



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

**Escherichia Coli Bakterien als Modellsystem zur „on-line“ Verfolgung
biologischer Bedrohungen mit Sensoren**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften

Verfasserin/Verfasser :	ZHOU Yamin
Matrikel Nummer:	0348510
Studienrichtung:	Chemie (A419)
Betreuerin/Betreuer :	O. Univ. Prof. Dr. F. L. Dickert
Wien, am	5. Nov. 2009

给我的父母

Vorwort

Diese Arbeit entstand in der Zeit von März 2009 bis Oktober 2009 in der Leitung von o. Univ. Prof. Dr. F. L. Dickert am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Währinger Straße 38 1090 Wien, Austria.

Dankliste

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle vor allem

Herrn Prof. F. L. Dickert für die Unterstützung meiner Arbeit,
allen meinen Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft, die hervorragende Arbeitsatmosphäre, insbesondere Herrn Mag. Paul Grillberger und Herrn Mag. Alexander Biedermann, sowie Frau Mag Serpil Can, die mir am Anfang meiner Arbeit viel geholfen hat.

Ich bedanke mich auch bei der Europäischen Kommission für die Finanzierung im Rahmen des Nanosecure-Projekts.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern und meinem Onkel, die mir immer Kraft und Mut geben und mir dieses Studium ermöglichen, meiner besten Freundin hier in Wien: Chunyan, und den Freundinnen in China, Xiaohui Liu, Liang Jiao und Zhenhong Cai

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung.....	11
2. Theoretischer Hintergrund	13
2.1 Chemische Sensoren	13
2.1.1 Aufbau eines chemischen Sensors	13
2.1.2 Anforderungen an chemische Sensoren	14
2.1.3 Anwendungsbereich der chemischen Sensoren	15
2.2 Piezoelektrischer Effekt.....	16
2.3 Quarz als piezoelektrisches Material	18
2.4 Schwingquarz	21
2.5 Prinzipien der massensensitiver Detektion.....	24
2.5.1 Einfluss von Flüssigkeit auf die Resonanzfrequenz.....	26
2.5.2 Die Parameter der verwendeten Schwingquarze.....	27
2.6 Rezeptorstrategien	27
2.6.1 Rezeptorsprinzip.....	28
2.6.2 Molekulares Pr ägen.....	29
2.7 <i>E. coli</i> als Analyt.....	31
2.7.1 Biologie von den <i>E. coli</i> Bakterien	31
2.7.2 Zellteilung von <i>E. coli</i> Bakterien	31

2.7.3	Klassifikation von <i>E. coli</i>	32
2.8	Rastersondenmikroskopie	34
2.8.1	das Prinzip von Rastersondenmikroskopie	35
2.8.2	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	36
2.9	UV/Vis- Mikroskop	38
3.	Experimenteller Teil	39
3.1	Elektrodendesign.....	39
3.2	Herstellung von Elektroden	40
3.3	Aufbringen und Prägung der Polymerschicht	42
3.4	Aufbau der Messaparatur	46
3.5	Aufzucht der <i>E. coli</i> Bakterien	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Konzentrationsabhängigkeit des Sensoreffekts.....	52
4.2	Über der Anfangskonzentration	54
4.3	Über dem Nährstoff	57
5.	Zusammenfassung.....	61
5.1	Deutsch.....	61
5.2	Englisch.....	62
6.	Anhang	64
6.1	Geräte.....	64
6.2	Chemikalien.....	64

7. Literaturverzeichnis	65
Lebenslauf.....	70

1. Einleitung und Zielsetzung

Ein Sensor ist ein Fühler, der physikalische oder chemische Eigenschaften von der Umgebung erfassen kann. Unsere Nase ist zum Beispiel ein Sensor, der zwischen erheblichen chemischen Substanzen unterscheiden kann, und gleichzeitig eine grobe Vorstellung von „Quantität“ bis zu einer sehr niedrigen Grenze geben kann. Analog funktioniert ein chemischer Sensor so, dass er unter chemischen Reaktionen einzelne Analyten qualitativ und quantitativ bestimmt. Darum lassen sich die chemischen Sensoren als künstliche Nasen oder Zungen auffassen. Unter der Tendenz der *Miniaturisierung* und der *Dezentralisierung* spielen in moderner Analytik die chemischen Sensoren immer wichtigere Rolle. Vor allem in Industrie und Umweltanalytik sind sie von großer Bedeutung, wie zum Beispiel beim Überwachen von Luftfeuchtigkeit, bei den Untersuchungen von Giften in der Luft.

⁽¹⁾ Heutzutage ist niemand verzweifelt, dass sich Sensoren bald an vielen Stellen in unserem alltäglichen Leben befinden werden. ⁽²⁾⁽³⁾

Die Chemosensoren spielen auch in der Prozesskontrolle eine wesentliche Rolle, da sie für die „On-line“ Messungen ⁽⁴⁾ gut geeignet sind. Und nach der Entwicklung der molekular geprägten Polymeren, die fast für jeden Analyten generiert werden können, ist es ermöglicht, dass unsere Chemosensoren die Zellen bzw. die Mikroorganismen in der Biologie detektieren, ⁽⁵⁾ wie zum Beispiel den Wachstumsprozess von beliebigen Mikroorganismen. Darüber hinaus können auch die biologischen Reaktionen, die relevant mit den Mikroorganismen sind, mittels unserer Chemosensoren gemessen werden.

In dieser Arbeit soll die Überwachung vom Bakterium *Escherichia Coli* (Entdecker: Theodor Escherich) durchgeführt werden. *Escherichia Coli* ist in der Molekularbiologie am meisten verwendeter Forschungsgegenstand. Die Isolierung

eines einzelnen Gens wurde zum ersten Mal von *E. coli* gelangen. Deswegen hat *E. coli* in der Biotechnologie eine wesentliche Bedeutung. *E. coli* ist Teil der Darmflora. Es teilt sich sehr schnell, so dass das Wachstum anderer Keim, die dem Körper schaden können, gehemmt wird. Außerdem ist *E. coli* als ein Symbol für Verschmutzung des Grundwassers in Wasser-Aufbereitung und Reinigung an großer Bedeutung. Gerade in der Medizin und Industrie kann die Kontrolle vom Wachstum des *E. coli* 's eine entscheidende Rolle spielen.

In dieser Arbeit sollen die *E. coli* Bakterien zuerst in Minimalnährmedium gezüchtet werden, und dann unter UV/Vis Mikroskop beobachtet werden. Anschließend wurde die Vermehrung von denen unter Einsatz von Quarzmikrowaagen (*engl.* Quartz Crystal Micro Balance QCM) gemessen. Dabei sollte unter der Variation von Anfangskonzentrationen *E. coli* 's bzw. von Zugaben einiger Nährstoffe der Einfluss der Nährmedien zum *E. coli* Wachstum untersucht werden.

Da *E. coli* sowohl in der Biotechnologie und auch in der Umweltanalytik eine besondere Rolle spielt, ist deren Erforschung von großer Bedeutung.



Abbildung 1: 3D Bild von Escherichia coli Bakterien

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Chemische Sensoren

Chemische Sensoren sind mininaturierte Messwertfühler, die eine chemische Antwort in elektrisches Signal umwandeln können. Ein chemischer Sensoren ist „a device which responds to a particular analyte in a selective way through a chemical reaction and can be used for the qualitative or quantitative determination of the analyte“.

2.1.1 Aufbau eines chemischen Sensors

Ein chemischer Sensor ⁽⁶⁾ besteht aus drei wesentlichen Teilen: ⁽⁷⁾ einem Erkennungselement, meistens einer sensitiven Schicht, einem Transducer und einer elektrischen Datenverarbeitungseinheit. Das Erkennungselement ist die entscheidende Komponente für jeden Sensor. Es ist verantwortlich für die Selektivität, die einem Sensor die selektive chemische Antwort für die jeweilige chemische Substanz ermöglicht, sodass die Interferenzen von anderen Substanzen vermieden werden. ⁽⁸⁾ Der Transducer wandelt die chemischen Signale in eine dazu direkt proportionale Größe, die leicht lesbar ist, um. Die Transducers unterteilen sich in folgende vier Arte: elektrochemische Transducers, wie zum Beispiel voltametrische, potentiometrische oder FET- basierte Sensoren ⁽⁹⁾, die optischen Transducers; die piezo-elektrischen darunter die *Surface Acoustic Wave* Einheiten (SAW-Devices) und die thermischen Sensoren. In dieser Arbeit dienen sich die Schwingquarze als piezoelektrischer Transducer.

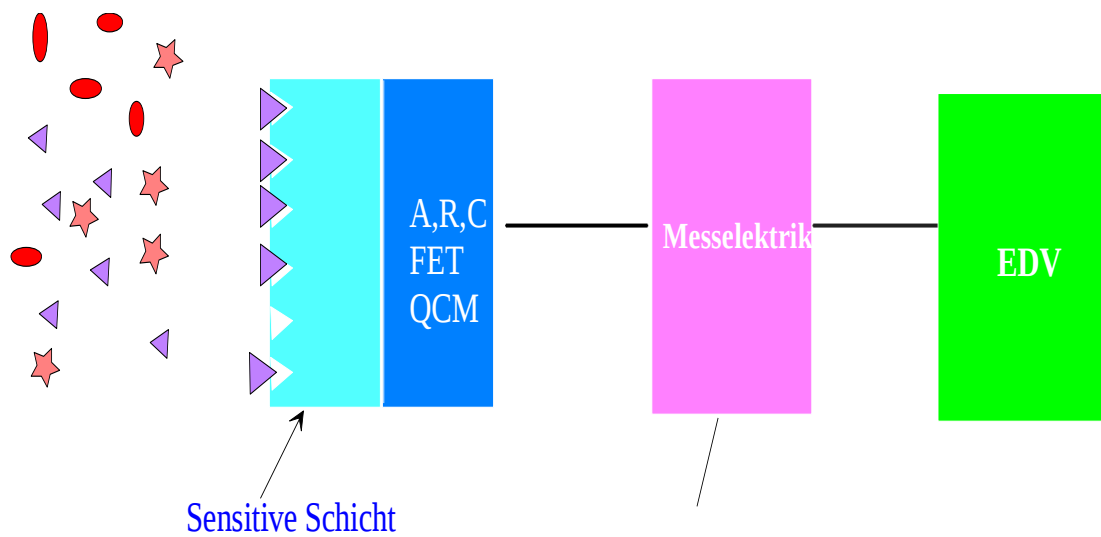


Abbildung 2: schematische Darstellung eines chemischen Sensors

2.1.2 Anforderungen an chemische Sensoren

Wenn eine neue Technik entwickelt ist, müssen die Kriterien, mit denen die Leistungsfähigkeit dieser Technik bestimmt werden kann, definiert und immer wieder verbessert werden. Ein optimaler Chemosensor bezeichnet sich dadurch aus:

(10) (11)

- Hohe Selektivität der chemischen Schicht für eine Substanz oder eine Gruppe
- Hohe Sensitivität und niedrige Nachweisgrenze
- Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Messeffekte
- Hohe Stabilität der sensitiven Schichte
- Kurze Response-Zeit
- Günstige Kosten
- Minaturierbarkeit

In meiner Arbeit werden die massensensitiven Transducer eingesetzt, wobei sich die molekular gepr ägte Schicht als Erkennungselement darauf befindet. Durch die spezifische Interaktion zwischen der Schicht und dem Analyten, kommt es zu einer Massen änderung auf den Sensormaterialien, die dann durch den Transducer in ein elektrisches Signal umwandelt wird.

2.1.3 Anwendungsbereich der chemischen Sensoren

Die Chemosensoren werden meistens in drei Gebieten weit eingesetzt. Das wichtigste Gebiet ist allerdings die Gesundheitspflege. Die Messungen wie zum Beispiel von Blut ⁽¹²⁾, Gasen, Ionen, zeigen den metabolischen Zustand von den Patienten. Solche Messungen, welche in einem medizinisch analytischen Laboratorium einige Stunden oder sogar Tage dauern, können in Anwendung von der sogenannten ‚*on the spot*‘ Sensoren in Minuten ermöglicht. Die modernen smart Sensoren, die beispielsweise auf ‚Field-Effekt Transistors‘ (FET) basieren können, kombinieren die Detektion mehrerer Analyte ⁽¹³⁾. Dies gilt besonders für den Fall von Ionensensoren für Natrium, Kalium, Calcium und pH-Wert.

Ein weiterer Bereich, wo die Chemosensoren eine wichtige Rolle spielen, ist die Kontrolle von industriellen Prozessen, besonders die sogenannte ‚*on-line in real time*‘ Kontrolle ⁽¹⁴⁾. Heutzutage wird die on-line Monitoring ⁽¹⁵⁾ hauptsächlich verwendet für die Messungen von pH- Werten, Karbondioxid- und Sauerstoff-Mengen. Dennoch werden die neu entwickelten Sensoren auch für die Überwachungen von einer großen Auswahl von direkten Reagenzien und Produkten wie Zuckern, Hefen, Alkoholen, phenolischen Verbindungen, so wohl unerwünschten Beiprodukten, eingesetzt ⁽¹⁶⁾. Im Allgemeinen sind die Chemosensoren in Lebensmittel- und Getränke-Industrie von großer Bedeutung. In

dieser Arbeit wurde massensensitive Sensoren für die on-line Messungen vom E. coli Bakterien Wachstum angeordnet.

In der Umweltanalytik lassen sich die Chemosensoren in vielen Bereichen einsetzen⁽¹⁷⁾. Im Wasser kann man mit denen, zum Beispiel BOD⁽¹⁸⁾ (biochemical oxygen demand), die Azidität, Nitrate, Phosphate, Fluoride, Calcium und die Salinität (den Salzgehalt) bestimmen, während die Pestizide, Düngungsmittel und die industriellen und häuslichen Abfälle aufwendigere Analysen erfordern. Kontinuierliche real-time Monitoring hat hier eine besondere Bedeutung für die Beobachtung von ökologischen Umgebungen. Die Analyten können ohnehin bis zum ppb Bereich nachgewiesen werden. Die Biosensoren sind von den chemischen Sensoren abgeleitet, welche auf der Immobilisierung der biologisch aktiven Erkennungssysteme auf einem Transducer basieren⁽¹⁹⁾. Als Erkennungselement wird in einem Biosensor ein biologisches System benutzt, wie Enzyme, Antikörper und sogar Mikroorganismen^{(20) (21)}.

2.2 Piezoelektrischer Effekt

Im Jahre 1880 wurde es von den Curie Brüdern entdeckt, dass anisotrope Kristalle, i. e. diejenigen ohne Symmetriezentrum, wie zum Beispiel Quarz⁽²²⁾ und Turmalin, unter mechanischen Stressen wie Druck, Torsion oder Zug ein elektrisches Signal aussenden. Dieses Phänomen beruht sich darauf, dass die elektrischen Schwerpunkte der anisotropen Kristalle durch mechanische Verformung verschoben werden. Makroskopisch wird ein Dipol generiert. Und dies wird als piezoelektrischer Effekt⁽²³⁾ (kurz: Piezoeffekt; von Griechisch piezo oder piezein, drücken, pressen) bezeichnet. Als reziproker piezoelektrischer Effekt bezeichnet man die lineare Verformung des Festkörpers als Folge einer Anlegung von einer äußeren Spannung. Die Anlegung einer Wechselspannung führt zu einer periodischen Umpolung des Piezomaterials, d. h., das Piezomaterial beginnt zu

schwingen. Im Resonanzfall schwingt der Festkörper mit einem Maximum der Schwingungsamplitude, und diese sogenannte Resonanzfrequenz wird kaum von außen Bedingungen wie zum Beispiel Temperatur, beeinflusst, nur aber relevant mit den Materialeigenschaften, und daher nennt man die Messtechnik, die auf Piezoeffekt basiert ist, immer eine robust Methode.

Die massensensitiven QCM-und SAW-Transducer sind in ihrer Funktionsweise auf den oben beschriebenen Effekten basiert.

Bei SAW⁽²⁴⁾ „surface acoustic wave“ wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer akustischen Welle zwischen zwei Elektroden gemessen. Die zwei Elektroden befinden sich an den gegenüberliegenden Enden des piezoelektrischen Substrates (Abbildung 3). Die Ausbreitungsgeschwindigkeit wird durch die Änderung der viskosen, elastischen und elektrischen Eigenschaften des Substrates bzw. von den gekoppelten Schichten, die selektive zu einem bestimmten Analyten sind, beeinflusst. Außerdem beeinflusst die Temperatur auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle. Die SAW-Transducer fordern deswegen eine strengere Messbedingung (thermostatisch), und daher nicht so universell eingesetzt wie QMB-Einheiten, obwohl sie normalerweise eine niedrigere Nachweisgrenze besitzt.

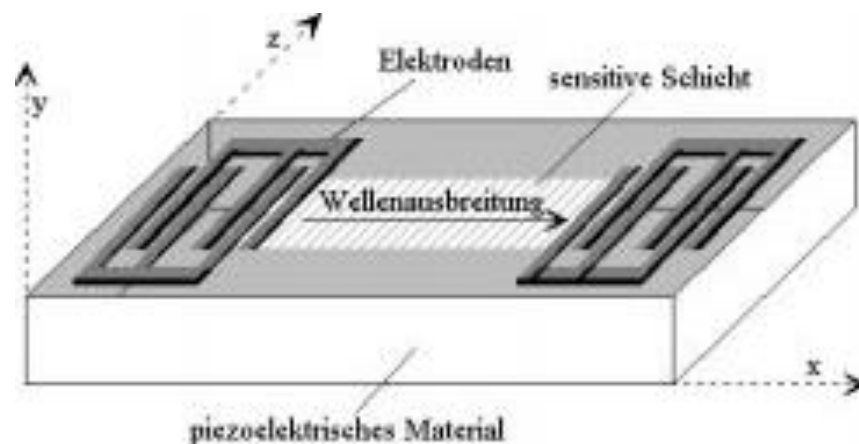


Abbildung 3: SAW Bauteil

2.3 Quarz als piezoelektrisches Material

In den analytisch-chemischen Messungen verwendet man in den meisten Fällen Quarz als piezoelektrisches Material. Quarz⁽²²⁾ kommt in der Natur mit einer Zusammensetzung von SiO_2 vor. Die bis 573°C stabile α -Modifikation des Quarzes besitzt eine dreizählige Achse und senkrecht dazu drei zweizählige Achsen, polare Symmetrieachsen. Sie gehört der trigonalen Kristallklasse der Raumgruppe $P3_221$. Diese α -Modifikation ist die wichtigste Form für die technische Anwendung. Diese Modifikation wird bei höheren Temperaturen in die β -Modifikation umwandeln, welche in der technischen Anwendung nicht ausgenutzt werden kann. Der natürliche α Quarz mit sechseckigem Querschnitt besitzt drei Hauptachsen: Die durch die Spitze des Kristalls gehende Achse wird als Z- Achse definiert, auch „optische Achse“ genannt, da die Doppelbrechung in dieser Richtung optisch auftritt. Die dazu senkrecht stehende X- Achse, die durch eine Ecke des hexagonalen Prismas durchgeht, wird auch als elektrische Achse genannt, da der direkte Piezoeffekt (longitudinaler piezoelektrischer Effekt) in dieser Richtung erscheint, d. h., durch eine Deformation des Kristalls tritt elektrische Ladung hier auf. Die letztliche Y- Achse steht senkrecht zu den beiden X&Z- Achsen, und wird als mechanische Achse genannt, offensichtlich wenn eine elektrische Spannung in der X-Richtung angelegt wird, kommt eine Elongation entlang der Y- Achse zur Folge. (Abbildung 4 zeigte den Querschnitt eines Quarzkristalls)

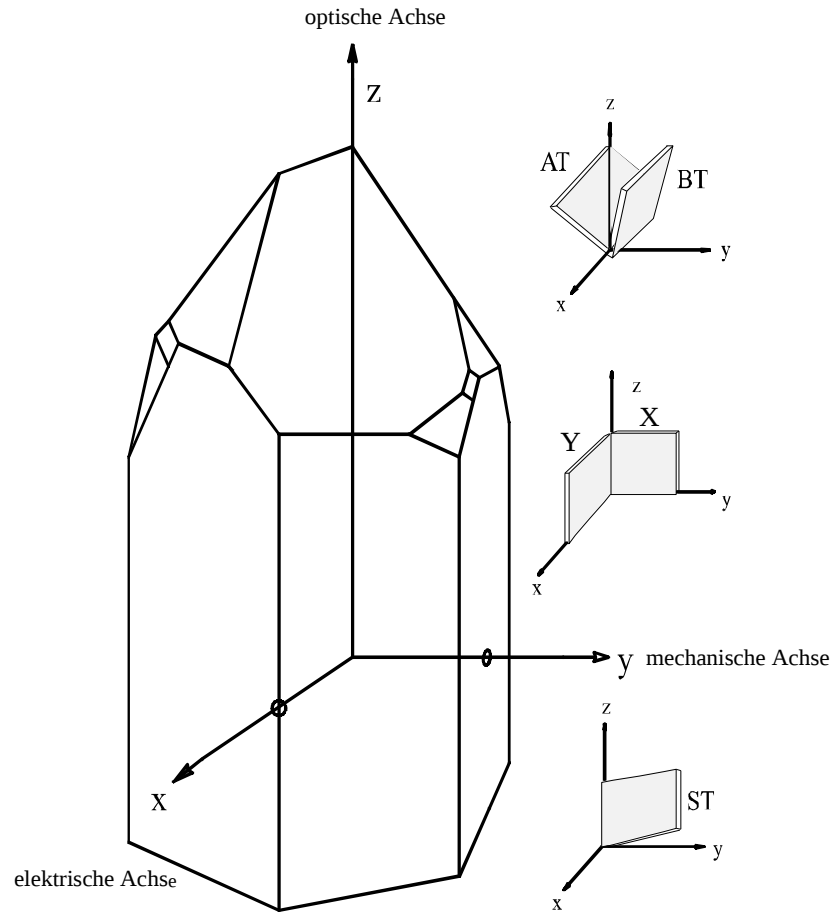


Abbildung 4: Querschnitt eines Quarzkristalls

Der Quarz zeichnet sich als piezoelektrisches Material mit geringer Dämpfung, guter dynamischer, mechanischer und thermischer Stabilität aus. Er wird deswegen als Resonanzsensor mit hohem Auflösungsvermögen angewendet. Eine Anlegung von Wechselspannung führt von tiefen zu hohen Frequenzen zu den Schwingungsformen von Biegung, Dehnung, Flächenscherung und Dickenschерung.

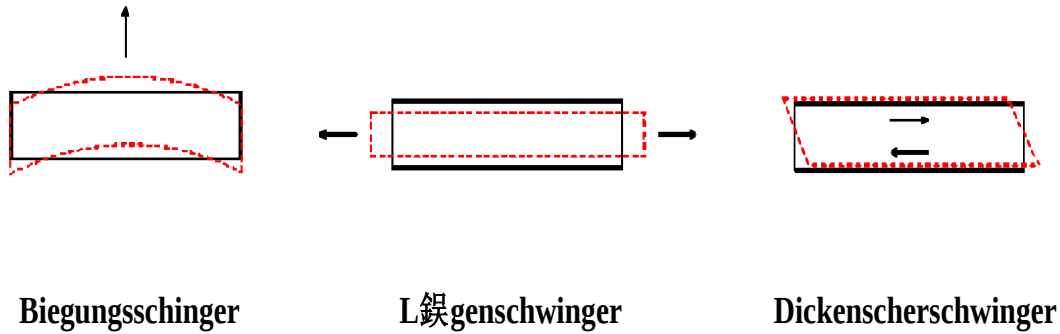


Abbildung 5: Schwingungsmoden eines Quarzes

Die Resonanzfrequenz von den jeweiligen Schwingungen wird über Gleichung 1 gegeben.

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

Gleichung 1

f_0 = Grundfrequenz des Schwingquarzes

c = Schallgeschwindigkeit (Quarz = 3340 m s^{-1})

d = Dicke des Quarzplättchens

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

Bei den Quarzmikrowaagen werden für Schwingquarz die AT- Schnitte verwendet (d.h. $32,5^\circ$ gegen Z- und $122,5^\circ$ gegen Y- Achse geschnitten). Die AT- Schnitte der Schwingquarz entsprechen einem minimalen Temperaturkoeffizienten bei Raumtemperatur.

2.4 Schwingquarz

Ein Schwingquarz ist ein dünnes geschliffenes Quarzplättchen, auf dem zwei Elektroden auf den gegenüberliegenden Seiten aufgebracht werden. Legt man an diesen Elektroden eine Wechselspannung, so beginnt der Schwingquarz eine mechanische Deformationsschwingung.

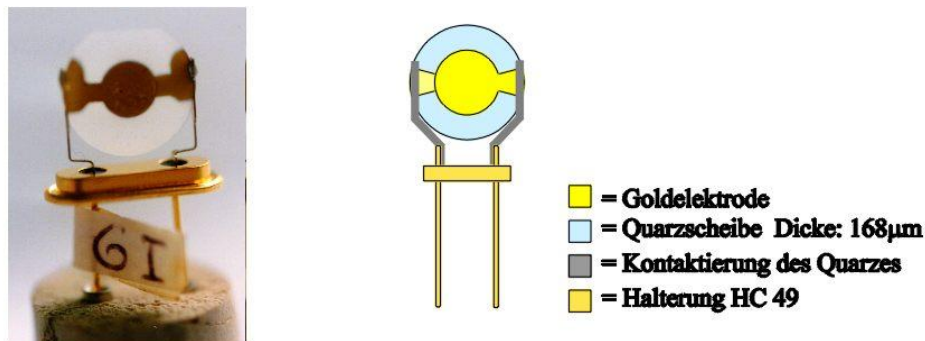


Abbildung 6: kommerziell erhaltbarer Schwingquarz

Die Wellenlänge der Grundschiwingung des Quarzes ist gleich 2-mal der Dicke des Quarzes, d. h. die Resonanzfrequenz soll im idealen Falle indirekt proportional zu der Dicke des Schwingquarzes, wie in Gleichung 1 gezeigt. Elektrisch können die Obertöne auch angeregt werden, aber nur die ungeraden sind möglich, da bei den geraden Obertönen die Elektroden gleiche Polarität haben würden. (Siehe in Abbildung 7)

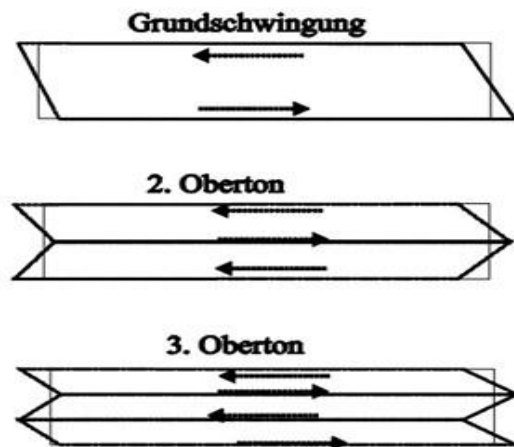


Abbildung 7: Grund- und Oberschwingung eines Schwingquarzes

Die Schwingung eines Quarzes kann in Analogie zu einer elektrisch mechanischen Schwingung verstanden werden. Der Schwingquarz ist im Prinzip ein gedämpfter harmonischer Oszillator, der unter Anlegung einer Wechselspannung angetrieben wird. Van Dyke und Butterworth⁽²⁵⁾ haben ein oszillierendes mechanisches System, welches durch ein elektrisches Feld angetrieben wird, durch ein einfaches elektrisches Netzwerk (Ersatzschaltkreis, Abbildung 8) dargestellt. Der sogenannte BVD Schaltkreis zeigt die Beziehung zwischen elektrischen Parametern dieses Schaltkreises und den physikalischen Eigenschaften des piezoelektrischen Resonators.

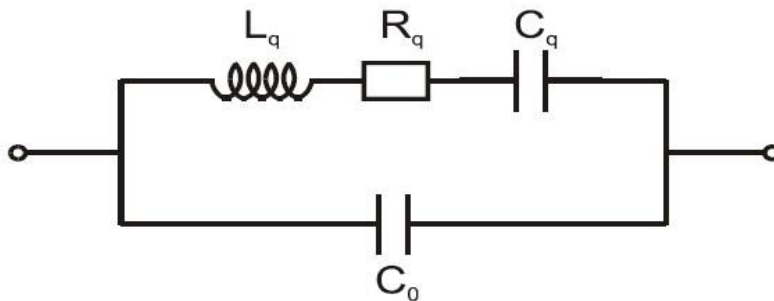


Abbildung 8: Butterworth van Dyke (BVD)-Schaltbild eines Schwingquarzes

Der BVD- Schaltkreis handelt sich um eine Parallelschaltung des Kondensators und des Serienschwingkreis: C_q , die dynamische Kapazität, entspricht der mechanischen Elastizität des Quarzes; R_q , der ohmische Widerstand, repräsentiert dynamische Schwingungsverlust, bzw. die Dämpfung; L_q , die Induktivität, beschreibt die schwingende Masse; und C_0 , die statische Kapazität, erfasst den kapazitiven Einfluss der Peripherie, insbesondere der Elektroden.

Die Lastresonanzfrequenz wird von der durch Parallele und Serielle Kapazität gebildete Lastkapazität bestimmt. Diese Frequenz liegt zwischen Serien- und Parallelresonanzfrequenz (f_s und f_p) des Schwingkreises.

Die Serienresonanz wird dargestellt in Gleichung 2

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

Gleichung 2: Serienresonanzfrequenz

Und bei höheren Frequenzen tritt die Parallelresonanz auf:

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

Gleichung 3: Parallelresonanzfrequenz

Neben den beiden Resonanzen sind die Nebenresonanzen auch zu sehen, wie die Twist und asymmetrische Schwingung, die bei höheren Frequenzen auftreten. Aber sie können durch die Optimierung der Geometrie und des Durchmessers der Elektroden unterdrückt werden.

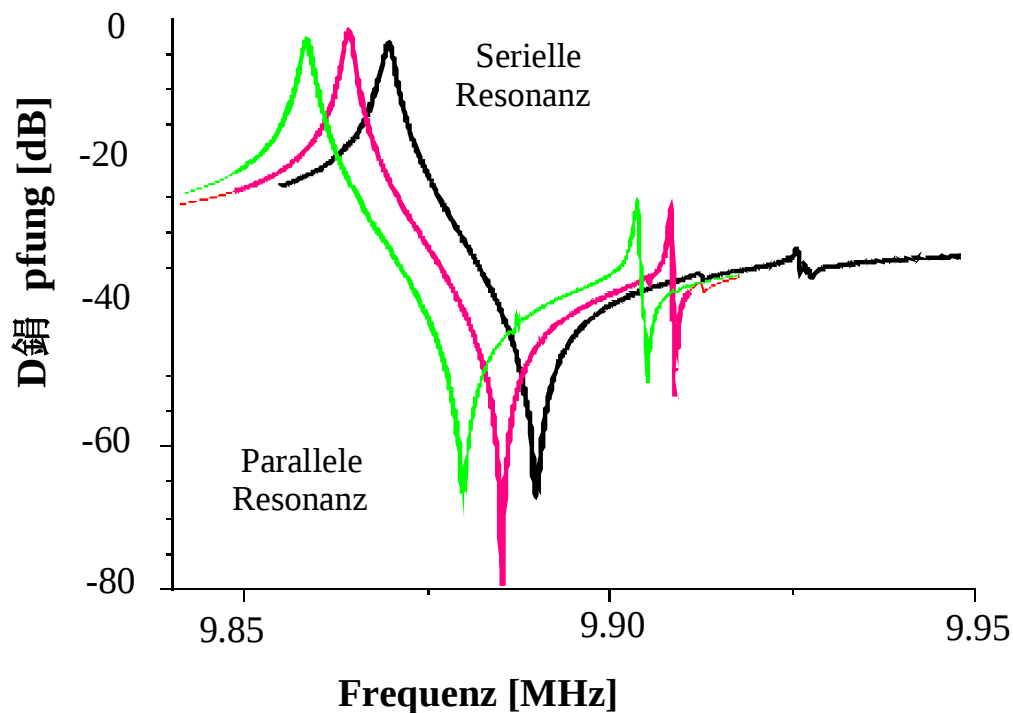


Abbildung 9: Das Dämpfungsspektrum eines Schwingquarzes

2.5 Prinzipien der massensensitiver Detektion

Bereits im Jahre 1959 wurde von Sauerbrey eine lineare Beziehung zwischen Massebeladung und der Änderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes gefunden. Wenn eine Masse von Analyten auf der Oberfläche der Elektrode absorbiert wird, schwingt der Quarz langsamer. Aber die genaue lineare Proportionalität ⁽²⁶⁾ zwischen der Massebeladung und der Abnahme der Resonanzfrequenz gilt nur wenn sich eine auf der Oberfläche angelagerte Masse genauso verhält wie das Quarzmaterial und die sensitive Schicht homogen auf der Elektrodenfläche aufgebracht wird.

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta m}{m_0} = -\frac{\Delta m}{A d \rho}$$

Gleichung 4: Sauerbrey Gleichung⁽⁵³⁾

Δf Änderung der Resonanzfrequenz

f_0 Grundfrequenz

Δm absorbierte Masse

A Fläche der Elektrode

d Dicke des Quarzes

ρ die Dichte der Schicht

Durch Umformung ergibt sich aus der Gleichung 4:

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

Gleichung 5

Aus Gleichung 5 wird es leicht erkannt, dass die Empfindlichkeit quadratisch von der Grundfrequenz abhängt. D. h. eine Erhöhung der Grundfrequenz führt zu einer Erniedrigung der Nachweisgrenze. Für einen 10 MHz Quarz ergibt sich die Empfindlichkeit von $0,226 \text{ Hz cm}^{-2}$, bzw. eine Massanlagerung von 4,4 ng auf einer Fläche von 1 cm^2 ruft eine Frequenzänderung von 1 Hz hervor. Die Steigung der Empfindlichkeit durch die Erhöhung der Eigenfrequenz ist aber begrenzt, da höhere Frequenzen einen großen schaltungstechnischen Aufwand anfordern. Auf Grund eines sehr guten Preis-Leistung-Verhältnisses werden meistens die QCM-Sensoren mit 5 bis 10 MHz Quarzen verwendet.

2.5.1 Einfluss von Flüssigkeit auf die Resonanzfrequenz

Die Resonanzfrequenz wird neben der Temperatur und Massebeladung auch von anderen Größen beeinflusst. Besonders in den flüssigen Medien wirkt sich hier eine Änderung der Viskosität und/ oder der Dichte aus, da in der flüssigen Phase schwingt nicht nur die benetzte Quarzfläche sondern auch die Flüssigkeit mitschwingen wird. Diese Schwingung hängt sehr stark von der Viskosität der Flüssigkeit ab. Gordon und Kanazawa haben die Beziehung zwischen der Viskosität und der Dichte der Flüssigkeit und der Resonanzfrequenz gefunden.⁽²⁷⁾

$$\Delta f = f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_f \rho_f}{\pi \mu_Q \rho_Q}}$$

Hier sind die Dichte des Quarzes ($\rho_Q=2,648 \text{ g/cm}^3$) und Schermodul des Quarzes ($\mu_Q=2,947 \times 10^{11} \text{ g/cm s}^2$) constant. Darüber hinaus kriegt man eine Gesamtgleichung von der Änderung der Grundfrequenz in der Flüssigkeit wie unten gezeigt:

$$\Delta f = -2,26 * (f_0^2 \Delta m + f_0^{3/2} \sqrt{\eta_f \rho_f})$$

Gleichung 7: die Frequenzänderung in der Flüssigkeit

η_f Viskosität der Flüssigkeit

ρ_f Dichte der Flüssigkeit

f_0 Eigenfrequenz des Quarzes an der Luft

Außerdem ist die Änderung der Dichte und Viskosität nach der Temperaturänderung von großer Bedeutung. Deswegen ist die Temperaturerhaltung bei der Durchführung der Messung erforderlich.

In dieser Arbeit wurde die Analytenlösung unter einer Pumpe ständig in die Messzelle mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit gepumpt. Der Druck, der von der Pumpe verursacht ist, führt auch zu einer Erniedrigung der Grundfrequenz.

2.5.2 Die Parameter der verwendeten Schwingquarze

Tabelle 1 zeigt die wichtigen Daten von QCM mit goldbedampfter Elektrodenstruktur

Grundfrequenz	10 MHz
Elektroden Material	Gold
Frequenzauflösung	±0,1 Hz
Resonatorfläche	0,24 cm²
Resonatordichte	0,168 mm
Massensensitivität	951 Hz/µg
Nachweisgrenze	0,6 ng
Schichtdichteneffekt	40nm/kHz

Tabelle 1: die Parameter eines Schwingquarzes

2.6 Rezeptorstrategien

Das molekulare Prägen von Polymeren, die ‚molecular imprinting‘ genannt, ist eine sehr elegante Methode der Herstellung funktioneller Materialien, die über selektive molekulare Erkennungsmerkmale ⁽²⁸⁾ verfügen. Diese Technik bildet künstliche und robuste Erkennungssysteme für die Gas- und Flüssigkeit-Phasen

aus.⁽²⁹⁾ Optische und massensensitive Bauteile sind geeignet für Spuranalytik bis zum ppb Bereich.⁽³⁰⁾

2.6.1 Rezeptorsprinzip

Die molekulare Erkennung, ähnlich wie die im Jahre 1894 von Fischer präsentierte Modell in der Biologie, "Schloss-und-Schlüssel" hat den chemischen Sensoren eine "long-term" Stabilität und hohe Selektivität ermöglicht.

Die molekulare Erkennung beruht sich auf den nicht-kovalenten Wechselwirkungen, typischerweise wie Wasserstoff-Brücken Bindungen, hydrophoben Effekten, Metallkoordinationen, van der Waals Wechselwirkungen, sowie elektrostatischen Wechselwirkungen, von zwei Molekülen, bzw. zwei Molekülsystemen. In der Chemosensorik sind die Hohlräume in der sensitiven Schicht mit spezifischen Bindungen, wobei die Geometrie von den Analyten eine wesentliche Rolle spielt, auch wichtige Wechselwirkung. In der Chemie können die künstlichen supramolekularen Systeme^{(31) (32)} so entworfen werden, dass sie molekulare Erkennung aufweisen. Die Host-Guest-Chemie ist dafür die Basis⁽³³⁾. Die Host-Guest-Chemie beschreibt die Komplexe, die von zwei und mehreren Molekülen über nicht kovalenten Wechselwirkungen in einer einzelnen Struktur gebildet werden. Die nicht kovalenten Wechselwirkungen sind hier verantwortlich für die Reversibilität der Einlagerung bzw. der Absorption von Analyten an den sensitiven Schichten, die in unseren QCM- Bauteilen benötigt sind.⁽³⁴⁾ Dagegen ist die kovalente Bindung im Vergleich zu nicht kovalenter Bindung stärker und spezifischer, aber die Reversibilität wird dabei eingeschränkt.

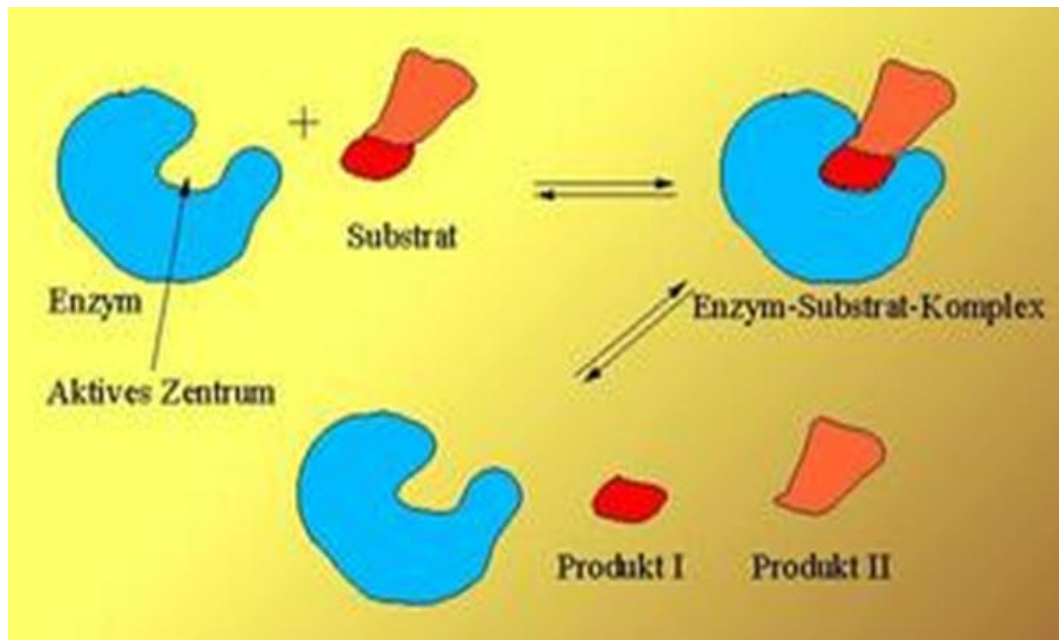


Abbildung 10: Molekulare Erkennung in der Biologie: Analog in der Chemie, durch die nicht kovalenten Wechselwirkungen

2.6.2 Molekulares Prägen

Durch molekulares Prägen von Polymernanopartikeln^{(35) (36)} können aus einfachen Bausteinen (Monomer) die an einzelne Supramoleküle angepassten, vollsynthetischen Rezeptoren, wie künstliche Enzyme, Antikörper^{(37) (38)}, produziert werden. Diese bieten neue Produktionsmöglichkeiten in der Biotechnologie und auch in den chemosensorischen Verfahren.

Das hoch vernetzte Polymer wird in Gegenwart von einem Prägemolekül (Templat), das sich als Schablone dient, synthetisiert.⁽³⁹⁾ Durch Selbstorganisation^{(40) (41)} passt sich das wachsende Polymer dem Prägemolekül und bildet einen Abdruck von dem Muster. In unserem Falle werden die Monomere zuerst vorpolymerisiert, und das Vorpolymer wird dann in Anwesenheit des Templates auspolymerisiert. Nach der Polymerisation wird das Prägemolekül durch

Verdampfung, Zersetzung oder Auswaschung entfernt. Die Kavitäten des Musters bleiben im Polymer zurück, und diese Kavität ist aufgrund des Hochgrades der Vernetzung des Polymers formal stabil.^{(42) (43)} Diese Kavitäten sind durch die geometrische Anpassung sowie die Wechselwirkungen von den funktionellen Gruppen in der Kavität selektiv für das Prägemolekül. Meistens wird eine organische Verbindung oder eben ein Mikroorganismus als Analyt verwendet. Sie werden zuerst auf einen glatten Glas-Stempel aufgetragen. Der Stempel wird dann auf der mit Polymer beschichteten Elektrode mit wenig Druck fixiert. Nach dem Auspolymerisieren wird der Stempel entfernt, die Template werden ausgewaschen. Die zurückgebliebenen Kavitäten entsprechen der molekularen Erkennung des Messsystems.

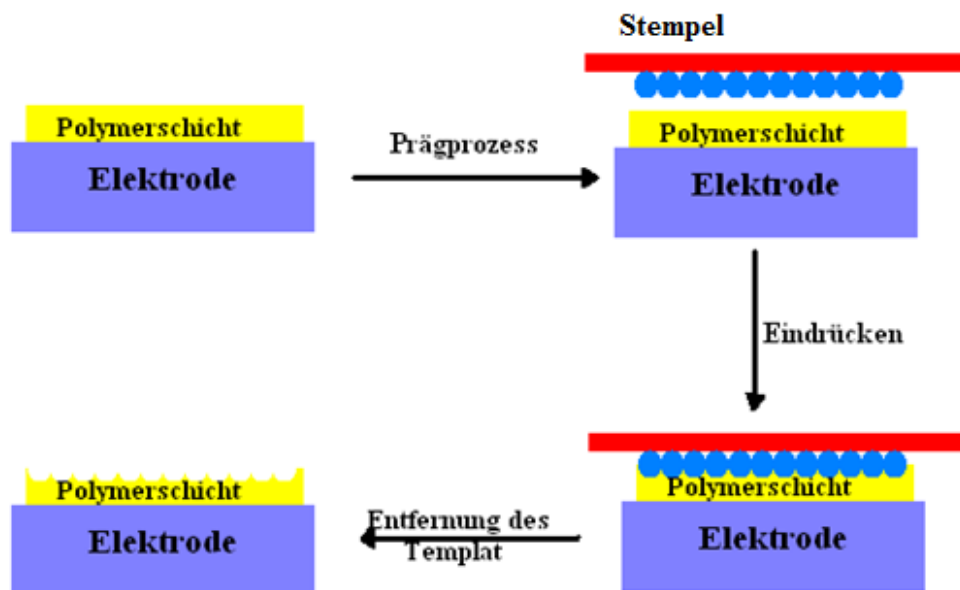


Abbildung 11: der Molekulare Präzessionsprozess

Molekulares Prägen hat zuerst einen großen Vorteil, dass es eine große Wahl an preisgünstigen Monomeren und Vernetzern zur Verfügung besitzt. Und die möglichen Template, die Prägemoleküle reichen von kleinen organischen

Molekülen bis hin zu großen Naturstoffen sogar Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren.

2.7 *E. coli* als Analyt

Escherichia coli (Abgekürzt: *E. coli*) wurde im Jahre 1885 von einem deutschen Kinderarzt und Bakteriologen *Theodor Escherich* entdeckt, und im Jahre 1919 nach seinem Entdecker bekannt. Es gehört zu den weltweit meisten untersuchten Organismen, dient oftmals als der ‚*Modellorganismus*‘ in den wissenschaftlichen Bakterienforschungen. *E. coli* ist ein gramnegatives Bakterium. Es kommt meistens in menschlichen und tierischen Darm vor. Die meisten *E. coli* Stämme sind nicht pathogen, aber manche wie Serotypen O157:H7 können erhebliche Lebensmittelvergiftungen hervorrufen.

2.7.1 Biologie von den *E. coli* Bakterien

Das *E. coli* ist gramnegativ, fakultativ anaerob und nicht sporulierend. Die Zellen sind typisch stäbchenförmig, mit einer Größe von $0,5 \times 1 \sim 3 \mu\text{m}$. Sie sind peritrich gebeißelt, können schwimmen, sind daher freibeweglich. Die optimale Temperatur für das Wachstum von *E. coli* sei 37°C , manche *E. coli* Stämme können bei den Temperaturen bis zu 49°C multiplizieren.

2.7.2 Zellteilung von *E. coli* Bakterien

Das unten gestellte Bild zeigt eine schematische Darstellung der Zellteilung von *E. coli* Zelle.

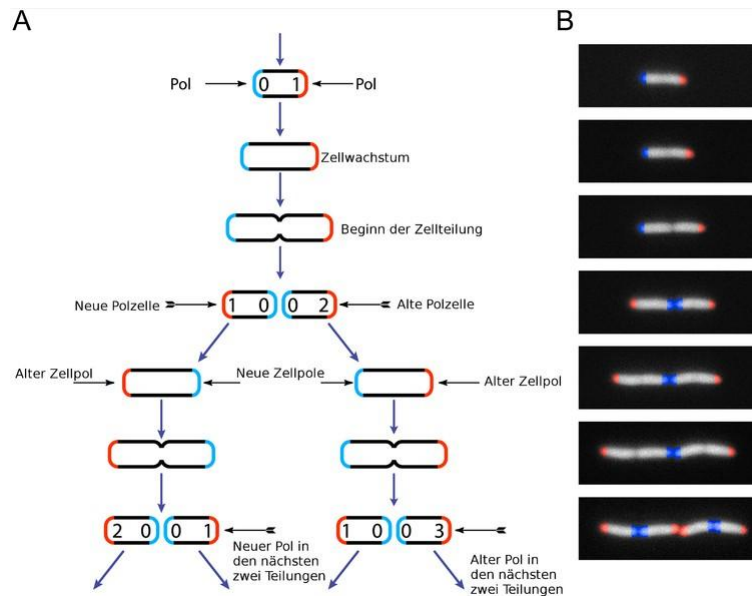


Abbildung 12: Schematische Darstellung von der Zellteilung der *E. coli* Bakterien (54)

Die *E. coli* Bakterien vermehren sich im Nährmedium durch Fragmentierung. Unter optimalen Bedingungen (Temperatur, Nährkomponenten) teilen sich die *E. coli* Zellen einmal in 20 Minuten. Die oben gestellte Abbildung bezeichnet deren Zellteilung. Während der Zellteilung werden zwei neue Polen ausgebildet,

2.7.3 Klassifikation von *E. coli*

Die *E. coli* Bakterienstämme werden basierend auf serologische Charakteristika und die Virulenz Eigenschaften klassifiziert.⁽⁴⁴⁾ Virentypen fassen um:

1) Enterotoxische *E. coli* (ETEC):

Die enterotoxische *E. coli* Stämme befinden sich im intestinalen Lumen. Sie können zwei proteinöse Enterotoxine generieren. Eines ist LT Enterotoxin (L: Large), das in Funktional und Struktur ähnlich wie Cholera toxin ist; das andere ist

ST Enterotoxin(S: Small), das cGMP Akkumulation in den Targetzellen auslöst. ETEC ist der Haupterreger von Diarrhöe in Kindern, sowie von Reisediarrhöe.

2) Enteropathogene *E. coli* (EPEC):

Ähnlich wie ETEC, löst EPEC ebenfalls Diarrhöe aus, aber der molekulare Mechanismus der Kolonialisierung ist anders. Sie benützen ein Adhäsion, das die intestinalen Hostzelle abbindet, indem eine Neuordnung in der Hostzelle hervorgerufen wird, nämlich eine Deformation der Hostzelle, ersichtlich eine Entzündung.

3) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC):

EIEC wird nur in menschlichen Körpern gefunden. Eine EIEC Infektion kann ein Syndrom, das identisch wie Shigellosis ist, auslösen. Es verursacht Diarrhöe mit Fieber.

4) Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC):

Der wichtigste Angehörige dieses Typs ist der Stamm O157:H7, der blutige Diarrhöe verursacht. EHEC kann hämolytisch-urämisches Syndrom mit akutem Nierenversagen auslösen. Die EHEC sind die häufigsten Gifte in Lebensmitteln.

5) Enteroaggregative *E. coli* (EAEC):

EAEC bilden die intestinalen Zellen ab, indem eine Diarrhöe ohne Fieber ausgelöst wird. EAEC sind nicht invasiv. Sie produzieren ein Hämolysin und ein ST Enterotoxin ähnlich wie bei ETEC.

2.8 Rastersondenmikroskopie

Rastersondenmikroskopie⁽⁴⁵⁾ (engl. **SPM** für **Scanning Probe Microscopy**) ist eine moderne Technik für die Oberflächenanalytik. Als Rastersondenmikroskopie bezeichnet man alle Arten von Mikroskopie, bei welchen das Bild über einer Wechselwirkung zwischen einer sogenannten Sonde und der Probenoberfläche erzeugt wird. Das Rastersondenmikroskop hat drei dimensionale Darstellungen von Oberflächen im Atombereich ermöglicht. Und das brachte signifikante Durchbrüche in Nanotechnologie, Biotechnologie und in der Physik der kondensierten Materie. Der wesentliche Vorteil des Rastersondenmikroskops gegenüber der elektronoptischen Mikroskopie liegt darin, dass es keine Vakuumbedingung benötigt. Weiterhin kann es sogar in flüssiger Phase angewendet werden. In der Chemosensorik wird das Rastermikroskop dafür verwendet, die strukturierte Polymerschicht zu kontrollieren, spielt deswegen eine wesentliche Rolle in dieser Arbeit.



Abbildung 12: Digital Instrument Multimode SPM mit einem Nanoscope III Controller

2.8.1 das Prinzip von Rastersondenmikroskopie

Das Prinzip von einem **SPM** Mikroskop ist leicht einzusehen: Die Analytenoberfläche wird mit einer an einem Contilever gesetzten Sonde Punkt für Punkt abgetastet. Die einzelnen Bilder, die punktuell aufgenommen sind, werden schließlich zu einem Gesamtbild zusammen gebracht.

Der wesentliche Bauteil eines **SPM** Mikroskops ist der Scanner, der die genauen Abtastungen auf die Oberfläche leistet. Dieser besitzt eine Anordnung von piezoelektrischen Kristallen, die dafür verantwortlich ist, dass man entweder die Probe oder die Sonde bewegen kann. Hierfür eignen sich deswegen die piezoelektrischen Kristalle, weil bei ihnen eine sehr kleine Längenänderung zu großer Steuerspannung führt.

Je nach welche physikalische Größe gemessen wird, kommen als Sonde verschiedenste Anordnungen. Zum Beispiel beim Rastertunnelmikroskop⁽⁴⁶⁾ (engl. **STM** für **Scanning Tunnel Microscope**) wird der Tunnelstrom zwischen einer leitenden Probe und einer Metallspitze, meistens aus Pt/Ir gemessen. Für die nicht leitenden Proben kann die Kraft zwischen der Probenoberfläche und der Sonde gemessen werden, nämlich beim Rasterkraftmikroskop (engl. **AFM** für **Atomic Force Microscope**). Weiters dient eine magnetisierte Spitze für die Untersuchung von magnetischen Domänen (MFM, **Magnetic Force Microscope**). EFM (**Electrostatic Force Microscope**) misst die elektrostatische Kraft zwischen der Probe und der Sonde. Das neu entwickelte SNOM (**Scanning Near-field Optical Microscope**) ermöglicht eine räumliche Auflösung bis zu 30nm⁽⁴⁷⁾ über die Bestimmung von Reflexion bzw. Absorption mit einer Saphirspitze.

2.8.2 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Das Rasterkraftmikroskop beruht sich auf der van der Waals Wechselwirkung zwischen der Oberfläche der Probe und der Spitze. Ein Laserstrahl wird auf der Oberfläche der Spitze reflektiert und in eine Photodiode gelenkt. Ein wesentlicher Vorteil vom AFM besteht darin, dass auch nicht- leitende Proben unmittelbar analysiert werden können. Die AFM Technik unterteilt sich in wesentliche drei Modi: Contact AFM, non-Contact AFM und das Tapping Modus.

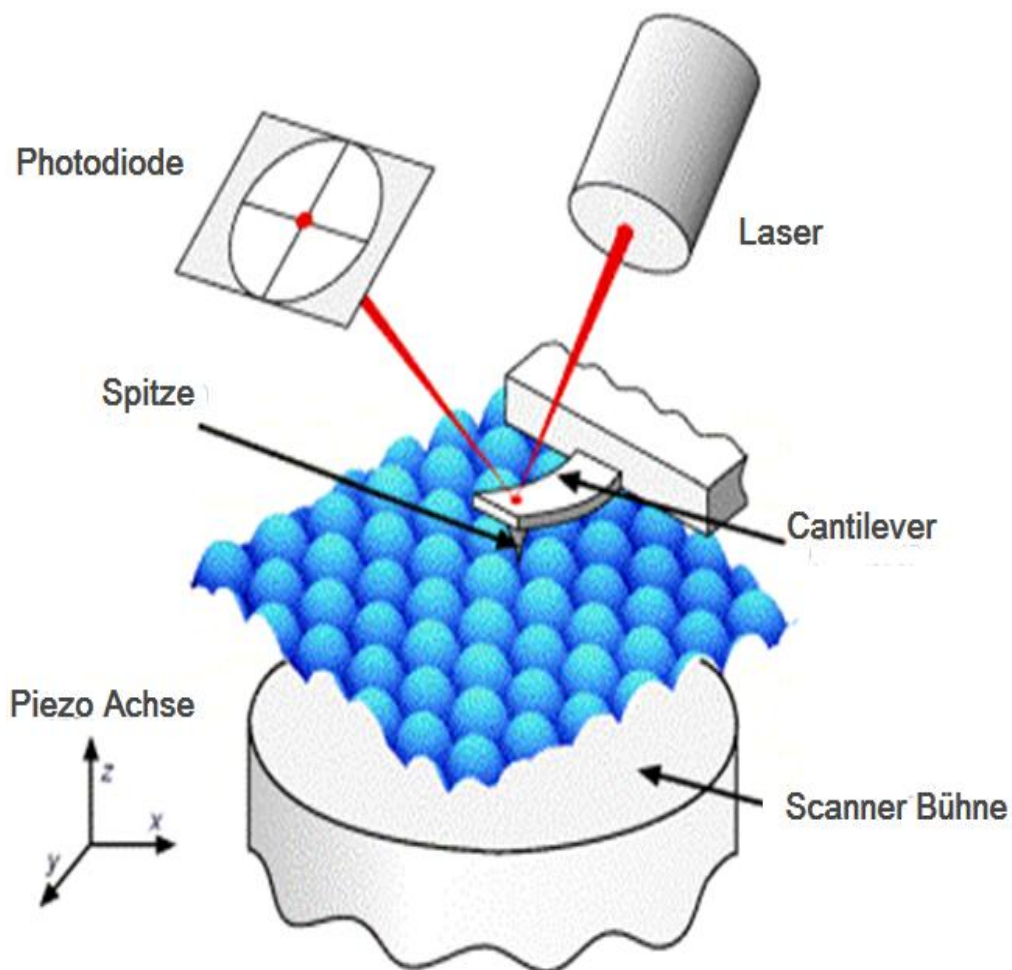


Abbildung 13: Schematische Darstellung der AF- Mikroskopie

1) Contact Mode AFM

Beim Contact AFM ⁽⁴⁸⁾ wird die Probenoberfläche mit einer Spitze, die sich auf einem biegsamen Contilever befindet, punktuell gescannt, indem die Probenoberfläche und die Spitze sich einander mit einer konstanten Kraft direkt kontaktieren. Der Contilever besteht aus Silicium oder N_4S_3 . Er hat eine Länge von 100- 500 μm und eine Dicke von 0,5- 5 μm . Während der Messung wird der Balken bzw. der Contilever durch die abstoßende Kraft zwischen der Spitze und der Analytenoberfläche aus dem Ruhezustand ausgelenkt. Die entsprechende Auslenkung wird durch die Änderung des Reflektionswinkels eines Strahls von einem Laser veranschaulicht. Der reflektierte Strahl wird mit einem Photodetektor aufgefangen. Die mögliche Auflösung dieser Technik ist hauptsächlich durch das Krümmungsradius bzw. die Schärfe der Spitze bestimmt. Je nach der Rauigkeit der Oberfläche sind laterale Auflösungen von 0,1 bis 10nm erlaubt, was bedeutet, dass im idealen Fall eine Abbildung einzelner Atome erreicht werden kann. Ein großer Nachteil dieser Methode liegt darin, dass es Schwierigkeit kommt, wenn man weiche Proben, besonders die biologische Materialien, untersuchen will, da bei der Messung eine mögliche mechanische Deformation der Oberfläche auftreten kann.

2) non- Contact Mode AFM

Beim nicht-Kontakt Modus wird der Federbalken durch eine externe Kraft zu Schwingungen angeregt. Dazu wird ein Piezoelement zusätzlich beim Federbalken angebracht. So befindet sich die Spitze nicht direkt auf der Probenoberfläche, sondern sie oszilliert darüber. Während des Scanning wird das Schwingungssignal wieder an das Anregungselement rückgekoppelt, sodass ein Schwingungskreis entsteht. Tritt zwischen der Spitze und Probenoberfläche Kraft auf, so ändert sich die Resonanzfrequenz des Schwingungskreises. Diese Frequenzverschiebung ist ein Maß für die Wechselwirkung, was als Regelsignal beim Abrastern genutzt wird.

Oder man legt die Resonanzfrequenz fest, so ergibt sich eine Phasenverschiebung beim Scannen. Der nicht Kontakt Modus wird übrige bei der Messung von weichen oder extrem hydrophoben Proben verwendet, wobei die höchsten Auflösungen im Einsatz von Vakuum oder Ultrahochvakuum erzielbar sind.

3) Tapping Mode AFM

Um eine Zerstörung weicher Proben durch die Kraftausübung zu vermeiden wird meist das sogenannte Tapping Mode AFM verwendet, wobei der Contilever normal zur Probe oszilliert, sodass die Spitze immer nur kurz die Probenoberfläche berührt. Im Tapping Modus erfolgt eine akustische Anregung des Piezoelements, was zu einer sinusförmigen vertikalen Schwingung der Spitze führt. Die Anregungsfrequenz wird so eingestellt, dass sie knapp unter der Resonanzfrequenz des Balkens liegt. Die vertikale Bewegung, was eine Topographie der Probe darstellt, wird über die Änderung in der Länge der Z-Achse des Piezos erfasst, während die Amplitude des Contilevers von der Photodiode registriert wird. Diese Technik eignet sich für die besonders empfindlichen Materialien, nebenbei es auch für größere Scanning Bereich verwendet wird. Der Nachteil liegt aber in der niedrigeren Scangeschwindigkeit.

2.9 UV/Vis- Mikroskop

Die *E. coli* Bakterien sind groß genug, dass man sie unter UV/Vis Mikroskop beobachten kann. In der Biologie wird das Bakterium normalerweise mit speziellerem Farbmittel eingefärbt, sodass man es leicht unter Licht anschauen kann. In dieser Arbeit wurde das Wachstum der Bakterien zuerst mittels eines UV/Vis-Mikroskops beachtet, um zu bestimmen, ob die Nährmedien richtig eingestellt sind.

3. Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 10 MHz Quarz als massensensitiver Bauteil in einer Messzelle verwendet. Als Analyt wurde *E. coli* Stamm W verwendet. Die ganze Arbeit wurde in flüssiger Phase durchgeführt.

3.1 Elektrodendesign

Für die Messungen in flüssiger Phase werden zwei Elektroden von unterschiedlicher Größe verwendet, um die Leitfähigkeitseffekte zu minimieren.⁽⁴⁹⁾ Die unterschiedliche Größe von Elektroden beeinflusst die Ablenkung von Feldlinien, und somit die Ionenstärke der Lösung. Die Resonanzfrequenz des Quarzes kann durch die Änderung der Ionenstärke beeinflusst werden. Das duale Elektrodendesign ermöglicht eine Referenzmessung nebenbei der Arbeitselektrode, d. h., eine Differenzbildung zwischen beiden Elektroden. Der wesentliche Vorteil dieses Designs liegt darin, dass die unselektiven Referenzänderungen, die von der Umgebung erzeugt werden, wie z. B. Matrixeffekte, sowie Temperaturänderung, abgezogen werden können, somit man eine reine Sensorantwort bekommt. In dieser Arbeit wurde mit Elektroden mit einem Durchmesser von 5mm als größere Elektroden und 4mm als kleinere gearbeitet. Die in folgender Seite stehende Abbildung zeigt ein Beispiel von Standardelektrodendesigns.

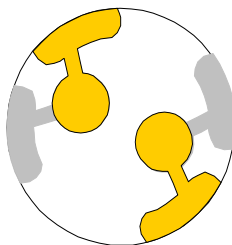


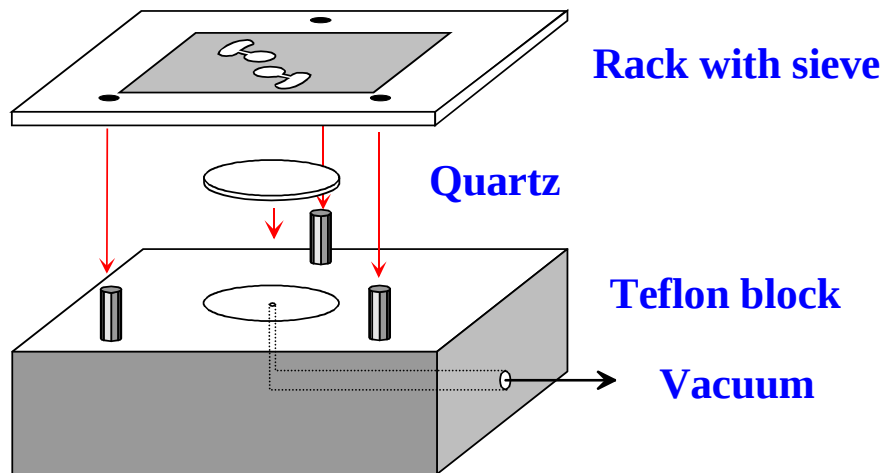
Abbildung 14: Elektrodendesign: die größere Elektrode auf der Oberseite, während die kleinere auf der Unterseite

3.2 Herstellung von Elektroden

Die Aufbringung von Elektroden auf den Quarzplättchen wird durch die Siebdruckverfahren ermöglicht. Prinzipiell verwenden wir eine Glanzgoldpasta GGP 2093, 12% der Firma Heraeus. Diese Pasta, welche kolloidales Gold enthält, wird mit einer Rakel auf den Quarzwafer aufgetragen und glatt abgezogen. Da die Goldpasta leicht eintrocknet, wird deren Viskosität mit einem Verdünnern, Dichlormethan enthält, eingestellt.

Man stellt die Siebe mittels Photolithographie her, wobei das Sieb mit einer Maschenweite von $21\mu\text{m}$ auf einen Rahmen aufgeklebt und mit UV-Photolack, Azocol Poly-Plus S von KIWO, eine UV- Polymerkopierschicht, die diazo-sensibilisiert ist, dünn bestrichen und homogen abgezogen wird. Der Photolack wird dann 30 min im Dunkel trocknen gelassen. Ein Stück Klebfolie, auf der die gewünschte Elektrodengeographie schwarz gedruckt wird, wird auf den UV-Belichtungstisch aufgeklebt, sodass das UV- Licht vollständig blockiert wird. Anschließend wird das Sieb 1 min lang UV belichtet und danach werden die ungehärteten Lackstellen (nicht belichtet) mit fließendem Wasser ausgewaschen und man kriegt die erwünschte Struktur von Elektroden.

Das Quarzplättchen wird mittels Vakuum auf einem Teflonblock befestigt und das Sieb mit erwünschten Lackstellen darüber fixiert. Die Goldelektroden werden dann auf den Quarzplättchen aufgebracht. Die Quarzplättchen werden mindestens 2 Stunden lang im Umluftofen bei $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingebrannt. Die organischen Lösungsmittel werden dadurch verbrannt, während sich die Goldschicht weitgehend homogen verteilt.



Screen printing of QCM electrodes

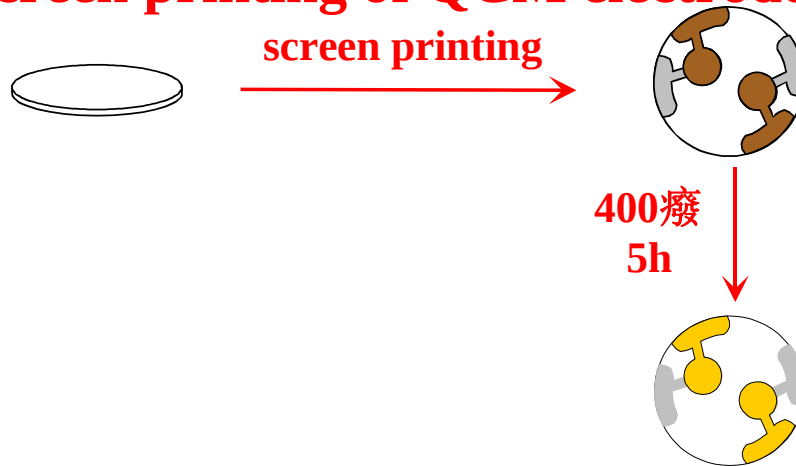


Abbildung 15: Die Herstellung der Elektrode: Siebdruck Verfahren

Die Qualität der Goldpasta hat einen starken Einfluss auf die Rauigkeit der Goldelektroden. Die Rauigkeit und die Dicke der Goldelektroden kann man anhand der AFM-Aufnahmen bestimmen. Eventuell kann man die Dicke der Elektrode auch durch die Messungen der Änderung der Resonanzfrequenzen zwischen vor und nach dem Aufbringen der Goldpasta am Netzwerkanalysator abschätzen.

3.3 Aufbringen und Prägung der Polymerschicht

Das Polymer spielt eine wesentliche Rolle für die Entwicklung eines Sensors. Das Polymer soll für jeden Analyten optimiert werden, was bedeutet dass das Polymer an den Analyten bezüglich der Polarität, der Funktionalität angepasst werden muss. Je nach Analyten sollen unterschiedliche Polymere mit mehreren Zusammensetzungen von Monomeren getestet werden, um ein der Messung geeignetes bzw. optimales Polymer auszuwählen⁽⁵⁰⁾. Außer der Auswahl und der Zusammensetzung der Monomere muss man noch eine Reihe von Faktoren beachten: die Porosität, die Quervernetzungsanteil, die Stabilität des Polymers. Da in dieser Arbeit wurde es in wässriger Lösung gearbeitet, ist das Quellenverhalten ein besonders wichtiger Parameter. Quillt ein Polymer stark, wird die Dämpfung in der Lösung schlecht, was zu einem größeren Rauschen führt. Dabei kann die Form der Imprints auch verloren gehen. Darum soll die Quellung des Polymers in flüssiger Phase minimiert werden.

Hier wurde eine Methode verwendet, die sich in zwei Schritte unterteilt: einen Vorpolymerisationsschritt und einen Prägungsschritt als Folge. Die Monomere werden zuerst zusammen in Lösungsmittel zum Vorpolymer gekocht. Das so hergestellte Vorpolymer wurde auf den Transducer bzw. den Quarz aufgetragen. Nachdem der Stempel aufgebracht wird, wurde der Polymer aushärten gelassen.

Das für die Messungen der Mikroorganismen am meisten geeignete Polymer ist Polyurethan⁽⁵¹⁾, welches in Tetrahydrofuran(THF) gelöst ist. Polyurethane (Abk. PU) sind Kunststoffe, die je nach Herstellung hart oder spröde sein können. Sie sind aus einer Polyadditionsreaktion von Diolen bzw. Polydiolen mit Polyisocyanaten zu erhalten. Die charakteristische funktionierende Gruppe der PU ist die Urethan Gruppe (-NH-CO-O-). Polyurethane können je nach Wahl des Isocyanats und des

Polyols unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Zum Erreichen erwünschter Eigenschaften können die Polyolkomponenten angepasst werden, während nur wenig verschiedene Isocyanatkomponenten zum Einsatz kommen können, da die Isocyanatkomponenten chemisch verändert werden können. In unserem Fall für die Detektion der Mikroorganismen wurden Bisphenol A (BPA) und 4,4'-Diisocyanato-Diphenylmethan (4,4'-MDI) eingesetzt, und zusätzlich ein dreiwertiger Alkohol Phloroglucin, als Quervernetzer. Als Katalysator war ein wenig Pyridin im Einsatz. Ein Quervernetzer wirkt sich positiv auf die Erhöhung der Haltbarkeit der generierten Hohlräume aus.

Um das Polymer herzustellen wurden zuerst Bisphenol A und Phloroglucin in ein Eppendorfgefäß mit 200 µL THF zugesetzt. Dann nach der Zugabe von 4,4'-MDI und Pyridin(Katalysatormenge) wurde mittels Vortex die Suspension homogeniert. Die Vorpolymerisation wurde unter Rühren bei 70 °C in einem Wasserbad durchgeführt. Während des Rührens wurden die Reagenzien langsam aufgelöst. Die Verschollenheit der Trübung der Lösung bezeichnet dass die Polyadditionsreaktion der Komponenten begonnen hat. Dies konnte etwa 10-15 Minuten dauern.

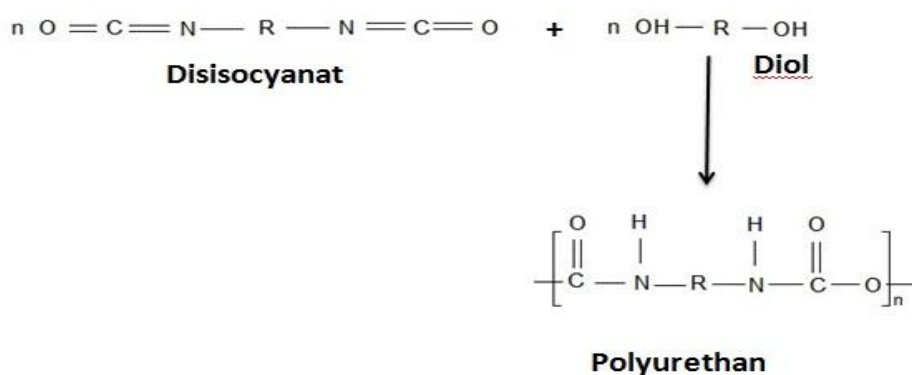
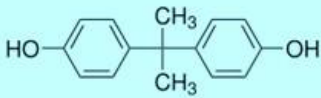
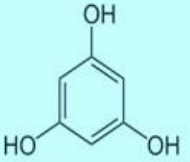
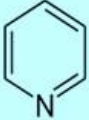


Abbildung 16: Die Polyadditionsreaktion für die Herstellung des Polyurethans aus Disisocyanaten und Diolen

Dabei ist es besonders zu beachten, dass die Temperatur nicht über 70 °C übergehen und die Lösung nicht zu lange erwärmt werden darf, was zur Aushärtung des Vorpolymers führen könnte. Gleich nach dem Herausholen des Gefäßes aus dem Wasserbad wurde weiteres 800 µL THF zugegeben dann im Vortex gut geschüttelt. Das hergestellte Vorpolymer kann man im Kühlschrank bei -20 °C aufbewahren. Ein wichtiger Punkt dabei ist, dass Isocyanate leicht mit Wasser reagieren, wobei Kohlendioxid und Amine unerwünscht generiert werden. Deswegen muss es darauf gut aufgepasst werden, dass jedes Mal nach dem Benutzen vom 4,4'-MDI, vor dem Zuschließen des Gefäßes mit Stickstoff gespült werden muss. Außerdem muss der Stempel der Bakterien immer ausgetrocknet werden, bevor es auf der Polymerschicht aufgebracht wird. Das verwendete Rezept der Monomere ist in Tabelle 2 auszustellen.

Tabelle 2 Die Zusammensetzung von Monomeren des Polyurethans

Bisphenol A 95,6mg	
Phloroglucin 23,9mg	
4,4'-MDI 80,3mg	$n \text{ O}=\text{C}-\text{N}-\text{R}-\text{N}-\text{C}=\text{O}$
Pyridin 12µL	
THF 200µL	

Es gibt im Prinzip zwei verschiedene Weisen, wie man das Vorpolymer auf den beiden Elektrodenoberflächen aufbringt: Spin-bzw. Drop-Coating-Verfahren. Die Drop-Coating-Methode wird lediglich bei der Hefepressung verwendet, da in dieser Methode das Vorpolymer direkt auf das Zentrum der Elektrodenoberfläche pipettiert wird, ohne weiteren Spinnenprozess. Daraus erfolgt eine dickere Schicht im μm -Bereich, die normalerweise nicht für die Analyten geeignet ist. In dieser Arbeit wird deswegen das Spin-Coating-Verfahren, das eine sehr dünne und homogene Schicht generieren kann, benutzt. Um die sogenannte Vorpolymerschicht auf der Schwingquarzoberfläche aufzutragen wurde die ursprüngliche Polyurethan-THF-Lösung noch mal mit 4ml THF auf 1:4 verdünnt. Dies wurde in einem Eppendorfgefäß durchgeführt (200 μl Lösung + 800 μl THF), und danach im Vortex gut homogenisiert. Von der verdünnten Polymerlösung wurden 10 μl mittels einer Gilsonpipette auf das Zentrum des in der Mitte des Spinners festgelegten Schwingquarzes aufgebracht. Anschließend sollte es eine Minute lang bei 2800rpm gespinnt werden, wobei das Lösungsmittel bzw. der THF verdampft wurde. So blieb eine dünne Polymerschicht auf der Schwingquarz- bzw. Elektroden-Oberfläche übrig. Gleich nach dem Abspinnen des Lösungsmittels wurde der Stempel der zu detektierenden *E. coli* Bakterien rasch in das noch nicht ausgehärtete Polymer auf die Arbeitselektrode gedrückt und geprägt. Parallel wurde ein sauberer Glasstempel auf die Referenzelektrode gedrückt. Zur Herstellung eines Bakterienstempels wurde eine Lösung der *E. coli* Bakterien mit einer Konzentration von 1-2mg/ml mit destilliertem Wasser gemacht. Diese Lösung wurde gut geschüttelt und dann 8 μL davon mit einer Gilsonpipette auf einen Glasstempel, der zuvor in Größenordnung von Elektroden, d.h. mit einem Durchmesser von etwa 5mm, zugeschnitten wurde, pipettiert. Das Glas ist deswegen ein sehr gut geeignetes Stempel-Material, weil es eine gute Rauigkeit im

Nanobereich aufweist und in wässrigen Lösungen gut benetzt wird. Die mit Bakterien Lösung beschichteten Glasstückchen werden im Umluft eine Stunde lang ausgetrocknet. Diese gefertigten BakterienStempel wurden in die Vorpolymerschicht zärtlich eingedrückt und mit einer Klammer auf dem Schwingquarz fixiert. Sie wurden dann mindestens einen Tag lang auspolymerisiert. Die GlasStempel wurden im warmen Wasser von circa 35-40 °C (die optimale Temperatur für *E. coli* Bakterien sei 37 °C), unter Rühren befreit, eventuell in verdünnter SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*) Lösung, wenn es auf dem Quarz geklebt ist. Dabei ist es zu merken, dass die beschichteten Quarze nicht zu lang im Wasser bleiben dürfen, und es nicht heftig gerührt werden darf, weil sonst die Polymerschicht zerstört bzw. abgelöst werden könnte. Die freistehenden Quarze wurden aus dem Wasser genommen und in der Luft getrocknet. So entsteht die sensitive Schicht, der wesentliche Teil unseres Sensors, mit den richtigen Kavitäten, in die sich die *E. coli* Bakterien reversible einlagern können.

3.4 Aufbau der Messapparatur

Für die Aufnahme der Sensoreffekte benötigt sich lediglich der mit sensitiver Polymerschicht beschichtete Schwingquarz. Zur Erfassung der Daten wird eine spezielle Messanordnung gebraucht, die Messzelle. Die Messzelle eignet sich für die Messungen in der flüssigen Phase, und sie sollte an den Analyten angepasst werden. Eine Messzelle besteht aus einem PDMS (*Polydimethylsiloxan*) Innengehäuse und einem Außenraum aus Plexiglas. (Abbildung siehe unten) Darin wird ein Schwingquarz eingefügt. Die Messzelle wird dann mit einer Oszillatorschaltung verbunden, wodurch die Signale verstärkt werden. Ein einerseits mit der Oszillatorschaltung verbundener Frequenzzähler liest dann die Frequenzen der Eigenschwingungen des Schwingquarzes ab. Andererseits ist der

Frequenzzähler an einem PC angeschlossen, so erfolgt die Daten-Erfassung und Visualisierung.

Um die Frequenz bzw. deren Dämpfung anzusehen wird vor dem Einsatz der Schwingquarz mittels eines Netzwerkanalysators geprüft, somit ein Ausreiß der der Messung nicht passenden Quarze ermöglicht werden kann. Ist die Dämpfung zu groß, darf der Quarz nicht eingesetzt werden, da ein großes Rauschen resultiert.

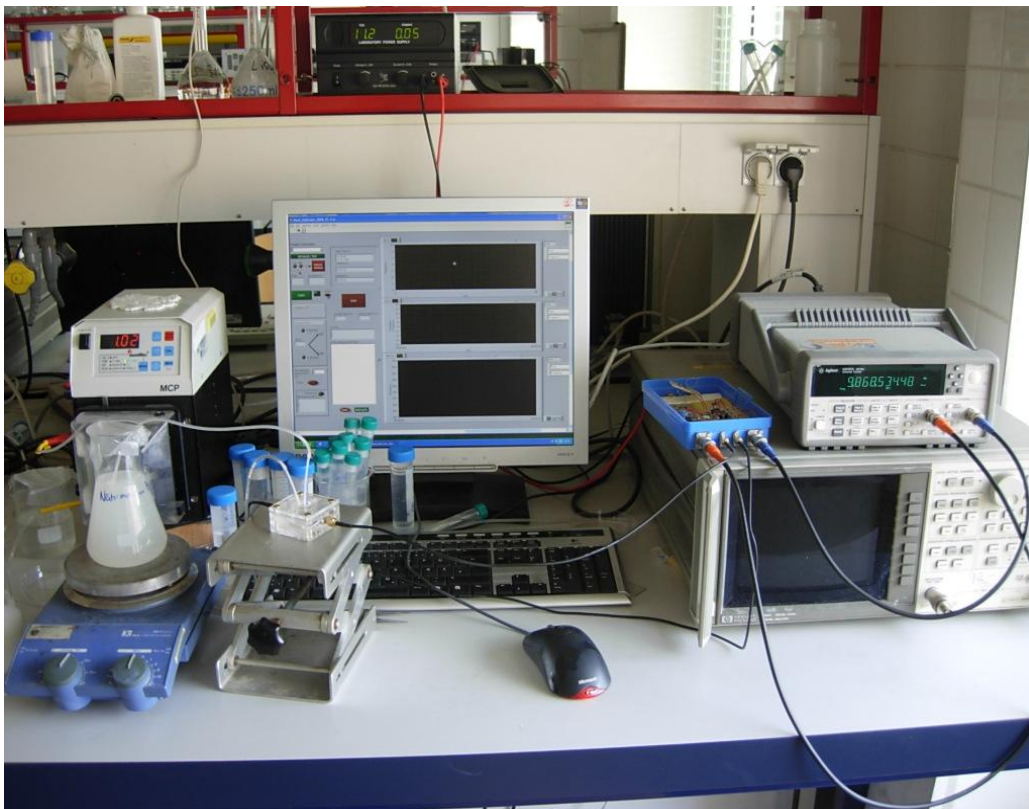


Abbildung 17: Der Messplatz für eine sensorische Untersuchung

3.5 Aufzucht der *E. coli* Bakterien

In dieser Arbeit wurde die Online Monitoring des Wachstums der *E. coli* Bakterien durchgeführt. So wurde ein geeignetes Nährmedium für die Bakterien gebraucht. Das kommerziell erhaltbare Bakterium wurde in einem Nährmedium gezüchtet. Um den Wachstum zu überprüfen wurde die Bakterien mittels eines Zählkammers unter einem UV/Vis- Mikroskop gezählt. Das Standardnährmedium für *E. coli* ist in unterer Tabelle von links zu sehen. Aber dies ist nicht geeignet für die sensorische Messung, da es Hefe-Extrakt enthält, was der Messzelle große Viskosität vergibt. Die Zusammensetzung des Nährmediums, welches in der Literatur als Minimalmedium bezeichnet ist, ergibt sich in der recht stehenden Tabelle von unten.

Standardnährmedium	
NaCl	5g
Hefeextrakt	5g
Peptone	10g

Tabelle 3

Minimalmedium	
Glucose	5g
Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g

Tabelle4

Die Werte beider Tabellen sind auf 1L dest. Wasser bezogen.

4. Ergebnisse

Ein massensensitiver Sensor wurde über einige Arbeitsschritte erzeugt. Jeder Schwingquarz muss nach dem Aufbringen von Elektroden geprüft werden, wie groß seine Eigenfrequenz und wie gut die Dämpfung ist. Es ist immer aufzupassen, dass die sensitive Polymerschicht auf der Elektrode, welche bessere bzw. kleinere Dämpfung besitzt, aufzutragen, somit ein besseres Ergebnis mit geringerem Rauschen bekommen wird. Zur Erzeugung der sensitiven Polymerschicht wurde das Polyurethan mittels Spin- Coating Verfahren auf die Elektrode aufgetragen. Hierbei muss man auf die Spingeschwindigkeit aufpassen, sodass ein möglichst homogener dünner Film besteht. Die Qualität der regulierten Polyurethanschicht kann durch AFM Bilderaufnahme kontrolliert werden.

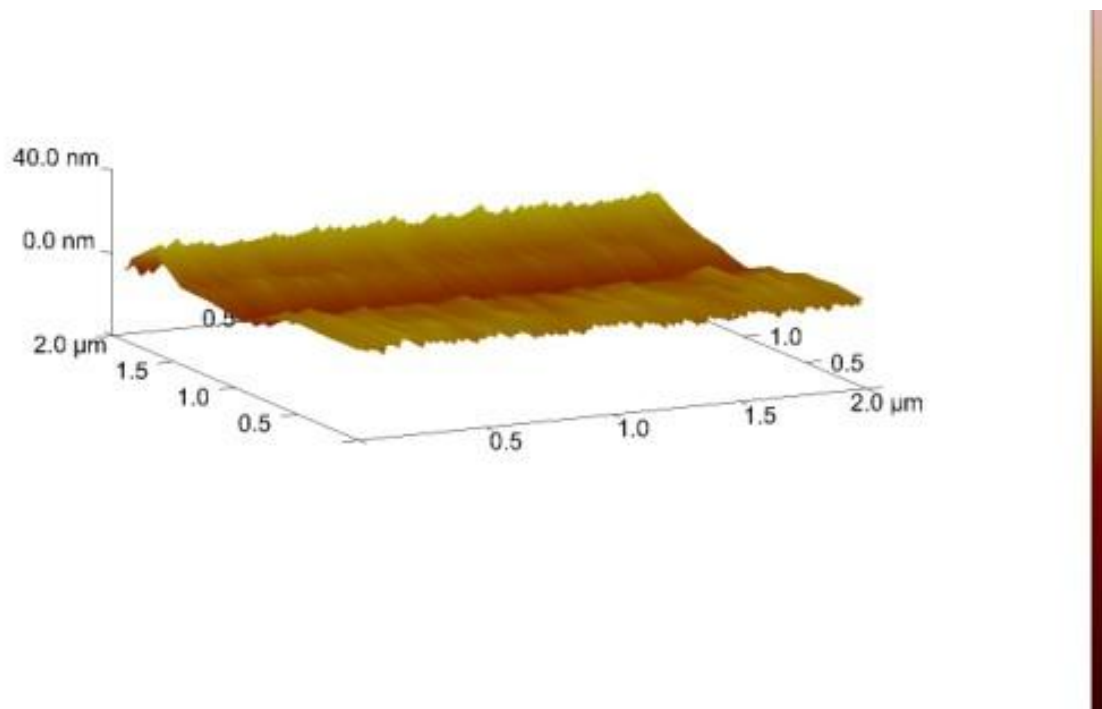


Abbildung 18: 3D Bild Aufnahme von Polyurthanschicht mittels contact mode AFM

Von oben gezeigtem Bild kann es gesehen werden, dass die hergestellte Polymerschicht mit einer sehr kleinen Rauigkeit gute Qualität aufweist. Es ist leicht zu sehen, dass es keine Gasblasen, die durch die Nebenreaktion des Isocyanaten mit der Luftfeuchte entsteht, dabei auftritt.

Bei der Templatherstellung wurde die Bakterienlösung auf ein Glasplättchen pipettiert. Es ist wesentlich, dass die Bakterien sich einander nicht überdecken. Dies kann mit einer richtigen Konzentration der *E. coli* Bakterien erzielt werden. Der Templatstempel kann mittels Mikroskops beobachtet werden.

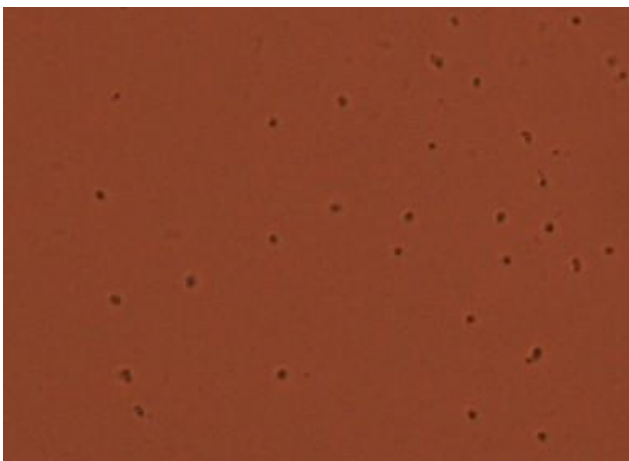


Abbildung 20

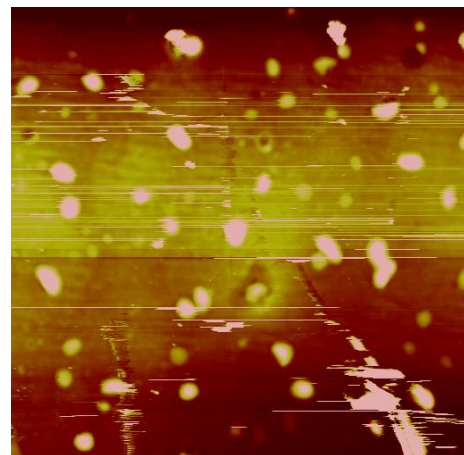


Abbildung 19

Die Stempel werden mittels UV/Vis-Mikroskops (oben links) und Contact Mode AFM (oben rechts) beobachtet

Die beiden Bilder besagen, dass der Stempel gut präpariert ist, bzw. die Bakterien auf der Glassoberfläche homogen aufgeteilt sind. So können bessere Kavitäten gekriegt werden, weiteres ein gutes Messungsergebnis folgt.

Der nächste Arbeitsschritt ist die molekulare Prägung mit dem Stempel. Hier wurde mittels Spin-Coating Verfahren das Polymer auf dem mit Polyurethan

beschichteten Schwingquarz aufgetragen. Der Stempel wurde in die Polymerschicht hineingedrückt, um die richtigen Kavitäten zu bekommen. Vor der Messung sollte die Polymerschicht noch mal durch die AFM- Aufnahme ⁽⁵²⁾ überprüft werden, ob die Bakterien einschließlich ausgewaschen wurden. Abb. zeigt, dass das Bakterium noch in der Kavität bleibt. In diesem Falle sollte der Quarz noch mal im warmen Wasser etwa halbe Stunde gelassen, und dann ein weiteres AFM Bild aufgenommen. Bei diesem unerwünschten Schritt könnte die Polymerschicht ebenfalls ausgewaschen oder zerstört werden, muss deswegen sorgfältig gearbeitet.

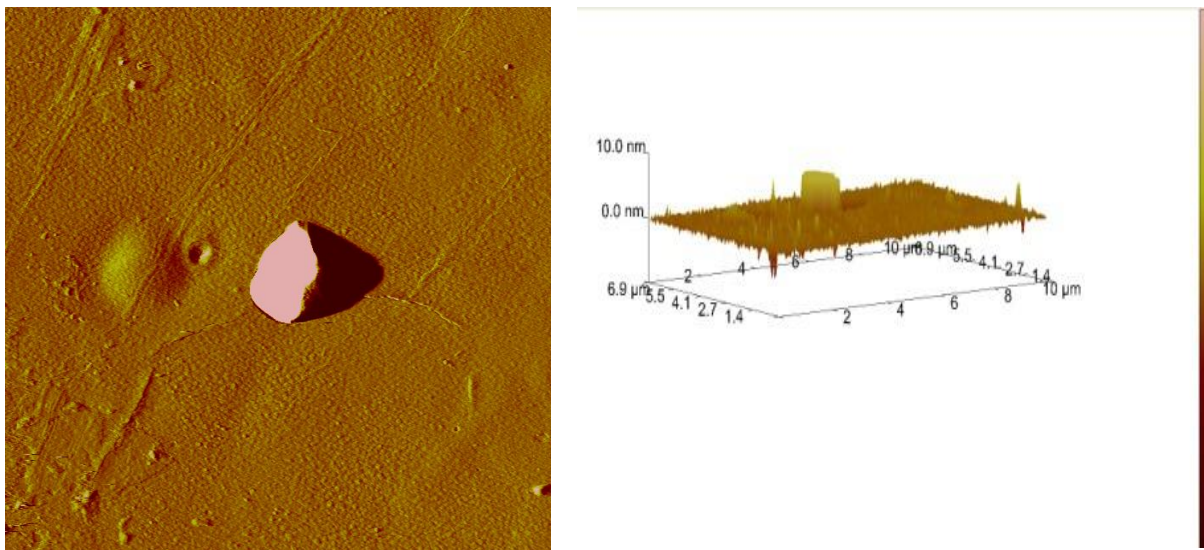


Abbildung 21 Ein E. coli Bakterium bleibt in der Polymerschicht

Nach allen diesen Schritten wurde die Messung gestartet. Der QCM Quarz wurde so in die Messzelle eingebaut, dass die mit Polymer beschichteten Elektroden nach oben liegen, wo die Analytenlösung einfließt. Dann wurden die Kanäle der beiden geprägten und nicht geprägten Elektroden beim Netzwerkanalysator kontrolliert, ob sie gut im Kontakt sind. Anschließend wurde die Messzelle mit dem Messsystem verbunden, d.h. die Messzelle an die Oszillatorschaltung, welche am Frequenzzähler angeschlossen ist, angebunden.

4.1 Konzentrationsabhängigkeit des Sensoreffekts

Die Messung beginnt mit einem Spülvorgang mit destilliertem Wasser. Hier sollte das Wasser mit einer bestimmten Geschwindigkeit in die Zelle von einer Pumpe hinein gepumpt. Hier ist es besonders wichtig, dass in der Zelle sich keine Luftblasen befinden. Dieser Vorgang sollte etwa 1 bis 2 Stunden lang geführt, wobei eine Basislinie bestehen sollte, bzw. die Eigenfrequenzen der Elektroden ausstabilisieren.

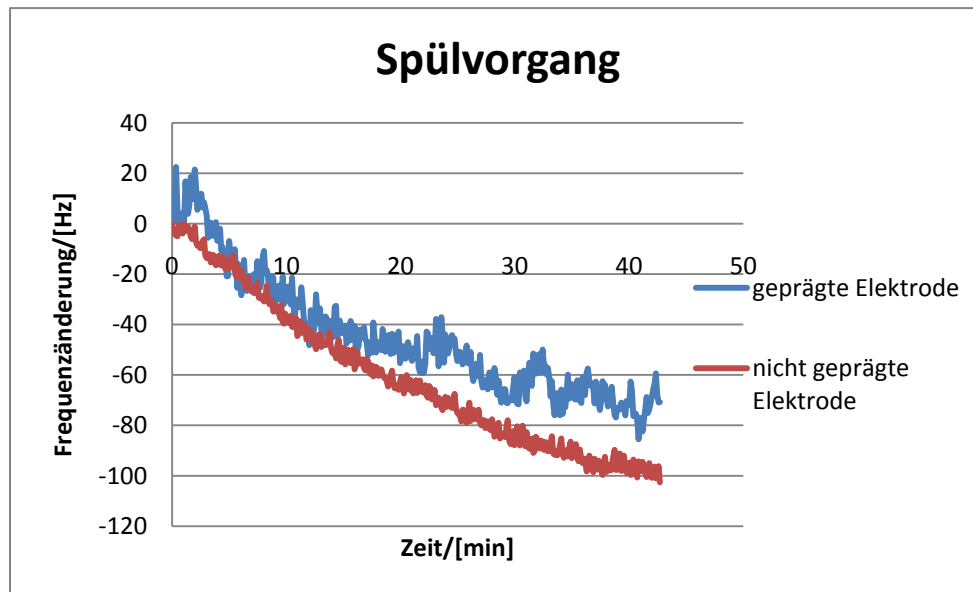


Abbildung 22 Spülvorgang der zwei Elektroden in einer Messzelle, mit destilliertem Wasser
gespült

In Abbildung 24 wurde ein Spülvorgang der zwei Elektroden gezeigt. Hier ist es leicht zu verstehen, dass die geprägte Elektrode eine größere Rauigkeit besitzt gegenüber der nicht geprägten Elektrode. Der Grund liegt darin, dass die geprägte Elektrode eine Polymerschicht mit Kavitäten besitzt, während die nicht geprägte Elektrode auf sich eine wohl homogene Polymerschicht trägt.

Nachdem der Trendlinie entstand, wurden die E. coli Bakterien Lösungen mit aufsteigenden Konzentrationen nacheinander in die Messzelle mit gleicher Pumpengeschwindigkeit gepumpt. Kommen die Bakterien mit der Lösung in die Messzelle herein, lagern sie sich reversibel in die entsprechenden Kavitäten ein. So tritt eine Massenbeladung auf der geprägten Elektrode bzw. der Arbeitselektrode auf, was zu einer Frequenzerniedrigung führt. Bei der nicht geprägten Elektrode sieht man auch eine Frequenzerniedrigung, den sogenannten unspezifischen Effekt, welcher möglicherweise aufgrund des Pumpendrucks und/ oder der Viskositäserhöhung der Lösung kommen könnte. Der absolute Sensoreffekt bekommt man durch die Abzieh von Frequenzerniedrigung der Arbeitselektrode mit der Erniedrigung der Referenzelektrode.

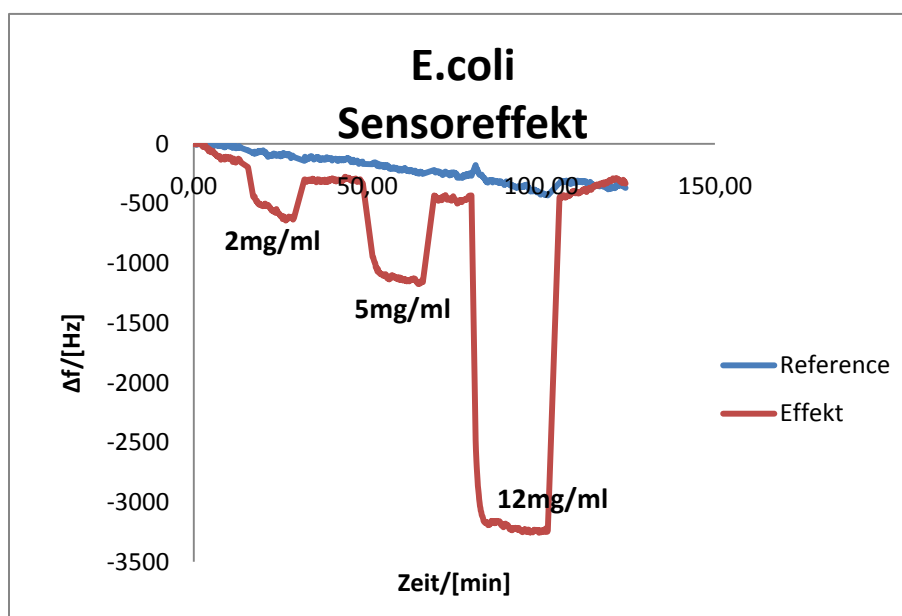


Abbildung 23: Konzentrationsabhängigkeit des Sensoreffekts

Um die Konzentration Abhängigkeit des Sensoreffekts zu bestimmen, wurde den *E. coli* Bakterien Lösung mit verschiedenen Konzentrationen nacheinander der Sensoreffekt gemessen. Dazwischen wurde die Messzelle immer wieder mit destilliertem Wasser gespült. Im idealen Falle, gemäß der Sauerbrey Gleichung sollte die Frequenz wieder zur Basislinie zurück kehren, was bedeutet, dass die in die Kavitäten eingelagerten Bakterien wieder ausgewaschen wurden. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass die Basislinie gut erhalten wurde. Der absolute Sensoreffekt beträgt bei der Konzentration von 2mg/ml etwa 200Hz.

4.2 Über der Anfangskonzentration

Demnach wurde der Wachstumsprozess über die sensorischen Messungen beobachtet. Hierbei wurde die Messzelle nach dem Spülen mit destilliertem Wasser noch mal mit der entsprechenden Nährmedium Lösung gespült. In diesem Falle geschieht sehr oft eine große Verkleinerung der Frequenzen. Die mögliche Ursache dafür wäre dass das Nährmedium aus ionischen Molekülen besteht, so es die Leitfähigkeit in der Zelle verändert. Wenn so was passiert, muss der Spülvorgang noch mal vom Anfang durchgeführt werden. Ein wichtiger Punkt hier ist, dass das Nährmedium immer frisch hergestellt werden muss, und die vorher abgewogenen *E. coli* Bakterien in einem Eppendorfgefäß aufbewahrt, erst vor der Messung in die Medium Lösung zugegeben.

Nachdem die Trendlinie entstand, wurden die *E. coli* Bakterien in die Nährmedium Lösung zugegeben. Diese Lösung wurde unter Rühren in die Messzelle gepumpt. Da diese Untersuchung des Wachstumsprozesses über Tag durchgeführt wird, wird der Ausgangsschraub aus der Zelle wieder in die Medium Lösung hinein gestellt (Abbildung 18, Seite 45). So entsteht ein Fließkreis der Bakterienlösung. Während der Messung vermehren sich die Bakterien im Nährmedium. Logischerweise ist hier eine kontinuierliche Verminderung der Frequenz zu sehen. Und das

Krümmungsverhältnis entspricht der Wachstumsgeschwindigkeit. Das heißt, je steiler die Krümmung ist, desto schneller vermehren sich die Bakterien. In optimaler Bedingung teilen sich die Zellen 1 Mal jede 20 Minuten.

Dieser Messungsvorgang wurde zuerst mit verschiedenen Anfangskonzentrationen bzw. 0,2, 0,5 und 1mg/ml, im Standard Minimal Medium (Tabelle 4, Seite 44) durchgeführt, um das Verhältnis zwischen Anreicherungszeit und der Anfangskonzentration zu beachten. Unten zeigt eine Messung mit Anfangskonzentration von 1mg/ml.

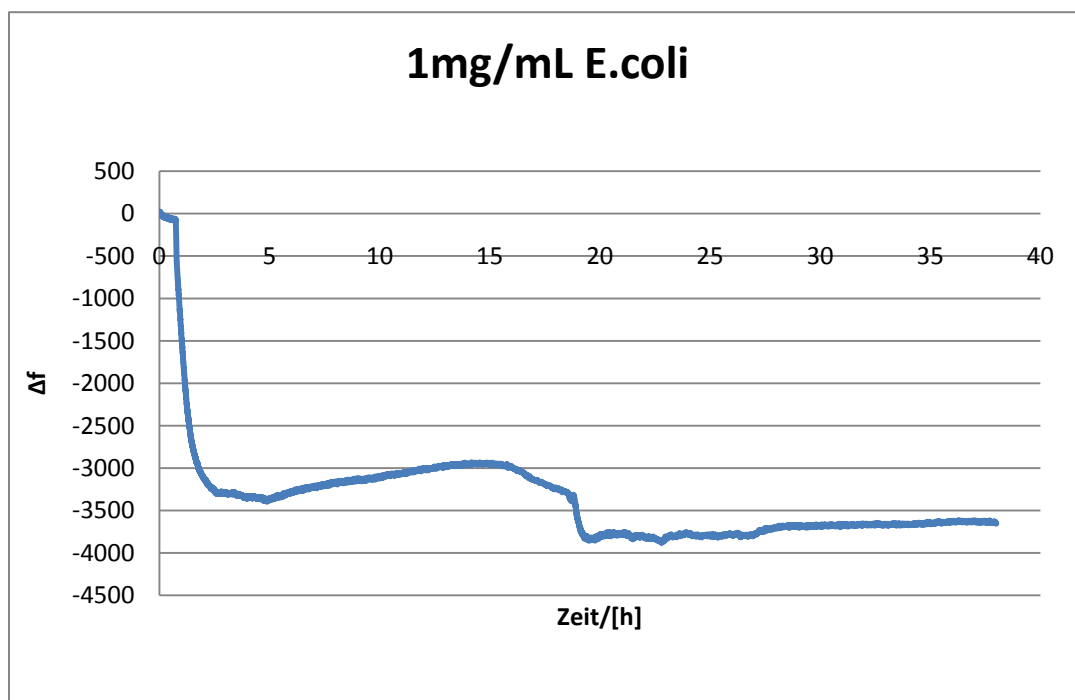


Abbildung 24: Wachstumsprozess mit Anfangskonzentration von 1mg/ml

Analyt: E. coli Stamm W

Bei allen Messungen von E. coli Wachstum senkt die Frequenz in den ersten drei Stunden stark ab, was bedeutet, dass die Bakterien sich schnell teilen, wenn am Anfang das Nährmedium reichlich ist, bzw. wenn es noch im Überschuss ist. Nach

etwa 10 Stunden ging die Kurve zu einer Abflachung. Der Grund dafür liegt darin, dass die Kavitäten alle besetzt sind. In diesem Falle sieht man keine Frequenzänderung mehr. Oder es könnte auch sein, dass die Bakterien sich in der Zeit nicht mehr vermehren. Bei allen Messungen kommt später eine sekundäre Erniedrigung der Frequenz. Möglicherweise haben sich die Bakterien selbst über den Kavitäten organisiert, so dass mehrere Zellen in die Kavitäten eingelagert werden können. Oder während des Wachstumsprozesses erhöht sich die Viskosität der Lösung, könnten die Bakterien einfach auf der Elektrodenoberfläche bleiben, so ein sekundärer Sensoreffekt hervorgerufen wird.

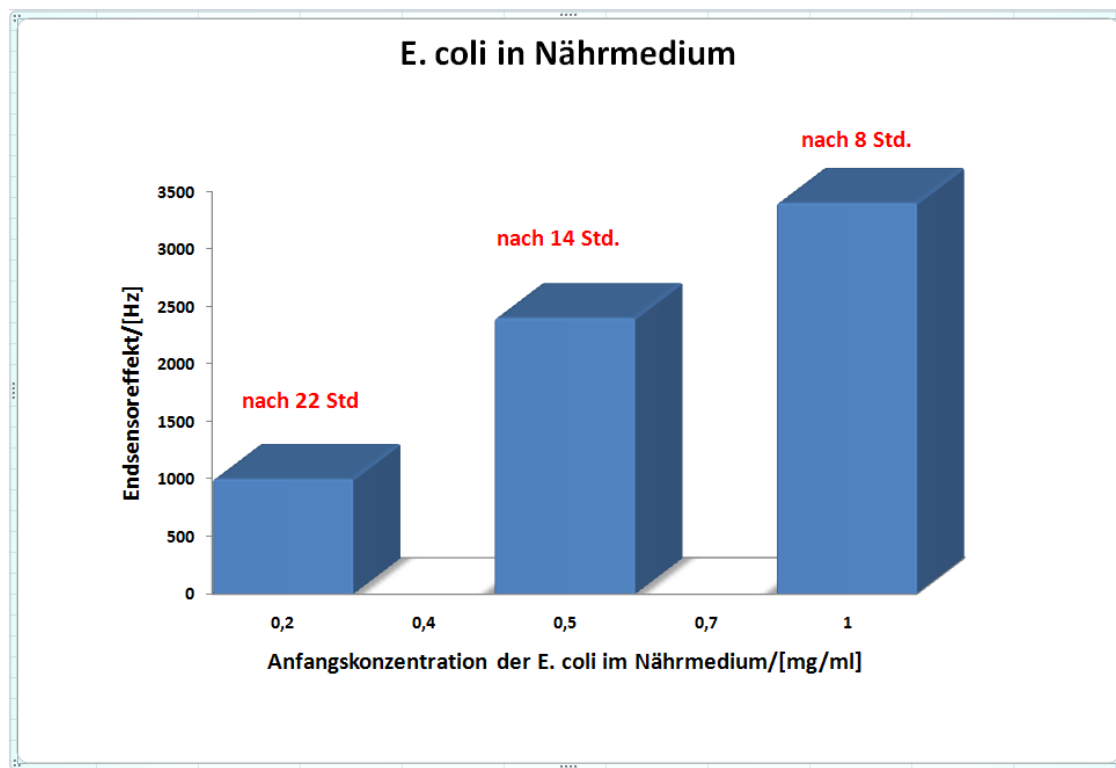


Abbildung 25: Zusammenfassung des Sensoreffekts bei verschiedenen Anfangskonzentrationen

In Abbildung 27 wurde eine Zusammenfassung über die Endsensoreffekte in Anlehnung an der Anfangskonzentration angezeigt. Daraus ist ersichtlich, dass je höher die Anfangskonzentration ist, desto reichert der Sensoreffekt schneller an, umso größer der Endsensoreffekt ist.

4.3 Über dem Nährstoff

Schließlich wurde der Zusatz vom Nährstoff eingestellt, sodass der Einfluss vom Nährstoff auf das Wachstum des Bakteriums ersichtlich wird. Da Glucose der wichtigste Nährstoff für E. coli ist, wurde es mit unterschiedlicher Menge von Glucose gemessen. Dabei ist die Konzentration von E. coli Bakterien auf 0,5mg/ml fest gestellt.

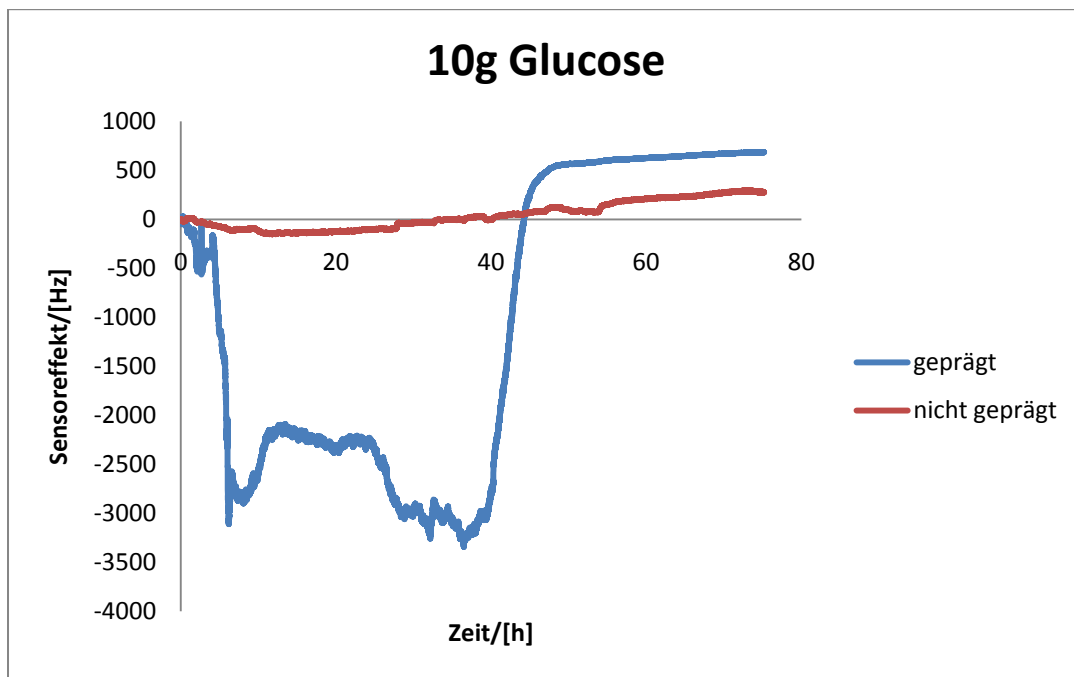


Abbildung 26: Sensoreffekt mit 10g Glucose,nach 40Std. mit dest. Wasser gespült

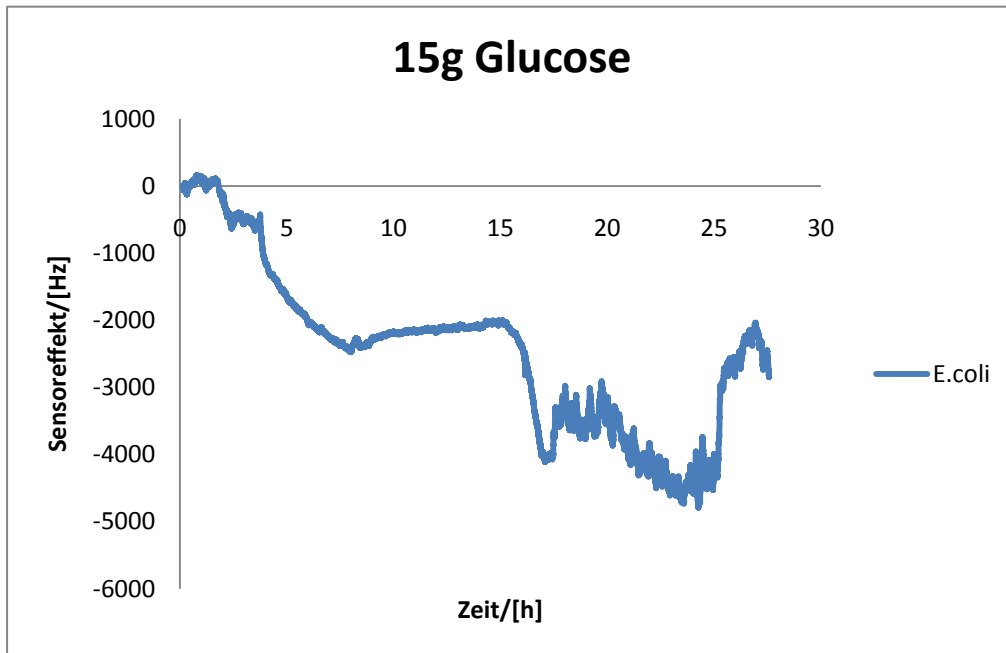


Abbildung 27: Sensoreffekt mit 15g Glucose

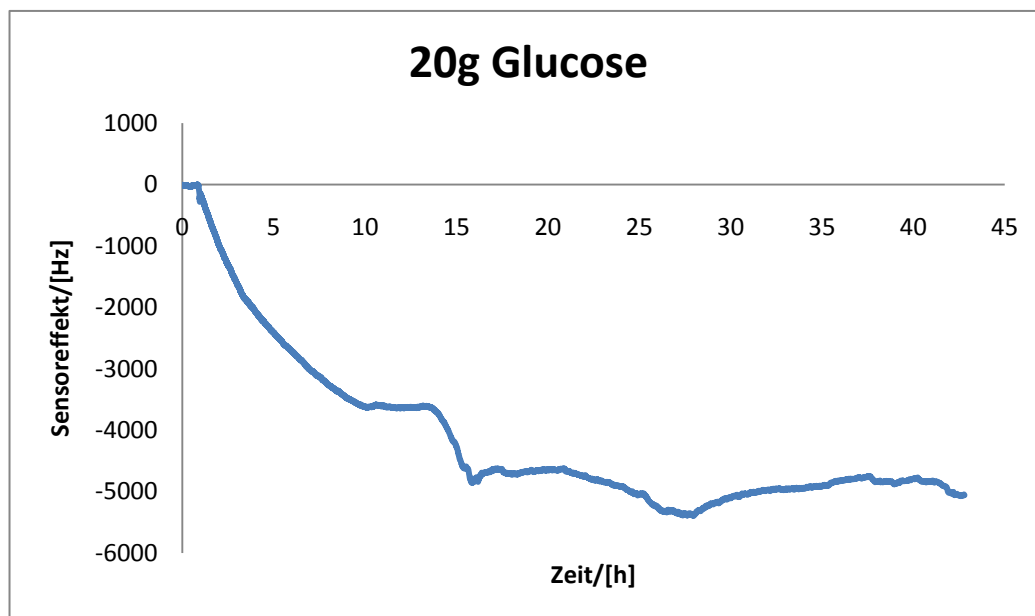


Abbildung 28: Sensoreffekt mit 20g Glucose

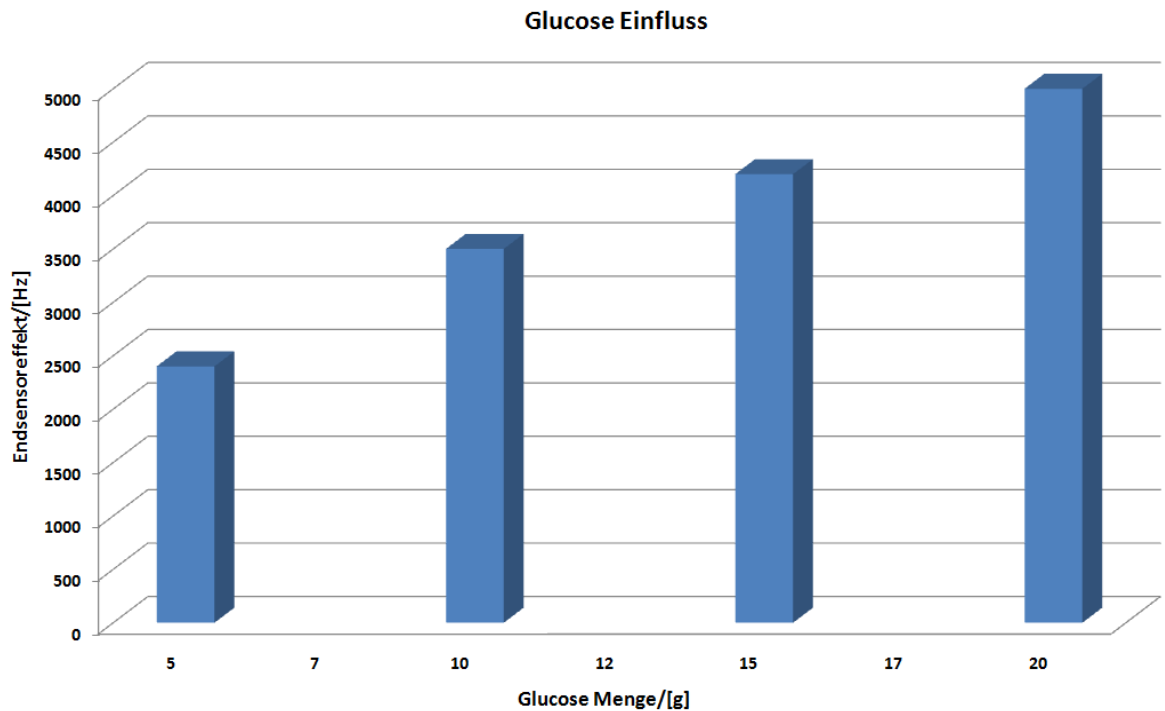


Abbildung 29 Zusammenfassung des Einflusses von Glucose

In Abbildungen 28-30 wurden die Verläufe der Frequenzänderungen angezeigt. In Abbildung 31 wurde wieder eine Zusammenfassung gestellt. Interessanterweise steigt der Sensoreffekt fast linear mit der Zugabe von Glucose. Bei der Zugabe von 20g Glucose beträgt die Frequenzerniedrigung 5kHz. Außerdem ist es anzudeuten: Obwohl der größte Endeffekt bei höchster Zugabe von Glucose liegt, treten die größte Wachstumsgeschwindigkeit und die kürzeste Anreicherungszeit jedoch bei ihrer kleinsten Menge. Es ist so umgekehrt wie bei der Einstellung von Bakterienkonzentration. Bei der Zugabe von 10g Glucose wurde ein Spülvorgang mit destilliertem Wasser nach der Abflachung der Messkurve zusätzlich gemacht. Wie gezeigt, die Frequenz steigt über Stunden wieder zurück, dann aber über Null Wert aufstieg. Es könnte so sein, dass durch lange Zeit des Spülens die Polymerschicht zerstört war und von der Quarzoberfläche abgewaschen würde.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsch

Im Rahmen meiner Arbeit wurde das *Escherichia coli* Bakterium als Analyt untersucht. Insbesondere wurde das Wachstum des Bakteriums überwacht. Das *Escherichia coli* dient seit langer als Modellmikroorganismus für die Gram negativen Bakterien in der Biologie und Biochemie. Die Untersuchung wurde mittels eines chemischen Sensors, der mit einem polymer beschichteten Schwingquarz (*engl. QCM Quartz Crystal Microbalance*) ermöglicht. Die gesamte Untersuchung wurde in der flüssigen Phase durchgeführt. Die molekulare Prägung ergibt dem massensensitiven Sensor die Kompetenz, die biologischen Moleküle bzw. Mikroorganismen selektiv zu detektieren. Zur Entwicklung eines massensensitiven Sensors für die Mikroorganismen sollte zum Ersten ein dem Bakterium bzw. der Messung geeignetes Polymer hergestellt. Die auf einem Glasstempel immobilisierten Bakterien (Templatstempel) wurden ins Polymer hineingedrückt. Nach der Entfernung des Stempels und dem Auswaschen der Bakterien entstand die selektive Schicht mit den Bakterien entsprechenden Kavitäten. So wurde ein selektiver massensensitiver Sensor hergestellt. Als Sensorantwort erhielt man eine Erniedrigung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes, wenn die Analytenbakterien in die Kavitäten eingelagert wurden, was dem Sauerbrey Effekt entspricht. Beim Online Monitoring des Wachstums der Bakterien in einem Nährmedium wurde eine kontinuierliche Abnahme der Frequenzantwort beobachtet.

Diese Methode ist geeignet für *Escherichia Coli* Bakterien zu detektieren. Sie könnte in Zukunft für die Überwachung von Abwässer bzw. Grundwässer entwickelt werden. Es kann analog für die anderen Mikroorganismen verwendet

werden, sodass die biologischen Bedrohungen mit Sensoren „on-line“ verfolgt werden kann.

5.2 Englisch

In this work, the detection of micro organisms, *Escherichia Coli* was approached. In particular, the increase of the bacteria in a mineral medium was monitored by use of a chemical sensor, which is based on a QCM (Quartz Crystal Microbalance). In Biology and biological Chemistry, the *Escherichia Coli* is a so-called model micro organism for the gram negative bacteria, which is worldwide researched since it was found out. Dependent on the molecular imprinting technique, the chemical sensors were developed with the capacity to detect great biological molecules and even some micro organisms, to a new branch of sensors, the so called biomimetic model sensors. In reason that the bacteria have to be raised in a special culture medium, the overall assay was implemented in aqueous phase. To form a mass sensitive sensor, the quartz was coated with a polymer, which is suitable for the detection of analytes. Then the template stamp on glass, on which the bacteria were immobilized, was pressed into the polymer film. The selective cavities were finally formed in the polymer, after the stamp was removed and the template bacteria were washed out of the polymer. Thus a mass sensitive chemical sensor, which is selective to the bacteria, was accomplished.

A degradation of the frequency presents the response of the sensor, whereas the analytes go into the cavities. This manner obeys the Sauerbrey equation. During the online monitoring of the increase of bacteria, the frequency decreased continuously till a saturation of the sensor response.

In this work, it's been proved that the mass sensitive chemical sensor based on the molecular imprinting technique, is very suitable for the detections of *Escherichia*

coli, even applicable for the longtime detecting. This technique could be further developed for the observation of groundwater and wastewater in future. In analogy it may be applied for other bacteria.

6. Anhang

6.1 Ger äte

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

Frequenzz ähler /HP 53131 A

AFM Nanoscope IIIa, Extented Multimode (digital instruments)

Auflichtmikroskop /Wild Heerbrugg M3Z

Ofen /Heraeus, Thermicon P

6.2 Chemikalien

Bisphenol-A (99+%, Aldrich, 239658-50G), 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), Glucose, NaCl, Pepton, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 ,
Hefeextrakt.

7. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. **P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert.** Chemosensors in Environmental Monitoring: Challenges in Ruggedness and Selectivity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* . 2009, Vol. 393, 467.
2. **Gründler, Peter.** *Chemische Sensoren*. s.l. : Springer, 2004.
3. **Edelman, Peter.** *Biosensors and chemical sensors*. Washington DC : American chem. Soc, 1992.
4. **K. Seidler, P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert.** Application of yeast imprinting in biotechnology and process control. *Analyst*. 2009, Bd. 134, 361.
5. **F. L. Dickert, O. Hayden.** Nano- and micro-structuring of sensor materials – from molecule to cell detection. *Synthetic Metals*. 2003, Bd. 138, 65-69.
6. **Nießer, R.** Chemische Sensoren – Prinzipien und Anwendung. [Buchverf.] R. Borsdorf. *Analytiker Taschenbuch*. Berlin : Akademie Verlag, 1987.
7. **Dickert, F. L.** *Chemie in unserer Zeit*. 1992, Bd. 3, 138-143.
8. **Dickert, G. Fischerauer and F.L.** An Analytic Model of the Dynamic Response of Mass-Sensitive Chemical Sensors. *Sens. Actuators B*. 2007, Vol. 123, 993.
9. **Camman, K.** *Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden*. s.l. : Springer Verlag, 1997.
10. **Hauptmann, P.** *Sensoren – Prinzipien und Anwendungen, 1. Auflage*. München : Hanser Verlag, 1990.
11. **Oehme, F.** *Chemische Sensoren heute und morgen, 1. Auflage*. Renningen-Mannheim : Expert Verlag, 1994.
12. **O. Hayden, K.-J. Mann, S. Krassnig, and F.L. Dickert.** Biomimetic ABO Blood-Group Typing. *Angew. Chem. Int.* . 45, 2006, 2626.
13. **P. A. Lieberzeit, A. Rehman, N. Iqbal, B. Najafi, F. L. Dickert.** QCM Sensor Array for Monitoring Terpene Emissions from Odoriferous Plants. *Monatsh. Chem.* 2009, Vol. 140, 947.

14. **P.A. Lieberzeit, A. Afzal, D. Podlipna, S. Krassnig, H. Blumenstock, F.L. Dickert.** Printing Materials in Micro - and Nano-Scale - Systems for Process Control. *Sens. Actuators B.* 2007, Vol. 126, 153.
15. **F.L. Dickert, P.A. Lieberzeit, P. Achatz, C. Palfinger, M. Fassnauer, E. Schmid, W. Werther and G. Horner.** QCM array for on-line-monitoring of composting procedures. *Analyst.* 2004, Vol. 129, 432.
16. **A. Rehman, N. Iqbal, P. A. Lieberzeit, F.L. Dickert.** Multisensor biomimetic systems with fully artificial recognition strategies in food analysis. *Monatsh. Chem.* 2009, Vol. 143, 931.
17. **P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert.** Chemosensors in Environmental Monitoring: Challenges in Ruggedness and Selectivity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* . 2009, Vol. 393, 467.
18. **Dickert, F.L.** Chemosensoren für Gase und Lösungsmitteldämpfe - Ein Beitrag zur Umweltanalytik. *Chemie in unserer Zeit.* 1992, Vol. 26, 138.
19. **Dickert, P.A. Lieberzeit and F.L.** Sensor Technology and its Application in Environmental Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, Vol. 387, 237-247.
20. **P.A. Lieberzeit, G. Glanznig, M. Jenik, S. Gazda-Miarecka, F.L. Dickert, and A. Leidl.** Softlithography in Chemical Sensing – Analytes from Molecules to Cells. *Sensors.* 2005, Vol. 5, 509.
21. **O. Hayden, D. Podlipna, X. Chen, S. Krassnig, A. Leidl, and F. L. Dickert.** Nanolithography and subnano molecular interactions for biomimetic sensors. *Materials Science and Engineering C.* 2006, Vol. 26, 924.
22. **Kleber, W.** *Einführung in die Kristallographie, 17. Auflage.* Berlin : Verlag Technik, 1985.
23. **West, A.R.** *Grundlagen der Festkörperchemie, 1.Auflage.* Weinheim New York Cambridge Basel : VCH Verlagsgesellschaft, 1992.
24. **P.A. Lieberzeit, W. Greibl, H. Stathopoulos, F.L. Dickert, G. Fischerauer, W.-E. Bulst.** Covalently Anchored Supramolecular Monolayers on Quartz Surfaces for Use in SAW Sensors. *Sensors and Actuators B.* 2006, Vol. 113, 677.
25. **Briese, W.** *Schwingquarze, ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik.* Berlin : Vistas Verlag, 1985.

26. **Hauptmann, P.** *Sensoren: Prinzipien und Anwendungen*. München Wien : Carl Hanser Verlag, 1990.
27. **K. K. Kanazawa, J. G. Gordon.** The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. *Anal. Chim. Acta.* 175, 1985, Vols. 99-105.
28. **P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert.** Rapid bioanalysis with chemical sensors: novel strategies for devices and artificial recognition membranes. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, Vol. 391, 1629.
29. **O. Hayden, C. Haderspöck, S. Krassnig, X. Chen and F.L. Dickert.** Surface Imprinting Strategies for the Detection of Trypsin. *Analyst.* 2006, Vol. 133, 1044.
30. **Franz L. Dickert, Oliver Hayden.** Molecular imprinting in chemical sensing. *trends in analytical chemistry.* vol. 18, no. 3, 1999.
31. **O. Hayden, P. A. Lieberzeit, D. Blaas, and F.L. Dickert.** Artificial Antibodies for Bioanalyte Detection - Sensing Viruses and Proteins. *Adv. Funct. Mater.* 2006, Vol. 16, 1269.
32. **F.L. Dickert, P. Lieberzeit, S. Gazda Miarecka, K.-J. Mann, O. Hayden, C. Palfinger.** Synthetic receptors for chemical sensors - subnano- and micrometre patterning by imprinting techniques. *Biosensors and Bioelectronics* . 2004, Vol. 20, 1040.
33. **Schuster, F.L. Dickert und O.** Piezoelektrische Chemosensoren - von der Adsorption zur molekularen Erkennung mit Host-Guest Chemie. *Chemie in unserer Zeit.* 1994, Vol. 28, 147.
34. **F.L. Dickert, A. Haunschild.** Sensor Materials for Solvent Vapour Detection - Donor-Acceptor and Host-Guest Interactions. *Adv. Mater.* 1993, Vol. 5, 887.
35. **G. Wulff, A. Sarhan.** *Angew. Chem.* 1972, Vol. 84, 364-381.
36. **Mosbach, K.** *Trends Biochem. Sci.* 1994, Vol. 19, 9.
37. **O. Hayden, P. A. Lieberzeit, D. Blaas, and F.L. Dickert.** Artificial Antibodies for Bioanalyte Detection - Sensing Viruses and Proteins. *Adv. Funct. Mater.* 2006, Vol. 16, 1269 .
38. **M. Jenik, A. Seifner, S. Krassnig, K. Seidler, P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert, C. Jungbauer.** Sensors for Bioanalytes by Imprinting - Polymers Mimicking both Biological Receptors and the Corresponding Bioparticles. *Biosensors and Bioelectronics.* 2009, Vol. 25, 9.

39. **F. L. Dickert, O. Hayden.** Bioimprinting of Polymers and sol-gel phases. Selective detection of yeast with imprinted polymers. *Analytical Chemistry*. 2002, Vol. 74, 1302-1306.
40. **M. Jenik, R. Schirhagl, C. Schirk, O. Hayden, P. Lieberzeit, D. Blaas, G. Paul, F. L. Dickert.** Sensing Picornaviruses Using Molecular Imprinting Techniques on a Quartz Crystal Microbalance. *Analytical Chemistry*. 2009, Vol. 81, 5320-5326.
41. **F.L. Dickert, P. Lieberzeit, S. Gazda-Miarecka, K. Halikias, K.-J. Mann.** Modifying Polymers by Selforganisation for the Mass-Sensitive Detection of Environmental and Biogenous Analytes. *Sensors and Actuators B*. 2004, Vol. 100, 112.
42. **P.A. Lieberzeit, C. Schirk, G. Glanznig, S. Gazda-Miareck, R. Bindeus, H. Nannen, Jörg Kauling und F.L. Dickert.** From Nanopatterning to Functionality - Surface- and Bulkimprinting for Analytical Purposes. *Superlattices and Microstructures*. 2004, Vol. 36, 133.
43. **P.A. Lieberzeit, W. Greibl, M. Jenik, F.L. Dickert, G. Fischerauer, W.-E. Bulst.** Cavities generated by self-organized monolayers as sensitive coatings for surface acoustic wave resonators. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, Vol. 387, 561-566.
44. **Todar, K.** Pathogenic E. coli. *Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin–Madison Department of Bacteriology : s.n.
45. **Oesterschulze, E.** The potential of the scanning probe microscopy for thin Film characterization. *Surface and Coatings Technology*. 1997, Vol. Volume 97, Issues 1-3, 694-706.
46. **Stroppe, H.** *Physik für Studenten der Natur- und Ingenieurwissenschaften*, 13. Auflage. FV Leipzig : s.n., 2005.
47. **Hecht, L. Novotny und B.** *Principles of Nano-Optics*. New York : Cambridge University Press, 2006.
48. **N. K. Myshkin, A. Ya. Grigoriev, S. A. Chizhik, K. Y. Choi and M. I. Petrokovets.** Surface roughness and texture analysis in microscale. *Wear*. 2003, Vol. Volume 254, Issue 10, 1001-1009.
49. **F. L. Dickert, K. Halikias.** Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials. *Sensors and Actuators B*. 2001, Vol. 3768, 1-4.

50. **M. Jenik, R. Schirhagl, C. Schirk, O. Hayden, P. Lieberzeit, D. Blaas, G. Paul, F. L. Dickert.** Sensing Picornaviruses Using Molecular Imprinting Techniques on a Quartz Crystal Microbalance. *Analytical Chemistry* . 2009, Vol. 81, 5320-5326.
51. **M. JenikSeifner, P. A. Lieberzeit, F. L. DickertA.** Pollen-imprinted polyurethanes for QCM allergen sensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* . 2009 年, 卷 394, 523-528 .
52. **F. L. Dickert, P. Achatz, K. Halikias.** Double molecular imprinting - a new sensor concept to improve selectivity in detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, Vol. 371, 11.
53. **Sauerbrey, G.** *Z. Phys.* 155, 1959, Vol. 206.
54. [Online] Public Library of Science, 08 07, 2005.
<http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0030045>.

Lebenslauf

Personalien

Name: Yamin Zhou

Geburtsdatum: 16.07.1983

Geburtsort: Tsingtao, China

Wohnort : 1230 Wien

Familienstand: ledig

Schulbildung

09.1989- 07.1994 Grundschole in Tsingtao, China

09.1994- 07.1997 Mittelschole in Tsingtao, China

09.1997- 07.2000 Gymnasium in Quzhou, China, Abschluß Abitur

Studium:

9.2002- 1.2004 Fakultät der Chemie
Qingdao University for Science and Technology
Richtung: Technische Chemie

4.2004-8.2004 Hochschule der Universität Wien
Sprache Kurs: Deutsch

10.2004 angemeldet für das Studium der Richtung Chemie

10.2008 bis jetzt Diplomarbeit bei O. Univ. Prof. Franz. L. Dickert
Im Institut für analytische Chemie und
Lebensmittelchemie der Fakultät für Chemie