



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Chemosensorik von „Escherichia coli“ in realen Matrices

Verfasser

Bernhard Pummer

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2009

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplom Chemie

Betreuerin / Betreuer:

O. Univ.-Prof. Franz L. Dickert

Vorwort:

Diese Arbeit entstand in der Zeit von September 2008 bis Jänner 2009 in der Arbeitsgruppe von O. Prof. Franz Dickert, am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Währinger Straße 38, A-1090 Wien. Finanziert wurde sie vom Nanosecure-Projekt der Europäischen Union zur Messung von Biogefahren, wie Anthrax.

Danksagung:

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei meinem Betreuer Prof. Dickert für die Aufnahme, Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen bedanken, die mich unterstützt haben und mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen haben. Ganz besonderer Dank gilt hier Frau Mag. R. Schirhagl, die mich eingeschult und mit ihrem Wissen immer unterstützt hat. Weiterer Dank gilt Herrn Mag. P. Grillberger für die Erstellung von elektronischen Schaltungen und Herrn Mag. A. Biedermann für die umfangreiche Bereitstellung von Messprogrammen.

Ich bedanke mich auch bei der Europäischen Kommission für die Finanzierung meiner Arbeit im Rahmen des Nanosecure-Projekts EU-FP6 IP 505463-1.

Und bei meiner Familie und meinen Freunden.

Inhaltsverzeichnis:

| | | |
|------|-----------------------------|---------|
| 1. | Einführung |4 |
| 1.1. | Zielsetzung |4 |
| 1.2. | Eigenschaften von Bakterien |4 |
| 1.3. | Quarzmikrowaage |7 |
| 1.4. | Rasterkraftfeldmikroskopie |12 |
| 1.5. | UV/VIS-Mikroskopie |13 |
| 2. | Verschiedene Matrices |14 |
| 2.1. | Wasser |14 |
| 2.2. | Maßlösungen |18 |
| 2.3. | Lebensmittel |25 |
| 2.4. | Nährmedium |36 |
| 3. | Stressbehandlung |40 |
| 3.1. | Thermische Behandlung |40 |
| 3.2. | UV-Licht & Ultraschall |44 |
| 3.3. | Verdauung |47 |
| 4. | Andere Messungen |49 |
| 4.1. | Denaturierung von Schichten |49 |
| 4.2. | Stammselektivität |51 |
| 5. | Zusammenfassung |53 |
| 5.1. | Deutsch |53 |
| 5.2. | English |53 |
| | Quellen |56 |
| | Lebenslauf |59 |

1. Einführung

1.1. Zielsetzung:

Bakterien sind Prokaryoten, die ubiquitär alle Lebensräume auf der Erde bevölkern. Manche von ihnen sind harmlos oder nützlich, während andere wiederum gefährliche Krankheiten auslösen können. Deshalb ist es sinnvoll, Lebensmittel, Trinkwasser und die Umwelt hinsichtlich ihrer Mikroflora zu untersuchen. Viele Bearbeitungsschritte von Lebensmitteln – allen voran die Temperaturbehandlung – dienen der Abtötung von Keimen. Daher ist es interessant zu wissen, welche Bakterien unter welchen Bedingungen und warum absterben.

Da *Escherichia coli* als Modellorganismus [1] in der Vergangenheit am genauesten erforscht wurde, wird er auch in dieser Diplomarbeit als Modell herangezogen. *E. coli* werden in verschiedenen Hintergrundmedien und unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht. Außerdem ist *E. coli* dem Anthrax-Bakterium sehr ähnlich, welches als biologischer Kampfstoff eingesetzt wird, sodass er auch im Rahmen des Nanosecure-Projekts untersucht wird. Es wurden dafür folgende Methoden verwendet: Quarzmikrowaagen, Atomkraftmikroskopie und UV/VIS-Mikroskopie.

1.2. Eigenschaften von Bakterien:

Bakterien sind einzellige Lebewesen, die keinen Zellkern besitzen. Sie werden als Prokaryoten bezeichnet und stehen den Eukaryoten (Pilze, Pflanzen, Tiere) gegenüber. Sie sind meist 0.5-3µm groß und damit viel kleiner als eukaryotische Zellen. Daher besitzen sie auch keine so stark abgegrenzten interzellulären Kompartimente. Sie können phänomenologisch nach folgenden Kriterien klassifiziert werden:

- Zellwand: grampositiv, gramnegativ
- Zellform: Stäbchen, Kokken (Kugeln), Spiralen
- Lebensraum: aerob, fakultativ, anaerob
- Ernährung: autotroph, heterotroph
- Begeißelung: atrich, monotrich, amphitrich, lophotrich, peritrich

Beim Gramfärbetest wird die Zellkultur zunächst mit Gentianaviolett und Lugol'scher Lösung eingefärbt, sodass sie blauviolett erscheinen. Anschließend

werden sie mit Ethanol gewaschen und erneut mit Fuchsinrot eingefärbt. Die endgültige Farbe hängt vom Aufbau der Zellwand ab: Grampositive Bakterien besitzen einen dicken Peptidoglycan-Panzer, der sie vor rauen Umgebungsbedingungen schützt. Sie leben daher im Boden und auf freien Oberflächen. Peptidoglycan lagert die blauvioletten Farbkomplexe beim Färbungstest irreversibel ein, sodass die Zellen am Ende violett erscheinen. Gramnegative Bakterien besitzen nur eine sehr dünne Peptidoglycanschicht, die zwischen zwei Lipidmembranen eingebettet liegt. Sie sind daher empfindlicher und leben bevorzugt in Gewässern und tierischen Verdauungsorganen. Da das Peptidoglycan durch eine Membran von der Außenwelt getrennt ist, werden die Farbstoffe nicht gebunden und vom Ethanol weggespült. Es bleibt nur die Färbung durch Fuchsinrot, die Zellen erscheinen rosa. [2]



Abb.1: Der Aufbau der Zellwand von grampositiven und gramnegativen Bakterienzellen.

Bakterienzellen können unterschiedliche Formen haben. Am häufigsten ist die Stäbchenform. Es gibt jedoch auch – vor allem bei den grampositiven Bakterien – kugelige Kokken. Weiters gibt es Zellen die spiralförmig eingerollt sind.

Aerobe Bakterien brauchen Luftsauerstoff, um ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten zu können. Sie bevölkern daher die sichtbare Umgebung. Anaerobe Bakterien haben einen vom Sauerstoff unabhängigen Stoffwechsel. Im Gegenteil reagieren viele Arten empfindlich auf Kontakt mit diesem aggressiven Gas – sie bevölkern daher sauerstofffreie Zonen. Fakultative Bakterien können sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen leben. [3]

Bakterien können sich auf verschiedene Weisen ernähren. Heterotrophe Bakterien sind auf das Vorhandensein von Nährstoffen, die andere Lebewesen produziert haben, angewiesen. In diese Gruppe fallen Destruenten, die totes Gewebe zersetzen, Symbionten, die zum gegenseitigen Vorteil von einer anderen Spezies ernährt werden (z.B. Haut- und Darmflora), und Parasiten, die auf Kosten anderer Lebewesen leben und pathogen sind. Autotrophe Bakterien synthetisieren ihre Nährstoffe aus einfachen organischen Verbindungen.

Gewinnen sie die dafür nötige Energie aus Sonnenlicht, heißen sie photoautotroph (z.B.: Blaualgen, Purpurbakterien), gewinnen sie sie aus chemischen Reaktionen, heißen sie chemoautotroph. [4]

Bakterienzellen können an ihrer Oberfläche Geißeln tragen, mit denen sie sich aktiv bewegen können. Man unterscheidet je nach Lage und Anzahl der Geißeln verschiedene Typen: atrich (geißellos), monotrich (eine Geißel), amphitrich (zwei gegenüberliegende Geißeln), lophotrich (Geißel-Büschel an einer Stelle), peritrich (ganzflächig begeißelt).

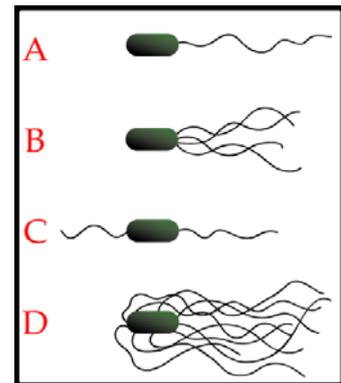


Abb.2: Verschiedene Begeißelungen [5]

Escherichia coli ist ein gramnegativer, fakultativ anaerober, heterotropher, stäbchenförmiger Bakterienstamm, der als Teil der Darmflora im Dickdarm der Säugetiere lebt. Obwohl die meisten Arten für den Menschen unschädlich sind, gibt es einige pathogene und fakultativ pathogene Arten [6]. E. coli ernährt sich hauptsächlich von Zuckern, wie Glucose oder Lactose, und wächst optimal bei 37°C, was der menschlichen Körpertemperatur entspricht. Es ist peritrich begeißelt und kann sich in Lösung aktiv fortbewegen. Dadurch kann es einem Nährstoffgradienten zu höheren Nährstoffkonzentrationen folgen, oder Bedrohungen wie hohen Salzkonzentrationen und extremen pH-Werten ausweichen. E. coli bildet beim Wachstum auf Oberflächen einen dichten Biofilm und verdrängt damit andere Keime. Als Bestandteil der Darmflora schützt es den Darm so vor der Besiedelung durch pathogene Keime.

E. coli wird bei Temperaturen über 70°C abgetötet [7,8]. Der Grund hierfür ist, dass einige wichtige Enzyme, wie beispielsweise die für die DNA-Replikation wichtige DNA-Polymerase I, denaturiert werden. Daher werden Lebensmittel wie Milch und Fruchtsäfte pasteurisiert, um die Keimzahl zu reduzieren und die Haltbarkeit zu verlängern. Je höher die Temperatur ist, umso rascher sterben die Bakterien ab. Streng genommen kommt es bereits bei unter 70°C zu einer Keimreduktion, allerdings ist sie langsamer. Die Dezimale Reduktionszeit, oder D-Wert, ist jene Zeitspanne, die nötig ist, um 90% der Bakterien abzutöten. Da das Bakterienabsterben bei Hitze ein Reaktionsgesetz erster Ordnung ist, ist der D-Wert von der Gesamtzeit unabhängig. Aber er sinkt mit steigender Temperatur. Beispielsweise beträgt der D-Wert für mesophile Bakterien (Bakterien, die im Bereich 10-45°C leben, zu denen auch E. coli gehört) 12min bei 60°C und 3min bei 70°C [9].

1.3. Quarzmikrowaage – Sensor:

Ein Sensor ist ein Messfühler, der in der Analytik zur Detektion eines bestimmten Stoffes dient. Er besteht im Prinzip aus drei Teilen: einer sensitiven Schicht, die selektiv die gesuchte Komponente in einer komplexen Probe adsorbieren kann, einem Transducer, der die Adsorption in ein elektrisches Signal umwandelt, und einem Computer, der dieses Signal aufnimmt, interpretiert und darstellt.

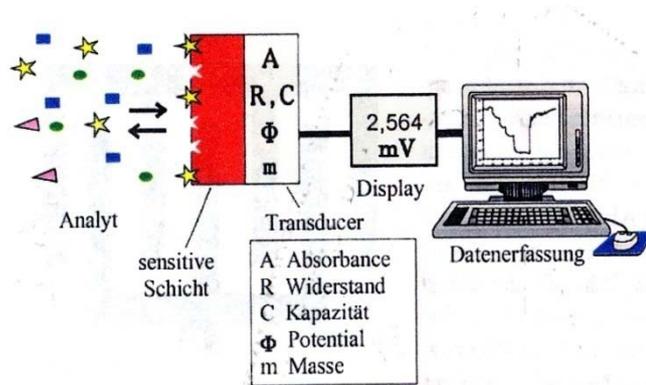


Abb.3: eine Sensoranlage [10]

Der am häufigsten angewandte Sensor ist die sogenannte Lambda-Sonde, die das Benzin-Luft-Verhältnis im Brennraum von Kfz-Motoren einstellt. Dadurch wird eine optimale Verbrennung garantiert, die eine möglichst hohe Leistung bei gleichzeitig möglichst wenig Benzinverbrauch garantiert. Die Lambda-Sonde besteht aus zwei sauerstoffdurchlässigen Platinelektroden, zwischen denen sich yttriumdotiertes ZrO_2 befindet. Bei $600-900^\circ C$ beginnt dieses Sauerstoffanionen zu leiten. Ist der O_2 -Partialdruck auf einer Seite größer, findet von dieser ein Nettostrom von Sauerstoff durch das ZrO_2 auf die andere Seite statt. Dadurch ändert sich das Potential an den Elektroden, was mit einem Voltmeter gemessen werden kann. Die Vorteile von Sensoren im Vergleich zu konventionellen Methoden sind die gute Automatisierbarkeit, die Miniaturisierbarkeit, die Möglichkeit eines On-Line-Monitoring, die kostengünstige Massenfertigung und die einfache Bedienung [11].

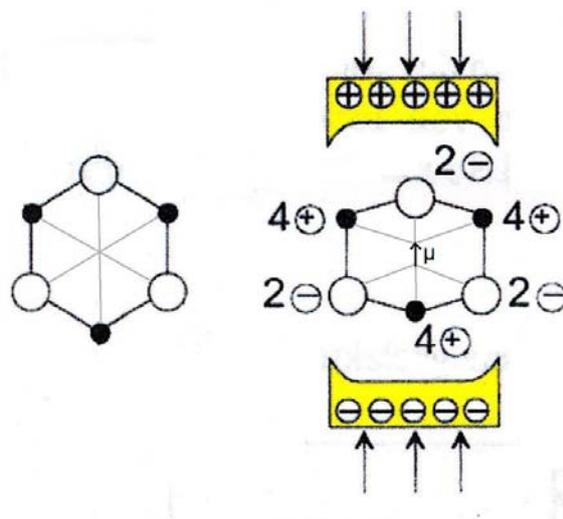


Abb.4: Der Piezoeffekt bewirkt die Ausbildung eines Dipols [10]

Quarz ist ein piezoelektrisches Material. Das heißt, beim Anlegen eines mechanischen Drucks entstehen durch Ladungsverschiebung Dipole, welche eine elektrische Spannung bewirken. Umgekehrt kann durch das Anlegen einer

Wechselspannung ein Quarz zum Schwingen angeregt werden. Es gibt verschiedene Schwingungsmoden, wie Biege-, Dehnungs-, Flächenscher- und Dickenscherschwingung. Bei Letzterer ist im Idealfall die Resonanzfrequenz nur von der Dicke der Quarzscheibe abhängig. Wird jedoch Masse an der Oberfläche adsorbiert, erniedrigt sich die Resonanzfrequenz und der Quarz schwingt langsamer. Der Zusammenhang ist in der Sauerbrey-Gleichung [13] formuliert:

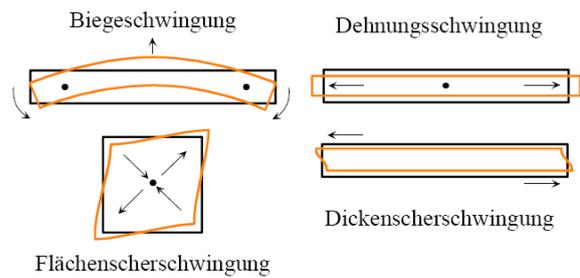


Abb.5: Schwingungsmoden eines Quarzes [12]

$$\Delta \nu = -\Delta m \cdot \nu_0^2 \cdot \frac{2}{c \cdot \rho \cdot A}$$

$\Delta \nu$...Frequenzänderung

Δm ...adsorbierte Masse

ν_0 ...Eigenfrequenz

c ...Schallgeschwindigkeit im Quarz

ρ ...Dichte von Quarz

A ...Fläche der Elektroden

Gemäß dieser Gleichung steigt der Effekt pro Masse quadratisch mit der Grundfrequenz an. Dadurch ist die Nachweisgrenze umso geringer, je dünner der Quarz ist. Da der Sensor damit aber immer empfindlicher und schwieriger herzustellen wird, ist die Eigenfrequenz nach oben hin beschränkt. Derzeit liegt das Maximum bei $\nu_0=50\text{MHz}$ [14], was einer Dicke von $33\mu\text{m}$ entspricht.

Wird ein Quarzplättchen, auf das Elektroden gedruckt wurden, nun mit einer sensitiven Schicht belegt, wird selektiv nur ein bestimmter Analyt an diese Oberfläche gebunden. Somit

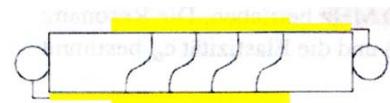


Abb.6: QCM mit Dickenscherschwingung [10]

trägt nur dieser Analyt zu einer Massen-, und damit Signaländerung bei. Da die Resonanzfrequenz aber auch von anderen Effekten, wie z.B. der Temperatur beeinflusst wird, und weil es immer auch unspezifische Adsorption gibt, ist es wichtig eine Referenzmessung durchzuführen. Daher werden immer mindestens zwei Elektrodenpaare auf einem Quarz aufgebracht. Das funktioniert, da die Dickenscherschwingung fast ausschließlich direkt unter der anregenden

Elektrode auftritt. Auf diese Weise war es bereits möglich, verschiedenste Analyte zu detektieren, wie z.B. Kompostgase [15], Viren [16], Erythrocyten [17] und Trypsin [18].

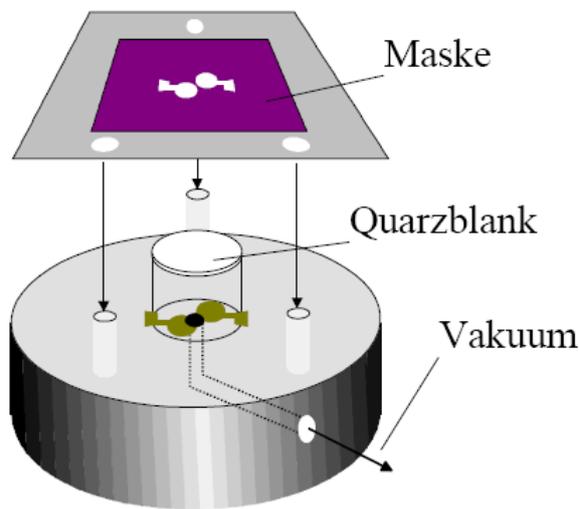


Abb.6: Siebdruckverfahren [12]

Als Ausgangssubstanz werden AT-Quarzscheiben mit einer Dicke von $165\mu\text{m}$ verwendet, was einer Resonanzfrequenz von 10MHz entspricht. Diese werden mittels Siebdruck [19] mit Goldelektroden versehen. Dafür muss erst eine Maske hergestellt werden: Ein Stoff mit $21\mu\text{m}$ Maschenweite wird mit Photolack beschichtet und auf einer Schablone belichtet. Der unbelichtete Lack lässt sich mit warmem Wasser abwaschen. Diese Maske wird auf

eine Quarzscheibe gepresst. Mit Hilfe eines Weichpolymer-Quaders wird anschließend kolloidale Goldpaste auf die Maske aufgetragen, die nur an den lackfreien Stellen durchlässig. Dann wird der Quarz entnommen und 3h im Ofen bei 400°C gebrannt. Daraufhin wird die andere Seite bedruckt.

Es werden vorzugsweise folgende Elektrodenstrukturen verwendet:

| | |
|---|--|
|  | Für die der Messlösung zugewandte Seite. $d=6.5\text{mm}$ |
|  | Für die den Kontaktdrähten zugewandte Seite (Gasphase). $d=4\text{mm}$ |

Der Grund für die Verwendung unterschiedlicher Elektroden liegt darin, dass das elektrische Feld bei gleich großen Elektroden auf beiden Seiten weitläufige Schleifen macht. Dadurch dringen viele Feldlinien in die Messlösung ein und werden gedämpft. Sind die Gegenelektroden kleiner, gehen die Feldlinien nicht mehr so stark durch die Lösung [20]. Die vier Kontaktfelder auf der Gasphasenseite dienen der Kontaktierung von 2 unabhängigen Kanälen (Messkanal, Referenzkanal). Zwei dieser Felder sind über den Rand der Quarzscheibe hinaus mit den Elektroden in der Flüssigkeit verbunden, sodass die Kontaktdrähte alle auf der Gasphasenseite liegen können.

Der Schwingquarz wird in eine Durchflusszelle gelegt und eingespannt. Die entsprechenden

Lösungen werden mit Hilfe einer Pumpe durch die Zelle befördert. Die Elektroden des Quarzes sind mit einem Oszillatorschaltkreis

verbunden, in den pro Kanal ein

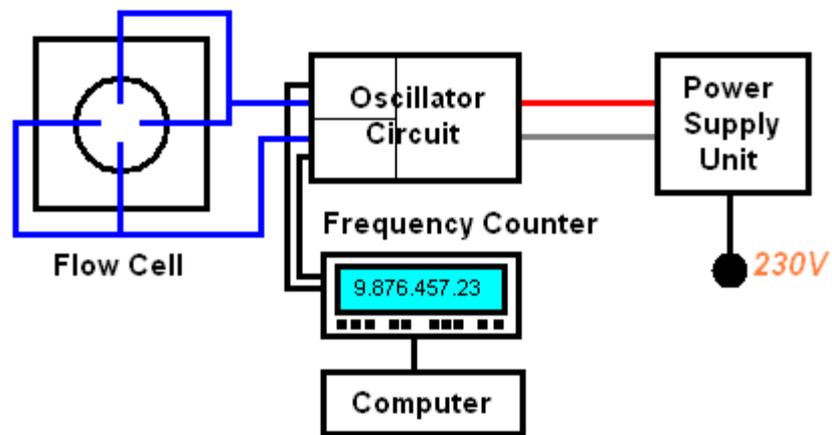


Abb.8: Schema einer Oszillatorschaltung

Schwingkreis eingebaut ist. Diese werden über ein Netzgerät mit Energie versorgt und haben eine einstellbare Eigenfrequenz. Ist diese identisch mit der Eigenfrequenz des Quarzes, kommt es durch Resonanz zur gegenseitigen Verstärkung der Schwingungen. Diese werden mit einem Frequenzzähler abgetastet und weiter an einen Computer geleitet, der die Daten sammelt und aufträgt.

Molekulares Prägen:

Die Selektivität des Sensors wird dadurch erreicht, dass die sensitive Schicht nur den gewünschten Analyten adsorbiert. Eine einfache und zugleich effiziente Methode ist das Molekulare Prägen [21-24]. Hierbei wird eine Lösung aus Monomeren mit dem gewünschten Analyten versetzt und anschließend auspolymerisiert. Durch Selbstorganisation ordnen sich die Monomere optimal um den Analyten, der als Schablone bzw. Templat dient, an und bilden eine feste Hülle. Wird das Templat nach Abschluss des Prozesses ausgewaschen, bleibt ein Hohlraum zurück, in den der Analyt optimal hineinpasst. Andere Analyte passen schlechter oder gar nicht hinein und werden daher nur wesentlich schwächer gebunden. Dies hat zwei Ursachen: Einerseits füllt nur der richtige Analyt die komplette Oberfläche der Kavität aus, und da die unspezifische Wechselwirkung umso größer ist, je größer die Berührungsfläche ist, ist sie für den Analyten maximal. Andererseits enthalten sowohl das Polymer, als auch der Analyt funktionelle Gruppen, die sich beim Auspolymerisieren optimal zueinander orientiert haben, sodass nur der Analyt alle jetzt fix im Polymer vorhandenen Gruppen ausnützen kann, um gebunden zu werden.

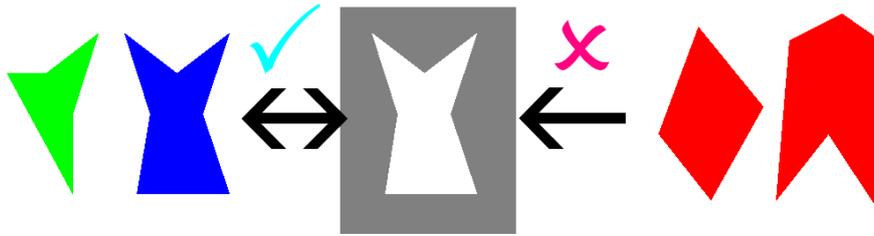


Abb.9: Schlüssel-Schloss-Prinzip

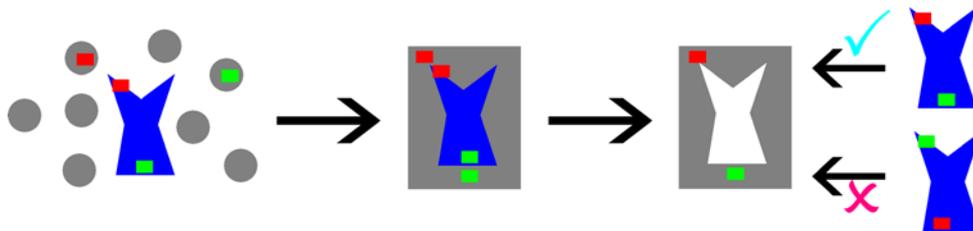


Abb.10: Templat-Verfahren. Neben der Form beeinflussen auch Wechselwirkungen charakteristischer Gruppen (rot, grün) die Ausbildung der Kavität. Dadurch ist die Selektivität auch bei mehreren Analyten ähnlicher bis gleicher Form gegeben

Der große Vorteil dieser Methode ist, dass die Struktur des Analyten nicht bekannt sein muss, da sich die Moleküle selbst organisieren. Weiters braucht man sich nicht auf einen Analyten zu fixieren, der mühevoll erst isoliert werden muss, sondern man kann direkt eine Probe als Templat einsetzen. Damit fungieren alle Komponenten, die diese charakterisieren, automatisch als Templat. Beispielsweise kann man einen Sensor mit frischem oder altem Motorenöl prägen: Der einzige Unterschied sind dann jene Substanzen, die bei der Abnutzung von Öl entstehen. Auf diese Weise kann man einen Sensor entwickeln, mit dem auch die Degradation von Öl bestimmt werden kann.

Für die sensitive Schicht wird Polyacrylat verwendet, welches nach folgender Rezeptur hergestellt wird:

- 29m% Dihydroxyethylenbisacrylamid
- 49m% Methacrylsäure
- 20m% Vinylpyrollidon
- 2m% Azoisobutyronitril

Polymere, die für Quarzmikrowaagen verwendet werden, müssen feste Schichten bilden. Ist das Polymer elastisch, bewegt es unkoordiniert auf dem Quarz hin und her. Die Sauerbrey-Gleichung gilt allerdings nur für rigide Materialien. Im Gegenteil können schwabbelige Oberflächen sogar die Frequenz erhöhen – was als Anti-Sauerbrey-Effekt bekannt ist. Je stärker das Polymer

vernetzt ist, umso fester wird die Schicht. Daher wird für dieses Polymer ein hoher Anteil am Quervernetzer Dihydroxyethylenbisacrylamid zugesetzt.

In anderen Polymeren, wie z.B. Polyurethan, zeigt der Stempel eine stärkere Adhäsion zur geprägten Schicht. Außerdem bleiben die Templat-Keime dann häufig gebunden und können vorzugsweise mit Lysozym bei 37°C und SDS-Puffer entfernt werden. Außerdem sind die Monomere von Polyacrylat gegenüber der Luftfeuchte stabil.

In destilliertem Wasser ist die Lebensdauer der Sensorschicht limitiert, wahrscheinlich aufgrund des Vernetzers. Die Säuregruppen der Methacrylsäure könnten das Amid des Quervernetzers DHEBA angreifen

Für die Prägung wird eine Bakterienlösung mit 1-2mg/ml E. coli auf ein Glasplättchen getropft und luftgetrocknet. Dann wird auf die größeren Quarzelektroden vorpolymerisierte Monomerlösung getropft. Anschließend wird auf eine Elektrode der vorbereitete Stempel, auf die andere ein nacktes Glasplättchen gelegt und das Ganze 1-2 Tage ruhen gelassen. Dann werden die Glasplättchen abgenommen und die fertigen Sensoren mit Wasser abgespült, um eventuell zurückgebliebene Bakterien zu entfernen.

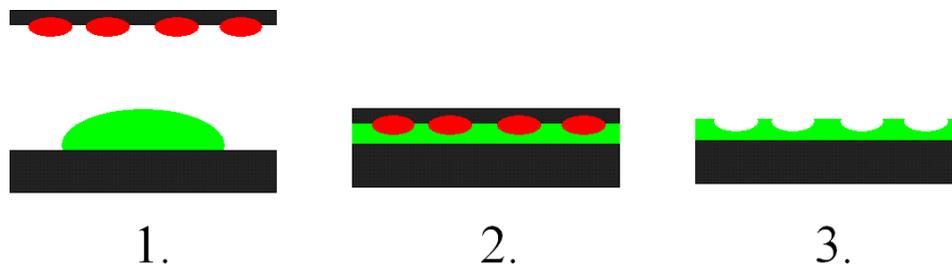


Abb.11: Stempeltechnik zur Prägung von Polymeren (grün) mit Bakterien (rot).

1.4. Rasterkraftfeldmikroskopie:

Bei der Rasterkraftfeldmikroskopie, kurz AFM (atomic force microscopy) genannt, wird mit einer Nadel, die sich auf einem Cantilever befindet, eine Oberfläche systematisch abgefahren [25]. Stößt die Nadel auf eine Erhebung, so fährt sie ein Stück nach oben. Diese Bewegungen werden mit Hilfe eines Lasers, der auf den Cantilever gerichtet ist, und dessen Licht auf einen Photodetektor reflektiert wird, verfolgt. Mit dieser Information kann man mit entsprechender Software die Oberfläche der Probe

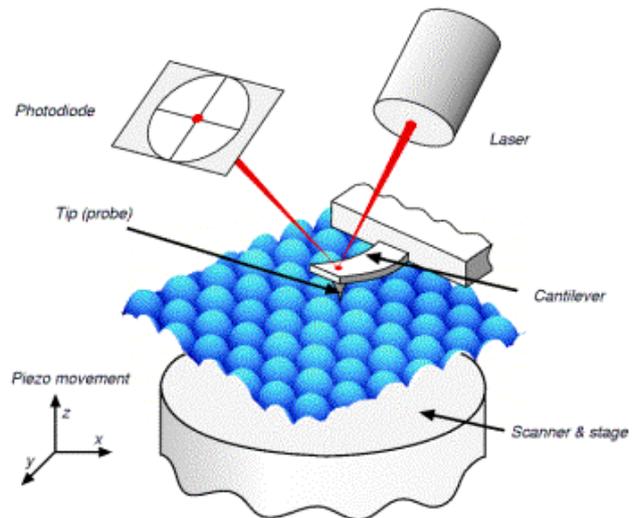


Abb.12: Funktionsprinzip eines AFM-Geräts [26]

rekonstruieren. Die eben beschriebene Methode ist der sogenannte Kontaktmodus. Im Gegensatz dazu gibt es den Tippmodus, in dem die Nadel auf und ab oszilliert. Dieser wird eingesetzt, wenn die Probe durch die Nadel angekratzt werden könnte. Zusätzlich gibt es den STM-Modus (STM steht für scanning tunneling microscopy), bei dem die Nadel konstant über die Probe hinweg fährt, ohne sie zu berühren. Gemessen wird nicht die Ablenkung eines Lasers, sondern stattdessen der Tunnelstrom, der auftritt, wenn man zwischen Nadel und Probe eine Spannung anlegt. Da die Tunnelwahrscheinlichkeit von der Breite der Barriere abhängig ist, kann man daraus die Topologie rekonstruieren. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Probe leitfähig sein muss.

Da die Auflösung eines solchen Geräts sehr hoch ist – im Idealfall können sogar einzelne Atome aufgelöst werden – und zusätzlich ein dreidimensionales Bild aufgezeichnet wird, kann man hier mehr Informationen gewinnen, als mit einfacher Lichtmikroskopie.

1.5. UV/VIS-Mikroskopie:

Bakterien sind groß genug, dass sie im Lichtmikroskop noch erkannt werden können, aber es lassen sich keine Aussagen über ihren Zustand machen. Zur besseren Abhebung vom Untergrund kann man die Zellen mit Fluoreszenz-

Farbstoffen einfärben. Unter UV-Licht sind die Bakterien dann als farbige Punkte auf schwarzem Grund erkennbar. In dieser Arbeit werden die Bakterien mit Bisbenzimid gefärbt, welches sich an AT-reiche DNA anlagert und grün fluoresziert.

Man kann Bakterien auch im Hellfeld untersuchen, allerdings ist es dort schwieriger, den Zielanalyten von Verunreinigungen zu unterscheiden.

2. Verschiedene Matrices:

2.1. Wasser:

Destilliertes Wasser ist das Standard-Medium für Messungen mit Schwingquarzen, da es keine zu keinen Matrixeffekten kommt, die das Signal beeinflussen könnten. Da *E. coli* im Gegensatz zu tierischen Zellen eine feste Zellwand besitzen, sind sie mechanisch stabil genug, dass sie nicht einfach aufplatzen, wenn man sie in destilliertem Wasser löst. Hier ist ein Beispiel für eine Probe mit 3mg/ml *E. coli* in destilliertem Wasser:

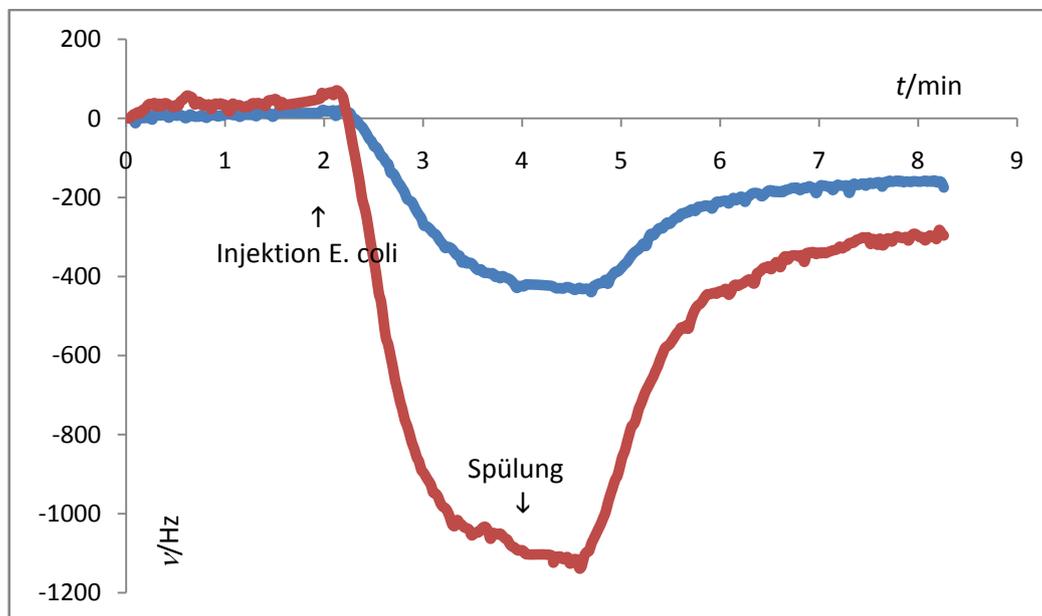


Abb.13: Zweikanalmessung von 3mg/ml *E. coli* in destilliertem Wasser. Coating mit Polyacrylat, Raumtemperatur, 4µm Schichtdicke. Messkurve (rot) und Referenzkurve (blau)

Als effektives Sensorsignal gilt jedoch immer nur die Differenz zwischen dem Messkanal und dem Referenzkanal. Die Differenzkurve ist unten zu sehen:

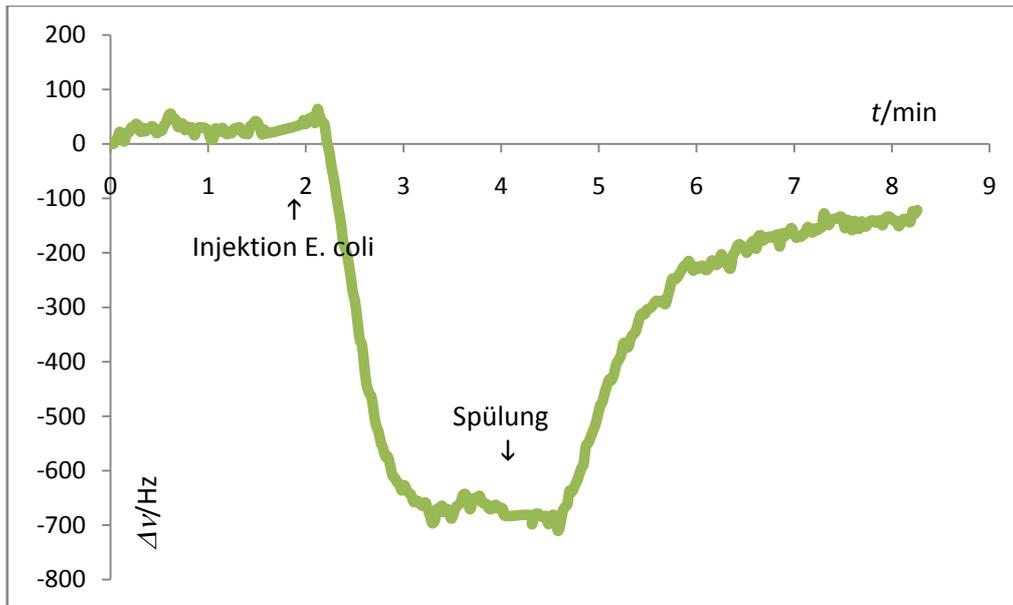


Abb.14: Differenzsignal zu Abb.13

Das Trinkwasser an der Universität Wien hat einen Gesamtionengehalt von 0.6g/l. Es kann gezeigt werden, dass die Ionenstärke der Lösung einen starken Einfluss auf die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes hat. Eine Erklärung hierfür ist, dass sensitive Schichten aus Polyacrylat verwendet wurden. Dadurch sind viele freie Säuregruppen im Layer vorhanden, zu denen die Ionen in der Lösung eine hohe Affinität haben. In der nächsten Messung sieht man Proben mit 1mg/ml, abwechselnd in destilliertem Wasser und Leitungswasser. Zwischen den Peaks wird immer mit destilliertem Wasser gespült.

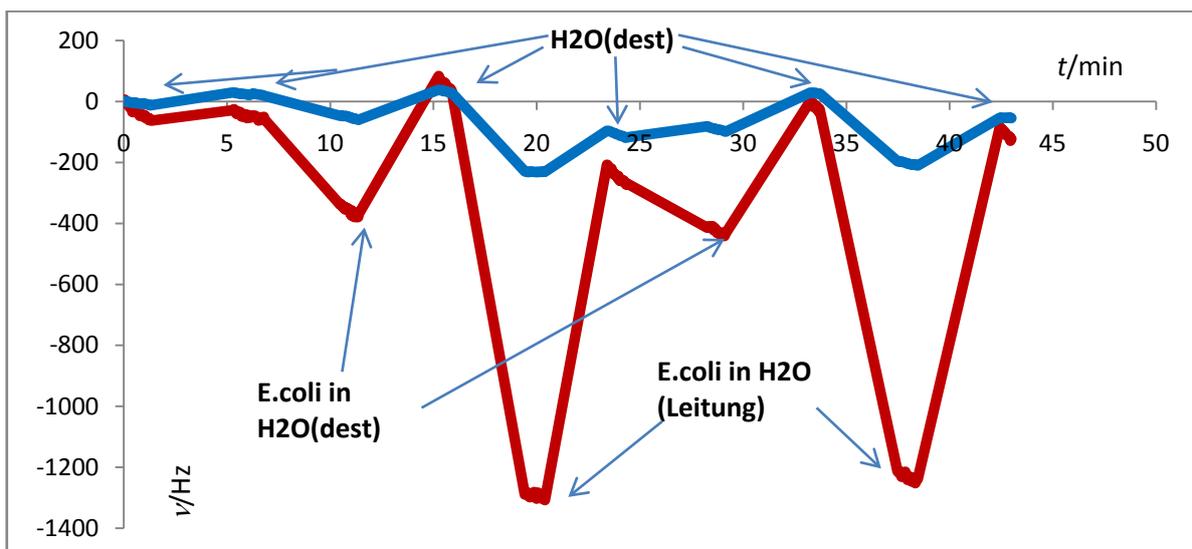


Abb.15: Zweikanalmessung, Coating mit Polyacrylat, Raumtemperatur; 1mg/ml E. coli abwechselnd in destilliertem und Trinkwasser, Hintergrund ist destilliertes Wasser

In dieser Messung sieht man E. coli in einem Hintergrund aus Leitungswasser. Zu sehen sind Peaks von 1mg/ml E. coli, abwechselnd in Leitungswasser und

destilliertem Wasser. Zum Schluss wird die Zelle mit destilliertem Wasser gespült.

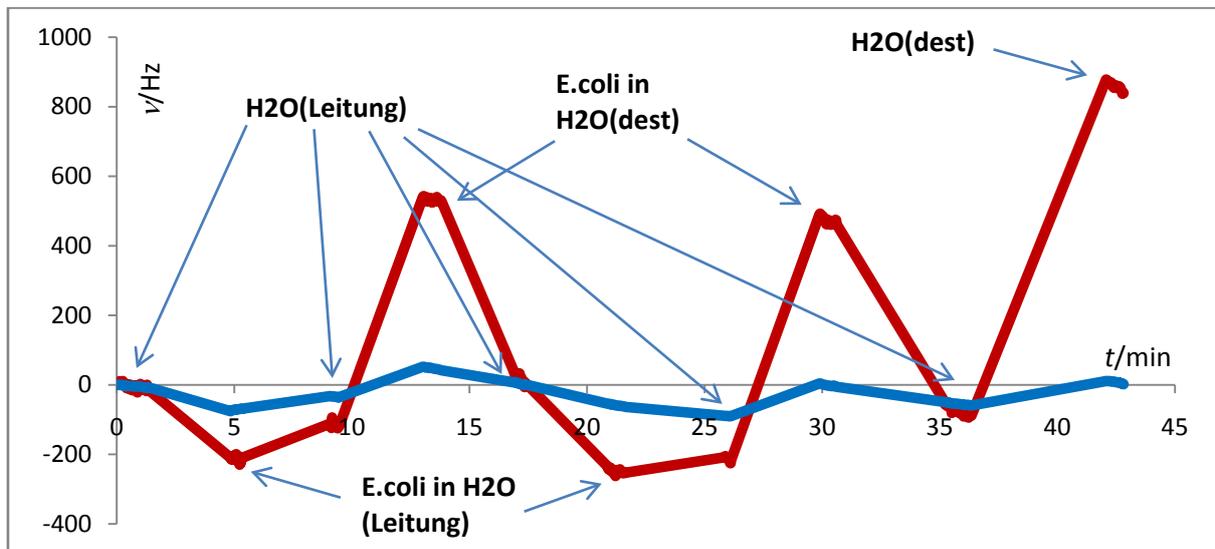


Abb.16: Zweikanalmessung, Coating mit Polyacrylat, Raumtemperatur; 1mg/ml E. coli abwechselnd in Trink- und destilliertem Wasser, Hintergrund ist Trinkwasser

In Abb.17 werden gemittelte Sensoreffekte aus 5 derartigen Messungen relativ zu einem Blank von destilliertem Wasser dargestellt.

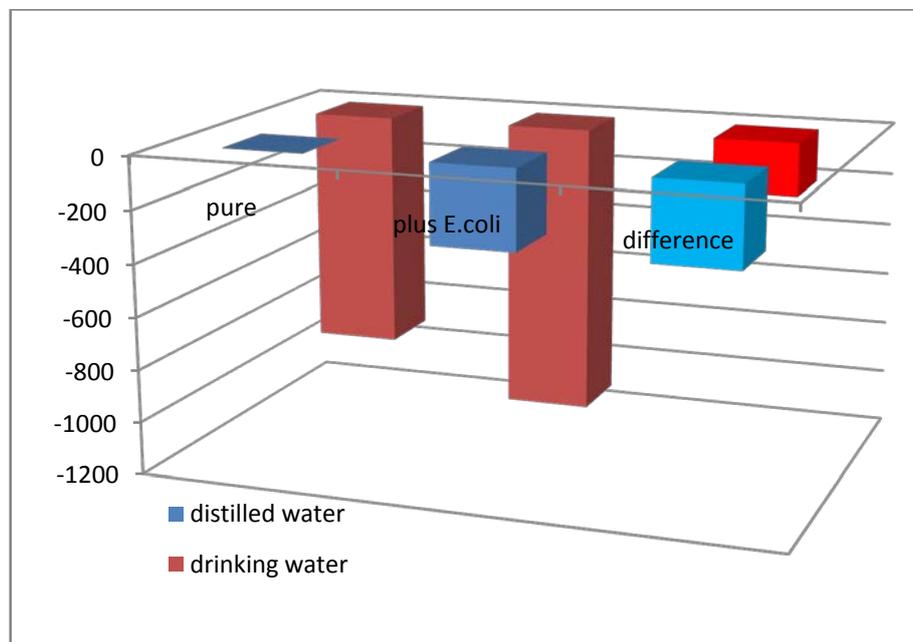


Abb.17: Relative Sensorsignale von destilliertem und Trinkwasser, mit und ohne 1mg/ml E. coli.

Wie man sehen kann, sind die Frequenzen in Trinkwasser zu niedrigeren Werten hin verschoben, aber die Nettoeffekte sind vergleichbar. Allerdings sind die ionischen Effekte schon bei geringen Änderungen in der Konzentration wesentlich größer als das eigentliche Signal. Das liegt, wie bereits in Kap.1.3

vorgeschlagen, am Polyacrylat. Ohne entsprechende Vergleichsmessungen kann man die Effektanteile von Hintergrund und Analyt nicht aufschlüsseln. Bei starken Änderungen im System kann es sogar dazu kommen, dass der Sensor aus seinem Resonanzbereich springt und keine verwertbaren Signale mehr liefert. Daher wird bei allen späteren Messungen als Spülmittel immer jene Lösung gewählt, in der sich auch die zu messenden Bakterien befinden.

Vorteilhaft ist, dass *E. coli* beide Male einen Sauerbrey-Effekt zeigen, obwohl der Sensor nur mit Bakterien aus destilliertem Wasser geprägt wurde. Das bedeutet, dass die Zellen in beiden Lösungen ungefähr gleiche Form und Größe haben. Wären sie deutlich unterschiedlich, würden die *E. coli* in Leitungswasser nicht mehr optimal in die Kavitäten passen und einen Anti-Sauerbrey-Effekt geben.

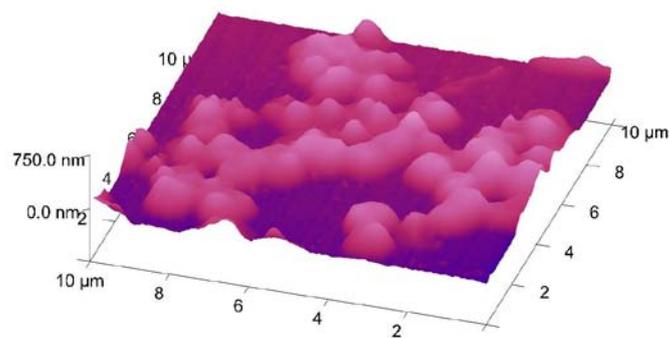
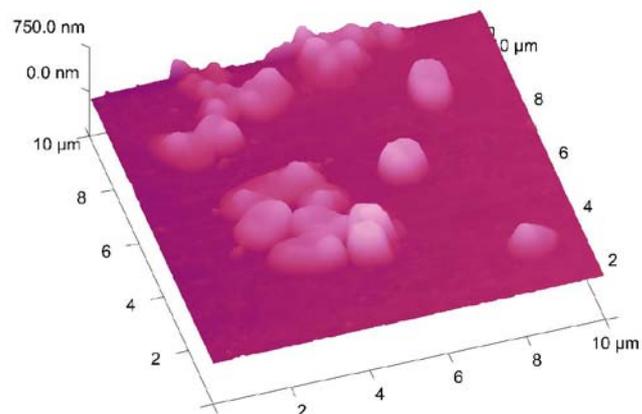


Abb.18 (oben): AFM-Bild von *E. coli* in Leitungswasser

Abb.19 (unten): AFM-Bild von *E. coli* in destilliertem Wasser



Auch anhand der AFM-Aufnahmen ist kein nennenswerter Unterschied zwischen E. coli in Leitungswasser und destilliertem Wasser zu erkennen.

2.2. Maßlösungen:

Es werden auch Messungen in verschiedenen Lösungen gängiger Moleküle durchgeführt. Glucose verhält sich hierbei am unspektakulärsten: Selbst bei 200g/l liegt der entsprechende Sensoreffekt im selben Bereich wie der in Wasser zu erwartende.

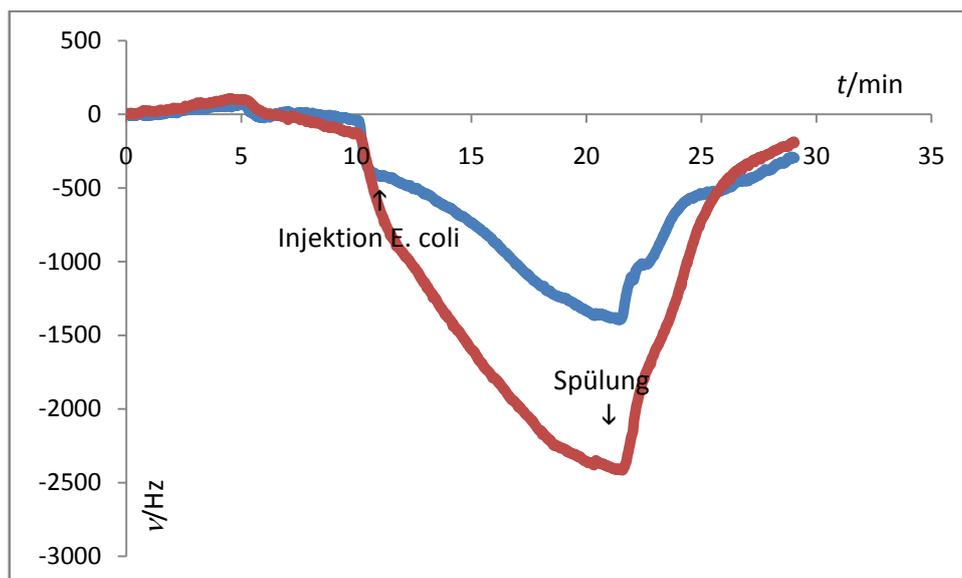


Abb.20: 3mg/ml E. coli in 200g/l Glucose-Lösung



Abb.21: Differenz zu Abb.20, der selektive Anteil am Sensoreffekt.

Natriumdodecylsulfat ist ein Detergenz, welches die nichtkovalenten Bindungen in Proteinen bricht und damit zur Denaturierung führt. Dadurch werden die

Bakterienzellen zerstört und sind für den Sensor nicht mehr detektierbar. Bei 10g/l SDS liefert der Sensor nur mehr ein Signal von etwa einem Fünftel dessen, was in Wasser zu erwarten wäre. In der folgenden Messkurve wird die Abhängigkeit der Sensorantwort von der Bakterienkonzentration (in mg/ml) überprüft. Der Zusammenhang ist gemäß der Sauerbrey-Gleichung linear, solange der Sensor nicht gesättigt ist.

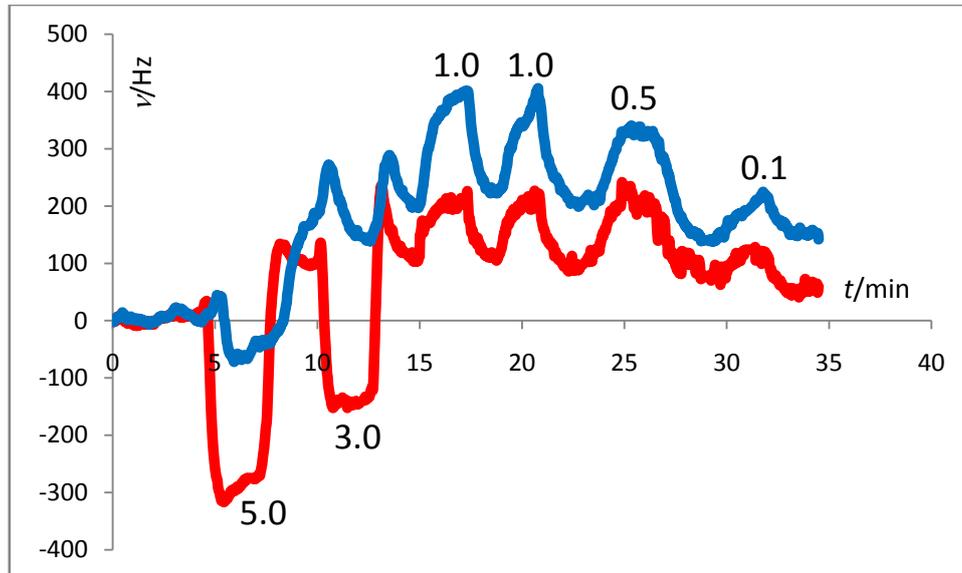


Abb.22: Sensoreffekte in 10g/l SDS. Die Zahlen geben die Konzentrationen an E. coli an. Messkanal (rot) und Referenzkanal (blau).

Die Mittelung aus mehreren Messreihen mit verschiedenen Konzentrationen ergibt folgenden Zusammenhang:

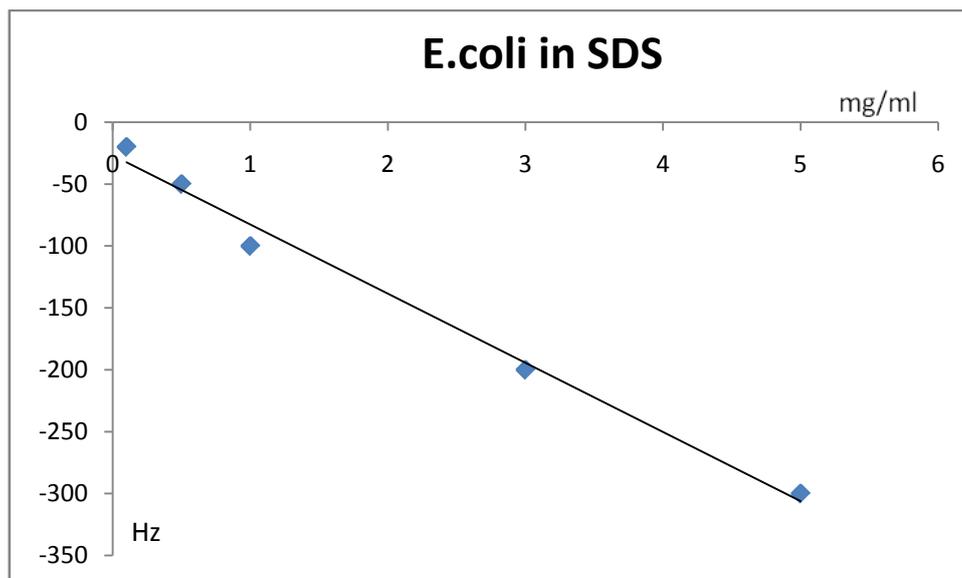


Abb.23: Der lineare Zusammenhang von Bakterienkonzentration und Sensoreffekt in 10g/l SDS.

Die Denaturierung der Zellen kann im AFM bestätigt werden. Die Zellen sind zwar noch als solche zu erkennen, aber stark verformt.

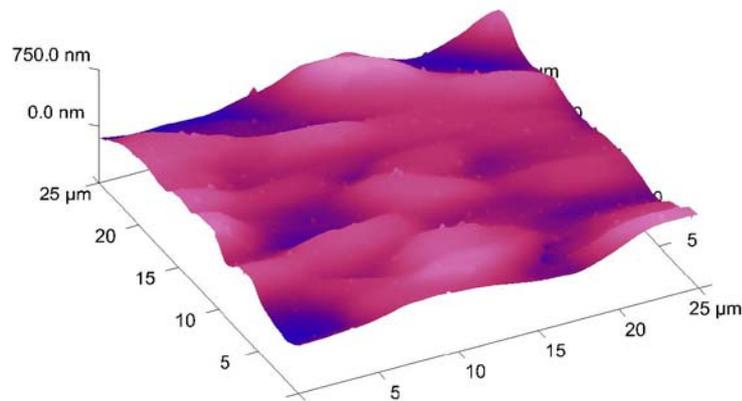


Abb.24: E. coli nach Denaturierung in 10g/l SDS-Lösung

Messungen in Kochsalzlösung werden bei NaCl-Konzentrationen von 0.05M, 0.10M, 0.15M, 0.17M und 0.20M durchgeführt. Diese sind am anfälligsten, da einerseits die Salzkonzentration einen Einfluss auf das osmotische Verhalten der Zellen und somit deren Größe hat, und andererseits die Ionen selbst das Sensorsignal beeinflussen. Da die Zelle umso mehr Wasser aufsaugt, je geringer die Ionenkonzentration in Lösung ist, nimmt ihre Masse zu höheren Salzgehalten hin ab. Dadurch schrumpft auch das Sensorsignal. Im Gegenzug machen die ionischen Leitfähigkeitseffekte bei höherer Salzkonzentration die Messung schwieriger. Im Extremfall kann es sogar zum Kurzschluss kommen. Ab circa 0.15M (=0.9m%) kann keine Sensorantwort mehr gemessen werden. Das ist der Bereich, in dem auch der NaCl-Gehalt des Cytosols der meisten Zellen liegt. Solche Lösungen werden in der Medizin als isotonische Lösungen bezeichnet und eingesetzt, da sie osmotisch neutral sind und die Zellen im umliegenden Gewebe nicht belasten.

Bei Kochsalzlösungen kann allerdings gelegentlich ein Anti-Sauerbrey-Effekt beobachtet werden. Das passiert, wenn die Zellen so weit geschrumpft sind, dass sie in der Kavität noch Platz haben, sich zu bewegen. Dann verhält sich das Layer nicht mehr wie eine starre Schicht, sondern mehr wie ein Pudding. Dadurch wird die Resonanzfrequenz erhöht statt erniedrigt. Der Anti-Sauerbrey-Effekt ist manchmal sogar größer als der zu erwartende Sauerbrey-Effekt, allerdings ist das Signal nicht proportional zur Konzentration.

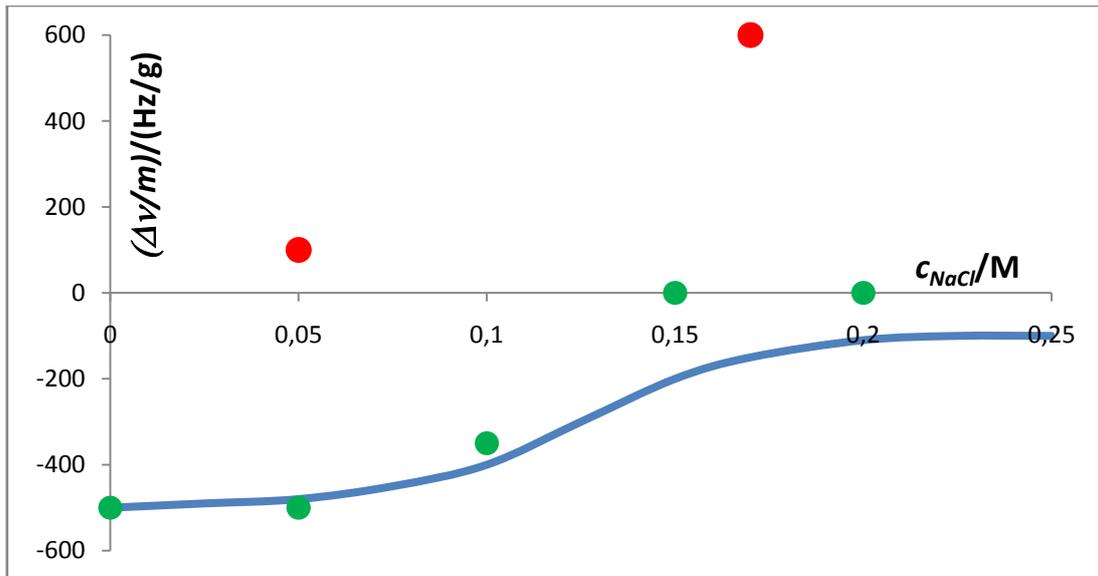


Abb.25: Abhängigkeit des Sensorsignals der Bakterien vom NaCl-Gehalt in der Messlösung. Die roten Punkte markieren die gemessenen Anti-Sauerbrey-Effekte.

Zwar besitzt *E. coli* eine hyperosmotische Stressantwort, die ihr in der Natur hilft, bei hohen Salzkonzentrationen den Wasserverlust wieder auszugleichen [27], allerdings benötigt sie hierfür Kaliumionen, die in diesen Lösungen nicht verfügbar sind. Daher sind – wie in Abb.26 ersichtlich, die Bakterien in 6M Kochsalzlösung verschrumpelt. Nebenbei sind Salzkristalle zu sehen.

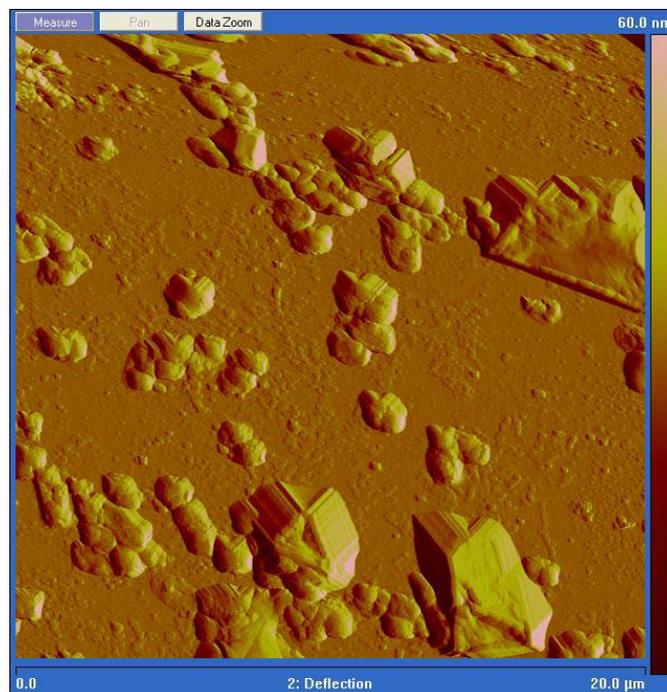


Abb.26: AFM-Aufnahme von *E. coli*, aus 6M NaCl-Lösung kristallisiert

Hier ist eine Messung von 1mg/ml E. coli in 0.05M NaCl-Lösung zu sehen. Die Kurve ist qualitativ und quantitativ gleichwertig mit der aus einer Messung in Wasser:

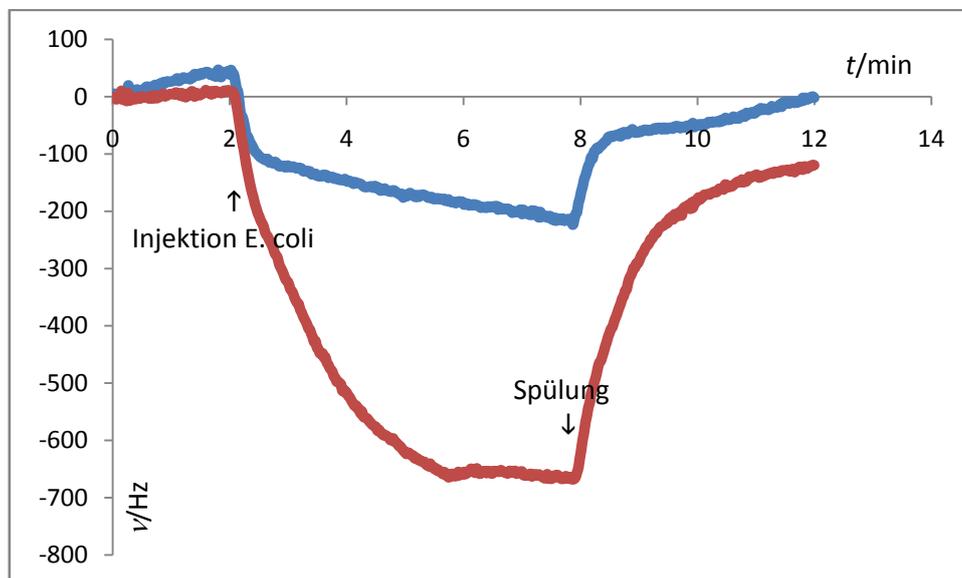


Abb.27: 1mg/ml E. coli in 0.05M NaCl. Polyacrylat-Layer, Raumtemperatur.

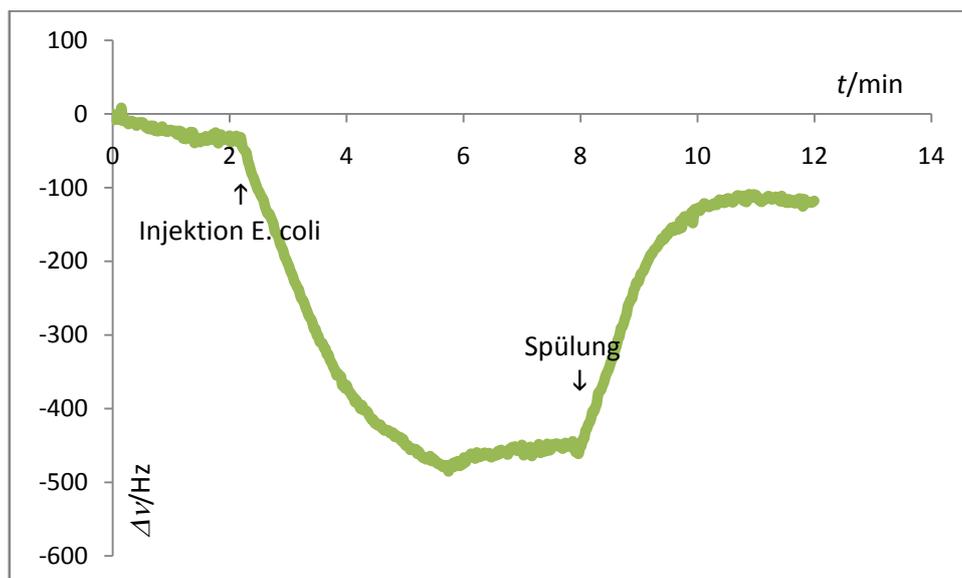


Abb.28: Differenzsignal zu Abb.27

Und hier eine Messung von 1mg/ml E. coli in 0.10M NaCl-Lösung. Das rauschen ist bereits stärker ausgeprägt und das Signal geringer:

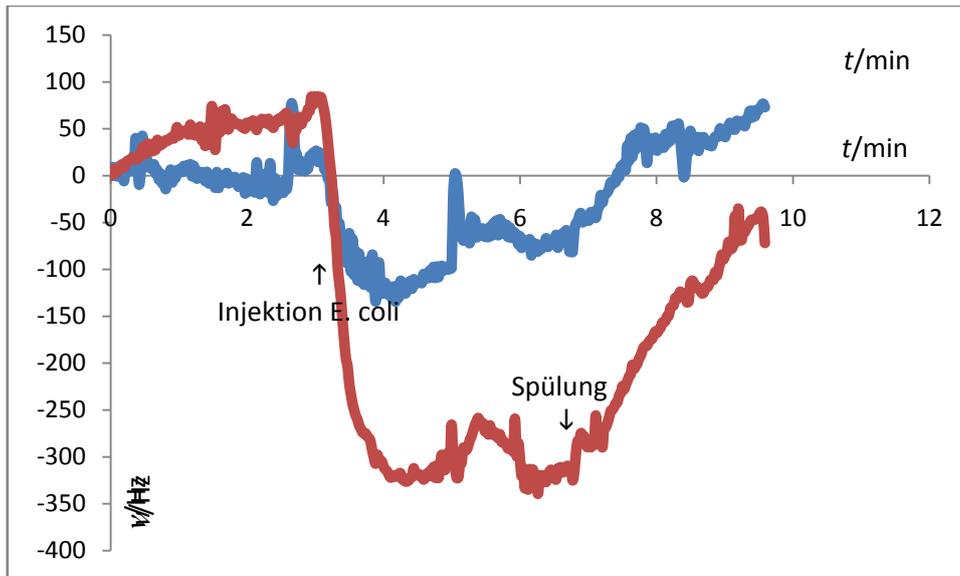


Abb.29: 1mg/ml E. coli in 0.10M NaCl. Polyacrylat-Layer, Raumtemperatur.

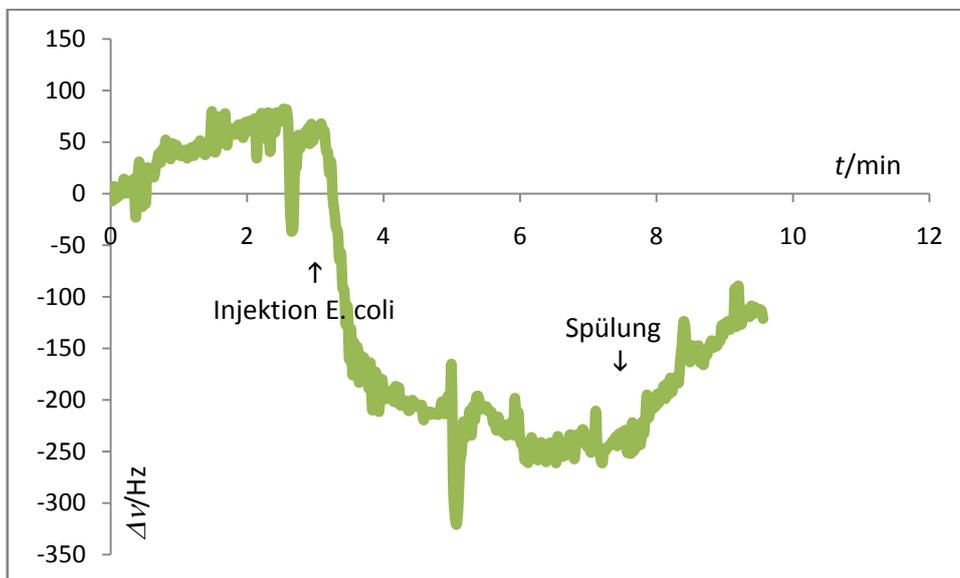


Abb.30: Differenzsignal zu Abb.29

Als nächstes ist eine Messung in 0.05M NaCl-Lösung zu sehen, die allerdings einen konzentrationsunabhängigen Anti-Sauerbrey-Effekt liefert. Die Signale entsprechen 5, 3 und 1mg/ml E. coli:

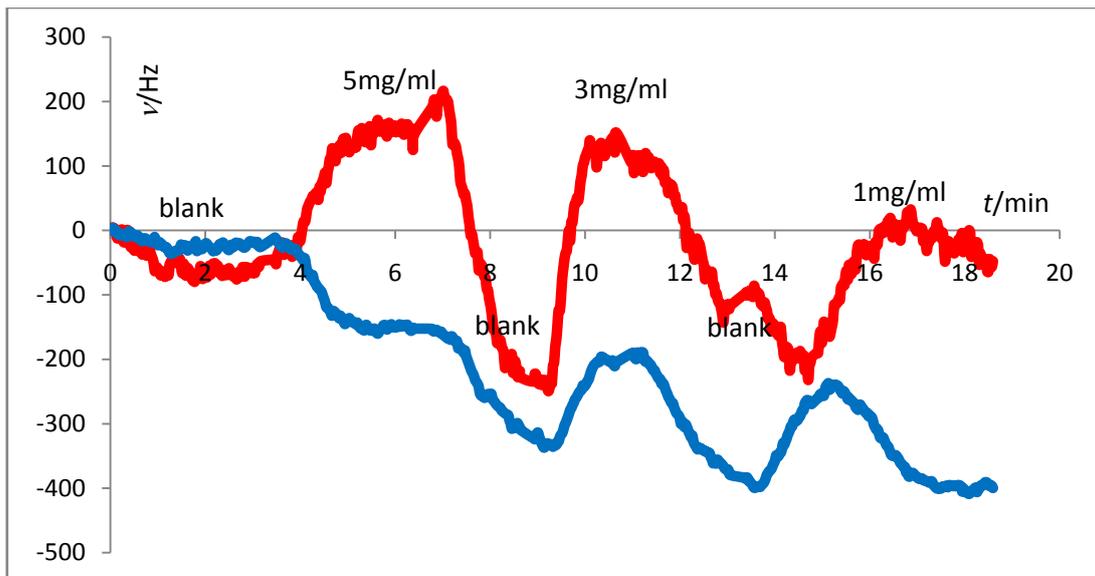


Abb.31: 5, 3 und 1mg/ml E. coli in 0.05M NaCl. Anti-Sauerbrey-Effekt.

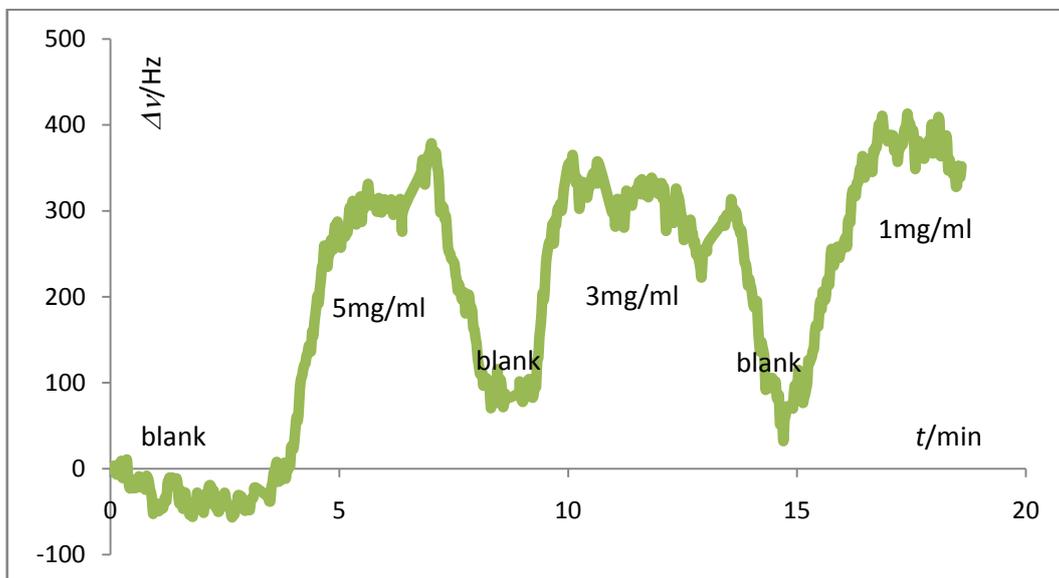


Abb.32: Differenzsignal zu Abb.31

Und hier ist ein Beispiel für eine Messung in 0.17M NaCl-Lösung. Die Signale entsprechen 0.3, 1.0 und 2.5mg/ml E. coli. Auch hier ist die Konzentrationsabhängigkeit sehr schlecht, sodass alle Signale annähernd gleich groß sind.

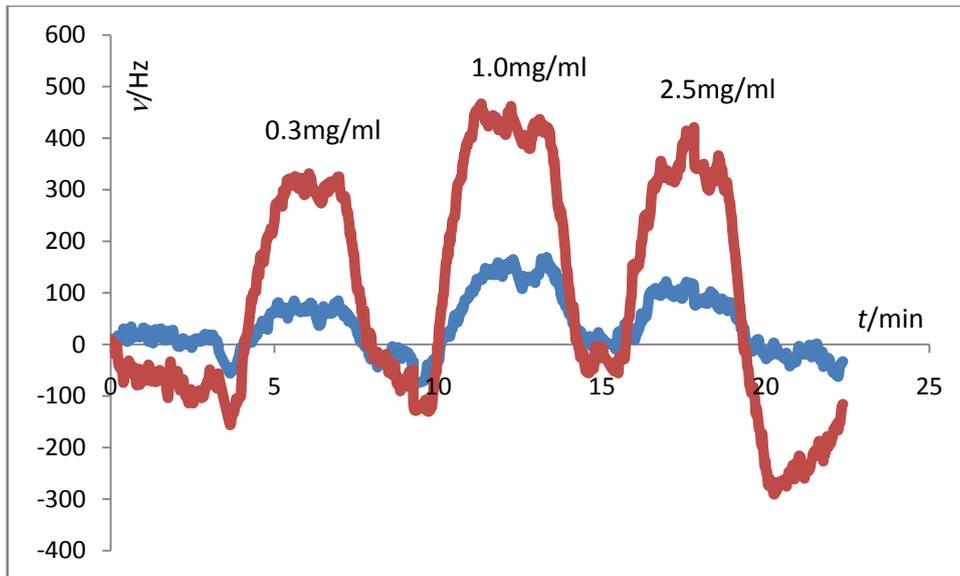


Abb.33: E. coli in 0.17M NaCl. Polyacrylat-Layer, Raumtemperatur. Messkanal (rot), Referenzkanal (blau).

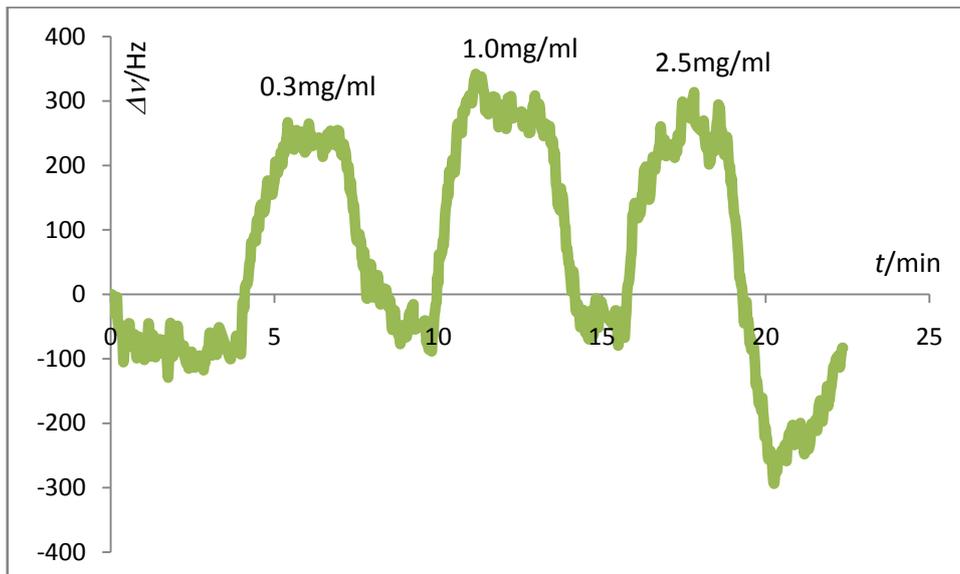


Abb.34: Differenzsignal zu Abb.33

In der nächsten Tabelle findet sich eine Gegenüberstellung aller durchgeführten Messungen. Das Sensorsignal ist relativ zu dem in destilliertem Wasser aufgetragen.

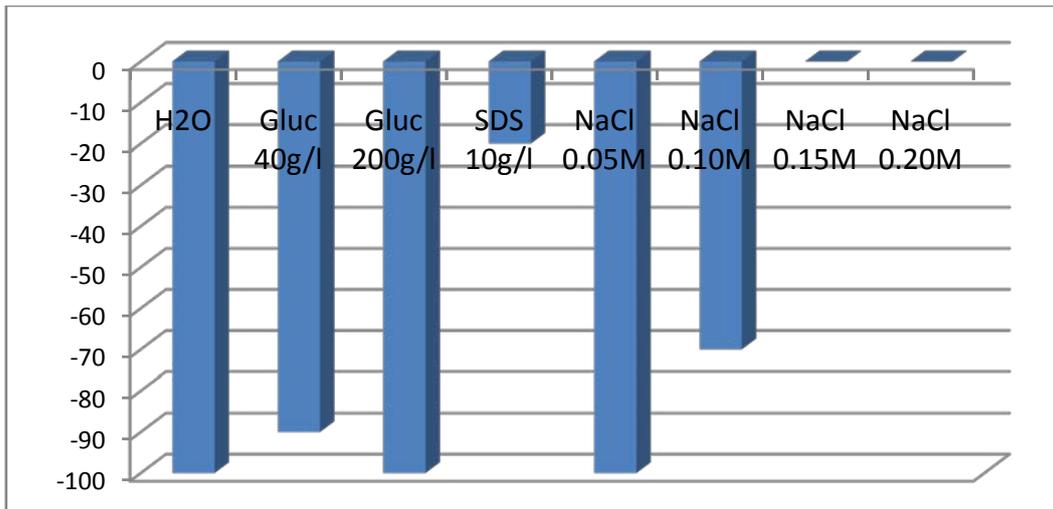


Abb.35: Vergleich von Signalintensitäten relativ zu destilliertem Wasser.

Eine Testmessung in Speisesoda-Lösung hat nichts ergeben, da es erstens mit den Säuregruppen des Polyacrylats reagiert und CO₂-Blasen bildet, und zweitens die Amidbindung im DHEBA basenkatalytisch spaltet, sodass sich das Polymer ablöst. Generell sind Messungen mit sauren oder basischen Lösungen nicht möglich, da sie das Layer beschädigen.

2.3. Lebensmittel:

Bakterien werden auch in verschiedenen Lebensmittelproben gemessen. Dazu werden entsprechende Lebensmittel aufgelöst bzw. verdünnt und die Messzelle damit geflutet. Für die Proben wird etwas von der Lösung mit Bakterien versetzt. Diese Prozedur wird mit folgenden Lebensmitteln durchgeführt: Coca Cola Light, NÖM Vollmilch, Happy Day Apfelsaft, Okinawa Soja Sauce, Maggi Klare Suppe, Earl Grey Schwarztee.

Die Cola-Probe wird entgast und auf das 10-fache Volumen verdünnt. Dann wird die Messzelle damit geflutet. Dann werden Proben mit 5 und 1mg/ml E. coli vermessen.

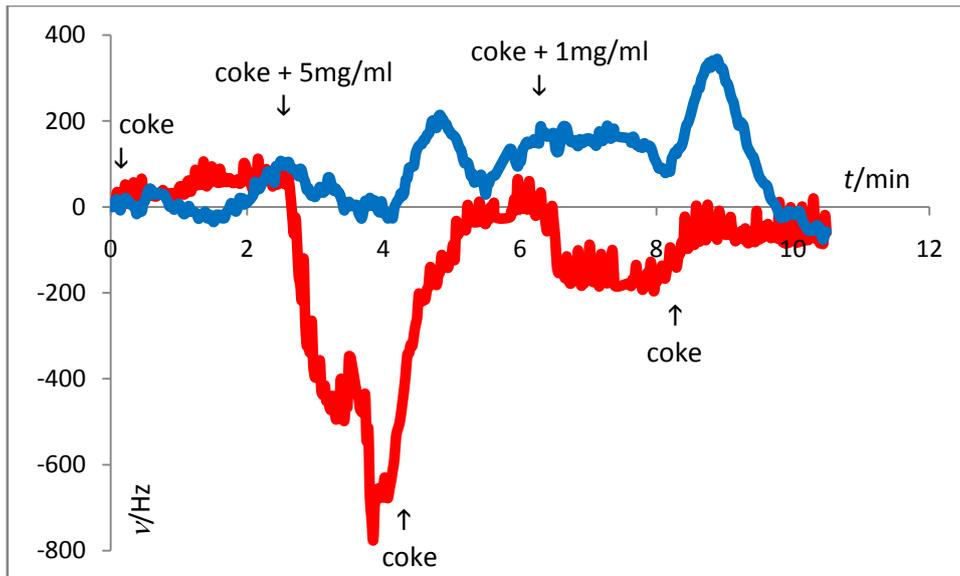


Abb.36: 1:10 verdünntes Coca Cola, mit 5 bzw. 1mg/ml E. coli gespiket.

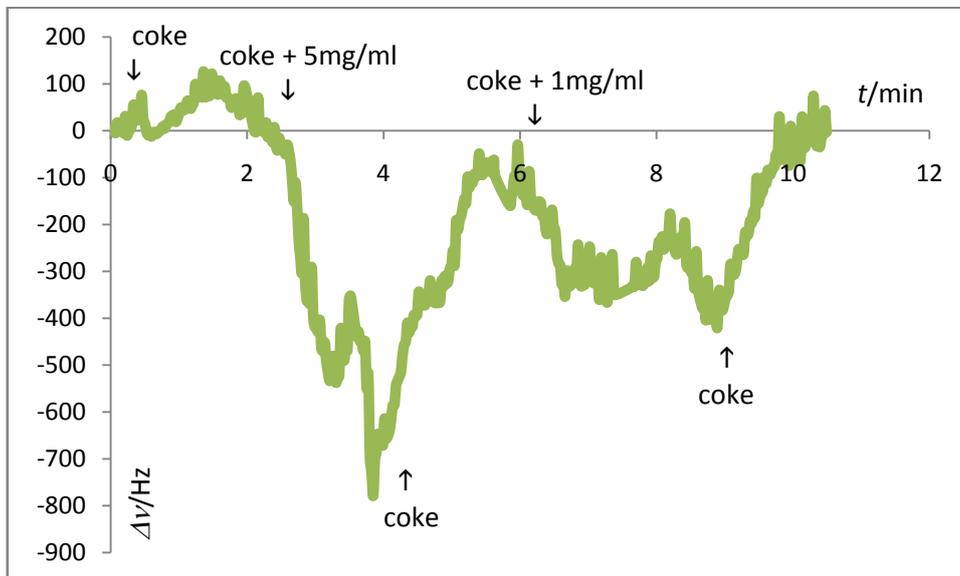


Abb.37: Differenzsignal zu Abb.36

Die Milch wird bei den Verdünnungen 1:10, 1:20 und 1:50 vermessen. Während bei 1:50 ein schöner Sensoreffekt zu beobachten ist, liegt 1:20 bereits im Grenzbereich der Methode. Bei 1:10 hat die Messung nicht mehr funktioniert. Was auffällt ist, dass die Bakterien in Milch einen starken Anti-Sauerbrey-Effekt zeigen. Das könnte damit zusammenhängen, dass die Milchproteine unspezifisch an das Layer binden und damit eine Deckschicht auf dem Sensor bilden. Die Kavitäten sind damit zu klein für die Bakterienzellen, welche daher nicht mehr ganz hineinpassen. Dadurch sind sie nur mehr lose gebunden und verhalten sich nicht mehr wie eine starre Schicht.

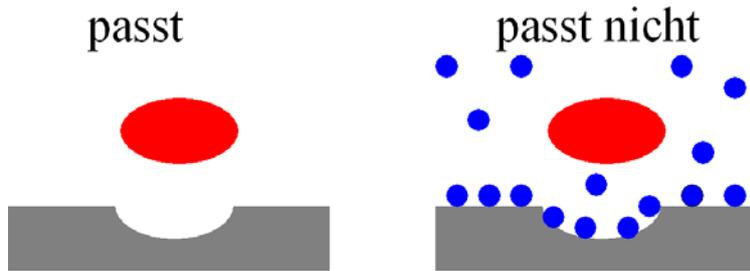


Abb.38: In Milch überzieht sich das Layer mit Milchproteinen, die daraufhin die Einlagerung von E. coli in die Kavität behindern.

Hier ist das Ergebnis von 1:50 verdünnter Milch mit Proben von 3, 3 und 1.5mg/ml E. coli.

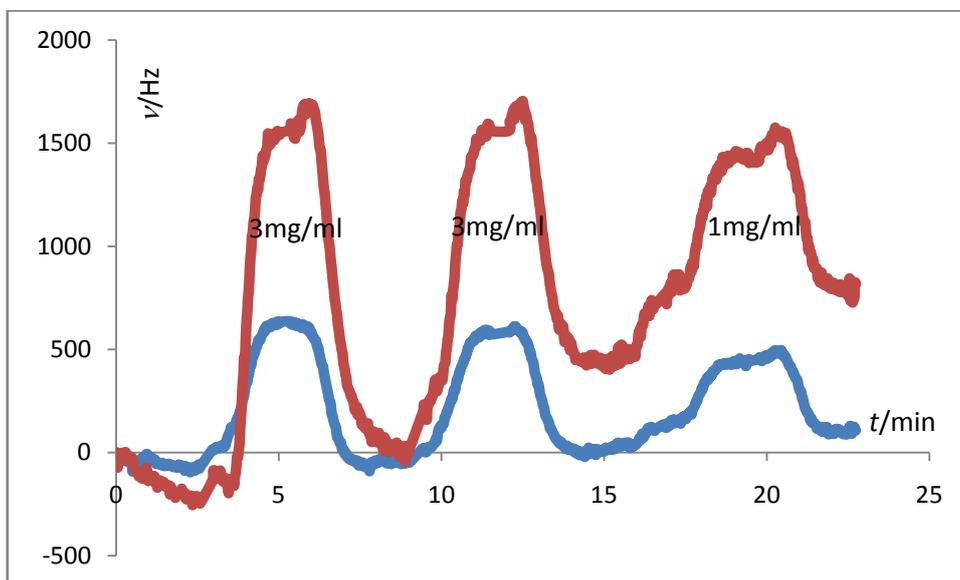


Abb.39: 1:50 verdünnte Milch, gespiket mit zweimal 3 und einmal 1.5mg/ml E. coli.

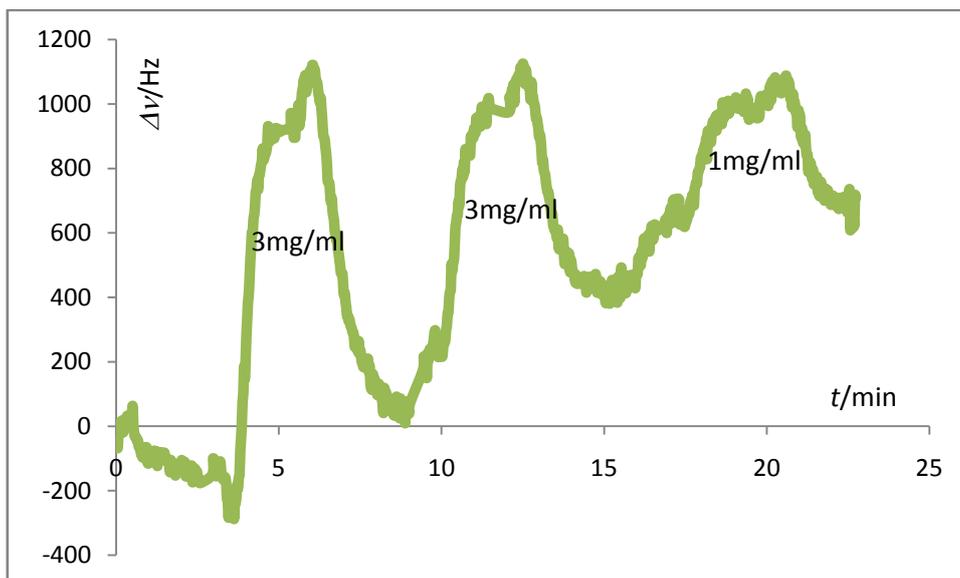


Abb.40: Differenzsignal zu Abb.39

Und hier das Ergebnis von 1:20 verdünnter Milch mit 3mg/ml E. coli.

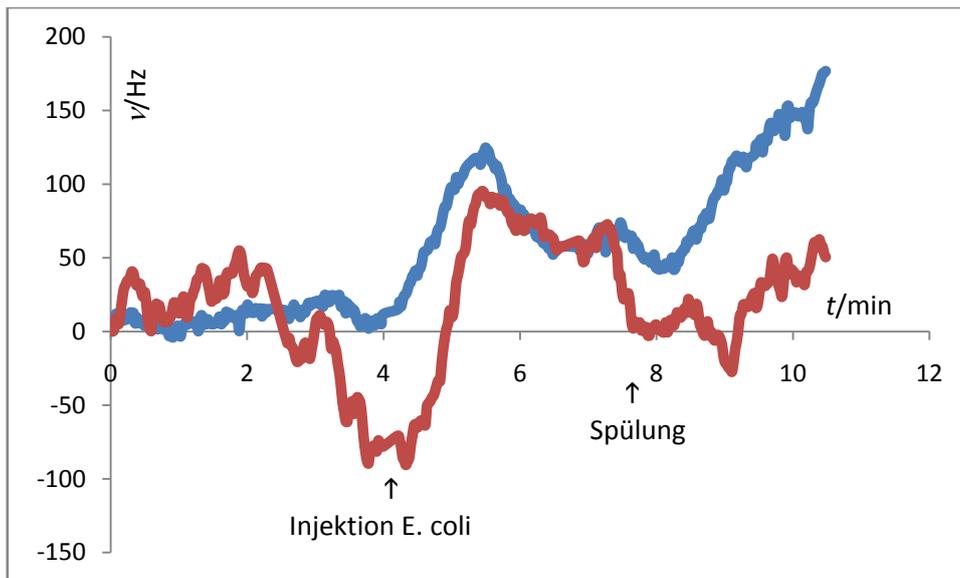


Abb.41: Messung in 1:20 verdünnter Milch mit 3mg/ml E. coli

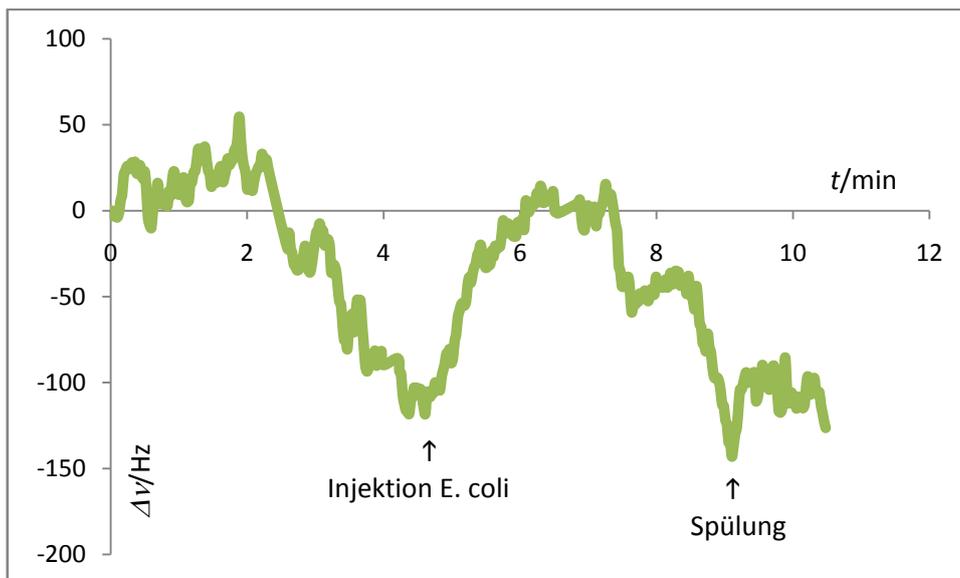


Abb.42: Differenzsignal zu Abb.41

Für die Messungen in Tee lässt man einen Teebeutel für 5min in 2l kochendem Wasser ziehen und dann abkühlen. In nachfolgender Kurve sind Proben mit 5, 3 und 1mg/ml zu sehen:

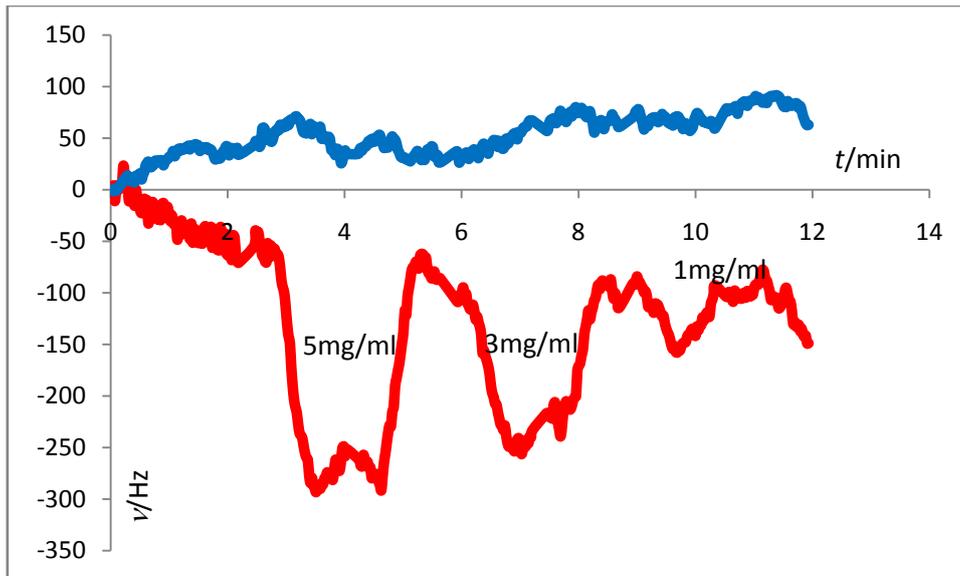


Abb.43: Messung in Tee bei 5, 3 und 1mg/ml

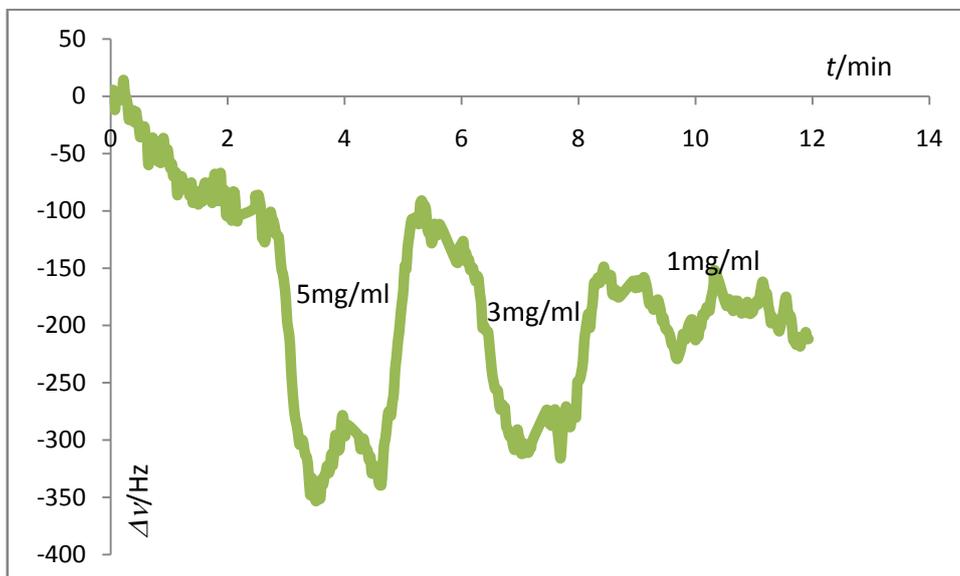


Abb.44: Differenzsignal zu Abb.43

Für die Suppenprobe wird ein Brühwürfel (Maggi Klare Suppe) in 1l kochendem Wasser gelöst, dann abfiltriert, um störende Gemüstückchen und Fettsäuren zu beseitigen, und verdünnt. Es hat sich gezeigt, dass eine Probe, die reich an Salz (5g/Würfel) und Proteinen (1.1g/Würfel) ist, schwer zu vermessen ist und daher stark verdünnt werden muss. Es wird bei Verdünnungsstufen der Stammlösung von 1:2, 1:10, 1:40, 1:80 und 1:250 gemessen. Die letzte ist bereits klar wie Wasser.

Selbst bei einer Verdünnung 1:40 sieht man noch gar nichts:

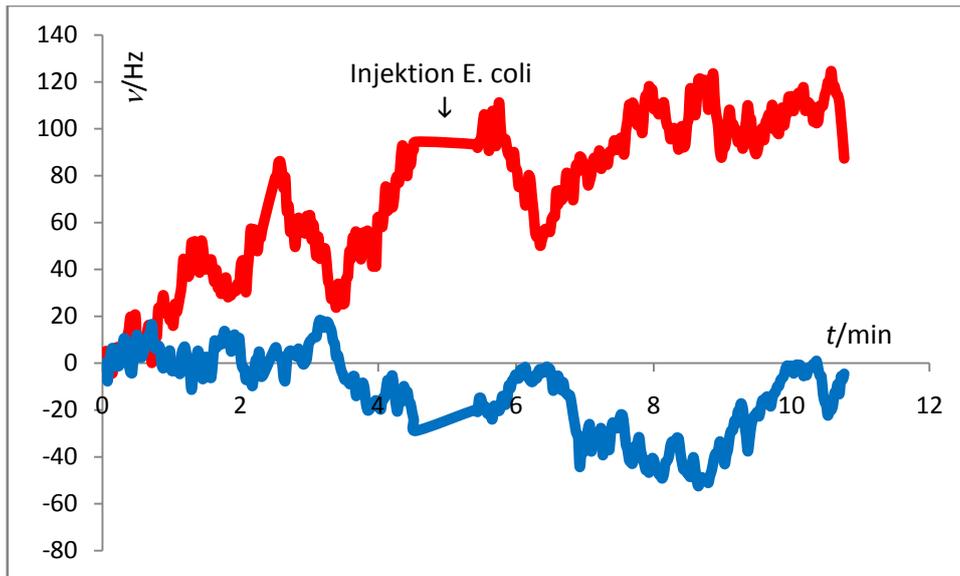
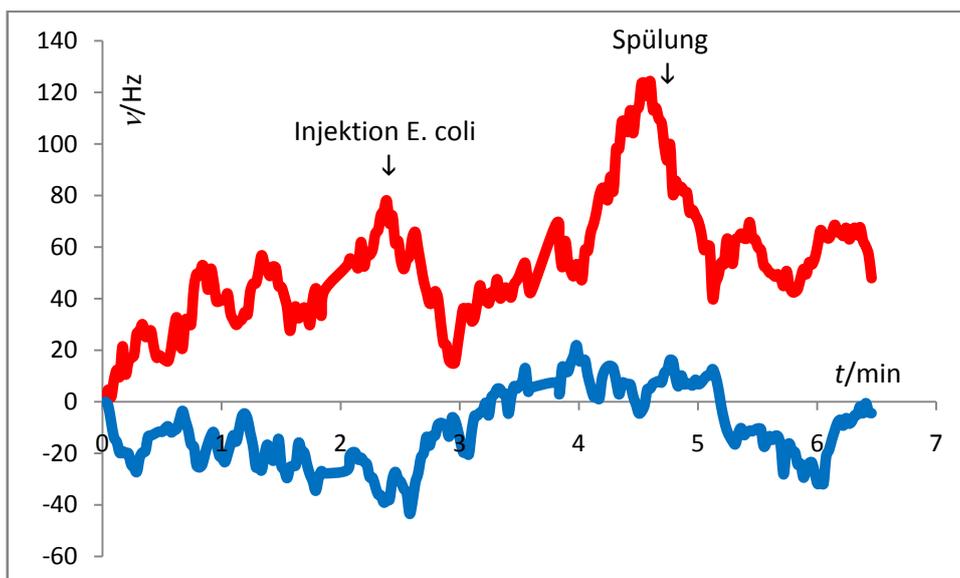


Abb.45: 1:40 verdünnte Suppenprobe mit 5mg/ml E. coli gespiket.

Auch bei der 1:80-Verdünnung kann man noch nichts erkennen.



**Abb.46: 1:80 verdünnte Suppenprobe mit 5mg/ml E. coli gespiket.
Messkanal (rot) und Referenzkanal (blau)**

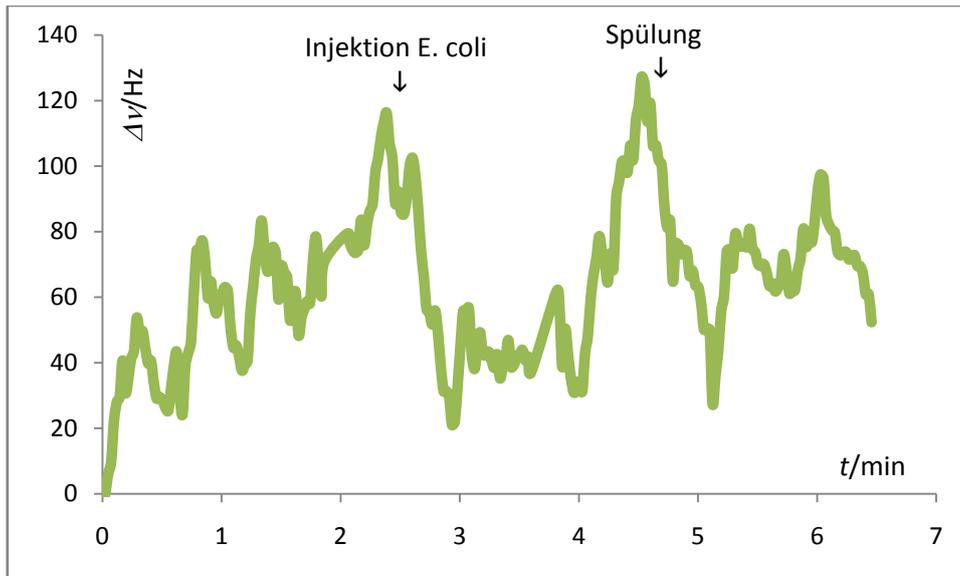
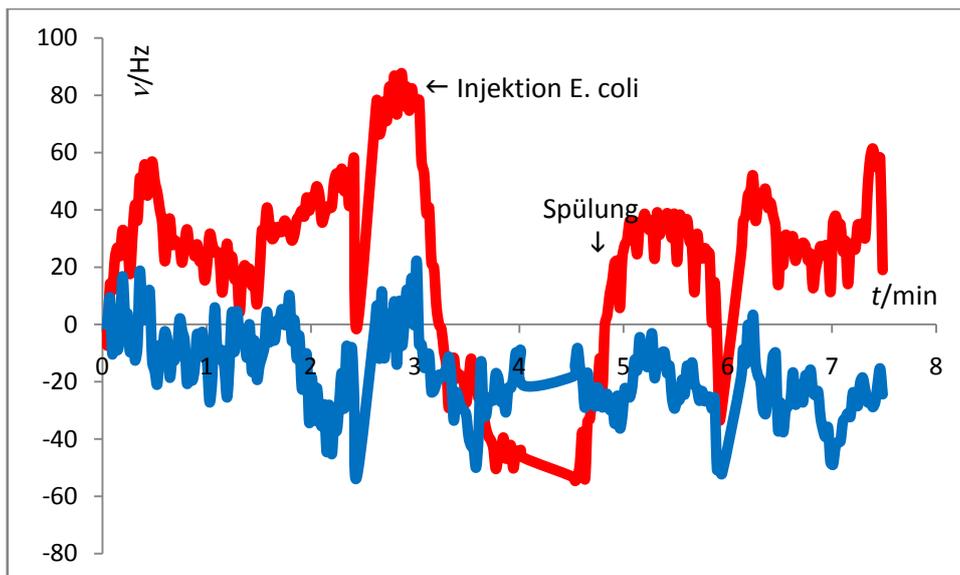


Abb.47: Differenzsignal zu Abb.46

Bei der 1:250-Verdünnung wächst das Signal allmählich aus dem Hintergrund:
Hier sind 3mg/ml E. coli injiziert worden.



**Abb.48: 1:250 verdünnte Suppenprobe mit 3mg/ml E. coli gespicket.
Messkanal (rot) und Referenzkanal (blau)**

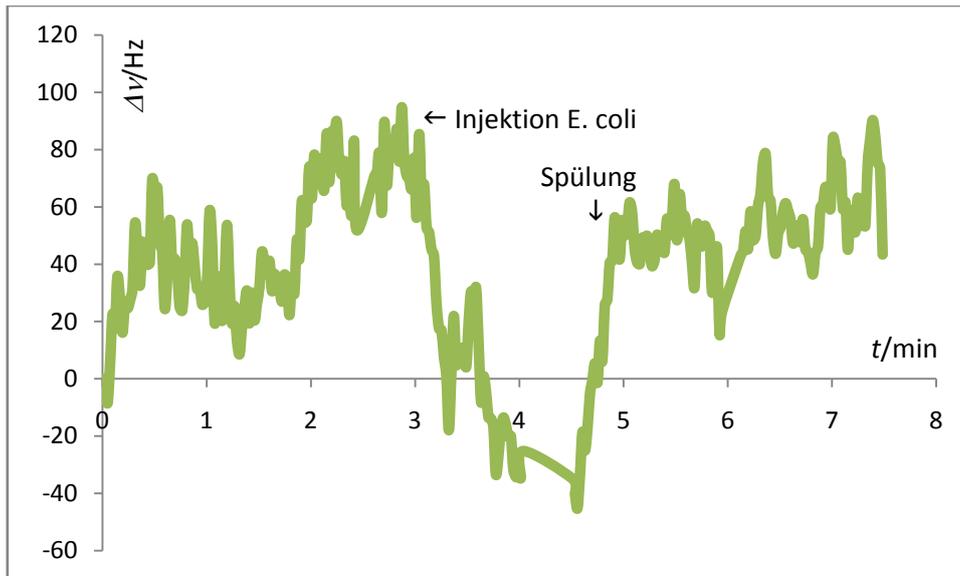


Abb.49: Differenzsignal zu Abb.48

Auch die Sojasauce zeigt bei den Messungen Probleme. Sie wird in Verdünnungsstufen 1:62.5, 1:125, 1:312.5, 1:937.5 und 1:3125 gemessen, und ist zuletzt bereits klar wie Wasser.

Erst bei der höchsten Verdünnungsstufe sind verwertbare Signale zu erkennen. Hier sind zwei Peaks von 2mg/ml E. coli zu sehen:

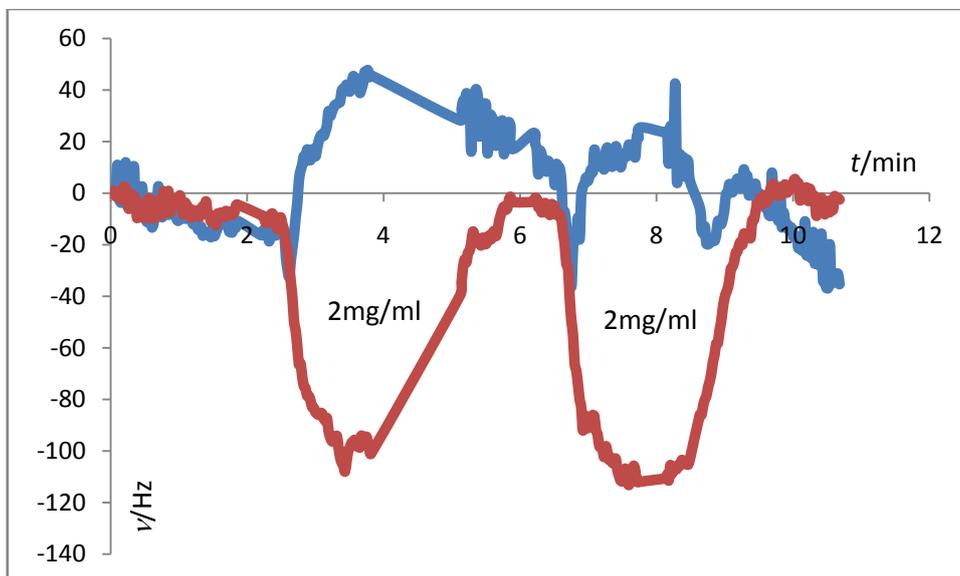


Abb.50: 1:3125 verdünnte Okinawa Sojasauce. Zweimal eine gespikete Probe mit 2mg/ml E. coli

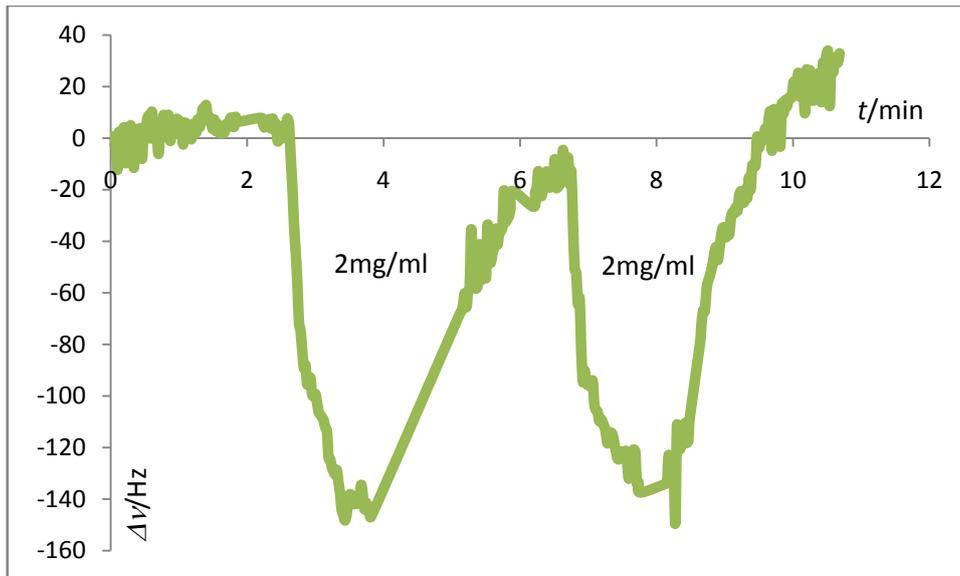


Abb.51: Differenzsignal zu Abb.50

Der Apfelsaft wird 1:50 verdünnt und gemessen. Bei Messungen in 1:10 verdünntem Saft sind bislang keine Sensoreffekte beobachtet worden. Die Proben sind mit 5, 3 und 1mg/ml E. coli versetzt.

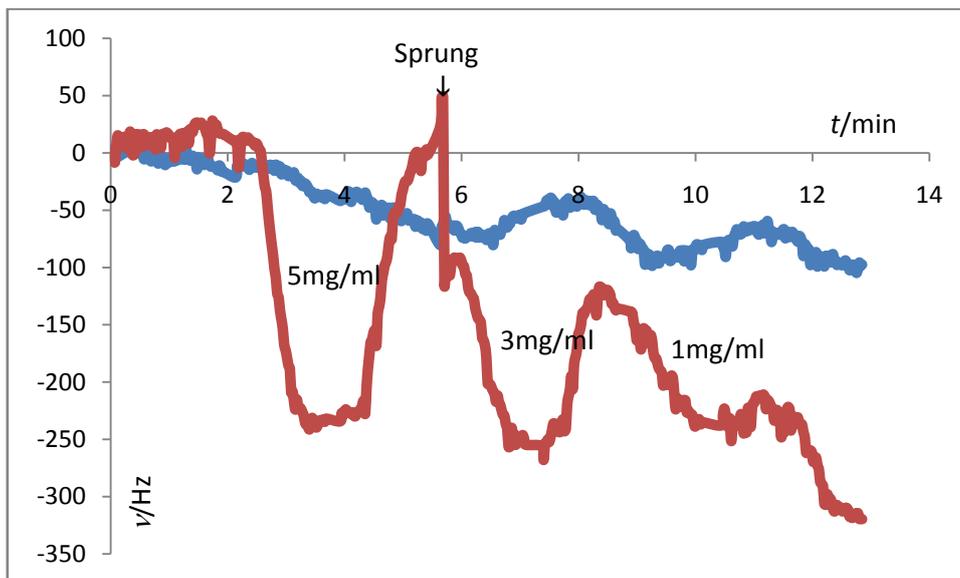


Abb.52: Messung in 1:50 verdünntem Apfelsaft, gespiket mit 5, 3 und 1mg/ml.

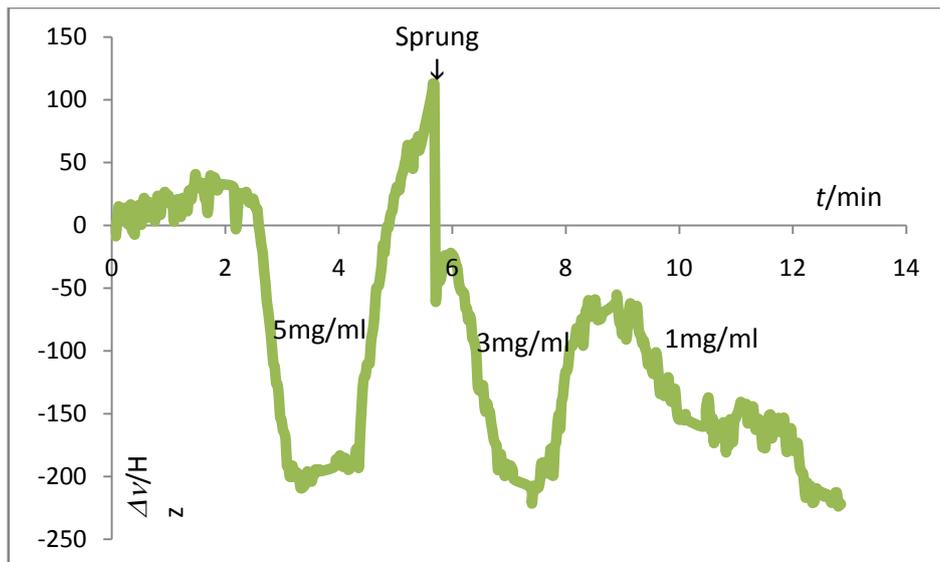


Abb.53: Differenz zu Abb.52

Ein gravierendes Problem bei der Messung in Apfelsaft ist die unvermeidbare Schaumbildung, wodurch ständig Luft in die Messzelle gelangt. Das vergrößert das Rauschen und erschwert Messungen bei höheren Konzentrationen. Sonst sind aber keine Probleme mit dieser Probe zu erwarten, da sie lediglich Kohlenhydrate (113g/l), und sonst weder Proteine, noch Fett, noch ausreichend Ionen enthält

In folgender Grafik sind die Sensoreffekte in % relativ zum Effekt von E. coli in destilliertem Wasser aufgetragen. Es werden folgende Verdünnungen für die Auswertung herangezogen: Coca Cola 1:10, Sojasauce 1:3125, Suppe 0.004cubes/l, Tee 0.5bags/l, Apfelsaft 1:50, Milch 1:50.

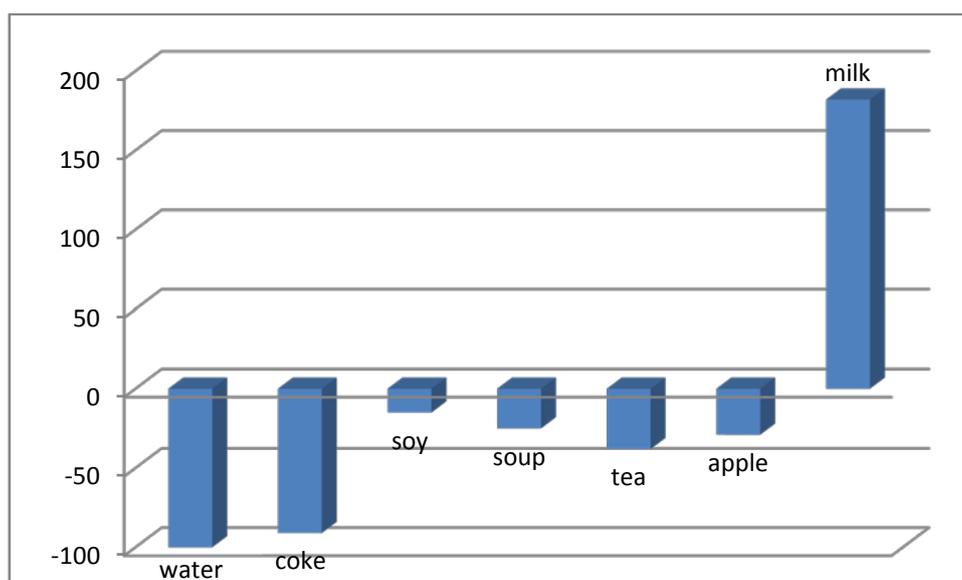


Abb.54: Hier sind die Signale in Lebensmittelproben relativ zu destilliertem Wasser zu sehen.

Man sieht, dass Coca Cola, welches de facto eine Zuckerlösung (108g/l Zucker) ist, sich am unproblematischsten verhält. Milch zeigt als einziges Lebensmittel einen Anti-Sauerbrey-Effekt, was durch den hohen Proteingehalt erklärt werden kann (35g/l). Der hohe Fettgehalt der Milch (35g/l) hat keinen Einfluss auf das Ergebnis. Lebensmittel, die protein- und salzreich sind, wie Sojasauce und Suppe, müssen stark verdünnt werden, um eingesetzt werden zu können, zeigen aber selbst dann nur schwache Signale. Das lässt vermuten, dass einige Substanzen in diesen Lebensmitteln die Sensorschicht dauerhaft schädigen. Beispielsweise können Proteine irreversibel an das Layer binden und die Kavitäten verstopfen. Dass dies bei Milch, welche auch proteinreich ist, nicht geschieht, lässt sich durch die Verschiedenheit der Proteine erklären: Milchprotein ist tierischer Herkunft und besteht zu 80% aus Casein und 20% aus Molkeprotein [28]. Casein bildet mit Calciumphosphat Micellen, welche in Lösung bleiben und dadurch hervorragend vom säugenden Jungtier aufgenommen werden können. Molkeproteine sind Globuline und Albumine, die viel Cystein enthalten, welches z.B. dem Aufbau von Glutathion, einem Antioxidans, dient. Sojaprotein besteht zu 70% aus Speicherproteinen, die beim Keimen einer Pflanze als Nahrungsquelle dienen und reich an essentiellen Glutamin sind. Dabei handelt es sich vor allem um Globuline, denen LDL-senkende Wirkung [29], aber auch allergene Wirkung [30] zugeschrieben werden. Der Rest sind Gluten, welches auch als Klebereiweiß bekannt ist, und aktive Enzyme. Dazu zählen Trypsininhibitoren (Fraßschutz), Cysteinproteasen (Peptidspalter) und Hemagglutinine (verursachen Blutgerinnung). Da diese unter Verdacht stehen, auch im Menschen schädliche Wirkung entfalten zu können, aber durch Erhitzen denaturiert werden, ist es ratsam, Soja nur gekocht oder raffiniert zu konsumieren [31]. Außerdem enthält Soja pflanzliche Östrogene und Lecithin, eine Gruppe emulgierend wirkender Phospholipide. Viele der genannten Inhaltsstoffe sind mehr oder weniger in den meisten Gemüsesorten enthalten, daher auch in der Suppenprobe.

2.4. Nährmedium:

Bakterien, die in für ihre Bedingungen optimierten Nährlösungen leben, können sich rasch und effizient vermehren. E. coli können sich im Idealfall bei 37°C alle 30min verdoppeln. Zur Untersuchung von Bakterienwachstum werden E. coli in eine Nährlösung gegeben, mit Bisbenzimid markiert und im Mikroskop untersucht.

Wenn Bakterien wachsen, bilden sie Kolonien aus, in der alle Zellen dicht gepackt aneinander liegen. Im Idealfall wird eine Kolonie pro vorhandene Zelle gebildet. In der Mikrobiologie macht man sich diese Eigenschaft zur Bestimmung von Bakteriengehalten zunutze: Man infiziert einen Nährboden mit einer Probe, woraufhin Kolonien wachsen, die selbst makroskopisch sichtbar sind. Durch Abzählen der gebildeten Kolonien kann auf die ungefähre Bakterienanzahl in der Probe geschlossen werden.

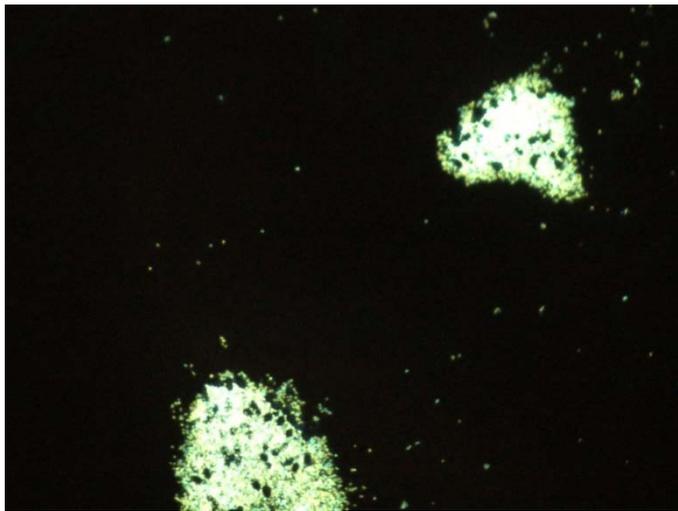


Abb.55:
Bakterien-
kolonien in
Nährlösung
(25mg/ml
Glucose,
15mg/ml
Ammonium-
sulfat,
15mg/ml
Malzextrakt,
1mg/ml
Protease
Pepton)

In der kommenden Bildfolge werden fluoreszenzmarkierte Bakterien bei 50-facher Vergrößerung gezeigt, die in einem Nährmedium gezüchtet und nach entsprechend angegebener Zeit entnommen wurden. Die Probe wird öfters geschüttelt, um die Kolonien zu zerstören und eine annähernd homogene Zellverteilung in der Lösung zu garantieren. Die Rezeptur lautet wie folgt: 30mg/ml D-Glucose*1H₂O, 10mg/ml (NH₄)₂SO₄, 1mg/ml NaCl

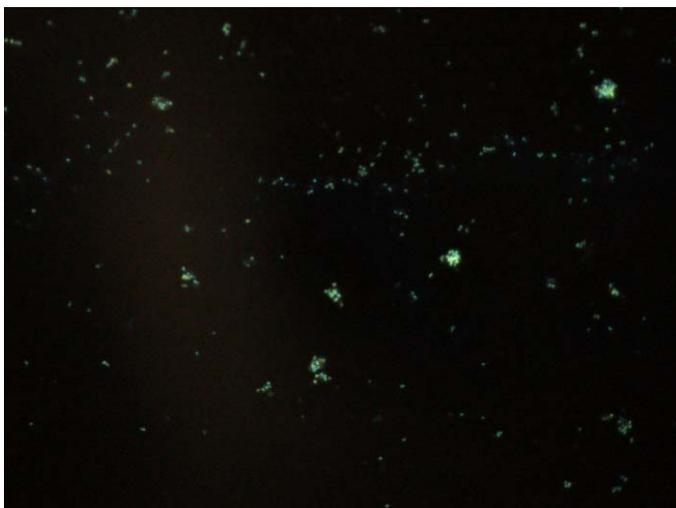


Abb.56: sofort gemessen

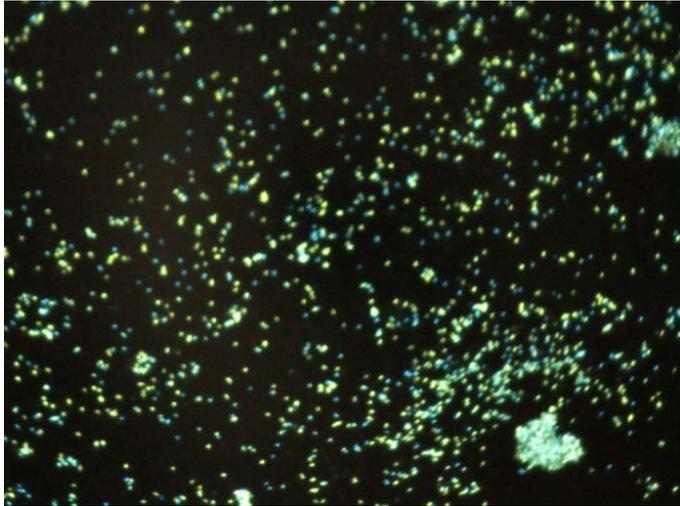


Abb.57: nach 2h

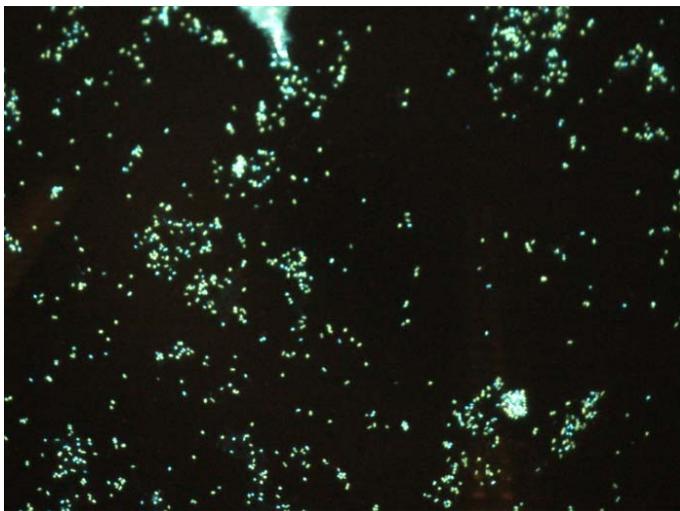


Abb.58: nach 5h

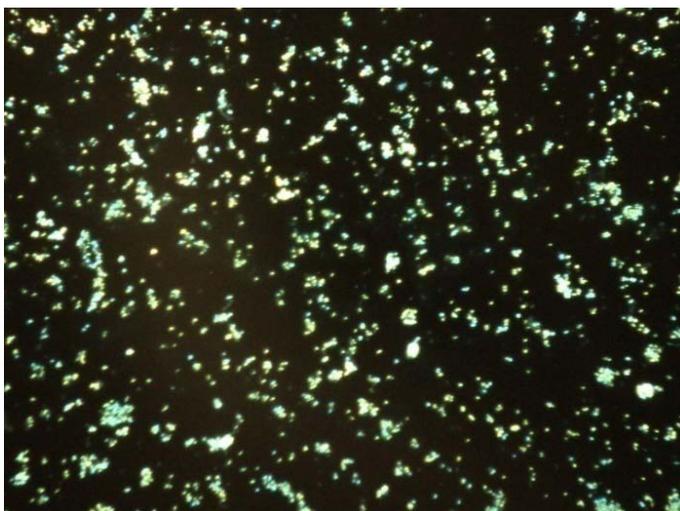


Abb.59: nach 96h

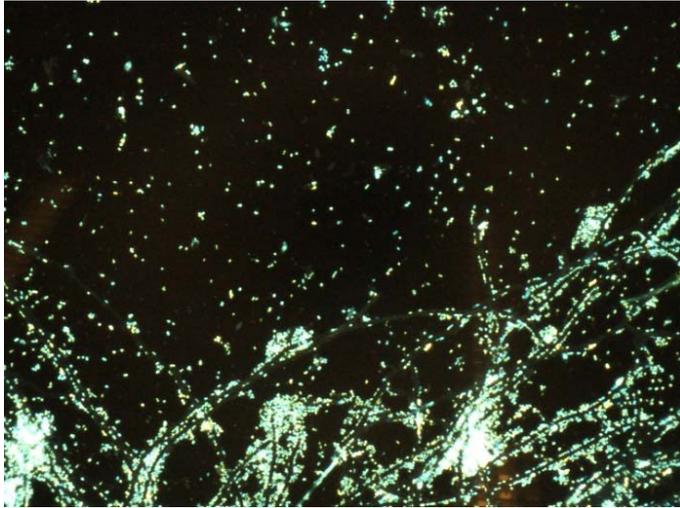
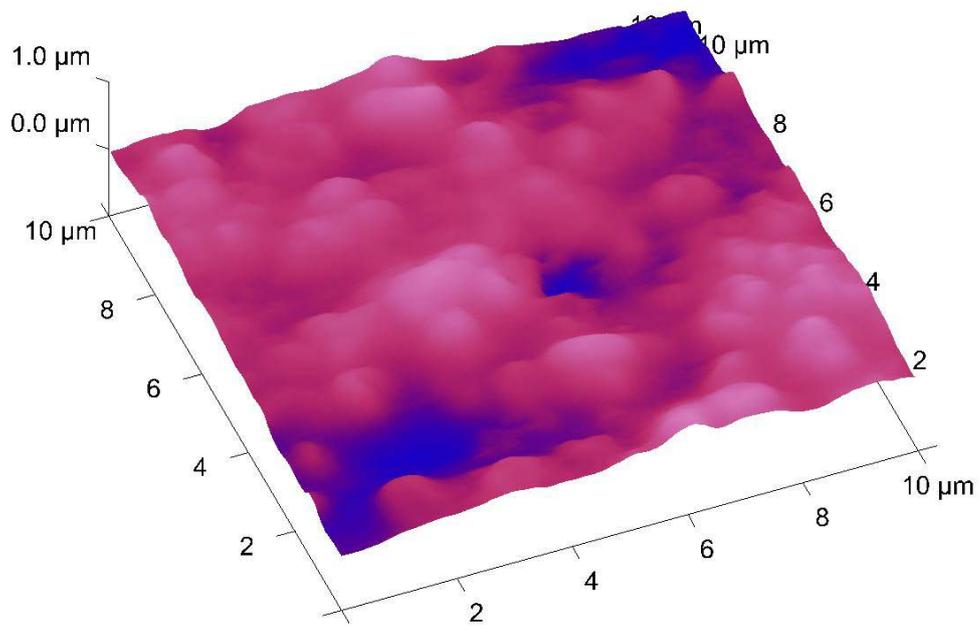


Abb.60: nach 115h

Innerhalb der ersten 2h ist die Population an Bakterien deutlich gestiegen. Danach setzt bereits eine Sättigung des Wachstums ein. Da *E. coli* durch hydrophobe Wechselwirkungen agglomerieren, ist die Populationsdichte trotz guten Schüttelns nicht überall gleich. Daher muss man mehrere Aufnahmen einer Probe miteinander vergleichen, um anschließend ein Bild auszuwählen, welches der ungefähren mittleren Population entspricht. Bei schlechter Auswahl kann es sogar erscheinen, als würden die Populationen zurückgehen. Im letzten Bild sind unten die Hyphen eines Schimmelpilzes zu sehen – was bedeutet, dass die Nährlösung im Laufe der Zeit kontaminiert wurde. Durch diese unerwünschte Konkurrenz und durch die hohe Populationsdichte sind die Bakterien hier bereits im Hungerstadium und daher nicht mehr so groß wie in den Bildern davor.

Und hier ist eine AFM-Aufnahme von *E. coli* zu sehen, die 3h in folgender Nährlösung gezüchtet wurden: 1.5mg/ml Na_2SO_4 , 1.5mg/ml NH_4Cl , 1.5mg/ml $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 20mg/ml D-Gluc $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$, dann 1h bei 90°C sterilisiert.



**Abb.61: AFM-Bild von in Nährlösung gewachsenen Bakterien
(Rezeptur: siehe Text)**

3. Stressbehandlung:

3.1. Thermische Behandlung:

Bakterien reagieren empfindlich auf höhere Temperaturen [5]. Daher zählt Hitzebehandlung zu den häufigsten und zuverlässigsten Sterilisationsmethoden, wie z.B. Pasteurisation, Kochen oder Braten. E. coli reagiert wie viele andere Bakterien auf höhere Temperaturen, aber auch auf andere Stressbedingungen, wie UV-Licht und Chemikalien, mit der sogenannten Hitzeschockantwort: Normalerweise wird der Sigmafaktor σ^{32} innerhalb weniger Minuten nach der Synthese abgebaut. Sigma-Faktoren sind bakterielle Proteine, welche die Transkription initiieren. Der Abbau von σ^{32} , welches die Hitzeschockgene kontrolliert, wird mit steigender Temperatur gehemmt. Dadurch werden mehr Hitzeschockproteine produziert, wie z.B. Proteasen (bauen beschädigte Proteine ab) und Chaperone (falten Proteine richtig). Sinkt die Temperatur ab, wird σ^{32} wieder abgebaut. Doch auch bei Raumtemperatur ist dessen Konzentration nicht Null, da die von ihm abhängigen Proteine auch im Stoffwechsel unter Normalbedingungen eine Rolle spielen [32].

Bei der Denaturierung von E. coli sind experimentell drei Stufen zu beobachten: Bei 70°C fallen einige temperaturempfindliche Proteine aus. Das Bakterium ist somit tot, doch die Zelle an sich ist noch nicht degeneriert. Bei 100°C verdampft das Wasser im Cytosol, sodass nur noch eine schlaffe Zellhülle, die v.a. aus Lipiden besteht, zurückbleibt. Bei circa 250°C pyrolysieren die Rückstände. Die verschiedenen Stufen werden mittels AFM verfolgt. Bis 100°C kann man zwischen trockener Erhitzung und Kochen unterscheiden. Im Fall des Ersteren schrumpeln die Zellen, da auch unterhalb des Siedepunktes Wasser verloren geht. Aus hygienischer Sicht ist jedoch Kochen einer trockenen Erhitzung vorzuziehen, da die Stöße der umgebenden Wassermoleküle zur rascheren Abtötung der Keime führen.

In der folgenden Bilderserie sind Bakterien nach zweistündiger Hitzebehandlung dargestellt. Alle Bilder sind 10µmx10µm groß und haben eine Auflösung von 2048x1024 Pixel.

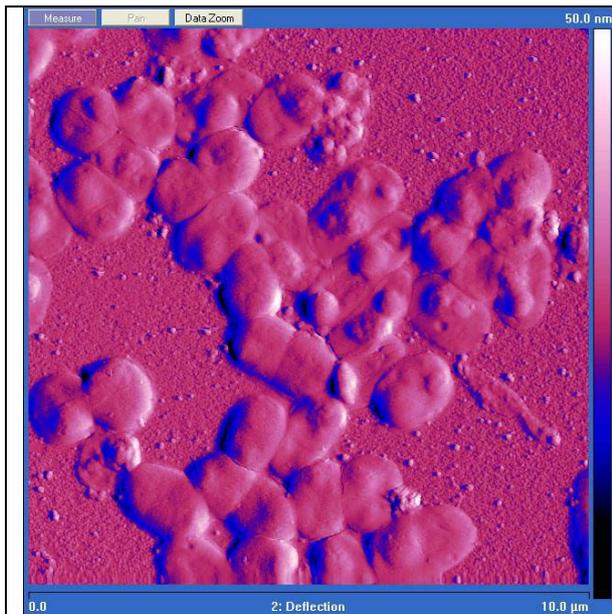


Abb.62: Bei einer unbehandelten Kultur sind die meisten Zellen intakt und mit Wasser vollgesaugt.

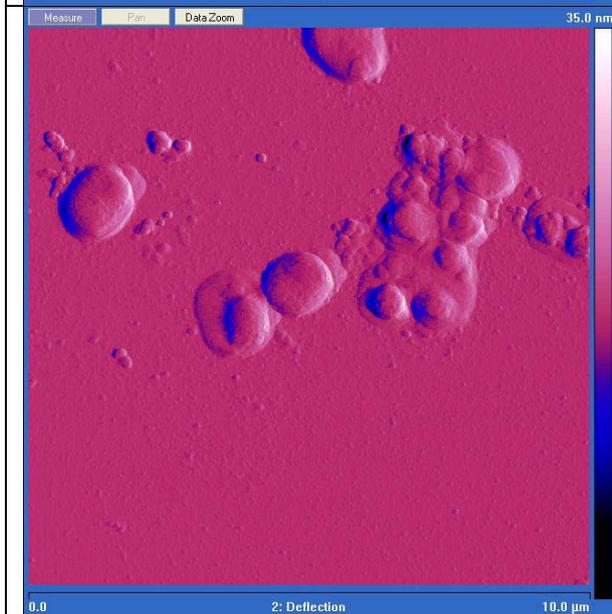


Abb.63: Bei 80°C (trocken erhitzt) sind die Zellen zwar tot, aber die Strukturen sind noch intakt. Es sind jetzt lediglich ein paar mehr Zellen abgeplattet, was durch den Flüssigkeitsverlust zu erklären ist.

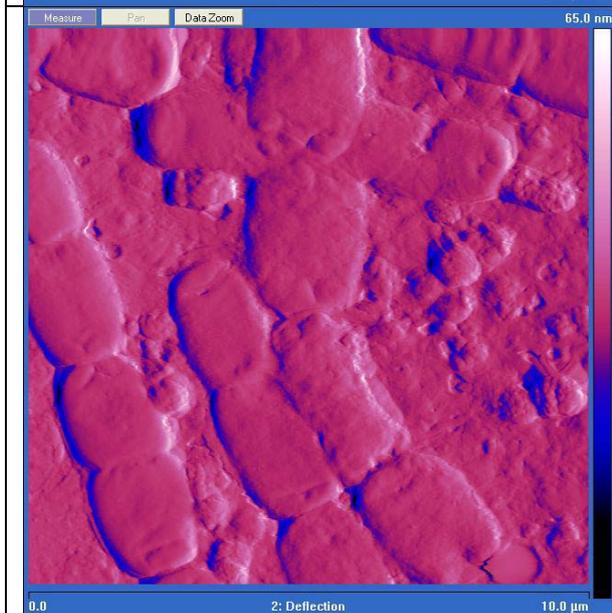


Abb.64: Bei 80°C (gekocht) sehen die Bakterien viel aufgequollener aus als bei trockener Erhitzung.

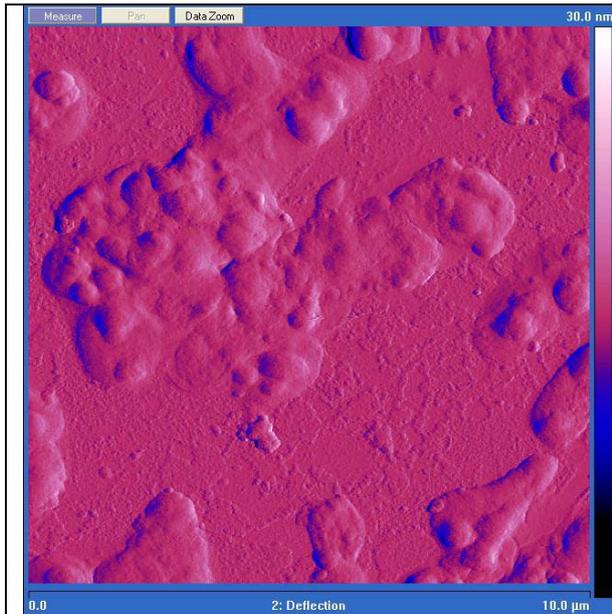


Abb.65: Bei 100°C (trocken erhitzt) sind durch das Verdampfen der Zellflüssigkeit die meisten Bakterien zerstört worden. Zwischen den noch halbwegs erkennbaren Zellhüllen sieht man auch jede Menge kleinerer Fragmente.

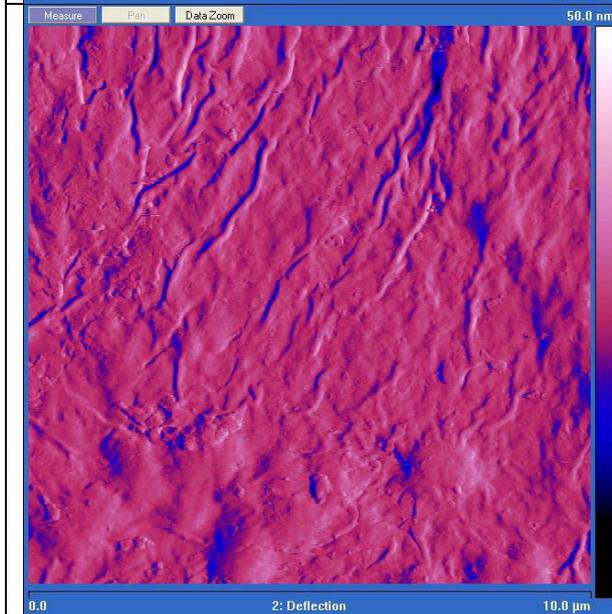


Abb.66: Bei 100°C (gekocht) ist die thermische Bewegung des Wassers groß genug, um die Zellen zu zerreißen, sodass nur ein Trümmerfeld aus Zellfragmenten zurückbleibt.

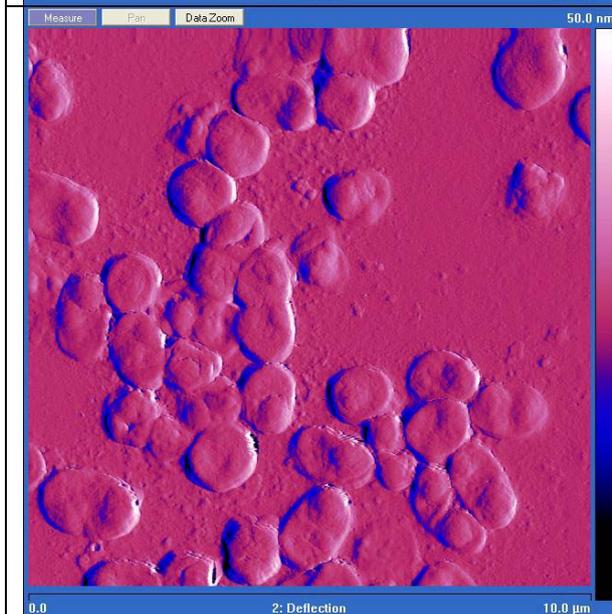


Abb.67: Bei 120°C ist zwar das Cytosol verdampft, die Zellstrukturen sind aber noch gut erhalten. Da diese hohen Temperaturen nur im Trockenen erreicht werden, werden die Zellstrukturen ungestört von Nachbarmolekülen festgebrannt.

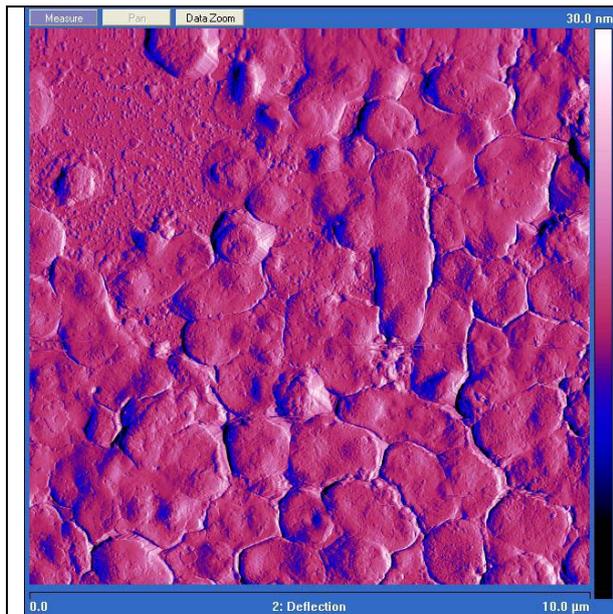


Abb.68: Bei 200°C sind nur mehr leere Zellhüllen übrig.

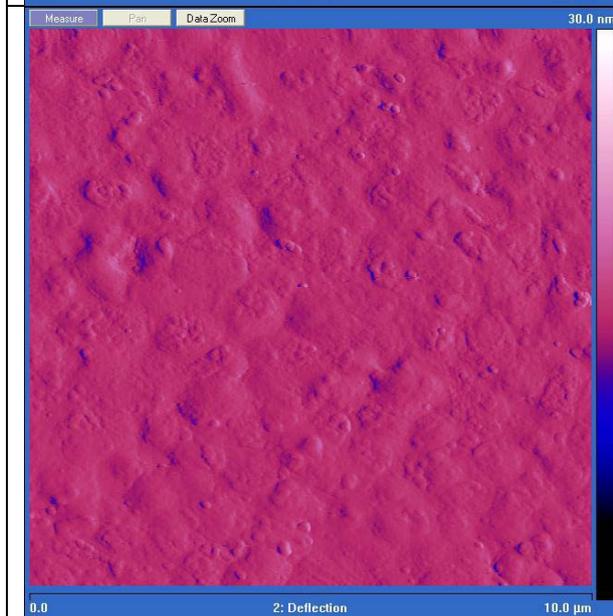


Abb.69: Bei 300°C sind auch viele nicht-wässrige Komponenten der Bakterien pyrolysiert oder verkohlt. Zurück bleibt lediglich etwas zellulärer Schutt, wie Kohlenstoff, Salze oder Maillard-Produkte. Zellstrukturen sind keine mehr zu erkennen.

Bei den QCM-Messungen können zwischen diesen Stufen keine Unterschiede erkennbar: Selbst, wenn die Zellen nachweislich vollkommen zerstört sind, zeigt der Sensor einen Effekt, der in der gleichen Größenordnung oder sogar größer ist als der Effekt der unbehandelten Bakterien. Das liegt daran, dass selbst Zellfragmente noch ähnliche Oberflächenstrukturen und die gleiche Polarität wie intakte Bakterien aufweisen. Dadurch werden die Kavitäten mit zellulären Trümmern aufgefüllt, die einen Sauerbrey-Effekt verursachen. Vergleichsweise zeigt die Referenzelektrode keinen Effekt, was eine unspezifische Adsorption ausschließt.

Hier ein Beispiel für 2mg/ml E. coli in Wasser. Der erste Peak entspricht unbehandelten, der zweite erhitzten (300°C, 3h) E. coli.

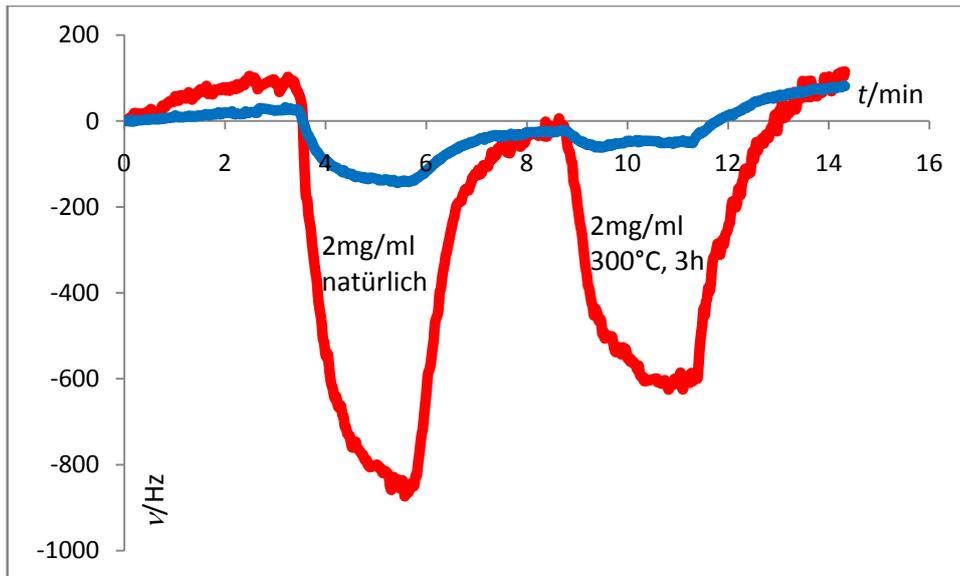


Abb.70: 2mg/ml unveränderte bzw. erhitzte (300°C, 3h) E. coli in destilliertem Wasser. Polyacrylat-Layer, Raumtemperatur.

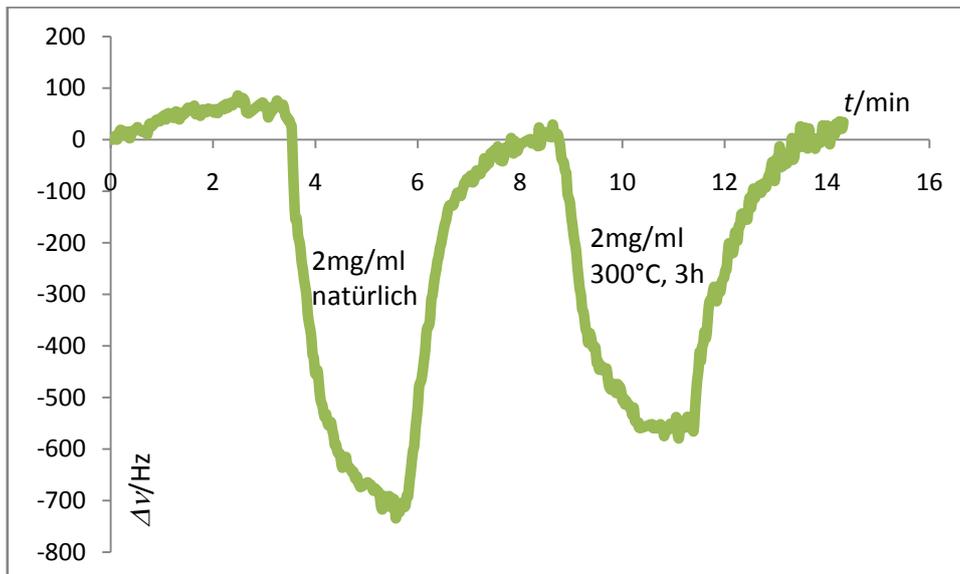


Abb.71: Differenzsignal zu Abb.70

3.2. UV-Licht & Ultraschall:

Hochenergetische Strahlung wirkt ionisierend und kann daher zur Abtötung von Keimen in Lebensmitteln verwendet werden. Zusätzlich werden Insekten, Wurmlarven und Verderbnis erregende Enzyme zerstört. Dabei können allerdings essentielle Nährstoffe und Vitamine zerstört werden, sowie Radikale in Lebensmitteln gebildet werden, was zu Degradationsprodukten führt. Zum Einsatz können UV-, Röntgen- und Gammastrahlung kommen. Während in Österreich lediglich Bestrahlung von Gewürzen erlaubt ist, ist es in den USA üblich, alle möglichen Lebensmittel mit Strahlung zu behandeln [33].

Im Bild unten links sieht man E. coli in natürlicher Form, unten rechts E. coli nach 1h UV-Bestrahlung. Die bestrahlten Bakterien sehen abgeplattet aus, sind aber noch gut erkennbar.

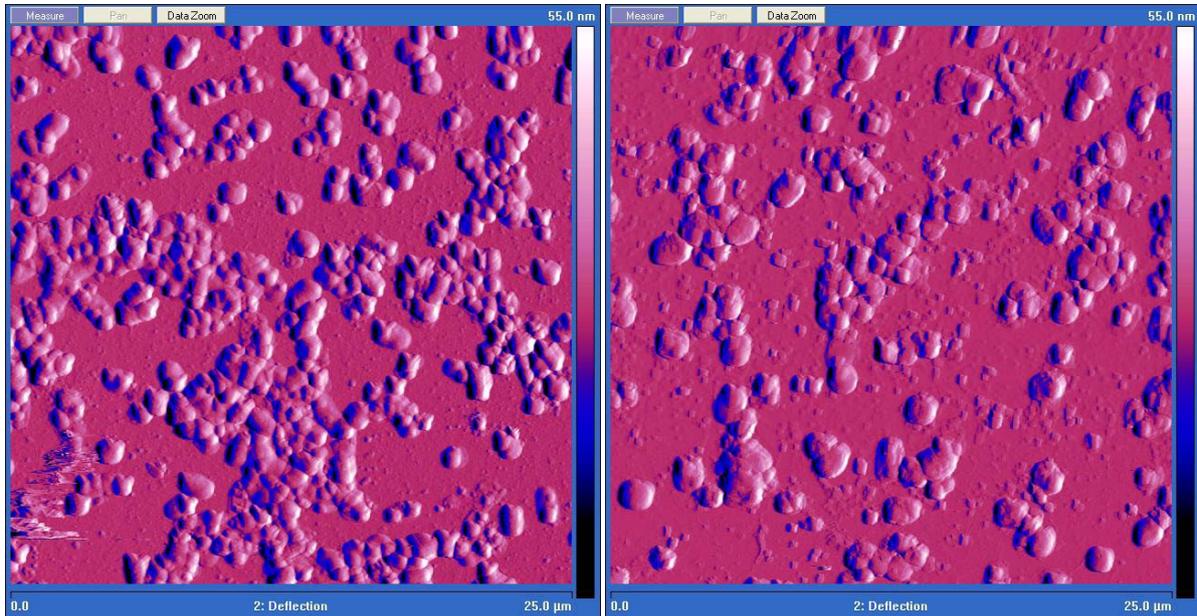


Abb.72 (links): E. coli unbehandelt; Abb.73 (rechts): E. coli für 2h mit UV-Licht bestrahlt

Da die Zellen zwar abgetötet, aber nicht zerstört werden, zeigt der Sensor auch bei UV-behandelten Bakterien einen Effekt. Diese Methode eignet sich daher nicht, tote von lebenden Zellen zu unterscheiden.

Wird Ultraschall durch ein Wasserbad geschickt, entstehen darin heftige, hochfrequente Stoßwellen, die stark genug sind, Zellen zu zerreißen. Daher werden E. coli Lösungen im Ultraschallbad behandelt und mit unbehandelten Bakterien verglichen. Die beiden Peaks entsprechen zwei äquivalenten Bakterienlösungen, von denen die erste nicht und die zweite 1.5h im Ultraschallbad behandelt worden ist. Erneut zeigen auch die Zellfragmente einen starken Sensoreffekt, der allerdings selektiv ist, da er nur auf dem Messkanal auftritt.

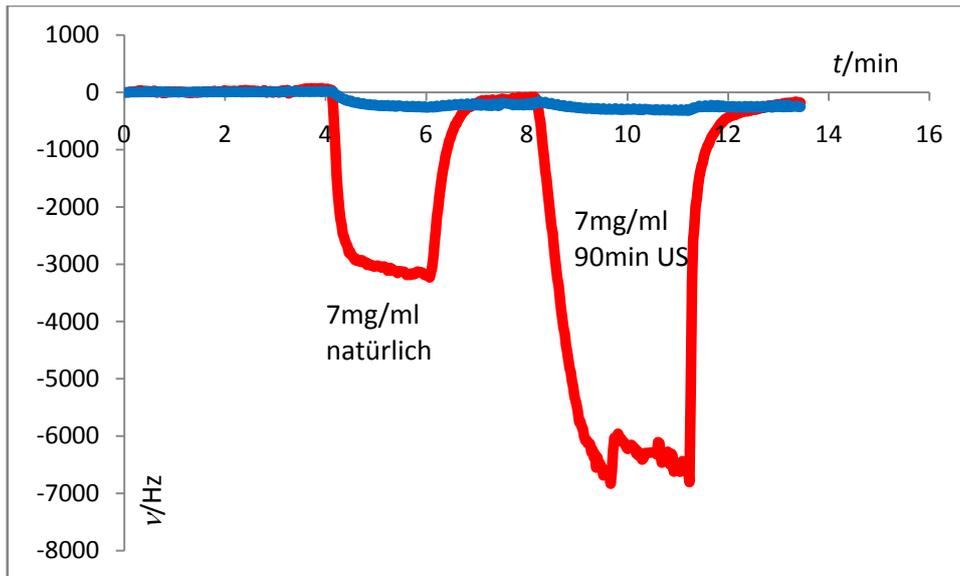


Abb.74: 7mg/ml unveränderte bzw. im Ultraschallbad behandelte E. coli in destilliertem Wasser gemessen

In der nächsten Kurve sind 3mg/ml Bakterienproben zu sehen, die auf verschiedene Weise für 45min sterilisiert wurden: mit UV-Licht bestrahlt, mit Ultraschall behandelt und gekocht.

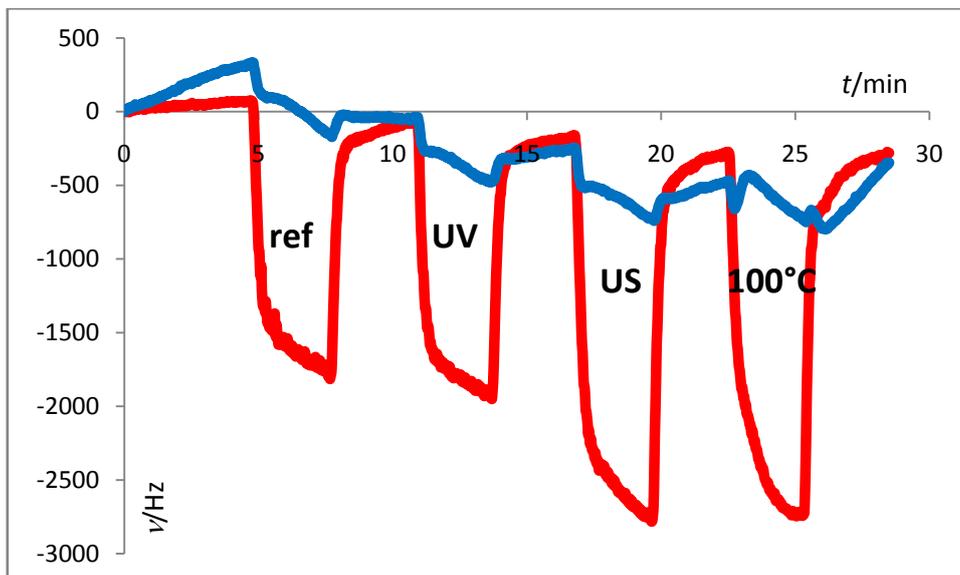


Abb.75: 3mg/ml verschieden stressbehandelte E. coli. Die Art des Stresses wird im Diagramm angegeben

Es zeigt sich, dass einige der üblichen Sterilisationsmethoden das Sensorsignal nicht verringern, und damit lebende und tote Zellen, sowie Zellfragmente einen Effekt bewirken.

E. coli können auch auf elektrischem Wege abgetötet werden: Legt man ein Feld von circa 5-50kV/cm an, so werden die Phospholipid-Doppelschichten, die die

Membranen der Zelle bilden, durchbrochen. Dieses Verfahren nennt man Elektropermeabilisierung und kann seit einigen Jahren als Alternative zur Pasteurisation angewandt werden [34].

3.3. Verdauung:

Zellen können auch auf biochemischem Wege zerstört werden: Lysozym ist ein Verdauungsenzym, welches Zellen zerstört und bei 37°C sein. Es spaltet die β -1,4-glycosidische Bindung zwischen N-Acetyl-D-muraminsäure und 2-Acetylamino-2-desoxy-D-glucose im Peptidoglycan der Bakterienzellwand [35]. Lysozym arbeitet am effizientesten bei 37°C in einer Pufferlösung, die 100mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Tris*HCl enthält und mit NaOH auf pH=8 eingestellt wird.

Es werden 50mg E. coli und 15mg Lysozym in 2.5ml Lysozypuffer gelöst und für 2.5h auf 38°C erwärmt. Dann wird die Probe auf 50ml verdünnt. Parallel dazu wird eine Vergleichsprobe ohne Lysozym hergestellt. Die folgende Messung zeigt vor einem Hintergrund aus destilliertem Wasser zweimal die Injektion von abwechselnd der unverdauten und der verdauten Probe. Bei dieser Messung wird – anders als bei vielen bereits gezeigten Messungen – nicht durchgehend bei laufender Pumpe gemessen, sondern für die Messung die Pumpe abgeschaltet. Dafür wird, während die Zelle gespült wird und der Quarz sich einschwingt, die Messung abgeschaltet. Das hat zwei Vorteile: Erstens kann es durch die mechanische Bewegung der Flüssigkeit beim Pumpen zu verstärktem Rauschen – den sogenannten Pumpenpeaks – kommen, was mit dieser Methode unterbunden wird. Zweitens sieht man dann die tatsächliche Differenz zwischen dem Gleichgewichtszustand mit und ohne Probe. Bevor sich ein Gleichgewicht eingestellt hat kann es nämlich zu Scheineffekten kommen, die falsche Ergebnisse vermuten lassen. Beispielsweise kann die Strömung zuerst über die Referenz- und dann über die Messelektrode laufen. Dann zeigt der Referenzkanal im ersten Augenblick einen stärkeren Effekt als der Messkanal, und somit ein positives Differenzsignal.

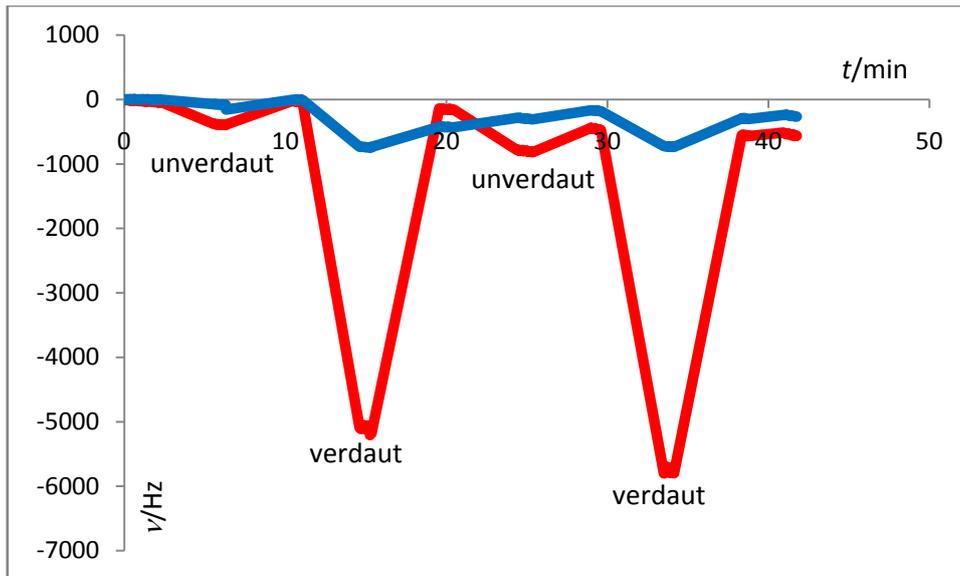


Abb.76: 1mg/ml E. coli abwechselnd in destilliertem Wasser und mit Lysozym verdaut. Hintergrund ist destilliertes Wasser. Messkanal (rot) und Referenzkanal (blau)

Wie zu sehen ist, gibt die unverdaute Probe einen Effekt von circa 500Hz – wie es zu erwarten ist. Die verdaute Probe zeigt aber einen Effekt von 5kHz, der viel zu hoch ist. Das lässt sich entweder dadurch erklären, dass entweder die Ionenstärke des Puffers das Sensorsignal so stark beeinflusst, oder dass das Lysozym direkt mit der sensitiven Schicht wechselwirkt. Allerdings wird der Sensor nicht zerstört, da die Sensorlinie durch Spülen mit Wasser wieder auf Null zurückgeht.

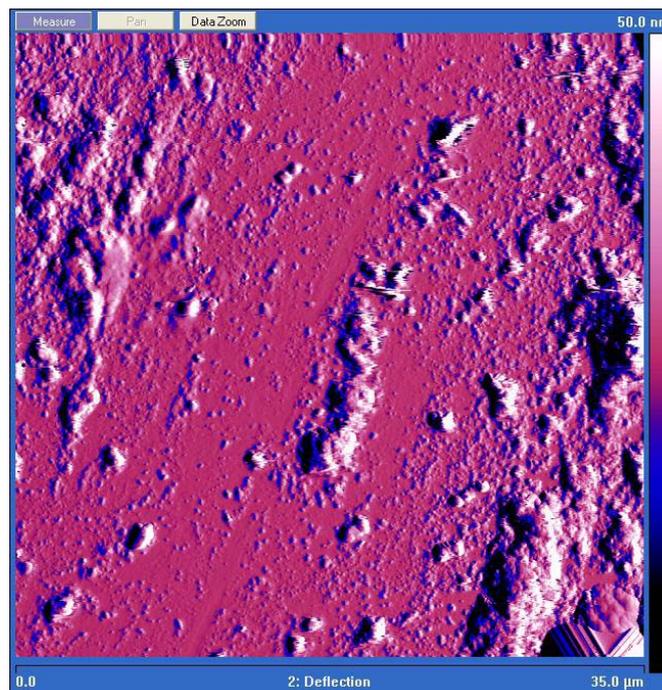


Abb.77: Mit Lysozym verdaute E. coli

In Abb.77 sind die verdauten E. coli zu sehen. Es zeigt sich, dass die Zellen tatsächlich zerstört wurden, und dass von ihnen nur mehr zellulärer Müll übrig ist.

4. Andere Messungen:

4.1. Denaturierung sensitiver Schichten:

Die Lebensdauer von Polyacrylat könnte durch die Reaktion der polymereigenen Säuregruppen mit dem Amid des Vernetzers limitiert sein (siehe Kap.1.2). Bei aggressiven Matrices jedoch kann eine drastische Verringerung der selektiven Detektion erfolgen. Ein möglicher Grund ist in Ablösemeechanismen zu sehen, wodurch die anhaftende Schicht die Adhesion verliert. Diese Problemlage ist in der Arbeitsgruppe bekannt und sich durch Haftvermittler zwischen Gold und der sensitiven Schicht lösen. Die Polarität dieser Zwischenschicht muss zwischen der des Goldes und der sensitiven Schicht liegen. In Abb. 78 ist eine optimierte Selektivität zu sehen:

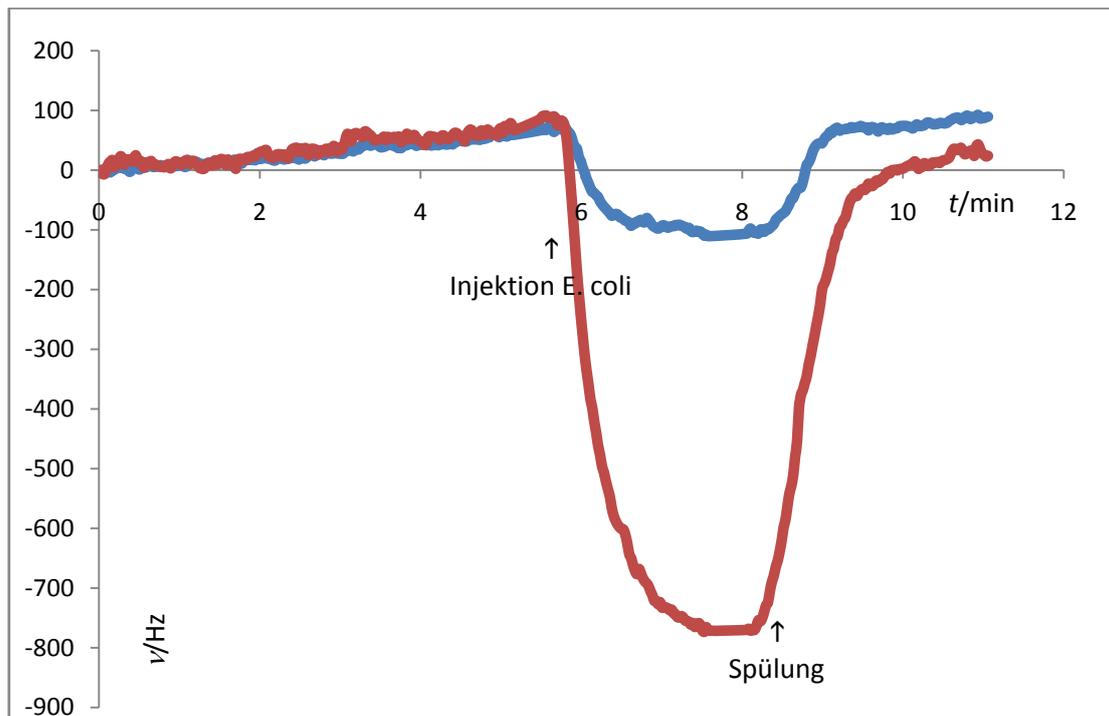


Abb.78: 2mg/ml E. coli in destilliertem Wasser, gemessen mit einem frischen Sensor.

Aggressive Medien, wie etwa eine langzeitige Einwirkung von Sojasauce führt zu einem Verschwinden des selektiven Messeffektes, wahrscheinlich durch Ablösung des Coatings. Eine Überprüfung kann durch Messungen an Luft erfolgen.

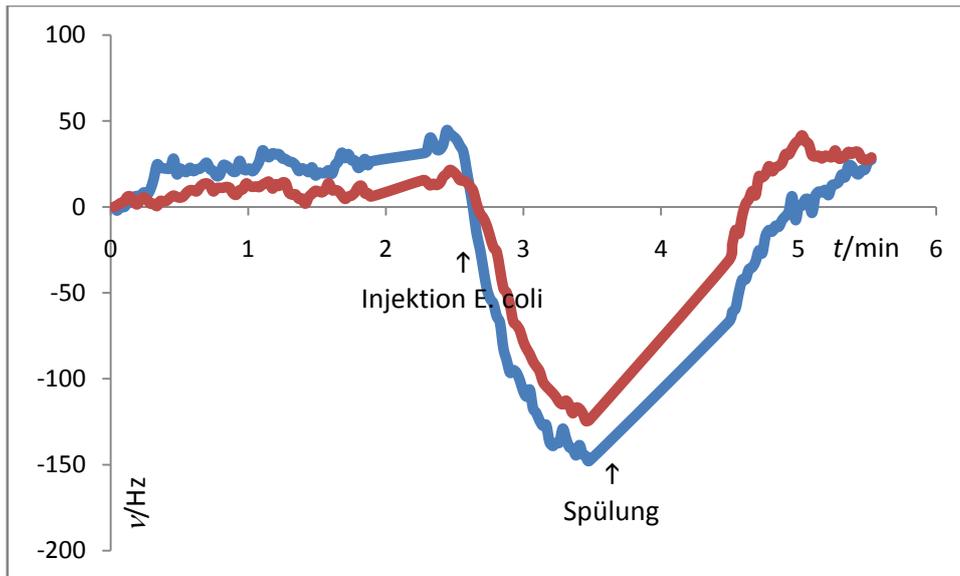


Abb.79: 2mg/ml E. coli in destilliertem Wasser, gemessen mit einem degradierten Sensor.

4.2. Stammselektivität:

In dieser Messung wird ein Sensor getestet, der mit E. coli eines Stammes, dem W-Stamm, geprägt wurde. Dann wird zunächst eine 3mg/ml Probe des W-Stamms vermessen, anschließend eine 3mg/ml Probe einer allgemeinen E. coli Mischung, zuletzt wieder die W-Stamm-Probe.

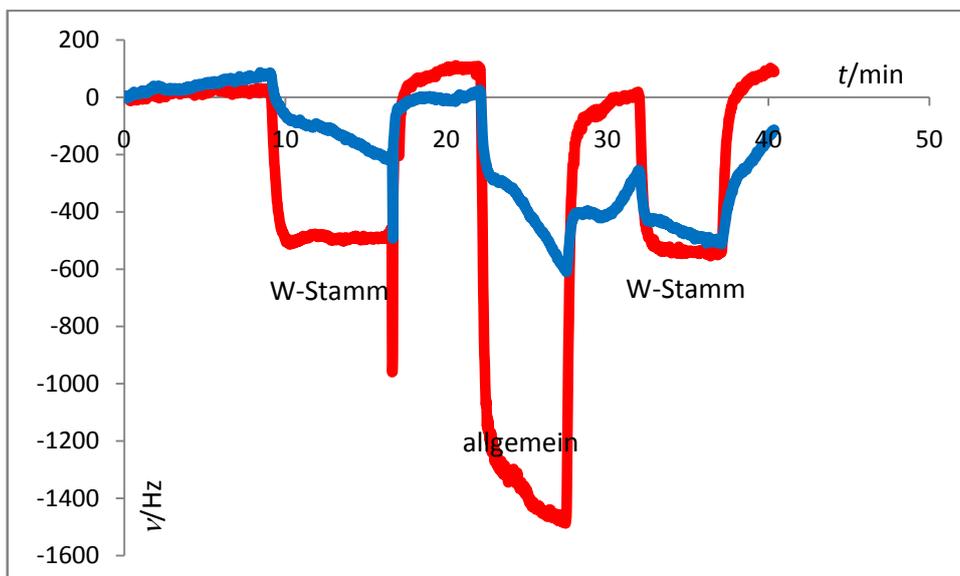


Abb.80: 3mg/ml E. coli in destilliertem Wasser auf Polyacrylat bei Raumtemperatur. Zuerst W-Stamm, dann allgemeiner Stamm, dann W-Stamm.

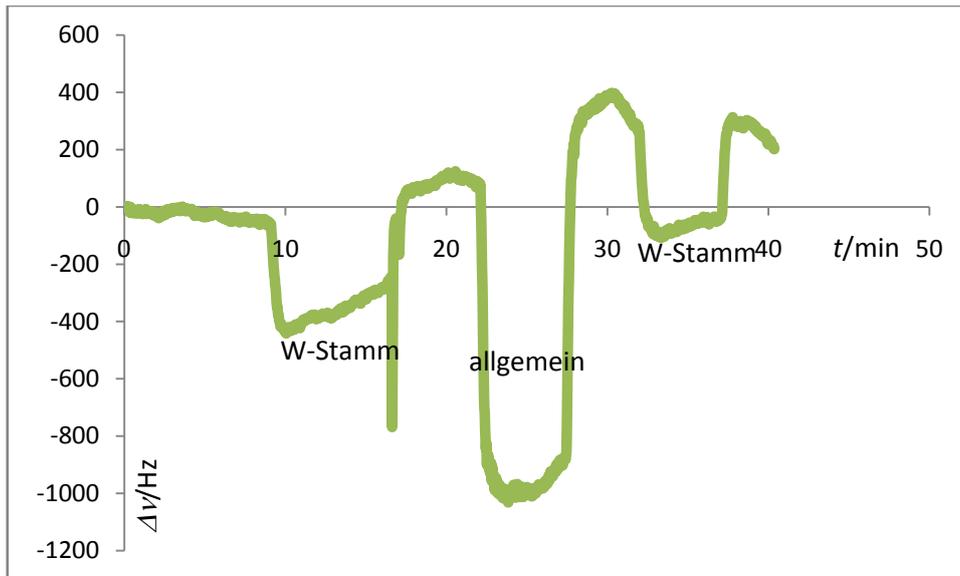


Abb.81: Differenzsignal zu Abb.80

Überraschenderweise spricht die Mischung stärker an, obwohl sie eigentlich weniger selektiv in die Kavitäten passen sollte. Dieses Verhalten wurde auch schon von Kollegen beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in der Mischung Bakterien enthalten sind, die generell stärker an das Polymer binden und dadurch einen größeren Masseneffekt bewirken. Diese Hypothese wurde allerdings noch nicht durch entsprechende systematische Untersuchungen bestätigt.

5. Zusammenfassung:

5.1. Deutsch:

In dieser Arbeit wurden *E. coli*, die verschiedensten Bedingungen ausgesetzt wurden, mit instrumentellen analytischen Methoden, wie QCM und AFM, untersucht. Umgekehrt wurden auch Möglichkeiten der QCM-Messungen aufgezeigt und diskutiert, sowie die Vor- und Nachteile von Polyacrylat-Schichten.

Prinzipiell lässt sich bestätigen, dass QCM-Messungen in Maßlösungen oder verdünnten Lebensmittelproben (siehe Kap.2) möglich sind. Außerdem wird der Einfluss der Matrixkomponenten auf das Sensorsignal diskutiert. Beispielsweise können Proteine unspezifisch an die Oberfläche binden und dadurch entweder einen Anti-Sauerbrey-Effekt bewirken, oder den spezifischen Effekt unterdrücken, sodass kein Signal gemessen wird. Während Zucker in der Probelösung den Sensoreffekt nicht beeinflusst, haben Kochsalz und SDS durch ihre Wirkung auf die Bakterienzellen sehr wohl einen Einfluss auf das Signal. Mit AFM-Messungen ist man in der Lage, unbeschädigte Zellen von den Fragmenten zerstörter Zellen zu unterscheiden. Mit entsprechenden Vergleichsmessungen kann man aber auch Unterschiede zwischen stressbehandelten und ungestörten Zellen erkennen. Mit Hilfe von QCM-Messungen kann man sowohl lebende und tote Zellen, als auch Zellfragmente detektieren. Das liegt daran, dass die grundlegenden Strukturen und Eigenschaften wie die Polarität trotz allem erhalten bleiben. Dadurch bleibt auch die molekulare Wechselwirkung zwischen Layer und Analyt erhalten.

E. coli wurde als Analyt gewählt, da diese Bakterien der prokaryotische Modellorganismus der Biochemie sind. Außerdem ähneln sie den Anthrax-Keimen, deren Erforschung auch im Rahmen des EU-Projekts Nanosecure erfolgt. Forschungen am ungefährlichen Modell können dann auf pathogene Keime übertragen werden.

5.2. English:

In this work *E. coli*, that were exposed to many different conditions, were analyzed with instrumental analytical methods, like QCM and AFM. On the other side, opportunities given by QCM measurements were shown and discussed, as were the pros and cons of polyacrylate layers.

Principally it is confined, that QCM measurements are possible in standard solvents and food samples (see chap.2). Additionally the influence of matrix components concerning the sensor signal is discussed. Proteins, for example, can unspecifically be bound to the surface and so cause either an anti-Sauerbrey effect, or oppress the specific effect, so that no signal can be measured. While sugar in the liquid sample doesn't affect the sensor effect, common salt and SDS really influence the signal due to their impact on the bacteria cells. With AFM measurements one can distinguish undamaged cells from the fragments of destroyed cells. With appropriate comparative measurements one can additionally differ between stressed and unstressed cells. With QCM measurements one can detect cells either dead or alive, and cell fragments. That's because the basic structures and properties, like the polarity, survive all kinds of treatment. That's why the molecular interaction between layer and analyte remain the same.

E. coli has been chosen as analyte, as those bacteria are the prokaryotic model organism of biochemistry. Besides, they're similar to anthrax bacteria, which are also studied within the EU project Nanosecure. Research on the harmless model can then be extrapolated to pathogenic germs.

Quellen:

- [1] G. Thomas; *Escherichia coli: model and menace*; Microbiology Today, Vol.31, p.114-115 (2004)
- [2] <http://de.wikipedia.org/wiki/Gram-F%C3%A4rbung>
- [3] M. T. Madigan, J. M. Martinko; *Brock Mikrobiologie*; Pearson Studium, p.150 (2006)
- [4] E. J. Jäger, S. Neumann, E. Ohmann; *Botanik*; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, p.345-346 (2003)
- [5] <http://en.wikipedia.org/wiki/Flagellum>
- [6] J. B. Kaper; *Pathogenic Escherichia Coli*; Internat. Journal of Medical Microbiology; Vol.295, Is.6-7, p.355-356 (2005)
- [7] http://www.fsai.ie/publications/leaflets/EcoliO157_Leaflets/foodfactory.pdf
- [8] *Heat Treatment To Reduce Escherichia Coli 0157:H7 Contaminations Of Apples Used For Juice – Brief Article*; Nutrition Research Newsletter (2001)
- [9] M. T. Madigan, J. M. Martinko; *Brock Mikrobiologie*; Pearson Studium, p.762-763 (2006)
- [10] F. L. Dickert; *Analytische Chemie IV – Chemosensoren*; Skriptum
- [11] F. L. Dickert, O. Hayden; *Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases. Selective Detection of Yeasts with imprinted Polymers*; Analytical Chemistry, Vol.74, p.1302-1306 (2002)
- [12] K. J. Mann; *Sensorik von Zellen und Viren mit biomimetischen Oberflächen*; Dissertation (2004)
- [13] G. Sauerbrey; *The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing*; Zeitschrift f. Physik, Vol.155, p. 206-222 (1959)
- [14] S. Kurosawa, H. Aizawa, M. Tozuka, M. Nakamura, J. W. Park; *Immunosensors using a quartz crystal microbalance*; Measurement Science and Technology, Vol.14, Is.11, 1882-1887 (2003)
- [15] P. Lieberzeit, A. Afzal, A. Rehman, F. L. Dickert; *Nanoparticles for detecting pollutants and degradation processes with mass-sensitive sensors*; Sensors and Actuators B, Vol.127, Is.1, p.132-136 (2007)

- [16] R. Schirhagl; *QCM-Sensor basierend auf einem synthetischen Immunglobulin*; Diplomarbeit (2007)
- [17] O. Hayden, K. J. Mann, S. Krassnig, F. L. Dickert; *Biomimetic ABO Blood-Group Typing*; *Angewandte Chemie Int.*, Vol.45, p.2626-2629 (2006)
- [18] O. Hayden, C. Haderspöck, S. Krassnig, X. Chen, F. L. Dickert; *Surface imprinting strategies for the detection of trypsin*; *Analyst*, Vol.131, p.1044-1050 (2006)
- [19] <http://de.wikipedia.org/wiki/Siebdruck>
- [20] F. L. Dickert, K. Halikias, O. Hayden, L. Piu, R. Sikorski; *Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials*; *Sensors and Actuators B* 3768 1-4 (2001)
- [21] O. Hayden, F. L. Dickert et al.; *Nanolithography and subnanomolecular interactions for biomimetic sensors*; *Materials Science and Engineering C*, Vol.26, p.924-928 (2006)
- [22] O. Hayden, D. Podlipna, X. Chen, S. Krassnig, A. Leidl, F. L. Dickert; *Bioimprinted QCM sensors for virus detection – screening of plant sap*; *Anal. Bioanal. Chemistry*, Vol.378, p.1929-1934 (2004)
- [23] P. Lieberzeit, A. Afzal, D. Podlipna, S. Krassnig, H. Blumenstock, F. L. Dickert; *Printing materials in micro- and nanoscale: Systems for process control*; *Sensors and Actuators B*, Vol.126, p.153-158 (2007)
- [24] J.O. Mahony, K. Nolan, M.R. Smyth, B. Mizaikoff; *Molecularly imprinted polymers – potential and challenges in analytical chemistry*; *Analytica Chimica Acta*, Vol.534, Is.1, p.31-39 (2005)
- [25] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber; *Atomic Force Microscopy*; *Phys. Rev. Letters*, Vol.56, p.930-933 (1986)
- [26] <http://www.farmfak.uu.se/farm/farmfyskem-web/instrumentation/afm.shtml>
- [27] S. A. Kögl; *Die hyperosmotische Stressantwort von Escherichia coli – von der Proteomanalyse zu einzelnen Komponenten*; Dissertation (2008)
- [28] www.protein-eiweiss.de/index_casein.html

- [29] M. Adams, D. Golden, A. Franke, S. Potter, H. Smith, M. Anthony; *Dietary Soy β -Conglycinin (7S Globulin) Inhibits Atherosclerosis in Mice*; Journal of Nutrition, Vol.134, Is.3, p.511-516 (2004)
- [30] [http://www.food-allergens.de/symposium-voll\(2\)/data/soy/glycinin.htm](http://www.food-allergens.de/symposium-voll(2)/data/soy/glycinin.htm)
- [31] http://www.biosicherheit.de/de/lexikon/164.trypsin_inhibitor.html
- [32] M. T. Madigan, J. M. Martinko; *Brock Mikrobiologie*; Pearson Studium, p.245-246 (2006)
- [33] D. Schuster; *Bestrahlte Lebensmittel (1): Beeinflusst Bestrahlung die Qualität von Lebensmitteln?*; <http://www.dieuniversitaet-online.at> (2003)
- [34] V. Heinz, W. Sitzmann, Stefan Töpfl; *Selektive Abtötung von zellulären Krankheitserregern und Verderbsorganismen: Das Elsteril®-Verfahren*; Chemie Ingenieur Technik, Vol.79, Is.8, p.1135-1143 (2007)
- [35] <http://de.wikipedia.org/wiki/Lysozym>

Lebenslauf:

Personalien

Name: Bernhard Pummer

Geburtsdatum: 16.04.1985

Geburtsort: Wien

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familie:

Familienstand: ledig

Vater: Ernst Pummer, 20.07.1953

Technischer Angestellter

Mutter: Elfriede Pummer (geb. Reigl), 22.12.1956

Diplomierte Krankenpflegerin

Ausbildung:

1991-1995: VS Trautmannsdorf/Leitha

1995-2003: BG Bruck/Leitha

seit 2003: Chemie-Studium, Universität Wien

2004-2005: Zivildienst, Ignaz-Semmelweis-Klinik

seit 1.9.2008: Diplomarbeit, AG Prof. Dickert