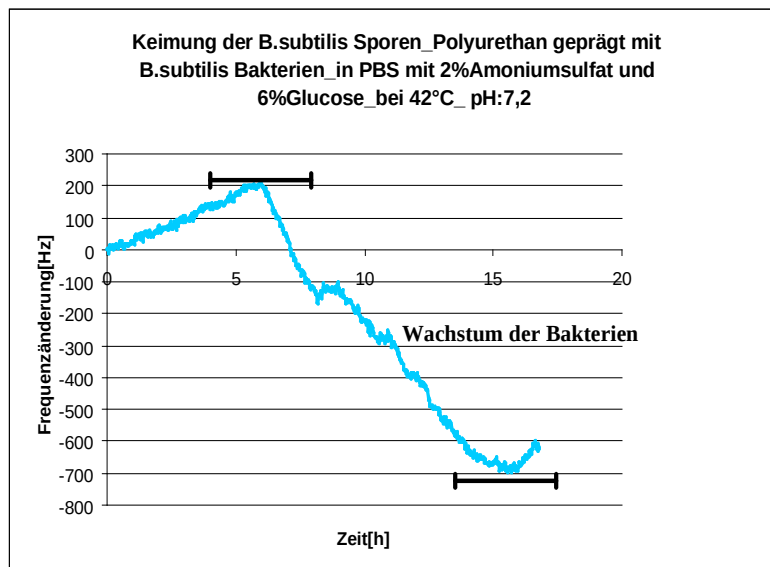


Abb. 81: Keimung der B.subtilis Sporen; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600 nm; Templat: B.subtilis Bakterien; Nährmedium: PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 6% Glucose; Temperatur: 42°C; pH: 7,2

Anschließend wurde der Glucosegehalt des Nährmediums auf 8% erhöht. Der Vermehrungszyklus beginnt wieder bei etwa 6 Stunden, was durch eine Abnahme der

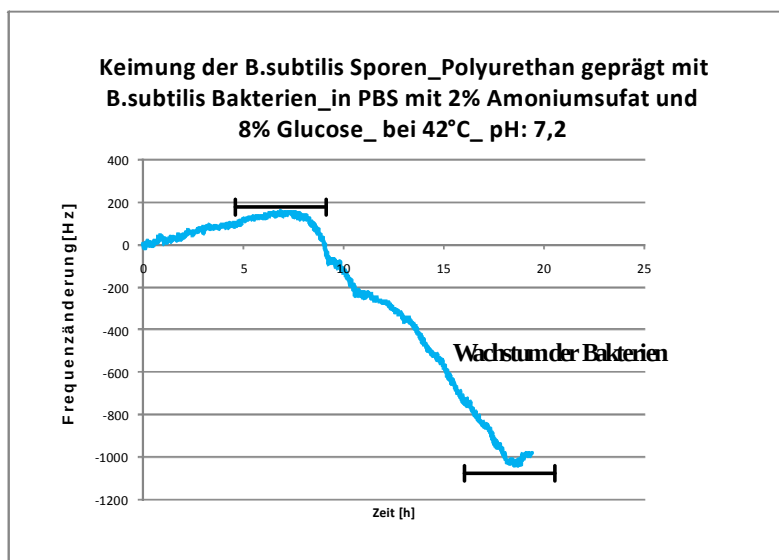


Abb. 82: Keimung der B.subtilis Sporen; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600 nm; Templat: B.subtilis Bakterien; Nährmedium: PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 8% Glucose; Temperatur: 42°C; pH: 7,2

Frequenz erkennbar ist. Es ist aus der Messkurve ersichtlich, dass die Dauer des Wachstums etwa 9,4 Stunden beträgt. Die entsprechende Messkurve ist in der *Abb. 82* dargestellt. Die Sensorantwort für das Wachstum der Bakterien beträgt ca. 1200 Hz. Die Masse 1200 ng bedeutet, dass sich $9,52 \times 10^7$ Zellen auf der sensitiven Schicht des Sensors befinden.

Der nächst herangezogenem Glucosegehalt des Nährmediums ist 10%. Die erhaltene Messkurve (*Abb. 83*) deutet darauf hin, dass bei so einer Konzentration der Glucose die Sättigung des Sensors erreicht ist, weil die Abnahme in der Frequenz fast dieselbe wie bei 8% Glucose ist. Der zeitliche Ablauf des Vermehrungszyklus lässt sich im

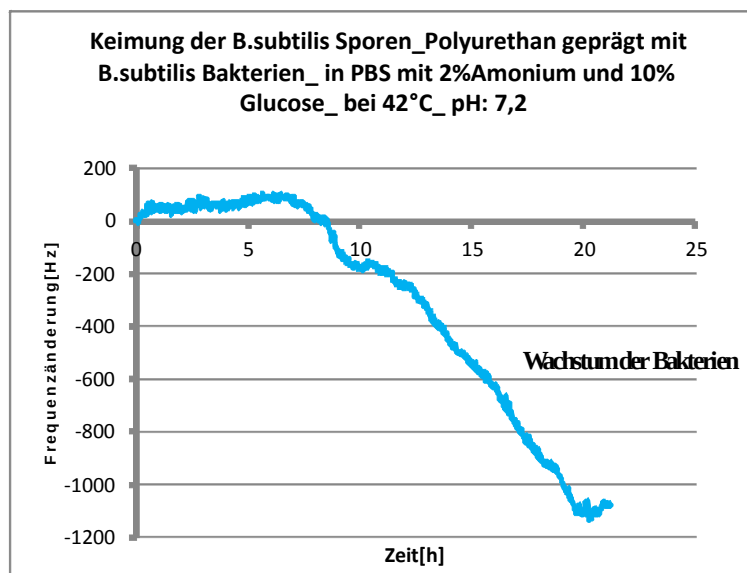


Abb. 83: Keimung der B.subtilis Sporen; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600 nm; Templat: B.subtilis Bakterien; Nährmedium: PBS mit 2%Ammoniumsulfat und 10% Glucose; Temperatur: 42°C; pH: 7,2

Wesentlichen nicht von der Messung mit 8% Glucosegehalt unterscheiden. Der Anfang des Wachstums liegt bei ca. 6 Stunden und die Dauer des Zyklus beträgt ungefähr 10,8 Stunden. Die Sensorantwort ist eine Frequenzabnahme von 1200 Hz, die 1200 ng Masse und entsprechend $9,52 \times 10^7$ Zellen auf dem Sensor bedeutet. Da alle verfügbaren Hohlräume auf der Rezeptorschicht des Sensors besetzt sind, bleibt die Frequenz, trotz steigender Zellkonzentration am Ende der Messung konstant.

Aus diesen Messergebnissen wurde eine Kalibrierkurve erstellt (siehe *Abb. 84*), wobei die Verdopplungszeit der Bakterien in Abhängigkeit des Glucosegehalts gegen log (Sensoreffekt) aufgetragen ist. Aus dieser Kurve konnte eine pseudomonomolekulare

Geschwindigkeitskonstante ($4,85 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) für das Wachstum der Bakterien bestimmt werden.

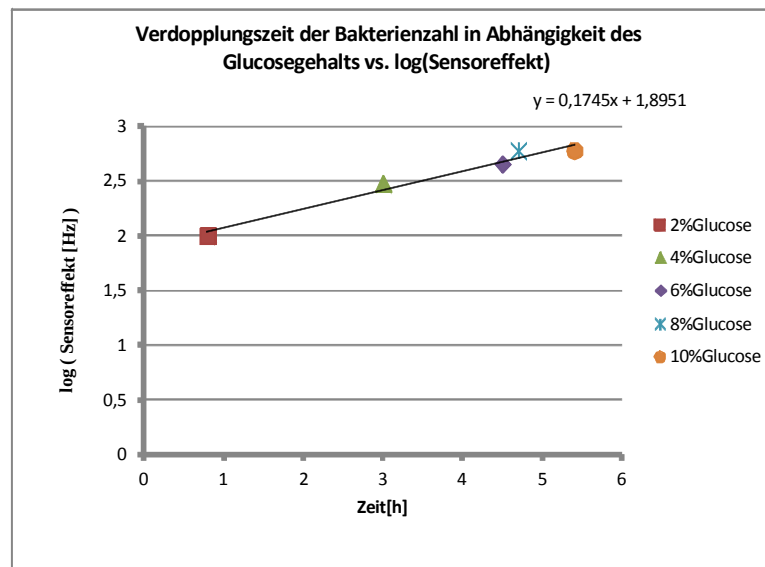


Abb. 84: Auftragung der Verdopplungszeit [h] der Bakterien in Abhängigkeit des Glucosegehalts gegen log(Sensoreffekt), um eine pseudomonomolekulare Geschwindigkeitskonstante für das Wachstum der Bakterien zu bestimmen

Messungen mit weiteren Glucosegehalten höher als 10% sind nicht sinnvoll, weil ein erhöhter Glucosegehalt eine wesentliche Änderung der Eigenschaften des Mediums bedingt. Dadurch werden die Zellen zusammenkleben und verursachen einen irreversiblen und unselektiven Sensoreffekt.

Der Nachweis von *Bacillus thuringiensis* Sporen erfolgt mit einem Sensor, der mit *B.thuringiensis* Sporen geprägt wurde. Die sensitive Schicht ist ein dünnes (ca. 600 nm) Polyurethan wie beim *B.subtilis* Sporensensor, da die *B.thuringiensis* Sporen ungefähr gleich groß wie die *B.subtilis* Sporen sind. Die Messkurve für den Nachweis von *B.thuringiensis* Sporen ist in der Abb. 85 zu sehen. Die Sensorantwort für $1,76 \times 10^9$ Partikel/ml *B.thuringiensis* Sporen ist eine Abnahme der Frequenz von ca. 500 Hz. Die Frequenzänderung der Referenzelektrode kann gegenüber der Messelektrode vernachlässigt werden. Mit weiteren Messungen wurden die Konzentrationsabhängigkeit sowie die Kreuzreaktivität des Sensors für die *Bacillus thuringiensis* Sporen untersucht. Da die Proben in sehr geringen Volumen zur Verfügung standen, wurden die Messungen mit *Bacillus thuringiensis* Sporen nicht mittels Durchflussmessung sondern nach dem "Stopped Flow" Prinzip durchgeführt.

Für die Messungen wird eine Messzelle mit kleinem Volumen (ca. 50 µl) verwendet. Mit einer Eppendorfpipette werden 100 µl Wasser in die Messzelle pipetiert und abgewartet, bis die sensitive Schicht mit Wasser gesättigt ist. Beim Pipettieren ist

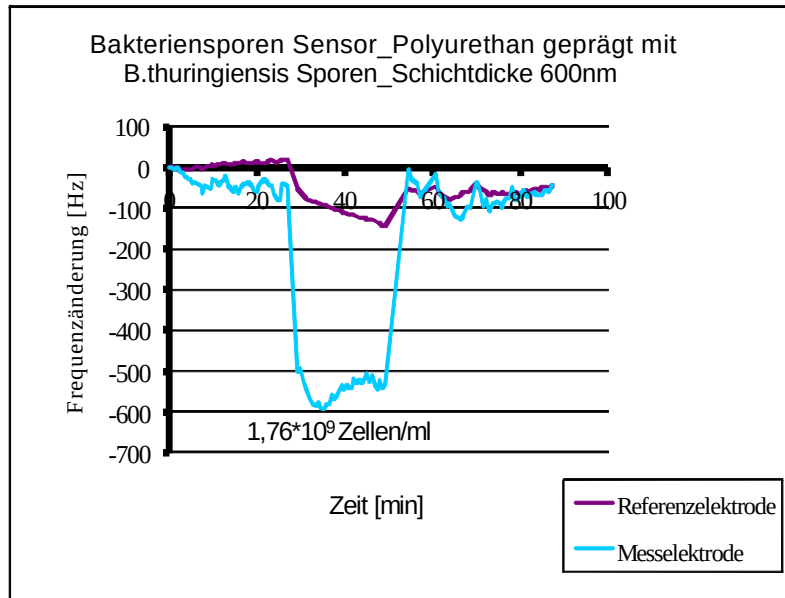


Abb. 85: Bakteriensporen Sensor; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 600 nm, Templat: B.thuringiensis Sporen; eine Abnahme der Frequenz von etwa 500 Hz für $1,76 \times 10^9$ Partikel/ml

darauf zu achten, dass sich keine Blasen in der Messzelle bilden bzw. die Elektroden vollständig mit Messlösung bedeckt sind. Danach werden 100 µl Sporensuspension in die Messzelle pipettiert und die entsprechende Oszillatorfrequenz gemessen. Nachdem die Frequenz sich stabilisiert hat, wird die Messzelle durch mehrmaliges Einspritzen mit destilliertem Wasser gespült. Bei diesem Schritt ist zu erwarten, dass die Frequenz zu der Grundlinie zurückkehrt. Dies ist ein wesentlicher Punkt, da so die Reversibilität des Sensors bewiesen ist.

In der Abb. 86 ist die Messkurve für die Querempfindlichkeit des Bacillus thuringiensis Sporensensors zu sehen. Die sensitive Schicht ist 500 nm dickes Polyurethan und geprägt wurde mit B.thuringiensis Sporen. Es ist aus der Messkurve ersichtlich, dass die Escherichia coli^[73] Zellen nicht in die mit einem Templat aus Bacillus Thuringiensis Sporen erzeugten Kavitäten passen. Darum ist der Sensoreffekt für dieselben Konzentrationen von E.coli Zellen erheblich niedriger als für B.thuringiensis Sporen. Der Sensoreffekt für 10^7 E.coli Zellen ist ein Frequenzabfall von ca. 50 Hz während er für 10^7 B.thuringiensis Sporen ein Frequenzabfall von ca.

250 Hz ist. Die Frequenzänderung der Referenzelektrode ist wieder zu vernachlässigen.

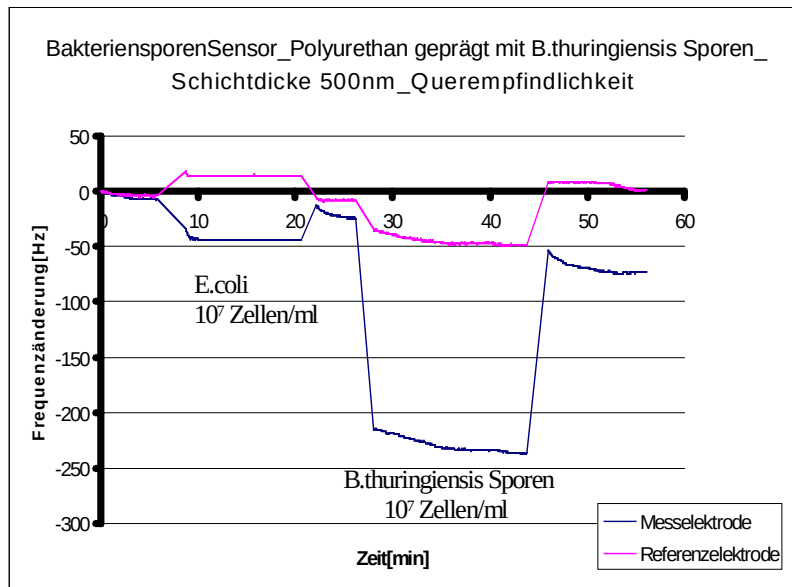


Abb. 86: Bakteriensporen Sensor; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 500 nm, Templat: B.thuringiensis Sporen; Messkurve für die Querempfindlichkeit: Eine Frequenzabnahme von ca. 50 Hz für E.coli Zellen und von ca. 250 Hz für B.thuringiensis Sporen wurde beobachtet.

Die Konzentrationsabhängigkeit des Sensors wurde mit einer Messung nachgewiesen.

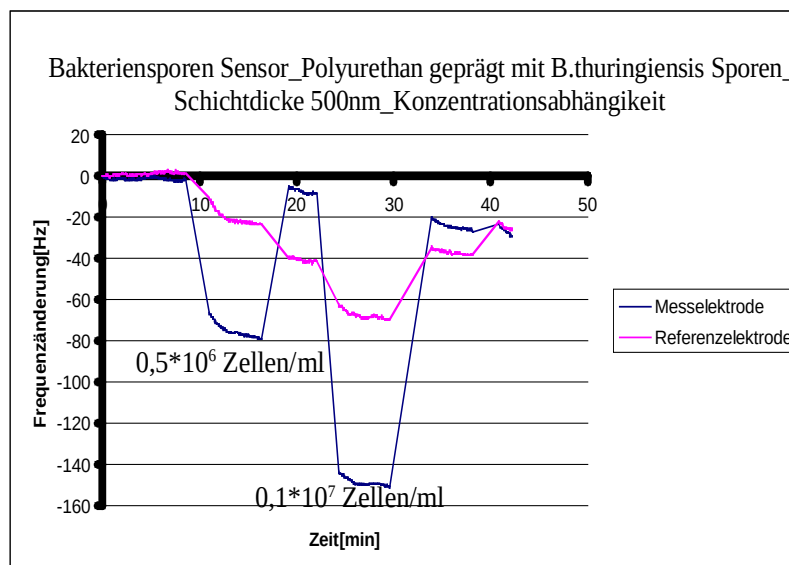
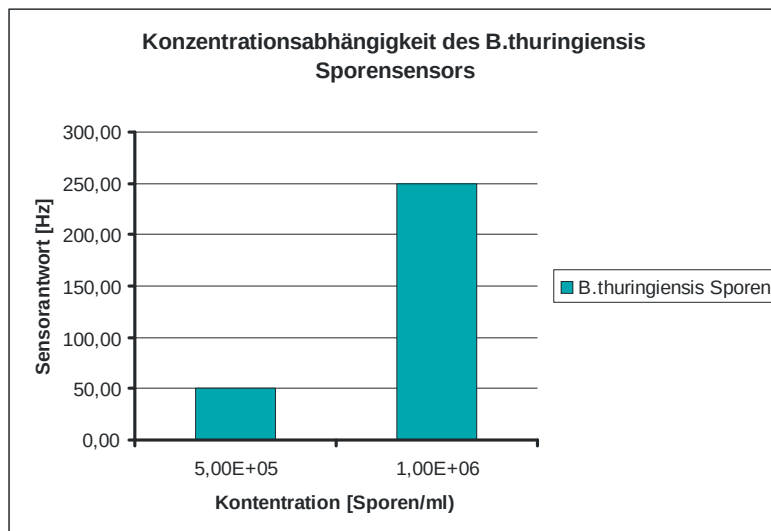


Abb. 87: Bakteriensporen Sensor; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 500 nm, Templat: B.thuringiensis Sporen; Messkurve für die Konzentrationsabhängigkeit

Nach dem Einschwingen der sensitiven Schicht (mit *B.thuringiensis* Sporen geprägtes Polyurethan) im Wasser wird eine Sporensuspension mit einer Konzentration von 5×10^5 Partikel/ml in die Messzelle pipettiert. Man erhält eine Frequenzabnahme entsprechend der jeweiligen Massenbeladung des Sensors. Danach wird die Sporensuspension durch mehrmaliges Einspritzen von Wasser ausgewaschen. Dadurch kehrt die Frequenz zur Basislinie zurück (Abb. 87).

Ein Ähnlicher Messvorgang wird für die Konzentration 1×10^6 Partikel/ml wiederholt. Die erhaltenen Sensorantworten für die Konzentration von 5×10^5 Partikel/ml und für die Konzentration von 1×10^6 Partikel/ml sind eine Abnahme in der Frequenz von ca. 80 Hz bzw. 160 Hz. Dieses Ergebnis zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit, wie auch



**Abb. 88: Konzentrationsabhängigkeit des *B.thuringiensis* Sporensensors;
Die Werte beziehen sich auf die Messkurve von Abbildung 87.**

in der Abb. 88 zu sehen ist.

Die nächste Messkurve von *B.thuringiensis* Sporensensor zeigt zusätzlich zu der Konzentrationsabhängigkeit des Sensors auch die Reproduzierbarkeit der Sensorantwort. Die sensitive Schicht des Sensors ist ein 500 nm dickes Polyurethan, das mit *B.thuringiensis* Sporen geprägt ist. Dieselben Konzentrationen wurden zweimal gemessen und die erhaltenen Sensorantworten sind jeweils identisch für die entsprechenden Konzentrationen. Die dazu gehörige QCM Messung ist in der Abb. 89 zu sehen. Die zu messenden Konzentrationen waren 10^5 Partikel/ml, 2×10^6 Partikel/ml und 3×10^6 Partikel/ml, welche die Sensorantworten, in Form von Frequenzerniedrigungen, bzw. von ca. 100 Hz, 200 Hz und 250 Hz ergeben haben.

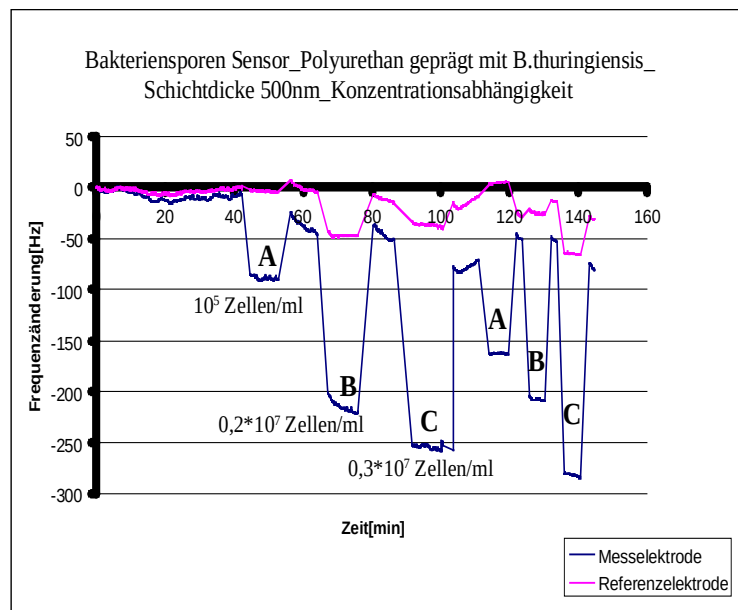


Abb. 89: Bakteriensporen Sensor; sensitive Schicht: Polyurethan mit einer Schichtdicke von 500 nm, Templat: *B.thuringiensis* Sporen; Messkurve für die Konzentrationsabhängigkeit

In Abb. 90 ist die Kalibrierkurve für die Konzentrationsabhängigkeit zu sehen. Der

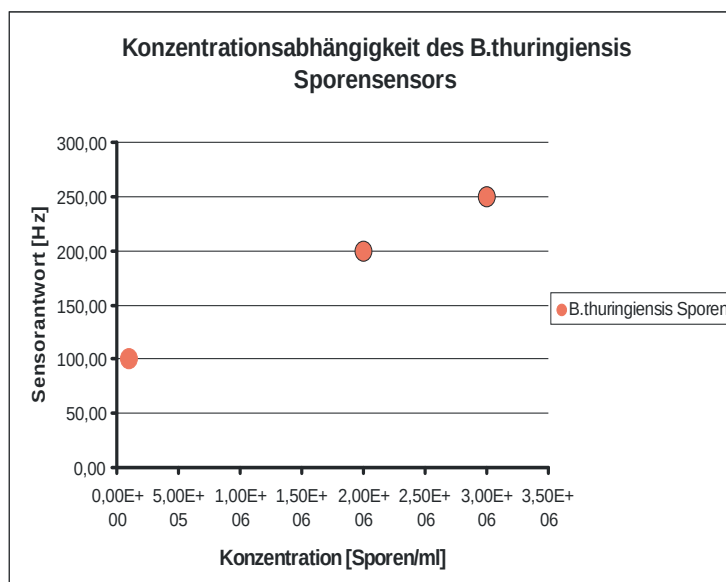


Abb. 90: Kalibrierkurve für Konzentrationsabhängigkeit des Sensors; mit der zunehmenden Konzentration steigt der Sensoreffekt

Verlauf der Kurve zeigt eine Linearität: Je höher die Konzentration desto größer ist die Sensorantwort.

7.2.4. Resümee

Bei diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Nachweis von *Bacillus Thuringiensis* Bakteriensporen in wässrigen Lösungen mit Hilfe von massensensitiven Sensoren möglich ist. Durch mehrmalige Messungen wurde die Reproduzierbarkeit des Messvorgangs bewiesen. Es ist offensichtlich, dass die Bakteriensporen sich in den Kavitäten reversibel ein- und auslagern.

Ein anderer Aspekt war die Querempfindlichkeit des Sensors, wobei gezeigt werden konnte dass die Sensorantwort auf andere Bakterienstämme sehr gering ist. Die Konzentrationsabhängigkeit des Sensors wurde ebenfalls untersucht und mittels Kalibrierungskurve dokumentiert. Mit einem *Bacillus subtilis* Sporensensor ist der Nachweis und die Überwachung der Keimung der Sporen möglich. Unter verschiedenen Konditionen (wie z.B. Variation von Glucosegehalt des Nährmediums) konnte das Wachstum der Bakterien verfolgt werden. Außer Sensormessungen wurden die Bakterien auch mittels AFM und Auflichtmikroskop charakterisiert und das Auskeimen der Sporen mit entsprechenden Bildern bestätigt. Da die äußerste Schicht der Sporen identisch und die Form sowie die Größe der Sporen ähnlich sind, ist das Messprinzip problemlos auf andere Arten der *Bacillus* Sporen übertragbar, da die selben Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der sensitiven Schicht zu erwarten sind. Die Detektion erfolgt mit einem speziellen Polymer für die sensitive Schicht. Die optimalen Polymere für die soft-lithographische Prägung sind die Polyurethane. Die geometrische Form des Templates generiert nach dem Aushärten eine adaptierte Kavität. Das Polyurethan als Sensormaterial für Bakteriensporen bzw. Bakterien wurde aus den Monomeren Diisocyanat und Polyvinylphenol unter Zusatz von Phloroglucin als Quervernetzer synthetisiert. Die Polymer-Zusammensetzung für die Herstellung der sensitiven Schicht wurde ebenso, wie jene für Polyurethan, optimiert.

7.3. Untersuchungen an 5 MHz Quarz

Die massensensitive mikroelektronische Bauteile, auf der Grundlage piezoelektrischer Materialien, können je nach Analysenzweck bzw. Analyten variiert werden. Für QCM Messungen stehen Quarze mit verschiedenen Grundresonanzfrequenzen zu Verfügung. Die wirtschaftliche Herstellungsgrenze liegt bei einer Grenzfrequenz von 20 MHz. Diese sind hoch empfindlich und werden häufig für Spurenanalyse eingesetzt. Für die Untersuchungen an Hefezellen ist eine Alternative bei den QCM (Quartz Crystal Microbalance) Messungen die Verwendung von 5 MHz Quarzen als massensensitiver Teil (Transducer) statt den 10 MHz Quarzen. Durch das Heranziehen von Quarzen mit unterschiedlichen Grundfrequenzen können dispersive Eigenschaften in der Sensorantwort studiert werden. Hier ist insbesondere an Materialeigenschaften der Sensorschicht und Oberflächenmobilitäten der adsorbierten Analyte zu denken. Für diesen Zweck wurden einige Untersuchungen mit 5 MHz Quarzen bezüglich Elektrodendesigns durchgeführt, sowie Netzwerkanalysator Charakterisierungen bis hin zu einfachen QCM Messungen durchgeführt. Ein optimiertes Elektrodendesign ist für ein ausgeprägtes Resonanzsignal mit hohem Signal/Rausch Verhältnis nötig. Es wurden viele verschiedene Elektrodendesigns getestet und dazu gehörige Netzwerkanalysator und QCM Messungen durchgeführt. Bei den Messungen mit 5 MHz Quarzen konnte dieselbe Oszillatorschaltung wie bei den 10 MHz Quarzen verwendet werden. Das Elektrodendesign von 10 MHz Quarze konnte dagegen nicht übernommen werden, da die Resonanzfrequenzen durch die Elektrodenstruktur unterschiedlich beeinflusst werden aufgrund der unterschiedlichen Resonatordicken.

7.3.1. Messergebnisse

Die Untersuchungen wurden mit dem Elektrodendesign von 10 MHz Quarze (dual Elektroden) begonnen. Das Auftragen der Goldelektroden auf dem Quarz wird mittels Siebdruckverfahren realisiert. In der *Abb. 91* ist ein Bild von verwendeten Sieben für die Dualelektroden mit Elektrodendurchmesser von 5 mm zu sehen. Die Elektrodenstruktur (siehe *Abb. 92*) für die verwendeten Siebe wurde mit dem Zeichnungsprogramm (Designer 9.0) erstellt. Der Elektrodenabstand beträgt 2,5 mm. Die *Abb. 93* zeigt eine Netzwerkanalysator Messung einer Elektrode (E1) und die

Abb. 94 der anderen Elektrode (E2) desselben Quarzes. Der Resonanz zeigt bei diesen beiden passiven Messungen keine scharfen Resonanzsignale. Der Grund dafür ist durch die Dämpfungsspektren bedingt.

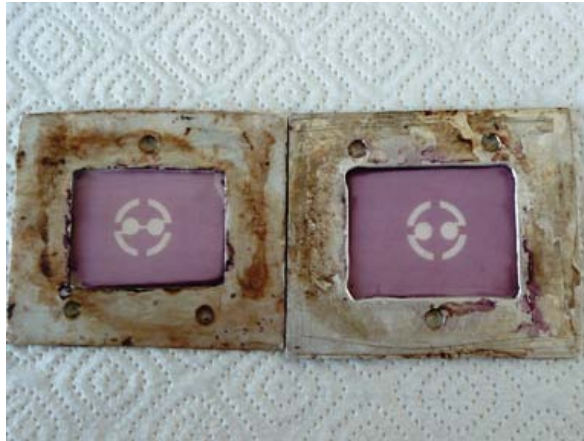


Abb. 91: Verwendete Siebdruckschablonen für die duale Elektrodenstruktur, Elektrodendurchmesser: 5 mm

Elektrodenstruktur:

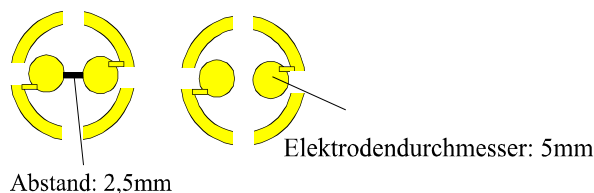


Abb. 92: Goldelektroden; Dualelektroden wie beim 10 MHz Quarz; Elektrodendurchmesser: 5 mm; Elektrodenabstand: 2,5 mm

Die Resonatordicke bestimmt die eigentliche Resonanzfrequenz. Da die 5 MHz Quarze dicker als 10 MHz Quarze sind, sind die Dämpfungen viel höher als beim 10 MHz Quarz. Die Abb. 95 zeigt eine QCM Messung eines 5 MHz Quarzes mit dualen Elektroden (Durchmesser: 5 mm, auf der einen Seite des Quarzes sind die Elektroden verbunden, Elektrodenabstand: 2,5 mm). Das Rauschen dabei ist ca. 20 Hz. Ein niedriges Signal/Rausch Verhältnis im Vergleich zu den Messungen mit 10 MHz Quarz ist zu beobachten. Mit all diesen Messungen ist zu sagen, dass die Dualelektrodenkonfiguration von 10 MHz Quarz für Messungen mit 5 MHz Quarzen aufgrund der hohen Dämpfung und hohem Rauschen nicht übertragbar ist.

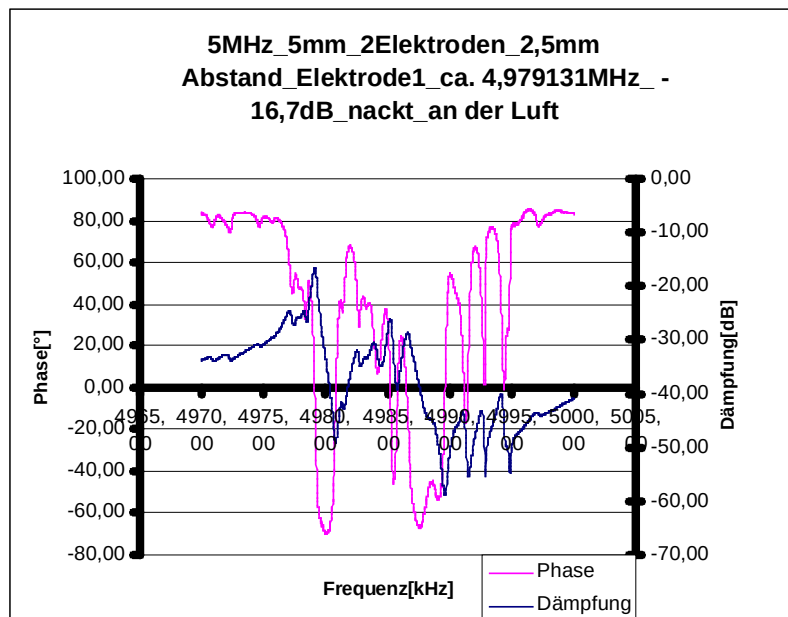


Abb. 93: Dämpfungsspektrum für eine Elektrode eines 5 MHz Quarzes mit 2 Goldelektroden; Elektrodendurchmesser: 5 mm; Elektrodenabstand: 2,5 mm

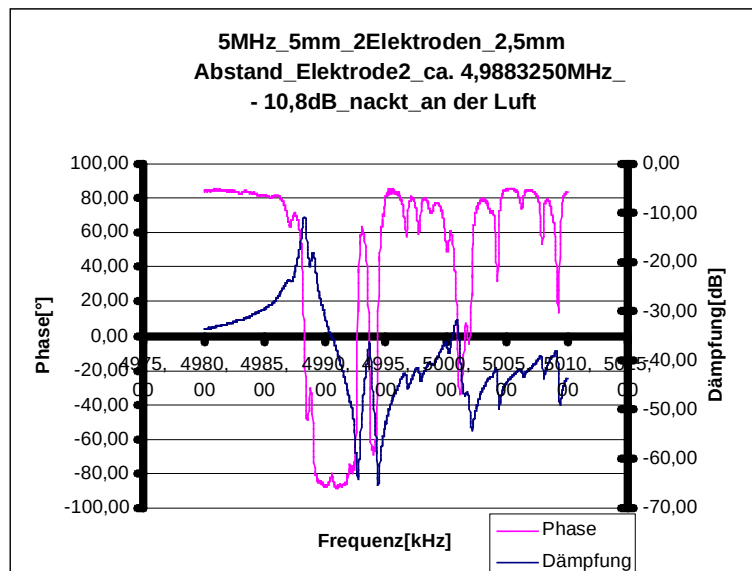


Abb. 94: Dämpfungsspektrum für andere Elektrode eines 5 MHz Quarzes mit 2 Goldelektroden; Elektrodendurchmesser: 5 mm; Elektrodenabstand: 2,5 mm

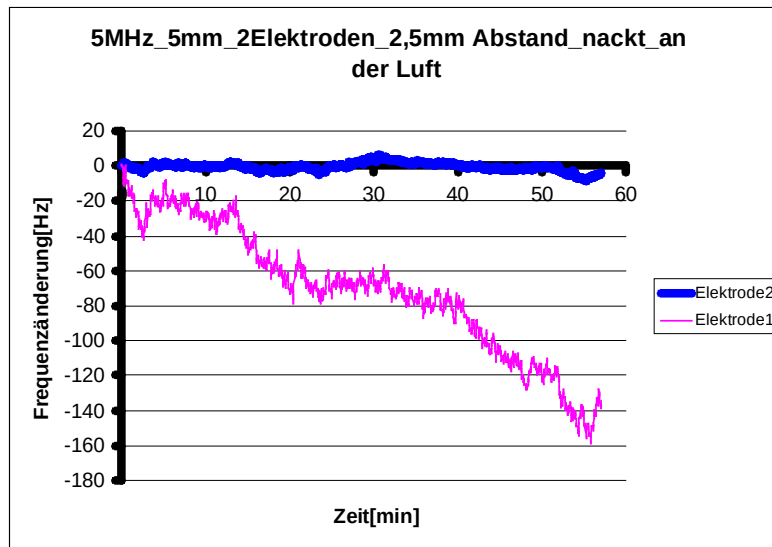


Abb. 95: QCM Messung eines 5 MHz Quarzes mit 2 Goldelektroden; Elektrodendurchmesser: 5 mm; Elektrodenabstand: 2,5 mm

Die nächsten Dämpfungsspektren sind von demselben Quarz nach dem Beschichten der Elektrode1 (E1) mit PVC. Die Abb. 96 zeigt die Netzwerkanalysator Messung von Elektrode1 und Abb. 97 die von Elektrode2.

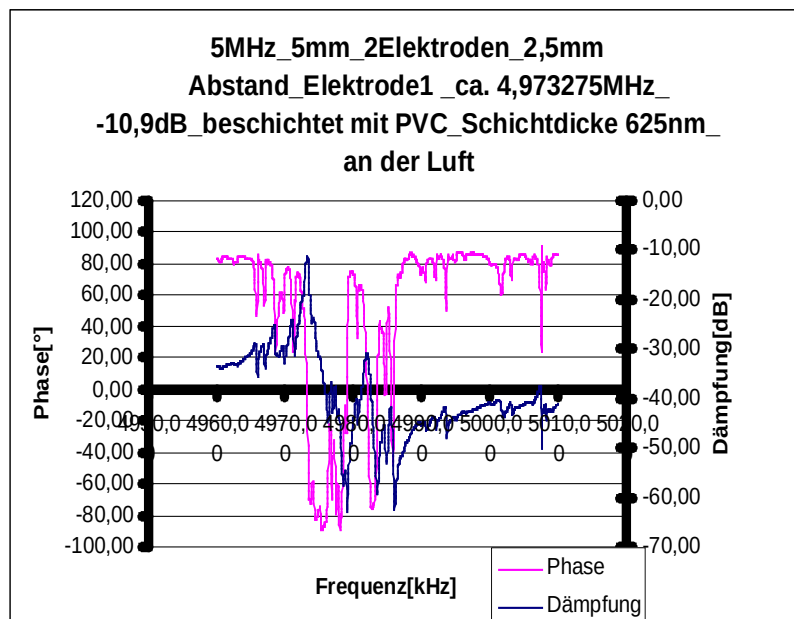


Abb. 96: Dämpfungsspektrum der E1 vom Quarz mit Dualelektroden nach dem Beschichten der Elektrode1 mit PVC

Die Beschichtung der Elektrode1 mit PVC sorgt für einen größeren Frequenzunterschied zwischen beiden Elektroden. Dadurch wurde ein Überlappen der Frequenzen während einer QCM Messung verhindert.

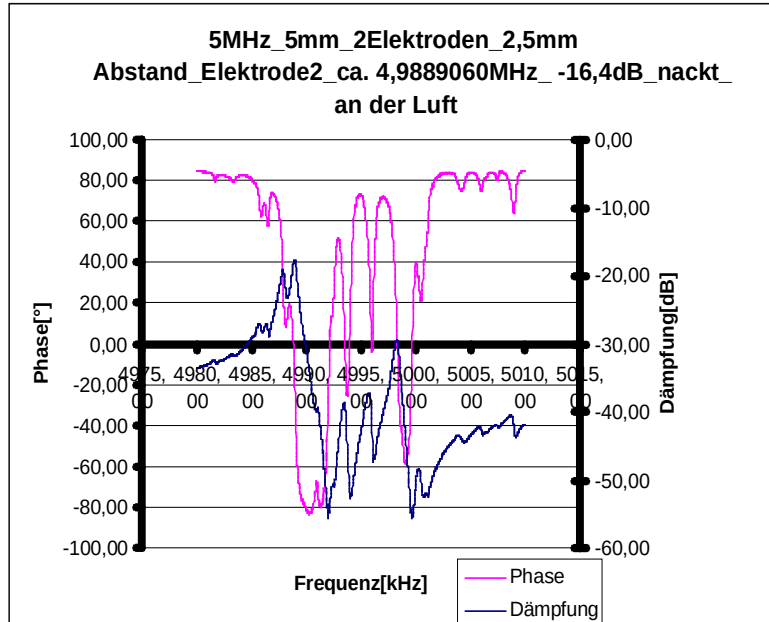


Abb. 97: Dämpfungsspektrum der E2 vom Quarz mit Dualelektroden nach dem Beschichten der Elektrode1 mit PVC

Andererseits wurden das erwünschte Signal/Rausch-Verhältnis und eine scharfe Resonanz nicht erreicht. Das Rauschen liegt wiederum bei ca. 20 Hz. Die QCM

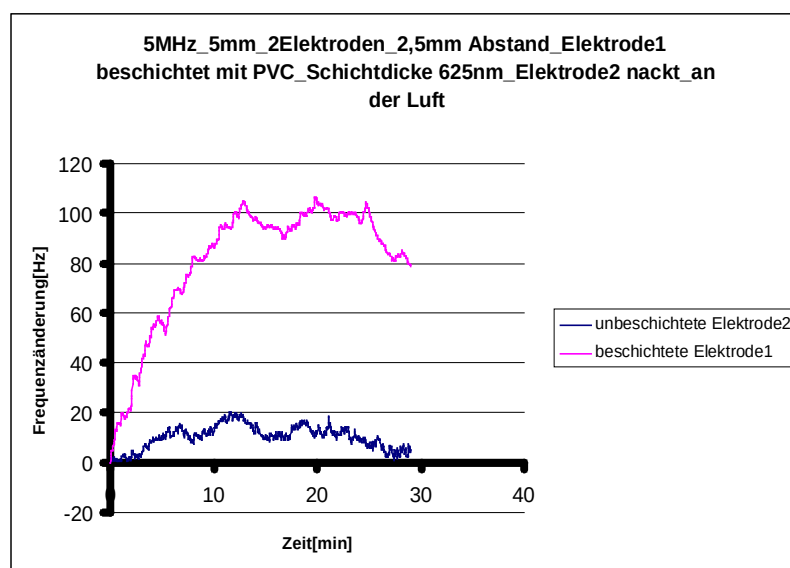
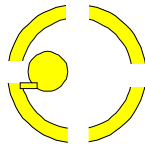


Abb. 98: QCM Messung vom Quarz mit Dualelektroden nach dem Beschichten der Elektrode1 mit PVC

Messung des 5 MHz Quarzes, dessen eine Elektrode mit PVC beschichtet ist, ist in der *Abb. 98* zu sehen. Das Signal/Rausch Verhältnis hat sich gegenüber dem ohne PVC Beschichtung nicht verbessert, ist auch immer noch nicht optimal für eine QCM Messung.

Für eine weitere Test-Messung wurde die eine Elektrode weggelassen, um ein Übersprechen zu verhindern. Die verwendete Elektrodenstruktur ist in der *Abb. 99*

Elektrodenstruktur:



Elektroden Durchmesser: 5mm

**Abb. 99: Eine Goldelektrode an der Seite des Quarzes;
Elektroden Durchmesser: 5 mm**

gezeigt.

In der *Abb. 100* ist die Netzwerkanalysator Messung eines Quarzes mit einer Elektrode an der Seite des Quarzplättchens zu sehen. Das Spektrum zeigt Aufspaltungen und es findet kein Resonanz statt. Dadurch wird die Frequenz während einer QCM Messung von einem Wert zu anderem springen. In der *Abb. 101* ist das Gesamtspektrum und in der *Abb. 102*, *Abb. 103*, *Abb. 104* sowie *Abb. 105* sind die Obertöne von demselben Quarz zu sehen. Bei den Obertönen sind die

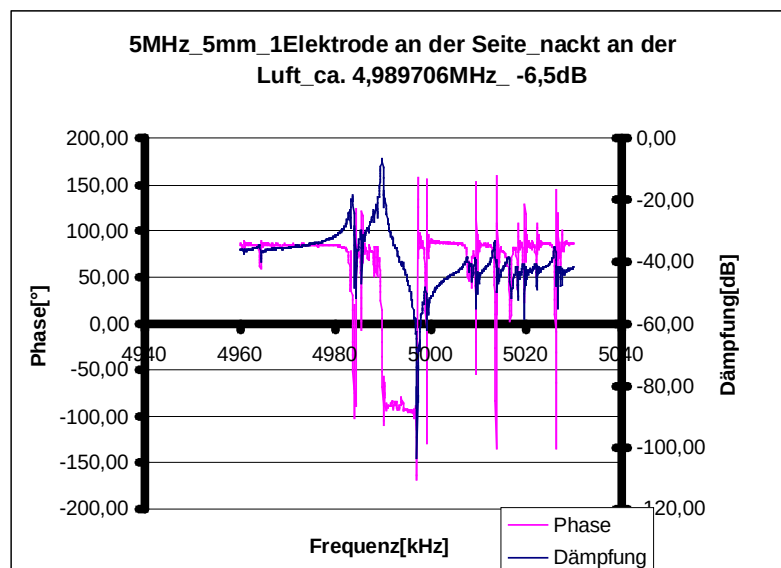


Abb. 100: Dämpfungsspektrum für die Elektrode (an der Seite des Quarzes) eines 5 MHz Quarzes; Elektroden Durchmesser: 5 mm

Resonanzfrequenzen scharf (dies ist aber eine Frage der Auflösung) und die Nebenresonanzen zu intensiv.

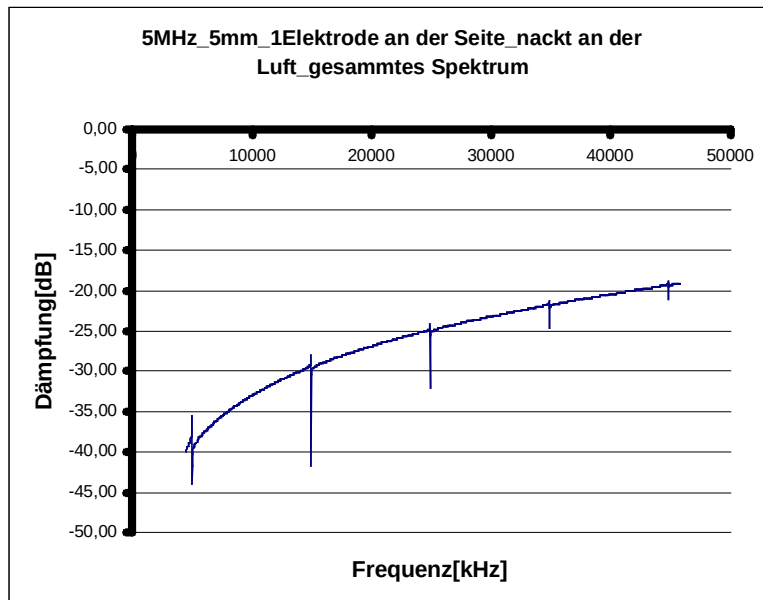


Abb. 101: Das Gesamtspektrum für die Elektrode (an der Seite des Quarzes) eines 5 MHz Quarzes; Elektrodendurchmesser: 5 mm

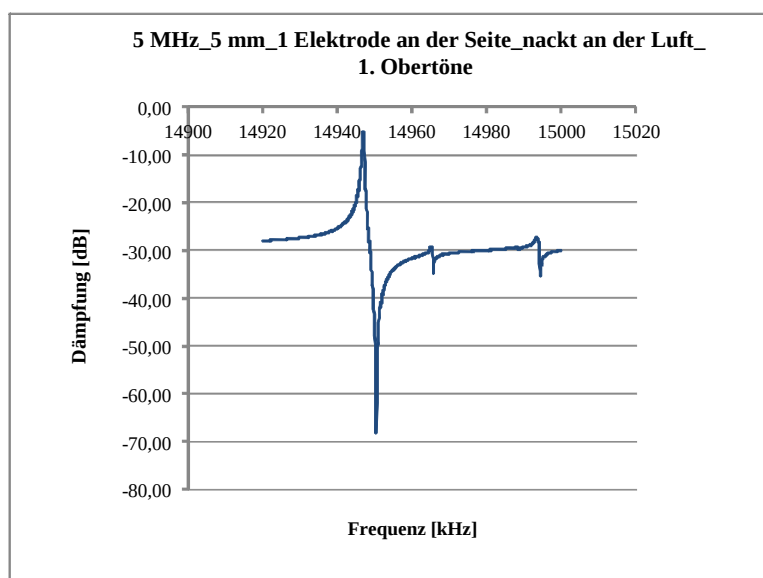


Abb. 102: 1.Obertöne von der Elektrode (an der Seite) eines 5 MHz Quarzes; Elektrodendurchmesser: 5 mm

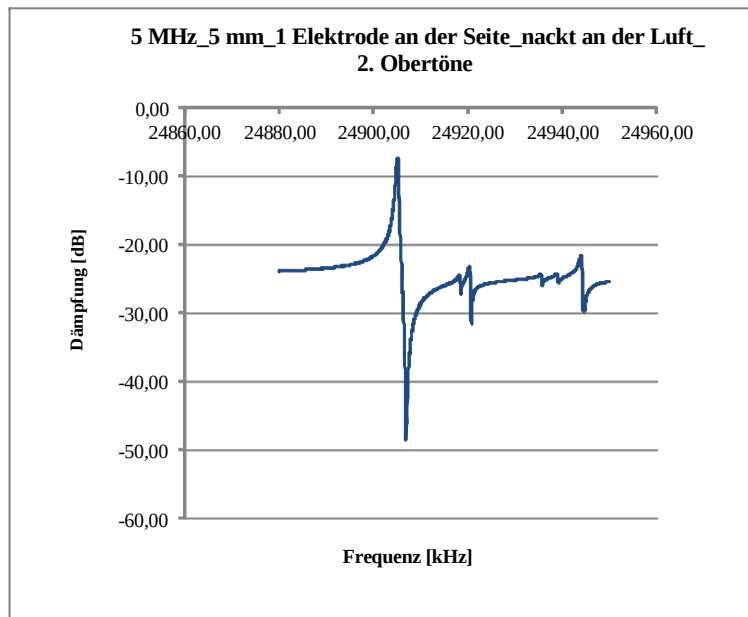


Abb. 103: 2. Obertöne von der Elektrode (an der Seite) eines 5 MHz Quarzes; Elektrodendurchmesser 5 mm.

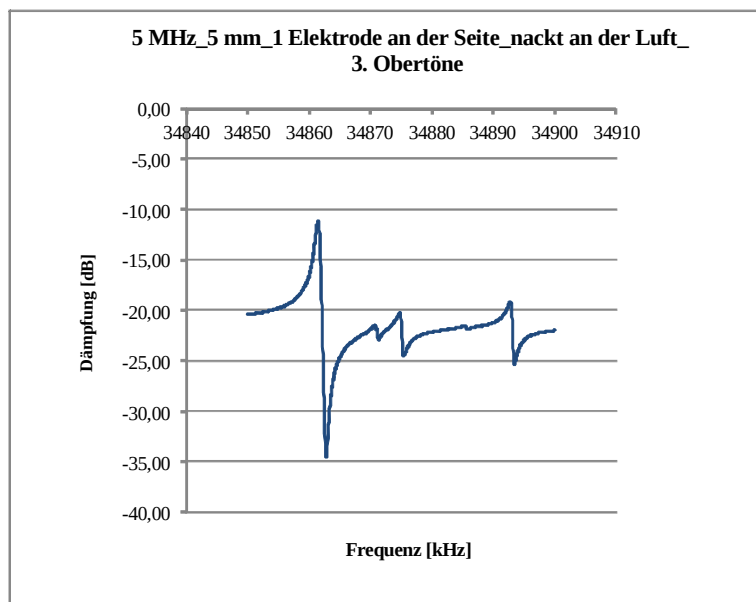


Abb. 104: 3. Obertöne von der Elektrode (an der Seite) eines 5 MHz Quarzes; Elektrodendurchmesser 5 mm.

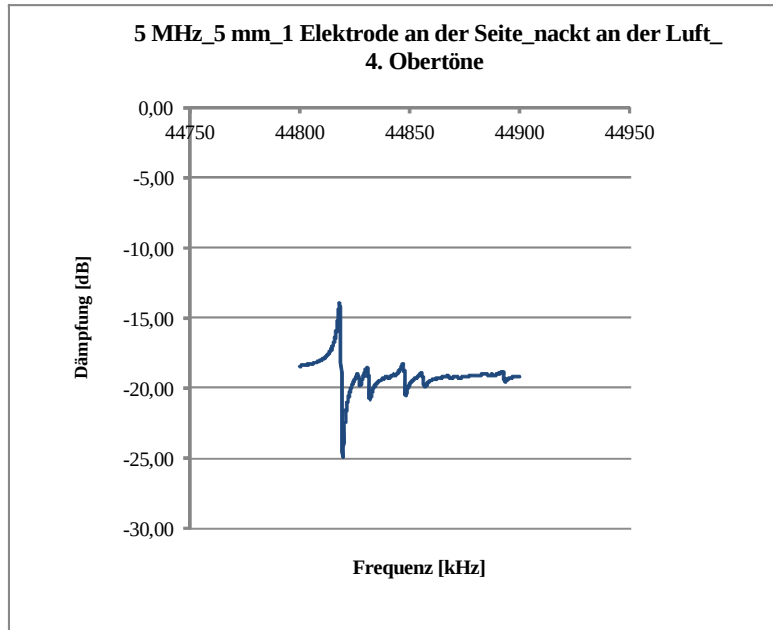


Abb. 105: 4.Obertöne von der Elektrode (an der Seite) eines 5 MHz Quarzes; Elektrodendurchmesser 5 mm.

In der Abb. 106 ist die QCM Messung von einem 5 MHz Quarz, der nur eine Elektrode an der Seite hat, ist zu sehen. Das Rauschen ist ca. 20 Hz. Das Signal/Rausch Verhältnis ist ziemlich niedrig und die Frequenz springt von einem Wert zum

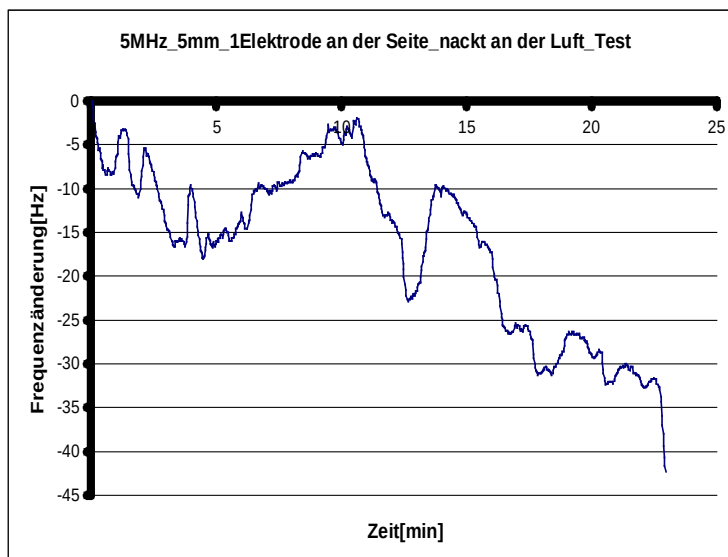


Abb. 106: QCM Messung eines 5 MHz Quarzes mit einer Goldelektrode an der Seite des Quarzes; Elektrodendurchmesser: 5 mm

Anderen. Dieses Verhalten ist aufgrund der hohen Dämpfung aufgetreten.

Zunächst wurde die Elektrodenstruktur, die in der Abb. 107 gezeigt ist, für die Untersuchungen herangezogen. Diesmal wurde eine Goldelektrode mit einem Durchmesser von 5,5 mm in der Mitte des Quarzes platziert. Eine bessere Dämpfung und Phase wurde bei der Netzwerkanalysator Messung beobachtet, wie in der Abb. 108 dargestellt ist. Das Dämpfungsspektrum ergibt eine viel bessere Resonanz als das Dämpfungsspektrum von der Elektrode an der Seite.

Elektrodenstruktur:

Elektroden Durchmesser: 5,5mm

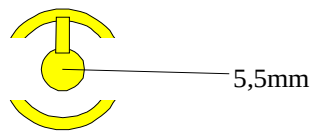


Abb. 107: Eine Goldelektrode in der Mitte des Quarzes; Elektrodendurchmesser: 5,5 mm

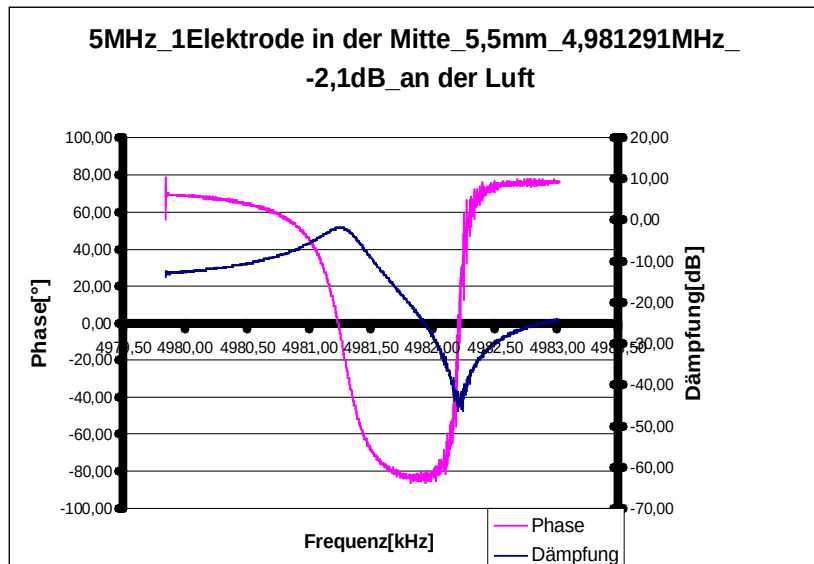


Abb. 108: Dämpfungsspektrum für die Elektrode (in der Mitte des Quarzes) eines 5 MHz Quarzes; Elektrodendurchmesser: 5,5 mm

Die Abb. 109 zeigt die QCM Messung des Quarzes mit einer Elektrode in der Mitte (Elektroden Durchmesser: 5,5 mm). Das Rauschen dabei hat ein Wert von ca. 1 Hz. Mit der verwendeten Elektrodenstruktur hat sich das Signal/Rausch Verhältnis deutlich

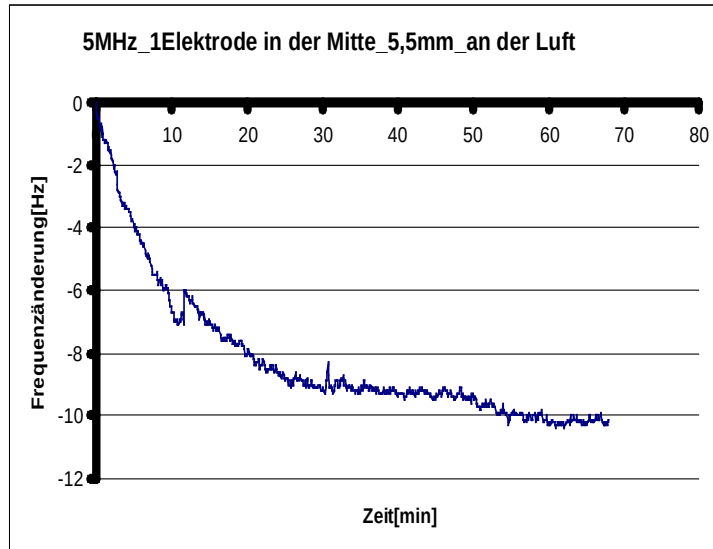


Abb. 109: QCM Messung eines 5 MHz Quarzes mit einer Goldelektrode in der Mitte des Quarzes; Elektrodendurchmesser: 5,5 mm

verbessert.

In der Abb. 110 sind die verwendeten Siebe für die Elektrodenstrukturen in die Mitte des Quarzes veranschaulicht.

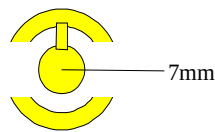


Abb. 110: Verwendete Siebe für die Elektrodendurchmesser 5,5 mm, 7 mm und 9 mm; Elektroden wurden in die Mitte des Quarzes platziert.

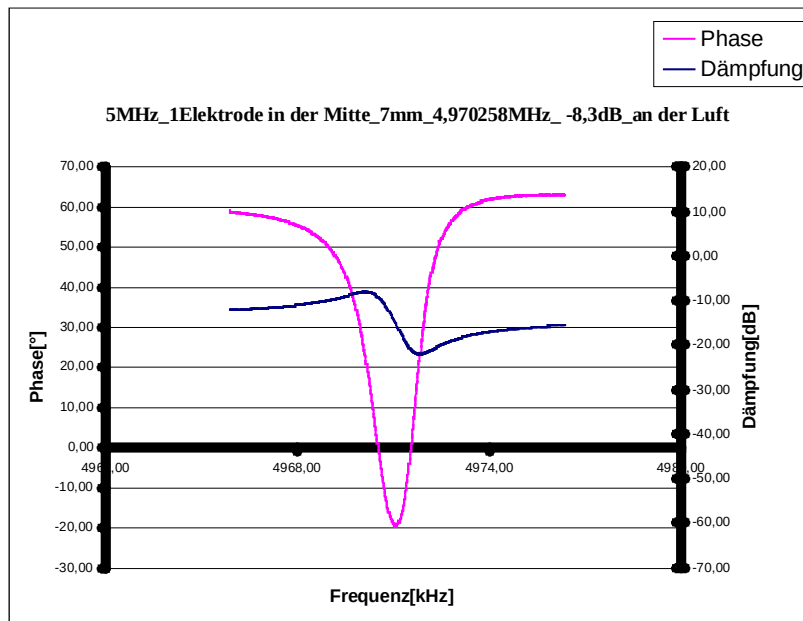
Weiteres wurde ein Quarz mit einer Elektrode in der Mitte des Quarzes mit einem Durchmesser von 7 mm untersucht. Die entsprechende Elektrodenstruktur ist in der *Abb. 111* zu sehen. Das dazu gehörige Dämpfungsspektrum (*Abb. 112*) zeigt eine höhere Dämpfung als Elektroden Durchmesser 5,5 mm. Die QCM Messung ist in *Abb. 113* präsentiert. Das Rauschen ist ca. 10 Hz. Es ist ersichtlich, dass entsprechend hoher Dämpfung auch die Signal/Rausch Verhältnis niedriger geworden ist.

Elektrodenstruktur:

Elektroden Durchmesser: 7mm



**Abb. 111: Eine Goldelektrode in der Mitte des Quarzes;
Elektroden Durchmesser: 7 mm**



**Abb. 112: Dämpfungsspektrum für die Elektrode(in der Mitte)
eines 5 MHz Quarzes; Elektroden Durchmesser: 7 mm**

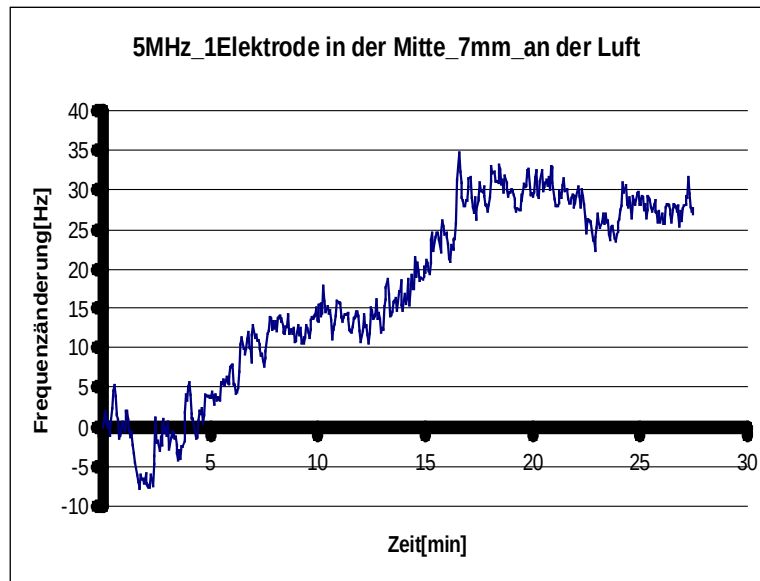


Abb. 113: QCM Messung eines 5 MHz Quarzes mit einer Goldelektrode in der Mitte; Elektrodendurchmesser: 7 mm

Als nächstes wurde der Durchmesser von der Elektrode in der Mitte zu 9 mm erhöht. Das entsprechende Elektrodendesign ist in der *Abb. 114* zu sehen. Das Dämpfungsspektrum (*Abb. 115*) zeigt wiederum eine höhere Dämpfung als Elektrodendurchmesser 5,5 mm. Die Kurve ist flacher als die in dem Dämpfungsspektrum von Elektrodendurchmesser 7 mm, welche eine exakte Frequenzablesung erschwert. Die dazu gehörige QCM Messung zeigt auch kein markante Unterschied zu QCM Messung von Elektrodendurchmesser von 7,7 mm, d.h. keine Verbesserung in Signal/Rausch Verhältnis (*Abb. 116*).

Elektrodenstruktur:

Elektrodendurchmesser: 9mm

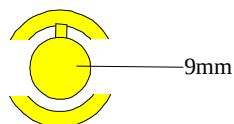


Abb. 114: Eine Goldelektrode in der Mitte; Elektrodendurchmesser: 9 mm

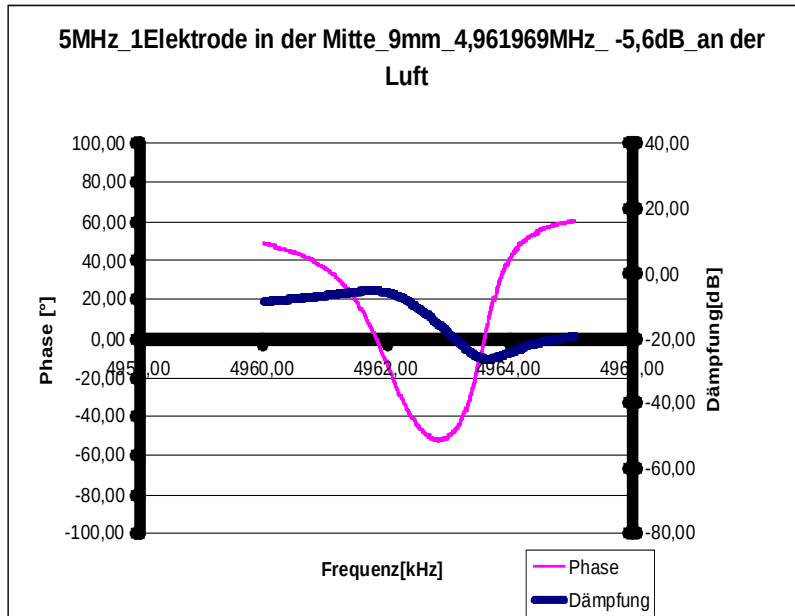


Abb. 115: Dämpfungsspektrum für die Elektrode (in der Mitte) eines 5 MHz Quarzes; Elektrodendurchmesser: 9 mm

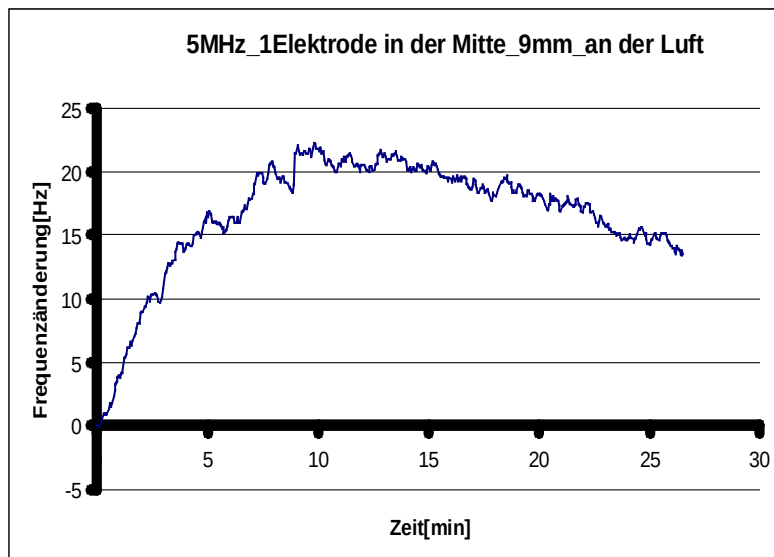


Abb. 116: QCM Messung eines 5 MHz Quarzes mit einer Goldelektrode in der Mitte; Elektrodendurchmesser: 9 mm

7.3.2. Resümee

In der Analytischen Chemie, wie in anderen Disziplinen, ist die beste Möglichkeit die Qualität von Messdaten über Resonanzphänomene zu verbessern, was beispielsweise auch in NMR und ESR durchgeführt wird. Das Grundprinzip dieser Strategie beruht auf den unterschiedlichen Frequenzabhängigkeiten der einzelnen Bauteile. Die Elektroden der QCMs sind im Grunde wie ein Kondensator aufgebaut. Die Qualität eines Quarzes wird vor dessen Einsatz mittels Netzwerkanalysator geprüft. Dieses Gerät speist innerhalb einer bestimmten (variierbaren) Spannweite Frequenzen ein und liest die Dämpfung und Phasenverschiebung aus. Dadurch wird ein sogenanntes Dämpfungs- oder Phasenspektrum erhalten. Eine geringe Dämpfung bedeutet ein hohes Ausgangssignal, welches in Bezug auf Auslesen der Frequenz und Signal/Rausch Verhältnis wünschenswert ist, und ein Maß für die Güte des jeweiligen Bauteils ergibt. Bei den Untersuchungen wurde das Elektrodendesign für den 5 MHz Quarz variiert, um ein verbessertes Signal/Rausch Verhältnis zu erreichen. Durch Verwendung von 5 MHz Quarzen als Transducer können dispersive Phänomene bezüglich der Sensorsignale analysiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Struktur als auch die Größe der Elektroden das Frequenzverhalten des Sensors stark beeinflussen. Es wurde versucht durch Änderung des Elektrodendesign ein hohes Signal/Rausch Verhältnis, was für ein QCM Messung unverzichtbar ist, ermöglichen. Für jede untersuchte Elektrodenstruktur wurden dazu gehörige Dämpfungsspektren aufgenommen und jeweils eine QCM Messung durchgeführt. Die erste Elektrodenstruktur die angewandt wurde war ein duales Elektrodendesign, was aber nicht optimal für einen 5 MHz Quarz war. Da die beiden Elektroden sich bei 5 MHz stärker beeinflussen aufgrund der Dicke des 5 MHz Quarzes, war es unmöglich eine exakte Frequenzauslese für die beiden Elektroden. Dann wurde einer der Elektroden weg gelassen und wurde nur eine Elektrode an der Seite des Quarzes getestet. Das Ergebnis war nicht besser als duale Elektrodenstruktur. Als nächstes wurden Elektroden mit Durchmessern von jeweils 5,5 mm, 7 mm und 9 mm in der Mitte des Quarzes platziert. Obwohl alle drei Elektrodenstrukturen ein verbesserte Signal/Rausch Verhältnis ergeben haben, war die Elektrodenstruktur mit einem Durchmesser von 5,5 mm am besten geeignet für die QCM Messungen und ergab ein sehr geringes Rauschen. Die größeren Elektroden (7 mm und 9 mm) ergeben höhere Dämpfungen wegen der stark ausgeprägten Randeffekten.

8. Zusammenfassung

Das Interesse an Sensoren, auch den universell anwendbaren massensensitiven Transducerprinzipien, ist in der Bioanalytik in den letzten Jahren stark angestiegen. Bioimprinting Strategien (MIPs) spielen hierbei eine sehr wichtige Rolle, da so die Natur nachgeahmt wird. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Generierung von chemisch sensitiven Schichten für Chemosensoren mittels molekularen Prägens. So können Bioanalyte in der Größe von wenigen Nanometern bis hin zu einigen μm analysiert werden. In diesen Dimensionen werden hier bevorzugt Polyurethanschichten strukturiert und mit 10 MHz Quarzen als Transducer kombiniert. Bei massensensitiven Sensoren, wie der Name anzeigt, wird die Massenbeladung als Messgröße über eine Frequenzänderung charakterisiert. Dieser Zusammenhang wird durch die Sauerbrey Gleichung beschrieben. Danach ist die beobachtbare Frequenzerniedrigung, bedingt durch die Massenbeladung, dem Quadrat der Resonanzfrequenz proportional. Die Voraussetzung für diesen Zusammenhang ist die Rigidität der Sensorschicht. In dieser Arbeit soll aufgezeigt werden, wie Zellen über Oberflächenmobilitäten zu einem komplexeren Verhalten führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit massensensitiven Methoden die Detektion von Bioanalyten, wie Hefen, Sporen und Bakterien mit Polymer beschichteten QCMs (Quartz-Crystal- Microbalance) in Flüssigphase durchgeführt. Insbesondere war der Mechanismus der Inklusion des Analyten in die geprägten Polymeren von Interesse. Hierbei spielen geometrische Anpassungen gemäß der Wirt-Gast Chemie, als auch enthalpische Wechselwirkungen zwischen Analyt und Schicht eine Rolle.

Die Hefen spielen eine bedeutende Rolle in der Biologie und Medizin, vor allem aber in der Biotechnologie. Mit Hefensensoren kann das Wachstum und die Vermehrung der Zellen "on-line" in Abhängigkeit des Nahrungsangebots verfolgt werden. Zum Erzielen eindeutiger Ergebnisse und der detaillierten Analyse individueller Zelleigenschaften wurden synchrone Zellen gezüchtet. Dabei wurden z. B. Doppelzellen (mit *N*-Hydroxyharnstoff synchronisierten Hefezellen) oder auch andere Zelltypen für die Stempelprägung generiert. Als Schichtmaterial wurde Polyurethan verwendet, das aus den Monomeren Diisocyanaten und Bisphenol A unter Zusatz von Quervernetzern, wie Phloroglucinol synthetisiert wurde. Der Mechanismus der Inklusion wurde am

Beispiel des wichtigsten Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* sowie die einzelnen Stadien in dessen Zellzyklus diskutiert. Die Sensoren wurden über die gravimetrischen Messungen auf Sensitivität, Selektivität, sowie Kreuzselektivität und Reproduzierbarkeit getestet. Je nach Schichtdicke des Polymers, Entwicklungsstadium des Templats, bzw. des Analyten findet man einen Sauerbrey oder Anti-Sauerbrey Effekt, d. h. eine Frequenzerniedrigung oder Erhöhung. Für eine optimale Prägung wurde eine Schichtdicke zwischen 0,7-2 μm gefunden, um eine reversible Ein- und Auslagern der Zellen in die sensitive Schicht zu garantieren. Prägt man die Sensorschichten bei geeigneter Schichtdicke mit Doppelzellen, so beobachtet man bei der Detektion von Einzelzellen das ungewöhnliche Phänomen einer Frequenzerhöhung, d. h. eines Anti-Sauerbrey-Effekts. Dieser Befund kann durch Oberflächenmobilitäten der Einzelzellen in den Doppelkavitäten erklärt werden. Bei höheren Analytkonzentrationen findet jedoch eine Agglomeration der Zellen statt, was dann zur Mobilitätsreduzierung führt. Auf diese Weise kann der Antisauerbrey- in einen Sauerbrey-Effekt übergehen. Dieser Effekt ist auch aufgrund enthalpischer Effekte von der Schichtdicke abhängig. Eine zukünftige Analyse dieser Befunde kann auch über die Dispersion der Resonanzfrequenz durchgeführt werden, wozu für 5 MHz QCMs der Elektrodenentwurf diskutiert wurde.

Das Gefahrenpotential und Missbrauch der Bakterien, wie z.B. Einsatz für terroristische und kriegerische Zwecke, erfordert eine rasche Vorort-Detektion mit Sensoren. Hier ist vor allem der Schnellauchweis von Krankheitserregern wie z.B. *Bacillus Anthracis* hervorzuheben. Diese Sensoren für Bakterien und Sporen basieren ebenfalls auf Oberflächenprägetechniken. Die untersuchten Analyte sind *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus Subtilis* Sporen bzw. Bakterien. Diese fungieren als Modellorganismen für den *Bacillus anthracis* (Milzbranderreger), der in einem konventionellen Labor ohne spezielle Schutzmaßnahmen nicht untersucht werden kann. Mit einem QMB Sensor wurden beide *Bacillus* Arten erfolgreich nachgewiesen. Sowohl die Sporen als auch die Bakterien wurden bezüglich Querselektivität und Konzentrationsabhängigkeit mit speziell geprägten QCM-Sensoren detektiert. Sowohl klassische Mikroskopie als auch AFM ermöglicht die Sprossung zu verfolgen. Der QCM-Sensor lässt die "on-line" Überwachung der Sporensprossung als Funktion der Zeit zu. So kann die Verfolgung des Auskeimens der Sporen in Abhängigkeit des Nährmediums analysiert werden.

9. Summary

A growing interest for bioanalytics concerning sensors was observed in the last years. This is also true for the universally applicable mass-sensitive transducer principles. Bioimprinting strategies (MIPs) play an important role, since nature mimicking is performed in this way. The thesis presented deals with the generation of chemically sensitive coatings for chemical sensors by molecular imprinting. Thus, bioanalytes can be analyzed in sizes of a few nanometers up to some μm . Here, polyurethane layers can be patterned in these dimensions, followed by combining them with 10 MHz quartz transducers. The mass load is characterized by frequency response of these sensors, as indicated by the name. The Sauerbrey equation describes this relation, cited. The frequency diminishing observed is directly proportional to the mass load and the square of the operating frequency, respectively. The requirement for the relation is the rigidity of the coating. This thesis will discuss in which way cells will lead to a more complex behavior according to surface mobility.

Within the scope of this thesis, detection of bioanalytes such as yeast, spores and bacteria were performed by polymer coated QCMs (Quartz-Crystal- Microbalance) in liquid phase. Especially, the mechanism of analyte inclusion into the imprinted polymers was evaluated. Hereby, the geometrical adaption according to both host-guest and chemistry and enthalpic interactions between analyte and coating are important.

Yeast cells play an important role in biology and medicine, especially in biotechnology. Yeast sensors enable us to monitor "on-line" the growing of these cells as function of nutrition. Synchron cells were cultured to gain unambiguous results and detailed analysis of individual cell properties. For this purpose, e. g. double cells (synchronized yeast cells by hydroxy urea) or some other cell types were generated for stamp imprinting. Polyurethane was used as coating material, which was synthesized of the monomers, diisocyanates and bisphenol A under the addition of cross linkers such as phloroglucinol. The mechanism of inclusion was discussed in the case of the important model organism *Saccharomyces cerevisiae* and their different stages in the cell cycle. The sensors were tested via their gravimetric responses in respect to sensitivity, selectivity, cross-selectivity and reproducibility. Sauerbrey or anti-Sauer-

brey effects, i.e. a frequency diminishing or its enhancement, are observed according to gravimetric measurements in dependence of the layer height, the development stage of the template and the analyte, respectively. An optimized layer height between 0.7-2 μm was found, to guarantee a reversible cell inclusion into the coating and split off. If the sensor layers are printed with double cells in a suitable height an unusual phenomenon will be observed in the case of detecting single cells according to frequency enhancement, i.e. an anti-Sauerbrey effect. This finding can be explained by surface mobility of the single cells in the double cavities. Agglomeration of cells will occur at higher analyte concentrations which will lead to a reduction of mobility. In this way, the anti-Sauerbrey will have a transition to Sauerbrey effect. This finding is dependent on layer height due to enthalpic interactions. Future analysis of these investigations can be followed by the dispersion of the operating resonance frequency. For this purpose, the electrode design for MHz QCMs was discussed.

The hazard potential and misuse of bacteria, e.g. use for terroristic and military purposes, challenges the development of sensors for the application in the field. It should favor the rapid analysis of pathogens, e.g. *Bacillus Anthracis*. These sensors for bacteria and spores are also based on surface imprinting. The analytes investigated were spores and bacteria of *bacillus thuringiensis* and *bacillus subtilis*. These bioanalytes act as model organisms for *bacillus anthracis* (Anthrax), which is not allowed to be analyzed in conventional laboratories without special procedural safeguards. Both spores and bacteria were detected in respect of cross-sensitivity and concentration dependency with selectively imprinted QCM-sensors. The budding of the spores can be monitored by classical microscopy and AFM. The QCM-sensor allows the "on-line" monitoring of budding as function of time. In this way, such a process can also to be optimized in respect to the culture medium.

10. Anhang

10.1. Nährmedien und Pufferlösungen

Das Nährmedium für *Saccharomyces cerevisiae* ist von *Tabelle 5* zu entnehmen.

	Konzentration [g/l]
Hefeextrakt	3
Proteose Pepton (enzymatic hydrolysate)	5
D-(+)- Glucose	10
(Malzextrakt	3)

Tabelle 5: YPD Nährmedium in H₂O bzw. PBS

Das Nährmedium für *Bacillus subtilis* Sporen ist in *Tabelle 6* angegeben.

	Konzentration [g/l]
NaCl	10
Hefeextrakt	5
Proteose Pepton (enzymatic hydrolysate)	10
D-(+)-Glucose	10

Tabelle 6: Nährmedium für *B.subtilis* Sporen in H₂O bzw. PBS

Pufferlösung:

	Konzentration [g/l]
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

Tabelle 7: PBS (Phosphate-buffered Saline), pH: 7,4

10.2. Geräte

Zentrifuge /Heraeus, Biofuge RS 28

Zentrifuge /Eppendorf, Centrifuge 5702

Ofen /Heraeus, Thermicon P

Netzwerkanalysator /HP 8752 C, 300 kHz – 1,3 GHz

Frequenzzähler /HP 53131 A

AFM Nanoscope IIIa, Extented Multimode (digital instruments)

Auflichtmikroskop /Wild Heerbrugg M3Z

10.3. Chemikalien

Bisphenol-A (99+%, Aldrich, 239658), Phloroglucin (99%, Fluka, 1284747 24506215), Diphenylmethan-4,4`diisocyanat (Merck, 8.20797.0100), Tetrahydrofuran (99,8%, Merck, 1.09731.2500), Pyridin (99,5%, Merck, 1.09728.0500), NaCl (AppliChem, A2942, 5000), $C_6H_{12}O_6$ (Merck, 1.04074.1000), KH_2PO_4 (Merck, 1.04873.1000), $(NH_4)_2SO_4$ (Merck, 1.01217.1000), Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich), SDS (Fluka), KCl, HCl (37%, Merck, 1.00317.2500), HNO_3 (65%, VWR, 20429.320), Aceton, Ethanol (99,8, Merck), H_2O_2 (30%, Merck), Pepton (Sigma), Malzextrakt (Sigma), Yeast extract (Sigma), *N*-Hydroxyurea (AppliChem).

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Serpil CAN

Geboren am: 9. März 1981, Istanbul/Türkei

Familienstand: Verheiratet

Kinder: 1 Tochter

Einreise nach Österreich: 10.09.2005

Bildungsweg

1987–1995 Volksschule + Hauptschule, Osmangazi İlköğretim

1995–1999 Cemberlitas Mädchengymnasium mit Schwerpunkt Englisch

2000–2005 Chemie-Studium, Istanbul-Uni, Fakultät für Ingenieurwesen
Abschluss – Bakkalaureat

2006–2009 Masterstudium Chemie, Uni Wien

2009-2012 Doktoratstudium Chemie, Uni Wien

Berufliche Erfahrung

Juli-August 2003 Praktikum im biochemischen Labor, Eyüp Krankenhaus, Istanbul

Juli-August 2006 Praktikum im Qualitätssicherungslabor, Fa. Laufen, Wilhelmsburg

Sprachkurse

2003–2005 6 Deutschkurse zu je zwei Monate, Goethe-Institut, Istanbul

Oktober 2005– Deutschkurs, Wiener Internationale Hochschulkurse, Uni-Wien

Februar 2006 Abschluss - Mittelstufe Zertifikat

März 2006– Deutschkurs, Ibis Acam, St.Pölten

Juli 2006

Besondere Kenntnisse

Sprachen Türkisch, Deutsch, Englisch

12. Literaturverzeichnis

- [1] F. L. Dickert, P. A. Lieberzeit, Chemosensors in Environmental Monitoring: Challenges in Ruggedness and Selectivity, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 467, **2009**.
- [2] E.M. Logothetis, Automotive Oxygen Sensors, *Chemical Sensor Technology*, Vol. 3(Hrsg. N. Yamazoe), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 89-104, **1991**.
- [3] S. Matsuura, *Sensors Actuators B*, 13-14, 7-11, **1993**
- [4] M. Nanfo, G. Guilbault, *Analytical Chemistry*, 46, 1769, **1974**.
- [5] O. Hayden, D. Podlipna, X. Chen, S. Krassnig, A. Leidl, F.L. Dickert, Nanolithography and Subnanomolecular Interactions for Biomimetic Sensors, *Materials Science and Engineering C*, 26, 924-928, **2006**.
- [6] M. Jenik, A. Seifner, P. A. Lieberzeit, F.L. Dickert, Pollen-imprinted Polyurethanes for QCM Allergen Sensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394, 523-528, **2009**.
- [7] M. Jenik, R. Schirhagl, C. Schirk, O. Hayden, P. A. Lieberzeit, D. Blaas, G. Paul, and F.L. Dickert, Sensing Picornaviruses Using Molecular Imprinting Techniques on a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.*, 81, 5320–5326, **2009**.
- [8] U. Latif, A. Mujahid, A. Afzal, R. Sikorski, P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert, Dual and Tetraelectrode QCMs Using Imprinted Polymers as Receptors for Ions and Neutral Analytes, *Anal Bioanal Chem* 400, 2507–2515, **2011**.
- [9] A. Seifner, P. A. Lieberzeit, C. Jungbauer, F. L. Dickert, Synthetic Receptors for Selectively Detecting Erythrocyte ABO Subgroups, *Analytica Chimica Acta* 651, 215–219, **2009**.
- [10] R. Schirhagl, U. Latif, D. Podlipna, H. Blumenstock and F. L. Dickert, Natural and Biomimetic Materials for the Detection of Insulin, *Anal. Chem.*, [dx.doi.org/10.1021/ac201687b](https://doi.org/10.1021/ac201687b), **2012**.
- [11] R. Schirhagl, U. Latif and F. L. Dickert, Atrazine Detection Based on Antibody Replicas, *J. Mater. Chem.* 21, 14594–14598, **2011**.
- [12] S. Yaqub, U. Latif, F. L. Dickert, Plastic Antibodies as Chemical Sensor Material for Atrazine Detection, *Sensors and Actuators B* 160, 227– 233, **2011**.

-
- [13] F. L. Dickert, *Chemie in unserer Zeit* 3, 138-143, **1992**.
- [14] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingmann, IUPAC Discussion Paper, Commission V.I, Juli **1989**.
- [15] P. Hauptmann, *Sensoren – Prinzipien und Anwendungen*, 1. Auflage, Hanser Verlag München , 101-131, Wien **1990**.
- [16] R. Nießer, *Chemische Sensoren – Prinzipien und Anwendung*, Analytiker Taschenbuch (Hrsg. Borsdorf), Akademie Verlag, 55-87, Berlin **1987**.
- [17] F.L. Dickert, A. Haunschild, *Advanced Materials* 12, 887-895, **1993**.
- [18] M. Niewenhuizen, A. Venema, *Mass-sensitive Devices*, *Sensors- A Comprehensive Survey Vol. 2*, VCH- Verlag (Hrsg. W. Göpel, J. Hesse, J. N. Zemel), 647-680, Weinheim **1991**.
- [19] F. Oehme, *Chemische Sensoren heute und morgen*, 1. Auflage, Expert Verlag, Renningen-Mannheim **1994**.
- [20] *Invisible Enemies of Agriculture*, *Courier Agrochem*, 2, 13-14, **2000**.
- [21] Dimitri Ivnitcki, Ihab Abdel-Hamid, Plamen Atanasov, Ebisam Wilkins, *Biosensors for detection of pathogenic bacteria*, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 599-624, **1999**.
- [22] D. L. Robertson, S. H. Leppla, *Molecular cloning and expression in Escherichia coli of the lethal factor gene of Bacillus anthracis*, *Gene* 44(1), 71-8, **1986**.
- [23] F. L. Dickert, O. Hayden, P. A. Lieberzeit, C. Haderspöck, R. Bindeus, C. Palfinger, *Nano- and Micro-Structuring of Sensor Materials – from molecule to cell detection*, *Synth. Mat.*, 138, Iss. 1-2, 65-69, **2003**.
- [24] W. Kleber, *Einführung in die Kristallographie*, 17. Auflage, Verlag Technik Berlin, 178-188, **1990**.
- [25] O. Hayden, P. A. Lieberzeit, D. Blaas and F. L. Dickert, *Artificial Antibodies for Bioanalyte Detection - Sensing Viruses and Proteins*, *Adv. Funct. Mater.*, 16, 1269–1278, **2006**.
- [26] R. Schirhagl, P. A. Lieberzeit and F. L. Dickert, *Chemosensors for Viruses Based on Artificial Immunoglobulin Copies*, *Adv. Mater.*, 22, 2078–2081, **2010**.
- [27] Michael T. Madigan, John M. Martinko, Brock *Mikrobiologie*, 11. überarbeitete Auflage, Pearson Studium Verlag, München, 425-429, **2006**.

-
- [28] F. L. Dickert, P. A. Lieberzeit, M. Jenik, A. Seifner, Pollen-Imprinted Polyurethans for QCM Allergen Sensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 523-528, **2009**.
- [29] R. Wiegel, D.P. Morgen, J.M. Owens, A. Ballato, K.M. Lakin, K. Hashimoto, C.C.W. Ruppel, Microwave acoustic materials, devices and applications, *IEEE Transactions on* Volume 50, Issue 3, 738-749, March **2002**.
- [30] F.L. Dickert und O. Schuster, Piezoelektrische Chemosensoren von der Adsorption zur molekularen Erkennung mit Wirt-Gast-Chemie, *Chemie in unserer Zeit*, 28, 147 – 152, **1994**.
- [31] F. L. Dickert and A. Haunschild, Sensor Materials for Solvent Vapor Detection Donor-Acceptor and Host-Guest Interactions, *Adv. Mater.*, 5, 887 – 895, **1993**.
- [32] A.R. West, Grundlagen der Festkörperchemie, 1.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim New York Cambridge Basel, 371-372, **1992**.
- [33] B. Neubig und W. Briese, Das große Quarzkochbuch, Franzis-Verlag, Feldkirchen **1997**.
- [34] W. Briese, Schwingquarze, ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik, Vistas Verlag, 5-108, Berlin **1985**.
- [35] G. Sauerbrey, Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Z. Physik* 155, S 206-222, **1959**.
- [36] CD Römpp Chemielexikon, 9. Auflage auf CD-Rom, Version 1.0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- [37] K. K. Kanazawa, J. G. Gordon, The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid, *Anal. Chem. Acta*, Volume 175, 99-105, **1985**.
- [38] R. Lucklum and P. Hauptmann, The Quartz Crystal Microbalance, Mass Sensitivity, Viscoelasticity and Acoustic Amplifications, *Sensors and Actuators B, Chemical*, Volume 70, 1-3, 30-36, **2001**.
- [39] F.L. Dickert, O. Hayden, S. Krassnig, K.-J. Mann, Biomimetic ABO Blood-Group Typing, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 2626, **2006**.
- [40] G.C. Dunhem, N. H. Benson, D. Petelenz and J. Janata, Dual Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem.* 67, 267-272, **1995**.
- [41] F. L. Dickert, K. Halikias, Sensors Based on Fingerprints of Neutral and Ionic Analytes in Polymeric Materials, *Sensors and Actuators B* 3768, 1-4, **2001**.

-
- [42] M. Rodahl, F. Höök and B. Kasemo, QCM Operation in Liquids- An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity, *Anal. Chem.* 68, 2219-2227, **1996**.
- [43] M. Polreichova, U. Latif and F. L. Dickert, Functionalized Polymers as Receptors for Detection of Cells, *Aust. J. Chem.*, 64, 1–5, **2011**.
- [44] T. Toshifumi, J. Haginaka, Separation and Sensing Based on Molecular Recognition Using Molecularly Imprinted Polymers, *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications*, 728, 1, 1-20, **1999**.
- [45] F.L. Dickert, M. Reif, H. Reif, Molecular Modelling of Host-Guest Interactions for Mass Sensitive Chemical Sensors, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352, 620, **1995**.
- [46] F. Vögtle, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, New York **1991**.
- [47] F.L. Dickert, P. Schuster, *Supramolecular Detection of Solvent Vapour with Calixarenes: Mass-Sensitive Sensors, Molecular Mechanics and BET Studies*, *Microchim. Acta*, 119(1-2), 55-62, **1993**.
- [48] F.L. Dickert, A. Bauer, The Detection of Halogenated Hydrocarbons via Host-Guest Chemistry – a Mass Sensitive Sensor Study with QMB and SAW Devices, *Adv. Mater.* 3(9), 436-438, **1991**.
- [49] F.L. Dickert, A. Haunschild, M. Reife, W. Bulst, Sensors for Organic Solvent Detection in the ppm Range Based on Diow[6.1.6.1]paracyclophanes – from Molecular Modeling to Analyte Recognition, *Adv. Mater.* 5(4), 277-279, **1993**.
- [50] O. Hayden, C. Haderspöck, S. Krassnig, X. Chen and F. L. Dickert, Surface imprinting strategies for the detection of trypsin, *Analyst*, 131, 1044–1050, **2006**.
- [51] F. L. Dickert, O. Hayden, Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases. Selective Detection of Yeast with Imprinted Polymers, *Analytical Chemistry* 74, 1302-1306, **2002**.
- [52] H. – G. Elias, *Makromoleküle*, Band 2, 5. Auflage, Hüthig&Wepf Verlag Basel. Heidelberg. New York, **1992**.
- [53] E. Oesterschulze, The Potential of the Scanning Probe Microscopy For Thin Film Characterization, *Surface and Coatings Technology*, Volume 97, Issues 1-3, 694-706, **1997**.

-
- [54] H. Stroppe, Physik für Studenten der Natur- und Ingenieurwissenschaften, 13. Auflage, FV Leipzig, 467, **2005**.
- [55] G. Binning and H. Rohrer, Scanning Tunneling Microscopy, Surface Science, Volume 126, Issues 1-3, 236-244, **1983**.
- [56] O. Hayden, R. Bindeus and F.L. Dickert, Combining Atomic Force Microscope and Quartz Crystal Microbalance Studies for Cell Detection, Meas. Sci. Technol. 14, 1876-1881, **2003**.
- [57] N. K. Myshkin, A. Ya. Grigoriev, S. A. Chizhik, K. Y. Choi and M. I. Petrokovets, Surface Roughness and Texture Analysis in Microscale, Wear, Volume 254, Issue 10, 1001-1009, **2003**.
- [58] I. Horcas et al. Rev. Sci. Instrum. 78, 013705, **2007**.
- [59] D.J. Müller and K. Anderson, Biomolecular Imaging Using Atomic Force Microscopy, Trends in Biotechnology, Volume 20, 8, 45-49, **2002**.
- [60] K.D. Jandt, Atomic Force Microscopy of Biomaterial Surfaces and Interfaces, Surface Science, 491, 405-420, **2001**.
- [61] www.swiss-composite.ch
- [62] M. N. Hall and P. Linder, The Early Days of Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY **1992**.
- [63] Alberts, Bruce, Lewis, Raff, Roberts und Walter, Molekularbiologie der Zelle(Übersetzung von L. Jaenicke), 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim **2004**.
- [64] H. Weber, Allgemeine Mykologie, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, **1993**.
- [65] M.T. Madigan und J.M. Martinko, Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, Pearson Studium, München 2006.
- [66] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin and S. G. Oliver, Life with 6000 Genes, Science 274, 546-552, **1996**.
- [67] A.M. Neiman, Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69, 4, 565-584, **2005**.
- [68] C. Taxis, P. Keller, Z. Kavagiou, L. J. Jensen, J. Colombelli, P. Bork, E. H. K. Stelzer and M. Knop, Spore Number Control and Breeding in *Saccharomyces Cerevisiae*- A Key Role for a Self-Organizing System, J. Cell. Biol., 171, 4, 627-640, **2005**.

-
- [69] C. Shimoda, Forespore Membrane Assembly in Yeast, Coordinating SPBs and Membrane Trafficking, *J. Cell Sci.*, 17, 389-395, **2004**.
- [70] V. Farkas, Polysaccharide Metabolism, in: A. H. Rose, J. S. Harrison, *The Yeasts*, New York, Academic Press, 37-366, **1989**.
- [71] www.marienfeld-superior.com/2007/information-zaehlkammer
- [72] F. L. Dickert, P. A. Lieberzeit, Rapid Bioanalysis with Chemical Sensors: Novel Strategies for Devices and Artificial Recognition Membranes, *Anal. Bioanal. Chem* 391, 1629, **2008**.
- [73] C. Zimmer, *Microcosm.- E-coli and the New Science of Life*, Arrow Bks., Juli **2009**.

