

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Diffraction and biological detection of the antibiotic ciprofloxacin

verfasst von / submitted by

Stephan Troyer, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 876

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Physik UG2002

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Markus Arndt

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Dr. Christian Brand

Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals Bragg-Beugung von polyatomaren organischen Molekülen, insbesondere dem Farbstoff Phthalocyanin und dem Antibiotikum Ciprofloxacin, an einem dicken Lichtgitter gezeigt. Das entstehende Beugungsmuster zeigt eine starke Winkelabhängigkeit und eine asymmetrische Verteilung der Beugungsintensitäten. Die Detektion des Interferenzmusters erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Als Alternative wird ein in Entwicklung befindlicher, aus Bakterien bestehender Detektor vorgestellt. Im Gegensatz zu sämtlichen bisher durchgeführten Interferenzexperimenten mit Materiewellen wird die ortsauflösende Detektion dabei mithilfe von Lebewesen durchgeführt. Die Funktion des Detektors basiert auf der biologischen Wirksamkeit des Antibiotikums auf Bakterien. Entscheidend für den Erfolg dieser Methode ist das Überleben der Bakterien von Vakuum sowie deren Immobilisierung, sowohl im Vakuum als auch beim später stattfindenden Wachstum. Durch eine Fixierung auf 150 μm dicken getrockneten Agarfilmen mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit der Vakuumexposition von rund 35 % konnten diese Ziele erreicht werden.

For the first time Bragg diffraction at a thick light grating has been shown for polyatomic organic molecules, in particular the dye phthalocyanine and the antibiotic ciprofloxacin. The resulting diffraction pattern shows a strong angular dependence and an asymmetric distribution of diffraction intensities. For detection of the interference pattern fluorescence microscopy has been used.

As an alternative approach a detector currently under development made out of bacteria is presented. In contrast to all matter wave interference experiments done so far, the spatially-resolved detection is done using living organisms. The detection mechanism is based on the biological activity of the antibiotic in bacteria. Crucially for the success of this approach is the survival of the bacteria in vacuum and their immobilization, both in vacuum and during later growth. By fixing them onto a 150 μm thick dried film of agar with a probability of surviving vacuum of about 35 % both goals could be met.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
1 Einführung	4
1.1 Verwendete Moleküle	5
2 Materiewellen	6
2.1 Molekülbeugung am mechanischen Gitter	6
2.2 Beugung am Lichtgitter	8
2.3 Beugung am dicken Gitter	9
2.4 Kohärenz	10
3 Bragg-Beugung von Ciprofloxacin	11
3.1 Aufbau	11
3.2 Bragg-Beugung	16
3.2.1 Erzeugung des Lichtgitters	16
3.2.2 Justage des Aufbaus	18
3.2.3 Resultate der Beugung	21
4 Detektor aus Bakterien	25
4.1 Biologische Grundlagen	25
4.1.1 Wachstumsphasen von Bakterien	25
4.1.2 Antibiotika	26
4.1.3 Escherichia coli	27
4.1.4 Auswirkungen der Austrocknung	27
4.2 Bakterienzucht	28
4.3 Vakuumexposition auf Glas	29
4.4 Herstellung einer Agarschicht	30
4.5 Auftragung der Bakterien	34
4.6 Wachstum von E. coli in der Feuchtigkeitskammer	36
4.7 Wachstum auf Agar-Pads	41
4.8 Bakterielle Detektion von Ciprofloxacin an Luft	45
5 Datenverarbeitung	50
5.1 Mikroskopie	50
5.2 Automatisierte Auswertung	50
5.2.1 Detektion der Bakterien	50
5.2.2 Focus stacking	51
5.2.3 Ausrichtung der Bilder	52
5.2.4 Bestimmung des Wachstums	53
6 Ausblick	54
Literaturverzeichnis	55
Abbildungsverzeichnis	60
Anhang	61
7.1 Berechnung Geschwindigkeitsaufspaltung	61
7.2 Simulation der Bragg-Beugung	62
7.3 Auswertung Ciprofloxacinstreifen (Python)	64
7.4 Verarbeitung Bakterienaufnahmen (Python)	66
Danksagungen	68

1 Einführung

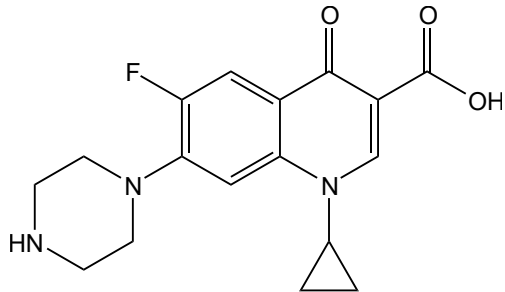
Seit ihrer Entdeckung wird die Quantenphysik als eine der erfolgreichsten physikalischen Theorien bezeichnet. Obwohl die philosophische Interpretation nach wie vor unklar und umstritten ist, wurde ihre Anwendbarkeit in einer Unzahl von Experimenten bestätigt. Eine Vorhersage der Quantenphysik ist, dass selbst massebehaftete Teilchen unter gewissen Umständen Welleneigenschaften aufweisen. Diese Wellennatur wurde in Beugungsexperimenten bereits den unterschiedlichsten Teilchen entlockt, beginnend von Elektronen (Davisson et al., 1927), über Neutronen (von Halban et al., 1936) bis hin zu verschiedenen Atomen (Estermann et al., 1930) und diversen Molekülen, von zweiatomigen (Estermann et al., 1930) bis hin zu Molekülen mit einer Masse von über 10 000 amu (Eibenberger et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Experiment vorgestellt, mit dessen Hilfe die Beugung einer Vielzahl fluoreszierender Molekülen untersucht werden kann.

Eine besonders in der Medizin und Biologie relevante Gruppe von Molekülen sind Antibiotika, welche in direkte Wechselwirkung mit Lebewesen treten können. Ein Beispiel dafür ist Ciprofloxacin. In bisherigen Molekülbeugungsexperimenten wurden physikalische oder chemische Prozesse genutzt, um die dabei entstehenden Interferenzmuster sichtbar zu machen. Gerade bei Antibiotika stellt sich nun die spannende Frage, ob man lebende Bakterien als Detektor nutzen kann. Dort, wo laut Quantenphysik viele Moleküle ankommen, würden die Bakterien sterben, während sie in den anderen Teilen des Interferenzmusters überleben.

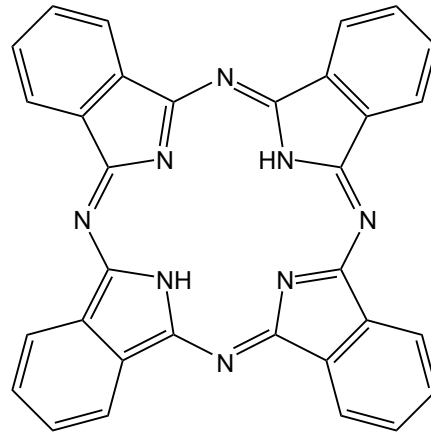
Auf dem Weg dorthin gilt es einige Herausforderungen zu meistern. Eine davon ist, dass die verfügbaren Molekularstrahlintensitäten so gering sind, dass ein Effekt von Ciprofloxacin auf die Bakterien nur nach mehrtägiger Akkumulation zu erwarten ist. Um die maximale Molekülkonzentration an der Position der Beugungsmaxima zu erhöhen, bietet es sich an, anstatt der für Moleküle üblichen Beugung an dünnen Gittern, Bragg-Beugung zu nutzen. Für Beugungsexperimente ist man auf ein Hochvakuum von rund 10^{-7} mbar angewiesen, welchem die Bakterien für mehrere Tage ausgesetzt werden müssen. Da es keine Bakterien gibt, die in ihrem natürlichen Lebensraum mit Vakuum konfrontiert sind, gilt es passende Bakterien auszuwählen und Bedingungen zu schaffen, die das Überleben der Bakterien in der Vakuumkammer ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt den experimentellen Aufbau, der notwendig ist, um erstmals die Bragg-Beugung komplexer Moleküle, im speziellen Ciprofloxacin und Phthalocyanin, zu beobachten. Der zweite Fokus liegt auf der Entwicklung eines ortsauflösenden, biologischen Detektors für Ciprofloxacin und ähnliche Antibiotika, der zu alledem noch vakuumkompatibel ist.

1.1 Verwendete Moleküle



Ciprofloxacin



Phthalocyanin

Molekülmasse

$$M = 331,35 \text{ amu}$$

$$M = 514,55 \text{ amu}$$

Statische Polarisierbarkeit

$$\alpha_0/4\pi\epsilon_0 = 66 \text{ \AA}^3$$

(Delgado, 2018)

$$\alpha_0/4\pi\epsilon_0 = 99 \text{ \AA}^3$$

(Ramprasad et al., 2006)

Absorption bei 532 nm

vernachlässigbar für $\lambda > 400 \text{ nm}$

$$0,9 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$$

(Taniguchi et al., 2018)

2 Materiewellen

Louis de Broglie hatte schon 1923 die Vision, dass der Welle-Teilchen-Dualismus von Photonen auch auf massebehaftete Teilchen zutrifft (de Broglie, 1923). Die Wellenlänge der Teilchen entspricht dabei dem Verhältnis von Planck'schem Wirkungsquantum h zu Impuls p :

$$\lambda_{dB} = \frac{h}{p} \quad (1.1.1)$$

Typische Welleneigenschaften sind dabei Beugung und Interferenz, die auch im Folgenden diskutiert werden.

2.1 Molekülbeugung am mechanischen Gitter

Ein Lehrbuchbeispiel der Wellenphysik ist die Beugung an einem periodischen mechanischen Gitter (siehe Abbildung 1). Bei einer Gitterperiode d und einer Wellenlänge λ erwartet man die Intensitätsmaxima im Fernfeld unter den Winkeln α_n zu finden:

$$\sin \alpha_n = \frac{n\lambda}{d}, n \in \mathbb{Z} \quad (2.1.1)$$

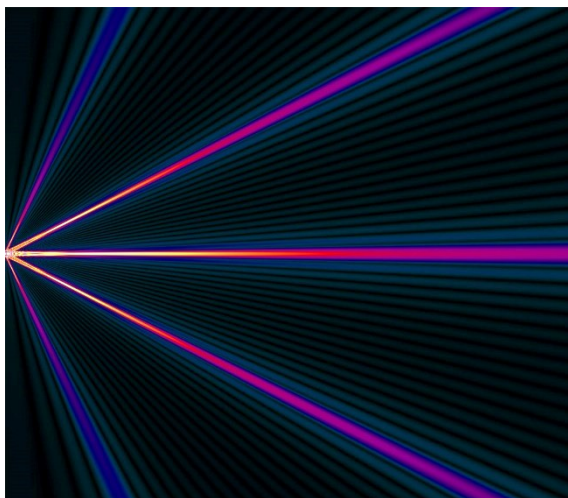


Abbildung 1 (schematisch): Gitterbeugung im Fernfeld
Abgebildet ist die Simulation des Beugungsmuster eines mechanischen Gitters im Fernfeld. Deutlich zu sehen sind fünf voneinander getrennte Interferenzmaxima.

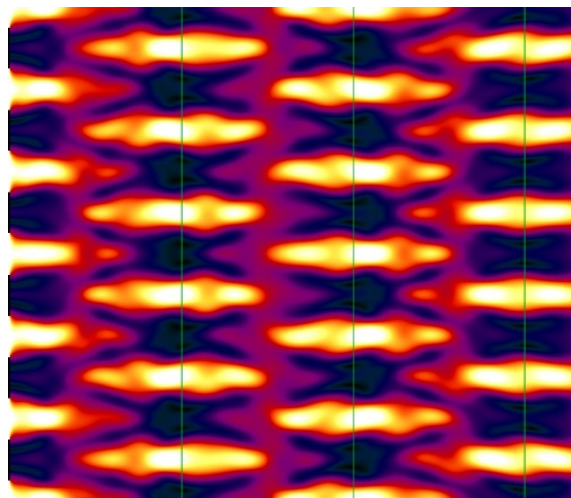


Abbildung 2 (schematisch): Gitterbeugung im Nahfeld
Das simulierte Beugungsbild hinter dem Gitter am linken Bildrand weist Selbstabbildungen des Gitters in Vielfachen der Talbot-Länge (grüne Markierungen) auf.

Während man die Beugung von Laserlicht an Strukturen mit einer Periode von 0,1 mm ohne Hilfsmittel problemlos optisch auflösen kann, sind die Herausforderungen der Molekülbeugung deutlich größer. Die Wellenlänge für thermische Molekularstrahlen mit Massen um 500 bis 1000 amu und Geschwindigkeiten von 100 bis 200 m/s ist gemäß Gleichung 1.1.1 etwa 100 000 Mal kleiner als die von Licht. Beschränkt man sich bei den

beugenden Gitterstrukturen auf Perioden größer als 100 nm^1 , liegen die Beugungswinkel im Bereich von $10 \mu\text{rad}$. Diese Auflösungsanforderung gilt es bei der Detektion des Interferenzmusters zu berücksichtigen. 1999 wurde mittels Photoionisation durch einen fokussierten Laserstrahl das erste Mal Beugung eines komplexen Moleküls, in diesem Fall C_{60} , erzielt (Arndt et al., 1999).

Befindet man sich hinter dem materiellen Gitter nicht im Fernfeld, sondern unmittelbar hinter dem Gitter, sieht das Beugungsbild wesentlich anders aus (siehe Abbildung 2). Bei Beleuchtung mit monochromatischen ebenen Wellen dominiert die Selbstabbildung des Gitters (Talbot, 1836) in Abständen der sogenannten Talbot-Länge L_{Talbot} :

$$L_{\text{Talbot}} = \frac{d^2}{\lambda} \quad (2.1.2)$$

Wären Gitter und Laserstrahl unendlich groß, würde sich dieser Effekt unendlich oft wiederholen. Ist dagegen nur eine endliche Anzahl n an Gitterspalten ausgeleuchtet, erfolgt in der Entfernung $L_{\text{Nah-Fern}}$ der Übergang von diesen Selbstabbildungen des Nahfeldes hin zum Fernfeldbeugungsmuster, deren Interferenzmaxima durch Gleichung 2.1.1 gegeben sind (siehe Abbildung 3).

$$L_{\text{Nah-Fern}} = \frac{(nd)^2}{\lambda} \quad (2.1.3)$$

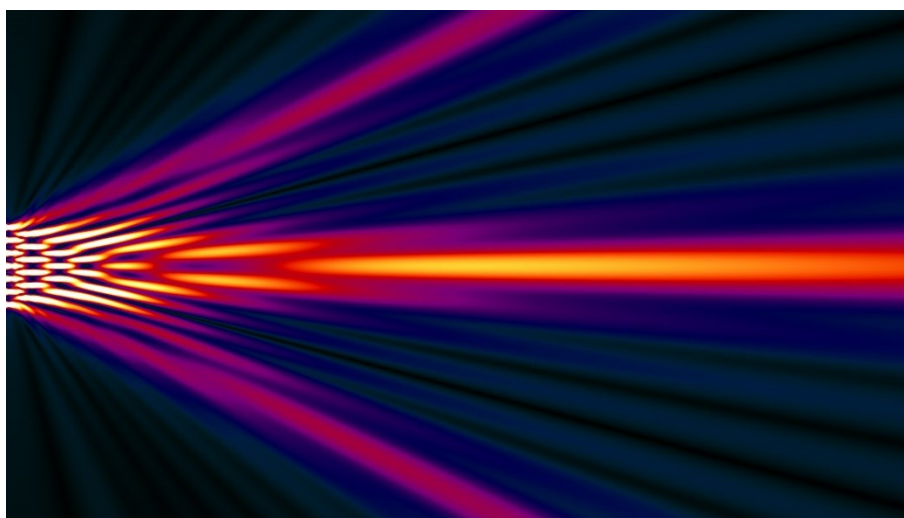


Abbildung 3 (schematisch): Übergang vom Nah- zum Fernfeld

Abgebildet ist wieder das simulierte Beugungsbild hinter einem Gitter. Zu sehen ist im linken Teil des Bildes das Nahfeld mit den Selbstabbildungen des Gitters. Im rechten Bildteil formt sich das Fernfeld-Beugungsmuster. Die Breite des Bildes entspricht dabei etwa $L_{\text{Nah-Fern}}$.

¹ Bei kleineren Perioden ist die Produktion eines regelmäßigen Gitters wesentlich schwieriger. Zusätzlich nimmt die unerwünschte Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen den Gitterstäben und den Molekülen, die die Spalte passieren, überproportional stark zu.

2.2 Beugung am Lichtgitter

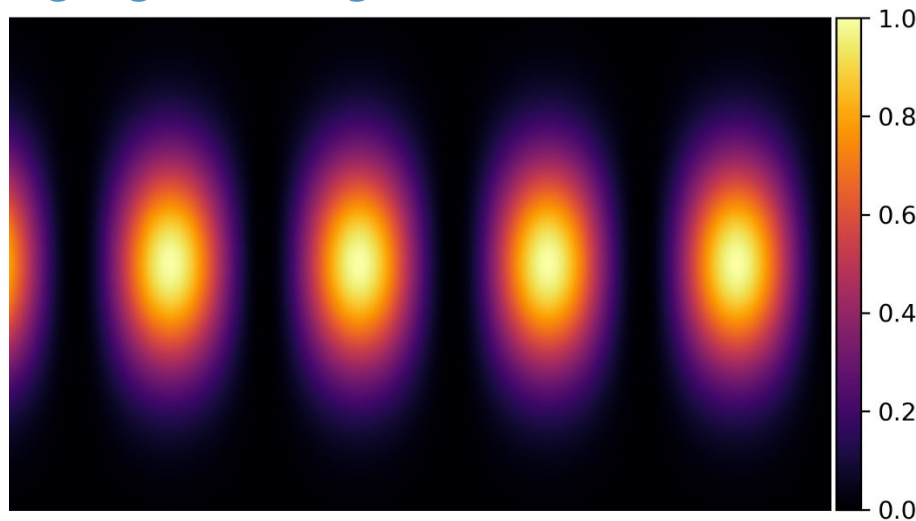


Abbildung 4 (schematisch): Intensitätsverteilung einer stehenden Lichtwelle
 Gezeichnet ist die relative Intensitätsverteilung einer stehenden Lichtwelle gemäß Gleichung 2.2.1. Bei der horizontalen Achse handelt es sich dabei um die x -Achse, bei der vertikalen um die y -Achse, während der Schnitt $z = 0$ gewählt wurde.

Die Verwendung materieller Gitter zur Beugung von Molekülen führt in der Praxis häufig zu Problemen: Die im Gitter deponierten Ladungen können insbesondere bei polaren Molekülen² zu einem Verlust des Beugungsbildes führen, da die elektrostatische Wechselwirkung von der Orientierung der Moleküle beim Durchflug abhängig ist (Knobloch et al., 2017). Zusätzlich reduziert Adsorption der Materiewellen an den Gitterstäben den molekularen Fluss, was gerade bei geringen Strahlintensitäten zu vermeiden ist. Alternativ zu den materiellen Gittern kann man stehende Lichtwellen als periodische Beugungsstruktur mit annähernd 100 % Transmissivität und sehr hoher Periodizität nutzen. Um eine stehende Lichtwelle zu erzeugen, bedarf es der Reflexion einer einfallenden Lichtwelle in sich selbst. Die Periode der dabei entstehenden Struktur ist halb so groß wie die der ursprünglichen Welle. Im Falle eines gaußförmigen Strahls kann die Intensität der entlang der x -Achse stehenden Welle durch Gleichung 2.2.1 beschrieben werden, wobei diese Intensitätsverteilung in Abbildung 4 zu sehen ist. P steht dabei für die Leistung des einfallenden Laserstrahls, k_L für dessen Wellenzahl und w_y und w_z für die Strahltaile in y - und z -Richtung.

$$I(x, y, z) = \frac{8P}{\pi w_y w_z} \exp\left(-2 \frac{y^2}{w_y^2}\right) \exp\left(-2 \frac{z^2}{w_z^2}\right) \cos^2(2k_L x) \quad (2.2.1)$$

Der Kapitza-Dirac-Effekt, die Beugung an solch einem Lichtgitter, wurde zuerst für Elektronen beschrieben (Kapitza et al., 1933) und experimentell bereits an Atomen (Gould et al., 1986), Elektronen (Bucksbaum et al., 1988) und Molekülen (Nairz et al., 2001) beobachtet.

² Die meisten biologisch relevanten Moleküle, wie auch in unserem Fall Ciprofloxacin, sind polar. Das Problem von polaren Molekülen im Gegensatz zu apolaren ist, dass ihre Wechselwirkung mit den Ladungen im Gitter je nach Orientierung des Moleküls anziehend oder abstoßend ist. Mittelt man über alle Orientierungen, wird das Interferenzmuster verwaschen.

Im Falle eines Moleküls mit der Polarisierbarkeit α wird im elektrischen Feld $\vec{E}$ der stehenden Lichtwelle dabei ein Dipolmoment $\vec{p}$ induziert:

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad (2.2.2)$$

Dieses Dipolmoment besitzt im elektrischen Feld wiederum ein Potenzial V , welches durch die in Gleichung 2.2.4 gegebene Intensität I der Lichtwelle ausgedrückt wird:

$$V = -\vec{E} \cdot \vec{p} = -\alpha |\vec{E}|^2 = -\frac{2\alpha}{c\epsilon_0} I \quad (2.2.3)$$

$$I = \frac{1}{2} c \epsilon_0 E^2 \quad (2.2.4)$$

Das Potenzial verursacht beim Durchqueren einen Phasenschub $\Delta\phi$:

$$\Delta\phi = \frac{1}{\hbar} \int V dt = -\frac{2\alpha}{c\epsilon_0 \hbar} \int I dt \quad (2.2.5)$$

Da die Intensität des Lichtgitters räumlich periodisch variiert, ändert sich auch der Phasenschub periodisch, je nachdem, an welcher Stelle das Molekül das Lichtgitter passiert. Dies führt zu einem Beugungsmuster.

Zusätzlich zum Phasenschub bewirkt das Lichtgitter bei Molekülen auch weitere Effekte: Bei passender Wellenlänge können Photonen des Lichtgitters absorbiert werden. Wenn diese später spontan emittiert werden, kann es aufgrund der dabei stattfindenden Lokalisierung der Teilchen zu Dekohärenz kommen (Hackermüller et al., 2004). Für Moleküle und Cluster sind aufgrund der komplexen internen Zustände außerdem Fragmentation (Dörre et al., 2014), Ionisation (Haslinger et al., 2013) und Erwärmung (Cotter et al., 2015) möglich.

2.3 Beugung am dicken Gitter

Fast³ alle bisherigen Molekülbeugungsexperimente verwendeten „dünne“ Gitter und fanden somit im Raman-Nath-Regime statt, in dem die Ausbreitung der Welle parallel zum Gittervektor vernachlässigt werden kann. Dieser Abschnitt widmet sich dem Fall eines „dicken“ Gitters, dessen Ausdehnung in Ausbreitungsrichtung der Moleküle mit der Talbot-Länge vergleichbar ist.

Beobachtet wurde die dabei stattfindende Bragg-Beugung erstmals durch Bestrahlung von Kristallen mit Röntgenstrahlung. Durch konstruktive Interferenz der Röntgenwellen treten unter wohlbestimmten Winkeln θ_n Reflexe auf. Die Winkel werden dabei durch die Bragg-Bedingung (Bragg et al., 1913) beschrieben:

$$n\lambda = 2d \sin \theta_n \quad (2.3.1)$$

Im Vergleich zur Beugung am dünnen Gitter weist Bragg-Beugung zwei wichtige Unterschiede auf: Während die Beugung an einem dünnen Gitter immer zu einem symmetrischen Beugungsbild führt, wirkt Bragg-Beugung wie ein Spiegel. Der Grund dafür liegt in der durch Gleichung 2.3.1 gegebenen Bedingung zusammen mit der

³ Das bislang einzige Experiment mit „dickem“ Gitter war die Beugung von Na₂-Molekülen.

Energieerhaltung⁴. Der zweite Unterschied liegt darin, dass bei Bragg-Beugung im Optimalfall bloß in eine einzelne Ordnung gebeugt wird, während sich der Strahl im Falle des dünnen Gitters auf viele Beugungsordnungen aufteilt.

Durch Wahl eines geeigneten Strahldurchmessers kann auch mit Licht ein dickes Gitter realisiert werden. Dies wurde für Atome (Martin et al., 1988), Bose-Einstein-Kondensate (Kozuma et al., 1999), Elektronen (Freimund et al., 2002) und Na₂-Moleküle (Abo-Shaeer et al., 2005) bereits gezeigt, bislang jedoch nicht für komplexe Moleküle. Zusammen mit der höheren Intensität aufgrund der geringeren Anzahl an populierte Ordnungen ist dies eine Motivation, um die Bragg-Beugung von Molekülen zu realisieren. Die höhere Intensität und bessere Trennung der Beugungsordnungen erleichtern dabei die Detektion des Beugungsmusters mit Bakterien. Außerdem würde im Fall eines geschlossen Interferometers der Fluss im Vergleich zur Verwendung dünner Gitter deutlich gesteigert werden. Relevant ist für diesen Fall auch, dass die eingeschlossene Fläche und somit die Empfindlichkeit gegenüber Trägheitskräften (Bordé, 1989) umso größer wird, je höhere Beugungsordnungen besetzt sind.

2.4 Kohärenz

In den vorangegangenen Abschnitten wurde stets davon ausgegangen, dass alle Teile der Welle zueinander in einer festen Phasenbeziehung stehen, also kohärent zueinander sind. Dies ist jedoch gerade für ausgedehnte thermische Quellen molekularer Materiewellen nicht der Fall. Eine Folge daraus ist, dass in einer bestimmten Entfernung L nach Zusammenführung nur Teile des Materiestrahls Interferenz zeigen können, die um weniger als die transversale Kohärenz X_C voneinander getrennt sind. Der Zusammenhang zu der Quellgröße s ist dabei:

$$X_C = \frac{2\lambda_{dB}L}{s} \quad (2.4.1)$$

Bei der Gitterbeugung muss die transversale Kohärenz der Moleküle mindestens zwei Gitterspalte umfassen, um ein Interferenzmuster zu bilden. Zudem müssen Ausdehnung und Divergenz des Molekülstrahls beschränkt sein. Da dessen inkohärenten Anteile voneinander unabhängige Interferenzmuster erzeugen und deren Intensitäten sich inkohärent aufsummieren, würde das Interferenzmuster ansonsten verwischt werden.

Zusätzlich zur transversalen gibt es auch longitudinale Kohärenz. Da in der Praxis verwendete Wellen eine Unschärfe in der Wellenlänge $\Delta\lambda_{dB}$ aufweisen, können sie nur interferieren, wenn sie gegeneinander um nicht mehr als die longitudinale Kohärenz L_C verschoben sind.

$$L_C = \frac{\Delta\lambda_{dB}^2}{\lambda_{dB}} \quad (2.4.2)$$

⁴ Anschaulich betrachtet wird ein dünnes Lichtgitter durch einen fokussierten Laserstrahl erzeugt, wodurch die Photonen eine gewisse Unschärfe in der Flugrichtung aufweisen. Deren Impulsunschärfe ist daher größer als die Impulskomponente des gebeugten Teilchens in Beugungsrichtung. Dadurch dominiert die Symmetrie des Lichtgitters das Beugungsbild.

Im Falle der Bragg-Beugung bewegen sich die Photonen hingegen nahezu parallel, wodurch die Asymmetrie des einfallenden Strahls das Beugungsbild dominiert.

3 Bragg-Beugung von Ciprofloxacin

Nach der Einführung in die zugrunde liegenden Konzepte widmet sich dieses Kapitel der praktischen Realisierung der Beugung von Molekülen. Im hierbei verwendeten Versuchsaufbau werden Moleküle durch einen fokussierten Laser von einer Glasplatte verdampft, passieren nach Kollimation durch einen Spalt ein Beugungsgitter und werden schlussendlich auf einem Glasplättchen aufgefangen. Das dabei entstehende Beugungsmuster wird anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Um Kollisionen mit den Molekülen der Umgebungsluft zu vermeiden, welche das Beugungsmuster zerstören würden, wird das ganze Experiment in Hochvakuum bei etwa 10^{-7} mbar durchgeführt.

Die Quelle erzeugt einen thermischen Molekularstrahl, bei dem die Geschwindigkeiten der Moleküle näherungsweise gemäß einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung verteilt sind. Da unterschiedliche Geschwindigkeiten gemäß Gleichung 1.1.1 zu unterschiedlichen Wellenlängen führen, werden sie unterschiedlich weit gebeugt. Ohne Geschwindigkeitsselektion würde dies dazu führen, dass die verschiedenen Beugungsbilder der Moleküle überlappen und sich in Summe wegmitteln. Um dies zu verhindern, kann als geschwindigkeitsabhängiger Filter die Schwerkraft genutzt werden: Schnelle Teilchen fallen über eine gegebene horizontale Distanz weniger weit als langsame, es entsteht eine vertikale Auftrennung der verschiedenen Wellenlängen.

3.1 Aufbau

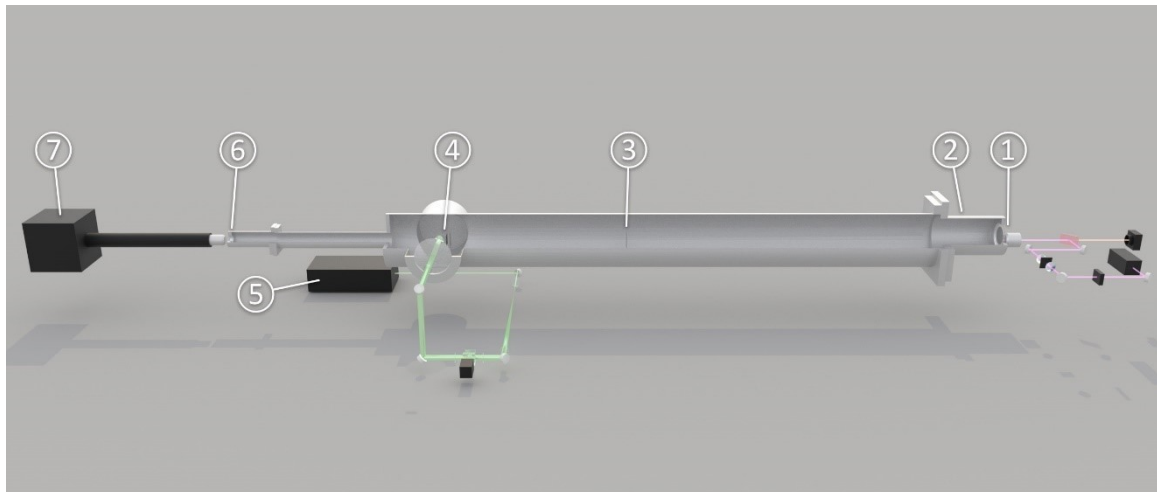


Abbildung 5: Versuchsaufbau für die Bragg-Beugung im Überblick

- (1): Mittels eines fokussierten Laserstrahls werden die Moleküle von einem Vakuumfenster verdampft.
- (2): Das Vakuumfenster kann mittels Faltenbalg verfahren werden, um für Nachschub an Molekülen zu sorgen.
- (3): Auf zwei Drittel des Weges von der Quelle zum Gitter befindet sich der zur Justage benötigte erste vertikale Spalt.
- (4): Der zweite vertikale Spalt sowie der horizontale Spalt befinden sich jeweils rund 1 cm getrennt zum Gitterspiegel.
- (5): Ein 30 W bei 532 nm starker Laser sorgt für das Lichtgitter.
- (6): Die Moleküle werden am Ende der Vakuumkammer auf einem Glasplättchen aufgefangen und mittels eines weiteren Lasers (nicht im Bild) zur Fluoreszenz angeregt.
- (7): Das Fluoreszenzlicht des Beugungsbildes wird mittels Kamera und Objektiv gesammelt.

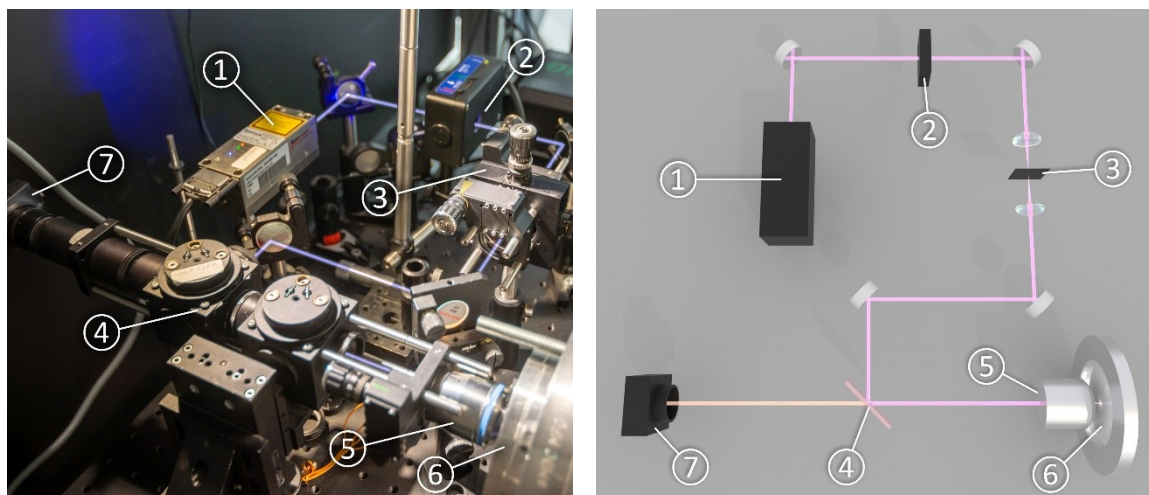


Abbildung 6: Quelle des verwendeten Molekularstrahls

Ein Diodenlaser (1) erzeugt den Laserstrahl, welcher einen Shutter (2) passiert, durch den der Laserstrahl und dadurch die Molekülquelle ein- und ausgeschaltet werden kann. Danach tritt der Strahl durch eine Modenreinigung (3) und wird über einen dichroitischen Spiegel (4) in ein Objektiv (5) gelenkt, welches den Strahl auf das innen beschichtete Vakuumbeschichtungsfenster (6) fokussiert. Die dabei entstehende Fluoreszenz wird mittels einer Kamera (7) beobachtet. Objektiv (5), Spiegel (4) und Kamera (7) befinden sich auf einer gemeinsamen Aufhängung, welche, Fokus inklusive, mittels Verschiebetisch parallel zum Vakuumbeschichtungsfenster verschoben werden kann.

(l): Foto, (r): schematisch

Als Quellmechanismus wird ein Laserstrahl auf eine dünne Schicht aus Ciprofloxacin bzw. Phthalocyanin (siehe Abbildung 6) fokussiert. Durch Lichtabsorption werden die im Fokus des Laserlichts befindlichen Moleküle erwärmt und verdampft. Da dieser Vorgang zur Vermeidung von Stößen mit Gasmolekülen im Vakuum erfolgt, werden die Moleküle auf die Innenseite eines Vakuumbeschichtungsfensters aufgetragen. Dies erfolgt, je nach erforderlicher Schichtdicke⁵, entweder per Auftropfen der in einem schnell verdampfenden Lösungsmittel gelösten Moleküle oder durch Bedampfung in einer Vakuumkammer. Um den Ursprungsort des Molekularstrahls möglichst genau zu definieren, wird der Laserstrahl mittels Objektivs auf $1,5\ \mu\text{m}$ (FWHM) fokussiert. Dazu durchläuft er davor einen modenreinigenden Raumfilter, bestehend aus zwei Sammellinsen mit einem gemeinsamen Brennpunkt, in dem eine $50\ \mu\text{m}$ kleine Lochblende montiert ist. Auf diese Weise werden alle Moden jenseits der Gauß'schen Grundmode herausgefiltert. Die Distanz des Fokus zum Vakuumbeschichtungsfenster kann dabei anhand der Position des Objektivs feinjustiert werden. Zusätzlich kann der Fokus per Verschiebetisch (siehe Abbildung 6) in den zwei zum Laserstrahl transversalen Achsen verfahren werden. Mit der Kamera wird durch einen dichroitischen Spiegel die durch den fokussierten Laser angeregte Fluoreszenz beobachtet. Dies hilft beim Fokussieren und dient der Kontrolle des Fokus, wie in Abbildung 7 zu sehen ist. Um die Quelle über einen längeren Zeitraum hinweg betreiben zu können, ist Nachschub an Molekülen nötig. Würde man den Laserstrahl über die beschichtete Platte bewegen, so würde auch

⁵ Eine dicke Schicht, wie sie etwa durch das Auftropfen entsteht, sorgt für einen größeren Fluss an Molekülen, erhöht aber auch die effektive Quellgröße, was wiederum zu einer geringeren Kohärenz führt.

das Beugungsmuster am Detektor wandern und dadurch in Summe verwischt werden. Stattdessen wird die Position des Laserstrahls fix gehalten und die Aufhängung des an einem Faltenbalg montierten Vakuumfensters schrittmotorgesteuert⁶ verfahren. Die dabei vom Laser in die Quellschicht eingeschriebenen Verdampfungsspuren sind in Abbildung 7 zu sehen. Auf diese Weise kann mittels eines beschichteten Vakuumfensters der Molekularstrahl für drei Tage aufrechterhalten werden.

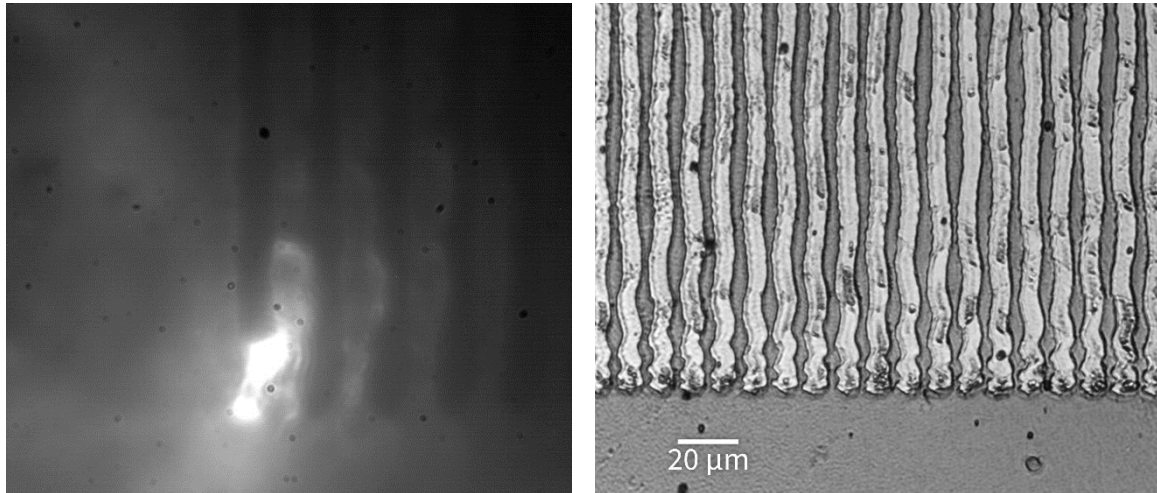


Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen des beschichteten Vakuumfensters

(l): Fluoreszenz der Beschichtung mit Phthalocyanin durch den fokussierten Laserstrahl; In der Mitte ist weiß der fokussierte Laserstrahl zu sehen, bei den schwarzen Streifen handelt es sich um dessen abgedampfte Spur
(r): Vertikale Spuren des fokussierten Laserstrahls in der Beschichtung mit Phthalocyanin im Durchlichtmikroskop

Da die verdampften Moleküle das Vakuumfenster in den gesamten Halbraum verlassen, benötigt es zur Erzeugung eines fein kollimierten Molekularstrahls zusätzlich noch einen Kolimationsspalt. Zur Vereinfachung der Justage werden zwei vertikal stehende Spalte (zu sehen im Überblick in Abbildung 5) verwendet, welche piezogesteuert geöffnet und geschlossen werden können. Der zweite Spalt wird genutzt, um den Strahl reproduzierbar relativ zur Vakuumkammer auszurichten.

In vertikaler Richtung findet am Gitter keine bedeutende Beugung statt. Zur gravitativen Geschwindigkeitsaufspaltung im Molekularstrahl wird allerdings trotzdem eine Kollimation benötigt. Für diesen Zweck befindet sich unmittelbar vor dem Beugungsgitter ein höhenverstellbarer horizontaler Spalt von 25 µm. Er sorgt dafür, dass die Moleküle vertikal in Abhängigkeit ihrer Geschwindigkeit und somit ihrer Wellenlänge aufgespaltet werden, wie in Abbildung 8 dargestellt ist.

⁶ Für diesen Zweck werden zwei Schrittmotoren von *Schneider Electric* mit einer Auflösung von 0,036° und einer Genauigkeit von 0,1° verwendet, welche den Faltenbalg mittels Schneckenwelle verfahren. Die Genauigkeit der Mechanik zur Positionierung des Faltenbalgs ist, wie in Abbildung 7 zu sehen ist, auf wenige Mikrometer begrenzt.

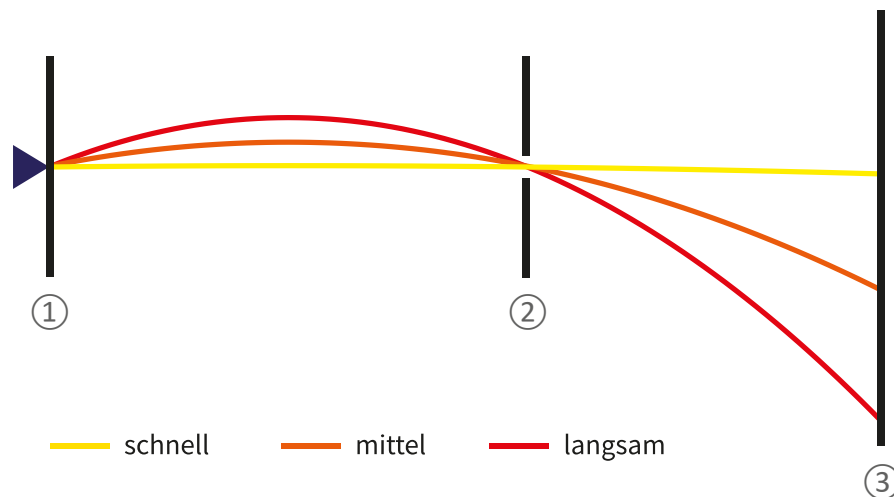


Abbildung 8: Funktionsprinzip der Geschwindigkeitsaufspaltung

Der Laserstrahl (links, violett) verdampft die im Fokus befindlichen Moleküle. Diese verlassen die punktförmige Quelle (1) mit verschiedenen Geschwindigkeiten in den gesamten Halbraum. Aufgrund der Schwerkraft werden ihre Flugbahnen durch Parabeln beschrieben. Der horizontale Spalt (2) sorgt dafür, dass am Schirm (3) eine eindeutige Beziehung zwischen Teilchengeschwindigkeit und vertikaler Position vorliegt. Die verschiedenfarbigen Kurven stehen dabei für unterschiedliche Geschwindigkeiten.

Der Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit v und Aufspaltung y ist dabei durch Gleichung 3.1.1 gegeben, wie in Anhang 7.1 nachzulesen ist, wobei L der Abstand zwischen Quelle und Detektor und L_1 der Abstand zwischen Quelle und horizontalem Spalt ist.

$$y = -\frac{1}{2}g \frac{L(L-L_1)}{v^2} \quad (3.1.1)$$

Zur Beugung wurden in der Vergangenheit bereits viele unterschiedliche Gitter genutzt. Neben Gitter geschrieben in einer SiN_x -Membran (Juffmann et al., 2012) waren dies beispielsweise Gitter aus Graphen (Brand et al., 2015) oder auch aus einem natürlichen Algenskelett (Sclafani et al., 2013). Die Gitterperioden lagen dabei typischerweise zwischen 100 nm und 200 nm, die Membrandicke reichte von einlagigen Atomschichten bis wenigen 100 nm im Algenskelett. Das Gitter ist dabei in einem Halter montiert, welcher transversal zum Molekularstrahl verfahren werden kann und zusätzlich per Schrittmotor um die vertikale Achse gedreht werden kann. Um mittels stehender Welle ein Lichtgitter erzeugen zu können, kann an diesen Halter alternativ auch ein Spiegel montiert werden.

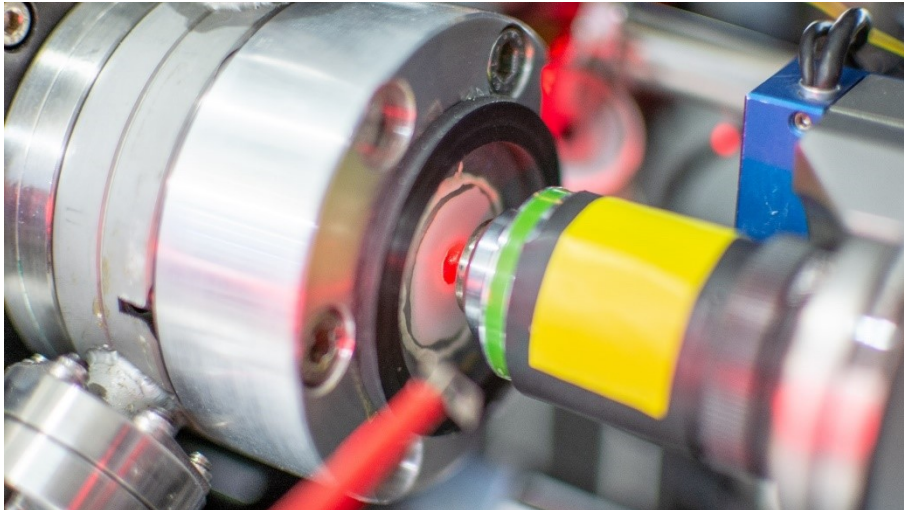


Abbildung 9: Detektion der Moleküle durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Moleküle werden nach der Gitterbeugung am Ende der Vakuumkammer auf einem eingeklebten Quarzplättchen (mittig im Bild) aufgefangen. Vakuumseitig werden sie durch ein dahinterliegendes Fenster mit einem Laserstrahl angeregt. Das Fluoreszenzlicht der angeregten Moleküle wird durch das Objektiv in der rechten Bildhälfte eingesammelt, passiert zur Trennung vom Anregungslicht einen Bandpassfilters und wird auf die dahinter liegende EMCCD-Kamera abgebildet. Zur Abschirmung des Umgebungslichtes kann die schwarz-gelbe Abdeckung nach links geschoben werden. Im unteren Teil des Bildes zu erkennen ist rot isoliert die Stromzuleitung samt Klinge für die Plasmareinigung des Fensters. Damit werden die Moleküle nach Belüftung der Vakuumkammer mit Stickstoff auf einen Druck von etwa 5 mbar durch Zünden eines AC-Hochspannungsplasmas (10 kHz bei 1,5 kV) dauerhaft entfernt und abgepumpt.

Unmittelbar hinter dem Beugungsgitter bildet sich ein Interferenzmuster aus. Das Ziel ist, diese Struktur durch eine Ortsbestimmung der Moleküle abzubilden. Während die Fluoreszenzdetektion von Atomen im Flug möglich ist, gibt es in komplexen Molekülen keine geschlossenen Übergänge. Die für eine effiziente Detektion notwendige Intensität würde so viel Stokes-Energie deponieren, dass sich die Moleküle bis zur Zerstörung aufheizen würden. Eine stabile Detektion hoher Auflösung ist aber möglich, wenn die Moleküle auf einem Glasplättchen aufgefangen werden. Dies hat den zusätzlichen Vorteil, dass bei niedrigen Flussraten das Material über Tage hinweg gesammelt werden kann. Das im Experiment verwendete Glasplättchen befindet sich 57,5 cm hinter dem Beugungsgitter, also knapp nach dem Übergang vom Nah- ins Fernfeld der Beugung. Zur Aufnahme des adsorbierten Musters werden die Moleküle durch einen Laser (661 nm im Falle von Phthalocyanin, 445 nm im Falle von Ciprofloxacin) elektronisch angeregt und ihre Fluoreszenz mittels eines Objektivs eingesammelt (siehe Abbildung 9). Ein Bandpassfilter (711/25 nm im Fall von Phthalocyanin, 550/80 nm im Falle vom Ciprofloxacin) filtert Reste des für die Anregung genutzten Laserstrahls heraus. Am Ende des Strahlengangs steht eine *Andor iXon EMCCD*, welche das 20-fach⁷ vergrößerte Fluoreszenzmuster aufzeichnet. Die Empfindlichkeit der Kamera ist dabei unter anderem aufgrund der am speziellen CCD stattfindenden Elektronenvervielfachung

⁷ Die numerische Apertur des Objektivs beträgt $NA = 0,5$.

(englisch electron-multiplying, EM) so hoch⁸, dass einzelne Moleküle beobachtet werden können, in manchen Fällen sogar mit einer Genauigkeit unterhalb des Abbe'schen Auflösungslimits (Juffmann et al., 2012). Um mehrere verschiedene Interferenzmuster aufzeichnen zu können, kann das Ende der Vakuumkammer inklusive dem Glasplättchen per Verschiebetisch und Faltenbalg verschoben werden. Sobald auf dem Plättchen kein freier Platz mehr vorhanden ist, kann es mittels Plasmas gereinigt werden. Hierzu wird der letzte Teil der Vakuumkammer abgetrennt und mit Stickstoff auf wenige Millibar geflutet. Anschließend wird statt des Objektivs eine Elektrode platziert, an die relativ zur Vakuumkammer eine hochfrequente Wechselspannung angelegt wird (Juffmann et al., 2012). Die Elektrode wird nahe an das Glasplättchen gebracht, wodurch sich auf dessen Innenseite ein Plasma entzündet. Durch Verschieben des Glasplättchens relativ zur äußeren Elektrode kann dabei das ganze Fenster gereinigt werden.

3.2 Bragg-Beugung

3.2.1 Erzeugung des Lichtgitters

Für die Bragg-Beugung ist es notwendig, einen entlang der Flugbahn der Moleküle dicken Lichtstrahl zu erzeugen (vergleiche Kapitel 2.3). Im Falle von Ciprofloxacin mit rund 200 m/s und einer Laserwellenlänge (= doppelte Gitterperiode) von 532 nm ergibt sich dabei mit Gleichung 2.1.2 eine Talbot-Länge von etwa $1,2 \text{ cm}$. Um auch bei breiter Strahltaille w_z mit hohen Laserintensitäten arbeiten zu können, wird die vertikale Strahltaille w_y niedrig gewählt. Es gilt dabei jedoch zu beachten, dass sich die Laserstrahlintensität längs des zur Geschwindigkeitsaufspaltung genutzten Spaltes nicht allzu stark ändert. Da ein schmalerer Spalt den Fluss des Molekularstrahls begrenzt, wurde als Kompromiss ein Spalt mit der Größe von $h = 25 \text{ }\mu\text{m}$ und eine vertikale Strahltaille von $w_y = 100 \text{ }\mu\text{m}$ (FWHM) gewählt. Da die Justage des Laserstrahls umso aufwändiger wird je breiter w_z im Verhältnis zu w_y ist, wurde eine horizontale Strahltaille von $w_z = 1,4 \text{ cm}$ (FWHM) gewählt.

Zur Molekülbeugung wurde ein *IPG Photonics*-Laser ($P = 30 \text{ W}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$) verwendet, dessen Strahl durch ein aus zwei Sammellinsen bestehendes sphärisches Teleskop auf $1,4 \text{ cm}$ aufgeweitet wurde. Mittels einer Zylinderlinse wurde er so fokussiert, dass am Ort des Molekularstrahls eine Strahltaille von $w_y = 100 \text{ }\mu\text{m}$ erreicht wurde. Um eine stehende Welle zu bilden, wurde der Strahl mittels eines hochreflektierenden Spiegels im Hochvakuum in sich selbst zurückreflektiert. Damit der rückreflektierte Strahl nicht zurück in den Laser läuft, wurde zwischen Teleskop und Zylinderlinse eine Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen, polarisierendem Strahlteiler und $\lambda/4$ -Plättchen eingebaut, wobei an den freien Seiten des Strahlteilers Strahlfallen platziert wurden (siehe Abbildung 10). Der optische Aufbau ist in Abbildung 11 zu sehen.

⁸ Bei einer Akkumulation über 20 s enden im Fall von Phthalocyanin pro Molekül rund 1800 Photonen auf dem Sensor der Kamera (Cotter et al., 2017). Die Quantenausbeute der verwendeten Kamera beträgt sowohl bei 550 nm als auch bei 711 nm rund 60% (Andor, 2008).

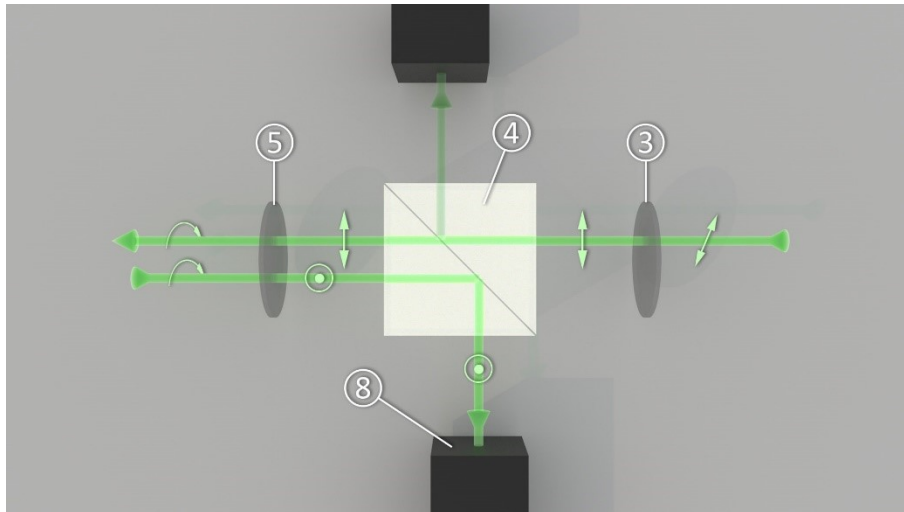


Abbildung 10: Strahlentrennung des rückreflektierten Strahls

Die Polarisation des von rechts einfallenden linear polarisierten Laserstrahls (symbolisch als Pfeil eingetragen) wird mittels $\lambda/2$ -Plättchen (3) so gedreht, dass die gewünschte Intensität durch den polarisierenden Strahlteiler (4) durchtritt. Mittels $\lambda/4$ -Plättchen (5) wird der Strahl anschließend zirkular polarisiert. Der rückreflektierte Strahl, der die gleiche Polarisation aufweist, passiert erneut das $\lambda/4$ -Plättchen und wird somit 90° gegenüber der ursprünglichen Polarisation gedreht. Dadurch wird er im Strahlteiler reflektiert und in eine Strahlfalle (8) geführt.

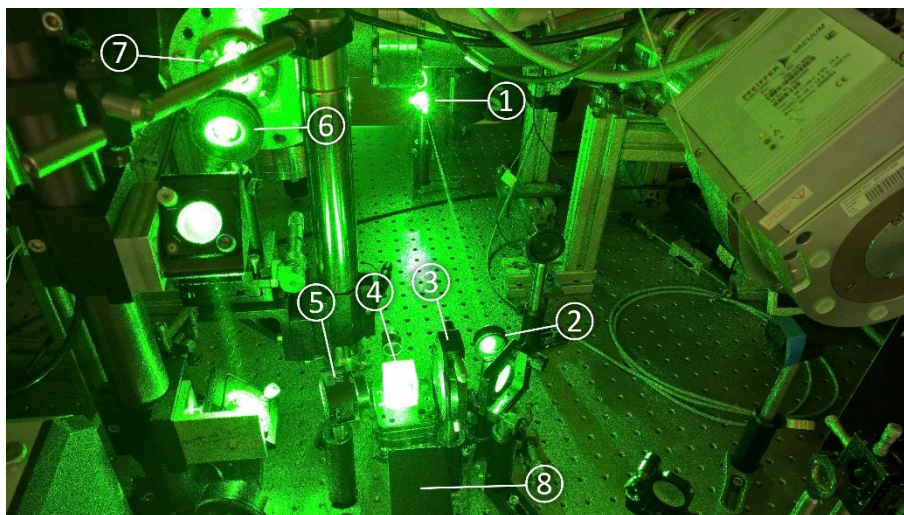


Abbildung 11: Optik für den Gitterlaser

Der Laserstrahl wird mittels eines aus zwei sphärischen Linsen, (1) und (2), bestehenden Teleskopes aufgeweitet. Anschließend passiert er wie in Abbildung 10 beschrieben ein $\lambda/2$ -Plättchen (3), einen polarisierenden Strahlteiler (4) und ein $\lambda/4$ -Plättchen (5). Mittels einer zylindrischen Linse (6) wird der Strahl auf die erforderliche vertikale Strahltaile fokussiert. Der Strahl tritt in die Vakuumkammer ein (7), wird dort am Gitterspiegel zurückreflektiert und läuft bis zum Strahlteiler (4) den gleichen Weg zurück. Dort wird er reflektiert und in einer Strahlfalle (8) aufgefangen.

Zur Erzeugung der stehenden Lichtwelle wurde ein Spiegel von *Laseroptik* mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Reflexivität von 99,8 % bei 532 nm verwendet. Eine Besonderheit der Beugung am dicken Gitter (Bragg-Regime) gegenüber der Beugung am dünnen Gitter (Raman-Nath- bzw. Kapitza-Dirac-Regime) ist aufgrund der Asymmetrie der Beugung die hohe Empfindlichkeit der Beugungseffizienz auf eine Verdrehung des Gitters. Aus diesem Grund muss der Winkel des Spiegels entlang der

Molekularstrahlachse in der Vakuumkammer mit einer Genauigkeit von wenigen Mikroradian kontrolliert werden können. Da sich die zuvor vorhandene Spiegelaufhängung als zu unpräzise und nicht langzeitstabil herausstellte, wurde eine neue Montagemöglichkeit geschaffen. Hierzu wurde der Spiegel in einen Halter geklemmt, welcher an ein *piezosystem jena PSH10/2* Piezo-Kippspiegelsystem montiert war und somit in beide Achsen über einen Bereich von 8 mrad mit einer Genauigkeit von $0,2 \mu\text{rad}$ gekippt werden konnte (piezosystem jena GmbH, 2017). Um den Spiegel zusätzlich orthogonal zum Molekularstrahl verschieben zu können, wurde das Kippspiegelsystem auf einen piezobasierten Linearaktuator⁹ von *SmarAct* montiert. Da in der Vakuumkammer für diese Anordnung keine anderweitige Montagemöglichkeit gegeben war, wurde sie mittels eines eigens angefertigten Halters und vier nach außen drückenden Schrauben in die Vakuumkammer eingekeilt, wobei der Aufbau im Überblick in Abbildung 12 zu sehen ist.

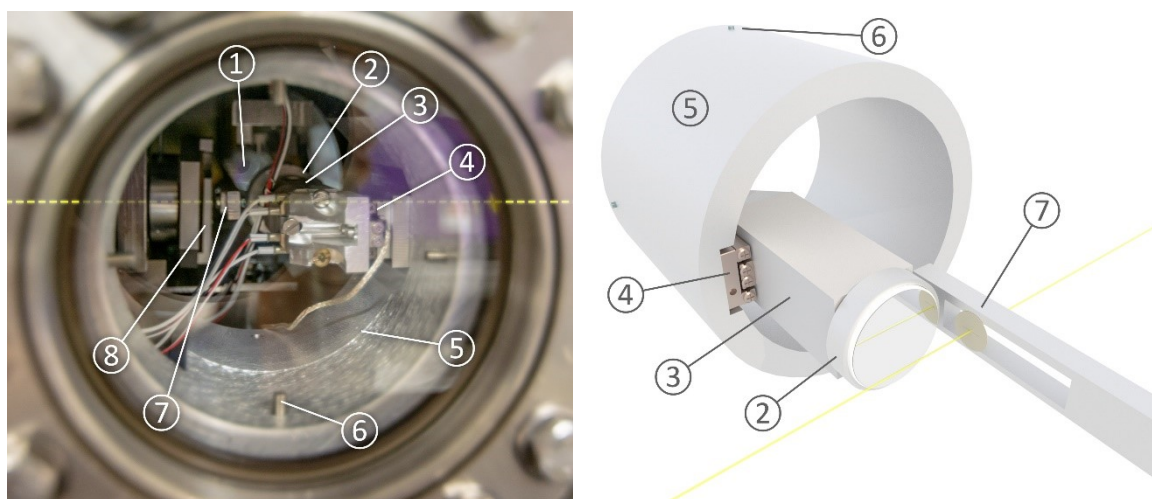


Abbildung 12: Spiegelhalter für das Bragg-Lichtgitter, Foto (l) und schematisch (r)

Der Laserstrahl tritt durch das rückseitige Vakuumfenster (1) und wird am Spiegel, welcher in einem Spiegelhalter (2) eingeklemmt ist, in sich selbst rückreflektiert. Der Spiegelhalter ist auf einem Kippspiegelsystem (3) angebracht, welches auf einem Linearaktuator (4) montiert ist. Dieser wiederum ist auf einem zylinderförmigen Halter (5) angeschraubt, welcher wiederum durch vier Schrauben (6) in der Vakuumkammer eingekeilt ist. Zur Orientierung ist der Molekularstrahl in Gelb eingezeichnet, zusätzlich sind noch die Halter für den Spalt zur Aufspaltung der Geschwindigkeit (7) und den vertikalen Kollimationsspalt (8) sichtbar.

3.2.2 Justage des Aufbaus

Um Molekülbeugung an einer stehenden Lichtwelle zu sehen, müssen sowohl Molekularstrahl als auch die stehende Lichtwelle ausreichend justiert und zueinander ausgerichtet werden.

Zu Beginn wird der Molekularstrahl relativ zu den beiden vertikalen Spalten positioniert. Vergleicht man die durch den Molekularstrahl resultierenden Bilder der beiden bis auf

⁹ Der verwendete Linearaktuator weist einen Verfahrweg von 26 mm bei einer Schrittweite von 1 nm und einer Wiederholbarkeit von 40 nm auf.

5 μm geschlossenen Spalte, kann man die Position dessen Quelle optimieren. Das dazugehörige Justageprinzip ist in Abbildung 13 illustriert.

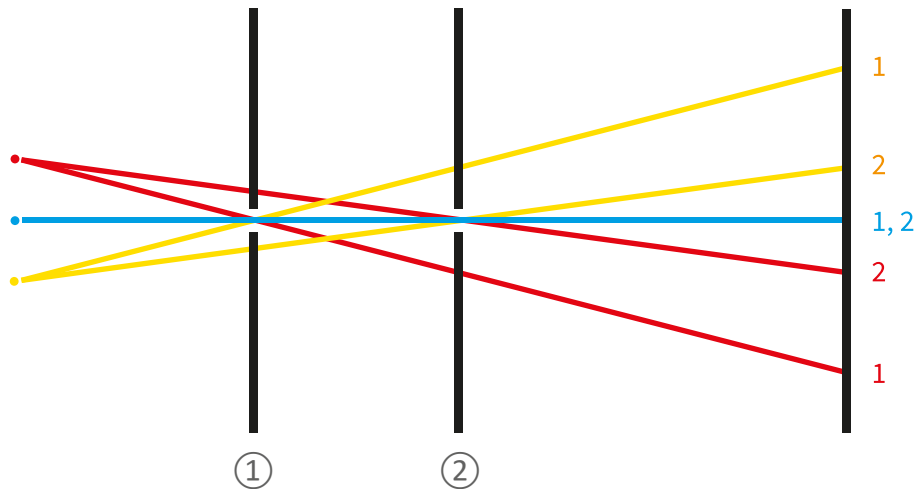


Abbildung 13: Justage des Molekularstrahls (Ansicht von oben)

Die Position der Quelle des Molekularstrahls wird justiert, indem Bilder geschossen werden, bei denen abwechselnd Spalt 1 oder Spalt 2 geschlossen ist. Nur wenn der Molekularstrahl genau in der Mitte liegt (blau), fallen die Bilder (1, 2) der beiden Spalte zusammen. Beginnt der Molekularstrahl hingegen links der Mitte (in Rot gezeichnet), so liegt das Bild des geschlossenen ersten Spaltes (bei geöffnetem zweitem Spalt) rechts des Bildes des geschlossenen zweiten Spaltes.

Nach Justage der Molekülquelle relativ zu den beiden Kollimationsspalten im Hochvakuum gilt das Hauptaugenmerk der Justage des Spiegels für das Bragg-Gitter. Da die für Bragg-Beugung benötigte Verkippung des Spiegels relativ zum Molekularstrahl (einige 10 μrad) um Größenordnungen kleiner als die maximale Auslenkung des Kippspiegelsystems ist ($\pm 4 \text{ mrad}$), genügt es, zur ersten Justage den Spiegel auf rund 1 mrad genau parallel zum Molekularstrahl auszurichten.

Die Lage des Spiegels relativ zum Strahl kann man optimieren, indem man den letzten Spalt soweit öffnet, dass man auf der Kamera noch die gesamte Breite des Molekularstrahls sieht. Anschließend verfährt man mittels des Linearaktuators den Spiegel soweit, dass er einen Teil des Strahls abschneidet. Danach optimiert man die horizontale Verkippung des Spiegels so, dass vom Molekularstrahl so wenig wie möglich abgeschnitten wird, wobei das Funktionsprinzip in Abbildung 14 illustriert ist.

Falls die optimale Position außerhalb der Reichweite des Kippspiegelsystems liegt, muss die Vakuumkammer belüftet werden und der zylindrische Halter mittels der vier in Abbildung 12 zu sehenden Schrauben verkippt werden. Um die Ausrichtung des Spiegels präzise zu verfolgen, werden die Linsen aus dem Strahlengang des Gitterlasers entnommen und die Rückreflexion des Spiegels auf eine Wand projiziert. Anschließend wird die Vakuumkammer wieder heruntergepumpt und die Spiegelausrichtung mittels Molekularstrahl optimiert. Diese beiden Schritte werden so lange wiederholt, bis die

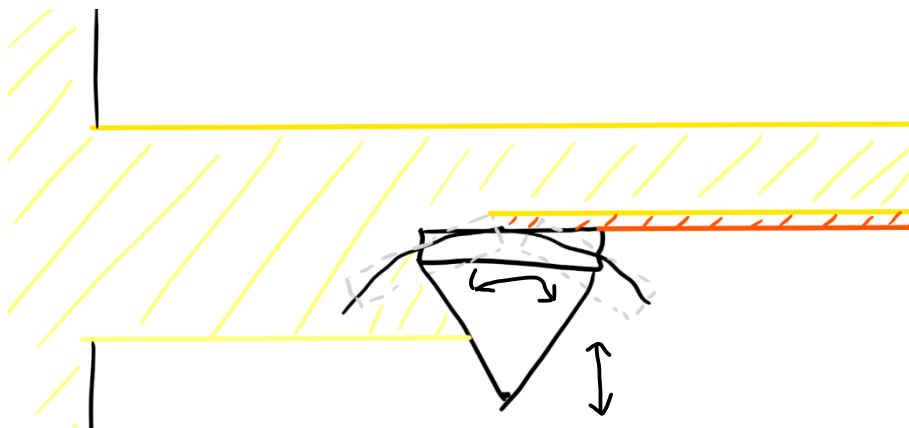


Abbildung 14: Optimierung der Spiegelausrichtung relativ zum Molekularstrahl

Der von links kommende Molekularstrahl wird mittels Spalt kollimiert. Der daraus resultierende Strahl wird durch den Spiegel samt Aufhängung weiter abgeschnitten. Eingezeichnet ist zusätzlich der Kreis, entlang dessen sich die Spiegelmitte bei Rotation um den eingezeichneten Rotationspunkt bewegt, mitsamt zwei weiteren möglichen Spiegelpositionen in Grau. Zu sehen ist dabei, dass die Breite des verbliebenen Molekularstrahls am größten ist, wenn sich der Spiegel parallel zum Strahl befindet. Diese Position ist in Schwarz eingezeichnet.

optimale Position des Spiegels erreicht wurde und das Kippspiegelsystem in beide Richtungen ausreichend Spielraum für Korrekturen im Vakuum hat.

Für die Justage der vertikalen Achse wird zunächst der zur Geschwindigkeitsaufspaltung genutzte Spalt aus dem Strahl gefahren. Der Spiegel wird so positioniert, dass er wieder einen Teil des Molekularstrahls abschneidet. Dadurch ergibt sich am Detektor ein wenige Millimeter hoher Streifen, der auf einer Seite den „Schatten“ eines Teils des Spiegels enthält. Wenn man am Detektor nun die Streifenbreite oben und unten vergleicht, hat man ein direktes Maß für die vertikale Verkippung des Spiegels. Um die Differenz auf null zu bringen, kann es wieder notwendig sein, den Spiegelhalter manuell zu verkippen. Auch in diesem Fall stellt eine Beobachtung des Rückreflexes des Spiegels sicher, dass die Justierung in horizontaler Richtung dabei nicht mehr verändert wird.

Da über dieses Schema die horizontale Achse unabhängig von der vertikalen justiert wird, nicht jedoch umgekehrt, wird mit der Justierung der horizontalen Achse begonnen. Da die Präzision in horizontaler Richtung wichtiger ist als in vertikaler Richtung, wird nach Justierung der vertikalen Achse die Justierung der horizontalen Achse wiederholt.

Nach der Justage von Molekularstrahl und Spiegel¹⁰ bedarf es noch der Justage des Laserstrahls, um den Überlapp zwischen Lichtgitter und Molekularstrahl zu maximieren. Als erstes wird die Ausrichtung des Laserstrahls so optimiert, dass er ohne der Zylinderlinse am bereits ausgerichteten Spiegel genau in sich selbst zurückreflektiert wird. Dies lässt sich knapp vor dem Strahlteiler überprüfen. Zusätzlich wird der Spiegel soweit in den Molekularstrahl gefahren, dass er ihn in der Mitte abschneidet. Im nächsten Schritt wird die Zylinderlinse wieder eingesetzt und ihre Rotation um die optische Achse auf möglichst vertikale Fokussierung optimiert. Wenn der Brennpunkt der Linse genau auf dem Spiegel liegt, ist der rückreflektierte Strahl nach zweitem

¹⁰Der Spiegel ist in vertikaler Richtung wesentlich größer als Molekular- und Laserstrahl.

Durchlaufen der Linse aufgrund der Symmetrie wieder annähernd parallel. Wird die Linse aber etwa 1 cm zurückgeschoben, konvergiert der Rückreflex in einem Abstand von rund 5 m. In dieser Distanz sieht man den langgezogenen Fokus des Strahls, dessen Ausrichtung in direktem Zusammenhang mit der Ausrichtung der Linse steht¹¹. Stellt man hinter den Ausgang des polarisierenden Strahlteilers noch eine sphärische Linse, kann man den projizierten Strich zusätzlich vergrößern. Nach Abschluss der Winkeljustage wird die Linse wieder so verschoben, dass der auf die Wand projizierte Strahl möglichst rund wird.

Um die Höhe des Laserfokus an den Molekularstrahl anzupassen wird der Spiegel etwas aus dem Strahl gefahren und ein horizontaler Schlitz eingefahren, der sowohl zum Molekularstrahl als auch zum Laserstrahl um 45° verdreht ist. Seine Höhe wird dabei so gewählt, dass die Transmission des Molekularstrahls mit eingesetztem Spalt zur Geschwindigkeitsaufspaltung maximal wird. Anschließend wird die Höhe der Zylinderlinse und die Ausrichtung des Laserstrahls so optimiert, dass der Rückreflex des Gitterlasers auch wieder den Schlitz passiert. Abschließend wird der Schlitz wieder aus dem Strahlengang gefahren und der Spiegel so positioniert, dass er rund 0,1 mm außerhalb der Mitte des Molekularstrahls endet¹².

Der letzte Schritt gilt der Feinjustage der vertikalen Position des zur Geschwindigkeitsaufspaltung genutzten horizontalen Spaltes: Für diesen Zweck wird dieser vorerst aus dem Strahl gefahren und der vertikale Kollimationsspalt bis auf 5 μm geschlossen. Nimmt man anschließend bei eingeschaltetem Laserstrahl ein Bild des Molekularstrahls auf, sollte entlang des dabei entstehenden mehrere Millimeter hohen Streifens eine beugungsbedingte Verbreiterung des Streifens sichtbar sein. Der horizontale Spalt wird soweit in den Molekularstrahl gefahren, dass dessen Transmission genau auf die Höhe der vorher beobachteten Verbreiterung fällt.

3.2.3 Resultate der Beugung

Nach der Justage des Aufbaus wurde der Fluoreszenzfarbstoff Phthalocyanin verwendet, um Bragg-Beugung mit Molekülen zu demonstrieren. Die Wahl fiel dabei auf Phthalocyanin, da es aufgrund seiner hohen Fluoreszenzquantenausbeute und einfacher Verdampfbarkeit in gegebener Zeit zum besten Signal-Rausch-Verhältnis führt. In Abbildung 16 ist ein Beugungsbild in voller Größe zu sehen. Auffallend ist, dass sich ein Großteil der Intensität in zwei Bereiche aufteilt: einen Streifen aus Molekülen, die kaum abgelenkt wurden, und rechts darunter beginnend einen Streifen aus stärker gebeugten Molekülen. Dieses Interferogramm unterscheidet sich dabei aufgrund seiner Asymmetrie essentiell von demjenigen dünner Gitter, welche immer zu symmetrischen Beugungsmustern führen.

Nach dieser ersten Demonstration wurde auch die Abhängigkeit des Interferogramms vom Winkel des Gitterspiegels untersucht, was in Abbildung 15 zu sehen ist. Hierfür

¹¹ Der Zusammenhang hängt von den dazwischen gelegenen Spiegeln ab, im hier verwendeten Setup sorgt der linke untere 45°-Spiegel aus Abbildung 11 dafür, dass der ursprünglich horizontale Strahl vertikal an der Wand endet, wodurch die Zylinderlinse beispielsweise an einem Lot ausgerichtet werden kann.

¹² Zum Vergleich: Der Molekularstrahl ist auf 5 μm bis 10 μm kollimiert.

wurde der Winkel über einen Bereich von 60 μm verändert, wobei alle 10 μm ein neues Beugungsmuster aufgenommen wurde. Deutlich zu sehen ist, wie sich der gebeugte Streifen durch Ändern des Winkels zuerst von einer Seite an die Mitte annähert und später auf der anderen Seite auftaucht.

Ein Problem bei der Verwendung von Phthalocyanin ist, dass zusätzlich zu der Beugung am Lichtgitter noch Absorption einzelner Photonen stattfindet. Dies äußert sich in Abbildung 16 etwa durch lokale Maxima zwischen den beiden intensiven Streifen. Zudem führt die Absorption zu einer Verbreiterung der Beugungsmaxima um den Faktor 3. Um diese Effekte zu vermeiden, wurden auch Beugungsbilder mit Ciprofloxacin aufgenommen, welches bei einer Wellenlänge von 532 nm deutlich weniger als Phthalocyanin absorbiert. Eines davon ist in Abbildung 17 zu sehen. Aufgrund der bedeutend schwächeren Fluoreszenz ist dabei das Signal-Rausch-Verhältnis trotz einer längeren Akkumulationszeit wesentlich schlechter¹³. Analysiert man wie in Abbildung 18 die horizontale Intensitätsverteilung des Beugungsbildes, zeigt sich, dass für schnelle Moleküle kaum Wechselwirkung mit dem Gitter stattfindet. Bei langsameren Molekülgeschwindigkeiten gewinnt der stärker gebeugte Streifen sowohl absolut als auch relativ zum hauptsächlich transmittierten Streifen an Intensität. Für noch niedrigere Geschwindigkeiten wiederum gewinnt im Verhältnis gesehen der transmittierte Streifen zu Lasten des stärker gebeugten an Intensität. Dieses Verhalten, welches auch in Abbildung 19 dargestellt ist, hat Ähnlichkeiten mit dem Phänomen der Pendellösung, welches mit Neutronen (Kunze et al., 1996) und Atomen (Dürr et al., 1996) bereits beobachtet wurde. Während die Pendellösung für gewöhnlich als Intensitätsverlagerung zwischen zwei Beugungsordnungen auftritt, sind im Falle von Abbildung 17 aber ganze Gruppen von Beugungsordnungen involviert.

Zusätzlich zum Experiment wurde das Beugungsbild auch simuliert (Brand et al., in Vorb.), wobei die Grundlagen dazu in Anhang 7.2 zu finden ist. Im Rahmen der Simulation wurde die Position des Beugungsbildes sowie der Winkel zwischen Molekularstrahl und Gitter gefittet. Für die horizontale Verdrehung des Gitters ergab sich dabei ein Wert von 18 μrad . Das daraus resultierende Bild der Simulation stimmt mit den Features der experimentellen Aufnahme überein.

Zusätzlich wäre es auch von Interesse die Winkelabhängigkeit der Beugung für Ciprofloxacin aufzunehmen. Dafür müsste der Aufbau allerdings über einen Zeitraum von mindestens einer Woche auf etwa 5 μrad stabil sein, was nicht der Fall war. Stattdessen bewegte sich die Quelle relativ zu den in der Vakuumkammer befindlichen Spalten auf der Zeitskala von Stunden bis Tagen. Da dies nur bei in Betrieb befindlichem Gitterlaser beobachtet wurde, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen thermischen Effekt, der aufgrund des 30 W starken Laserstrahls zustande kommt.

¹³ Dies ist kein Ausschlusskriterium, sondern bloß ein weiterer Grund für eine Detektion des Antibiotikums mittels Bakterien, da dieser Detektionsmechanismus von der Fluoreszenz unabhängig funktioniert.

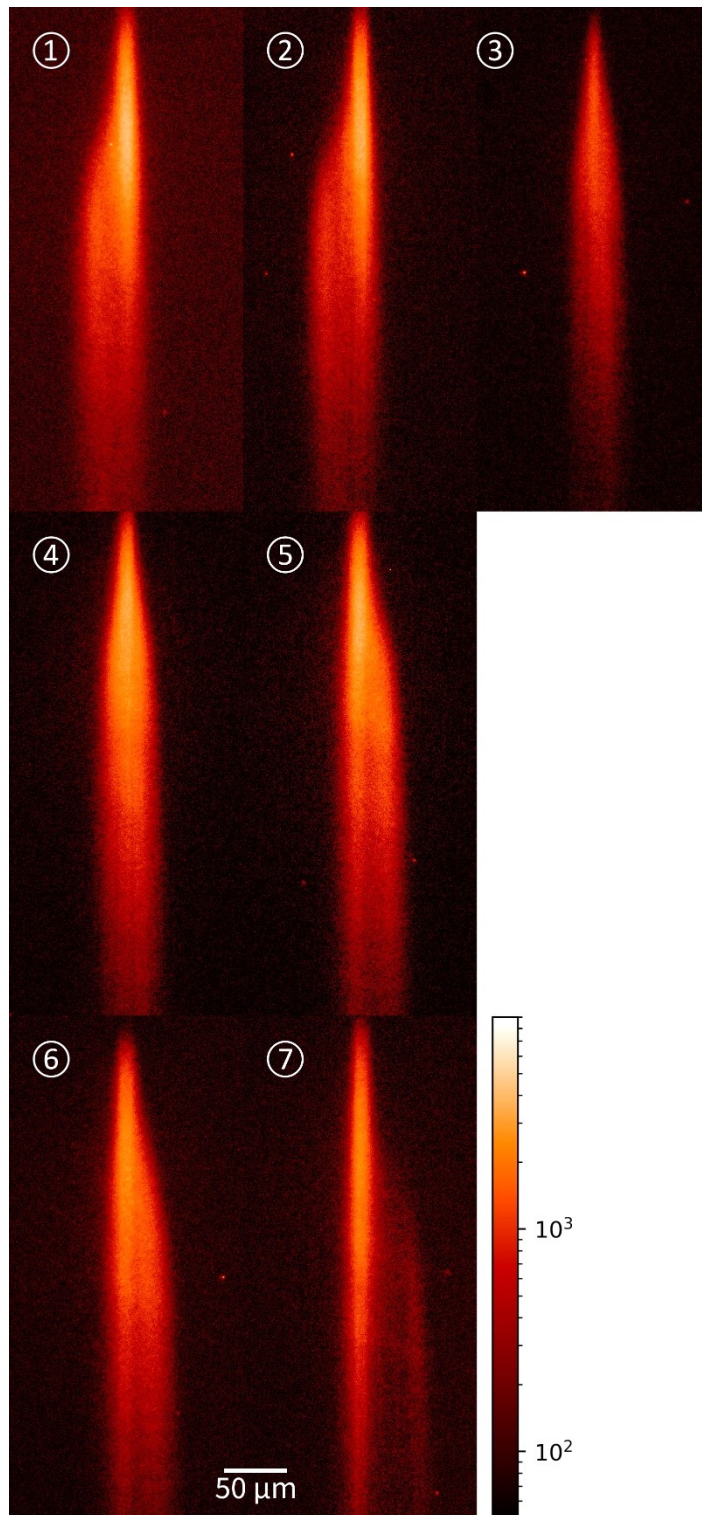


Abbildung 15: Winkelabhängigkeit der Beugung
Zwischen den einzelnen Aufnahmen (von links oben nach rechts unten) wurde der Spiegel relativ zum Molekularstrahl um jeweils $10 \mu\text{rad}$ gedreht, wobei er sich zwischen der 2. und 3. Aufnahme parallel zum Strahl befunden hat. Pro Aufnahme wurde Phthalocyanin über 2 h akkumuliert. Die Aufnahmen wurden mit einer Belichtungszeit von 20 s bei einem EM Gain von 150 getätigt. Zu sehen ist, wie der stärker gebeugte Streifen zuerst links auftritt und mit Drehung des Spiegels zunehmend nach rechts wandert.

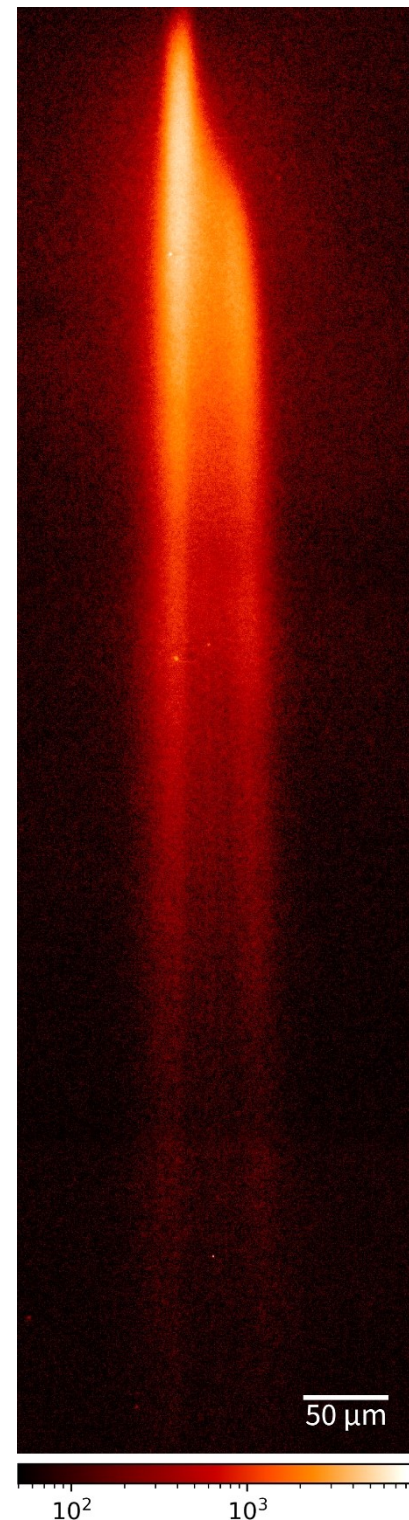


Abbildung 16: Bragg-Beugung von Phthalocyanin
Zu sehen ist links ein Streifen aus Beugungsordnungen um den transmittierten Strahl und rechts ein stärker gebeugter Streifen. Dazwischen befinden sich einige durch Absorption bedingte lokale Intensitätsmaxima. Für die Aufnahme wurde das Interferogramm über einen Zeitraum von 23 h akkumuliert. Die aufgetragenen Werte entsprechen den Sensorwerten bei einer Belichtungszeit von 20 s und einem EM Gain von 130. Diese Abbildung wurde in drei Teilen aufgenommen und nachträglich zusammengesetzt.

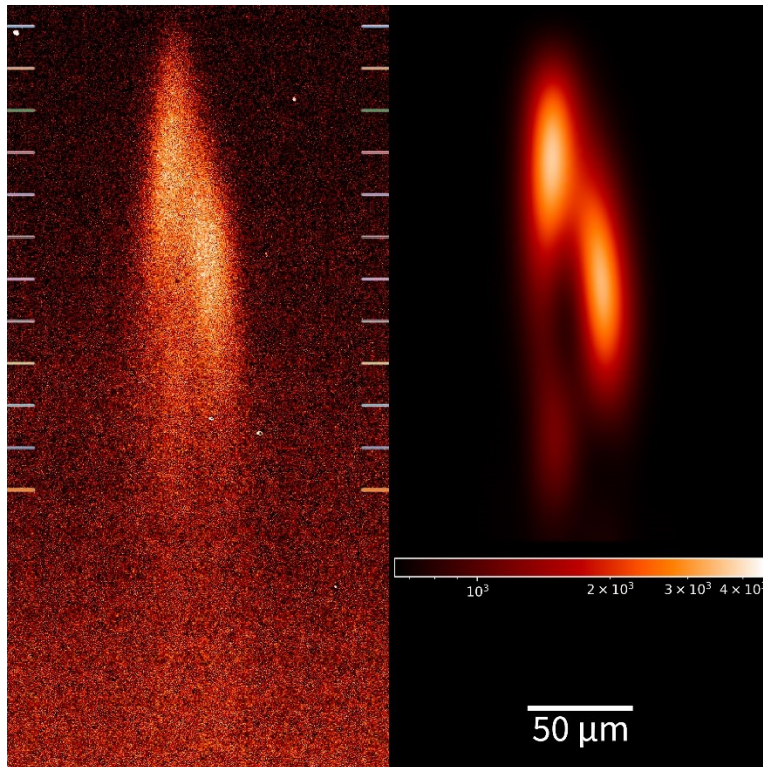


Abbildung 17: Bragg-Beugung von Ciprofloxacin

Zu sehen ist einerseits die experimentelle Aufnahme (l) und andererseits die gefittete Simulation (r) (Brand et al., in Vorb.), wobei die Simulation sämtliche Features des experimentellen Beugungsbildes aufweist.

Für die Aufnahme wurde Ciprofloxacin über einen Zeitraum von 26,5 h akkumuliert, die Kamera wurde danach 20 s lang belichtet bei einem EM Gain von 150.

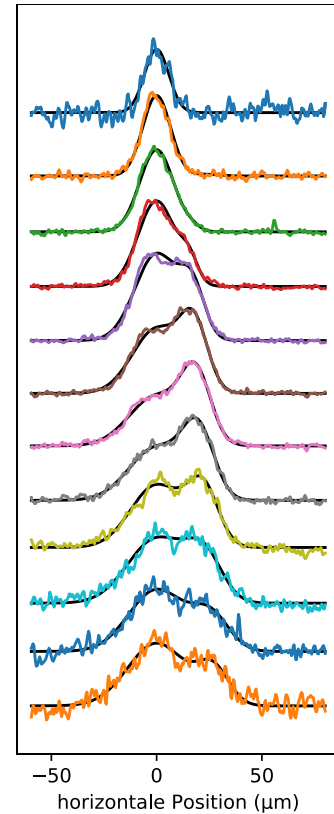


Abbildung 18: Querschnitte der Bragg-Beugung

Dargestellt sind die relativen Intensitäten der zwölf in Abbildung 17 farbig markierten horizontalen Schnitte, wobei vertikal jeweils über einen Bereich von 20 μm gemittelt wurde. Zur einfacheren Darstellung wurden die resultierenden Kurven außerdem mit einem Gaußfilter der Länge 0,4 μm geglättet und durch die Summe aus zwei Normalverteilungen (schwarz) angenähert.

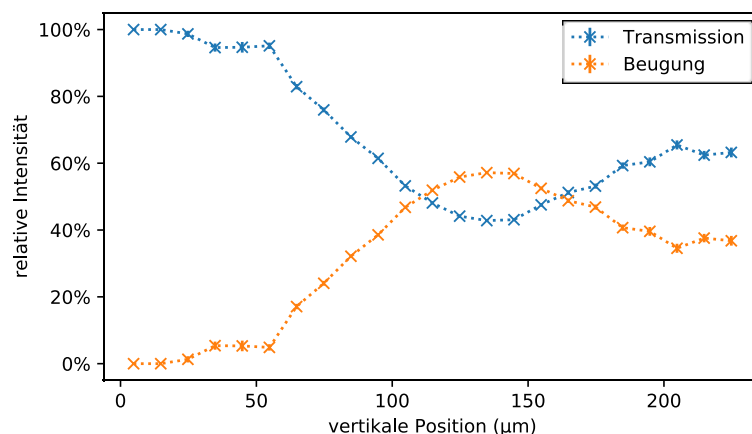


Abbildung 19: Änderung der Intensität von transmittiertem und gebeugtem Strahl

Ähnlich zu Abbildung 18 wurde der obere Teil von Abbildung 17 in 23 jeweils 10 μm hohe Bereiche unterteilt, welche vertikal aufsummiert und mittels der Summe zweier Normalverteilungen gefittet wurden. In dieser Abbildung dargestellt ist das Verhältnis der Maxima dieser Verteilungen, also der maximalen Intensität vom mehrere Beugungsordnungen umfassenden „transmittiertem“ und dem ebenfalls mehrere Beugungsordnungen umfassenden „gebeugtem“ Streifen. Wesentlich deutlicher zu sehen als in Abbildung 17 ist dabei, wie die relative Intensität des einen Streifens zugunsten des anderen ab- und wieder zunimmt.

4 Detektor aus Bakterien

Nachdem im vorigen Kapitel erstmals die Realisierbarkeit der Bragg-Beugung von Ciprofloxacin demonstriert wurde, widmet sich dieses Kapitel der Detektion mittels Bakterien. Hierfür ist als erstes ein kurzer Exkurs in die Biologie nützlich, um einerseits den Detektionsmechanismus und andererseits die mit dem Vakuum verbundenen Herausforderungen zu verstehen.

4.1 Biologische Grundlagen

Sieht man von den Pflanzen ab, so dominieren Bakterien gewichtsmäßig mit Abstand die irdische Biosphäre (Bar-On et al., 2018). Ein Grund für diesen Erfolg ist, dass sie verglichen mit anderen Lebewesen eine sehr hohe Wachstumsrate aufweisen. Bei bestimmten Bakterien der Gattung *Escherichia coli* findet eine Zellteilung bei optimalen Bedingungen alle 20 Minuten statt. Durch diesen schnellen Reproduktionszyklus bzw. der kurzen Generationszeit sind sie in der Lage, sich rasch an ändernde Umweltbedingungen zu adaptieren. Die Anpassung erfolgt einerseits durch Mutationen bei der Zellteilung und andererseits durch die Einstellung des Stoffwechselhaushaltes an die lokale Umgebung.

4.1.1 Wachstumsphasen von Bakterien

Bringt man Bakterien in eine neue Nährstoffumgebung, erzeugen sie als erstes auf die Umgebung abgestimmte Abbauenzyme¹⁴ und anschließend für das Wachstum benötigte Proteine (Madar et al., 2013). Während dieser Zeit findet kein Wachstum statt, weshalb diese Phase auch als *Anpassungs-* oder *Lag-Phase* bezeichnet wird. Sie geht schließlich in die *exponentielle Wachstumsphase* über, in der sich im Falle von *E. coli* die Bakterienzellen im Schnitt alle 20 Minuten teilen, was deren Gesamtzahl verdoppelt. Der Grund für die Lag-Phase ist, dass es in Summe zu einem schnelleren Wachstum führt, wenn zuerst alle notwendigen Proteine und Enzyme erzeugt werden. Dies bringt gegenüber allfälligen Konkurrenten, die unmittelbar mit der exponentiellen Phase starten, einen Vorteil in der Sicherung der verfügbaren Ressourcen (Schultz et al., 2013). Da sowohl Nährstoffe als auch Platz nicht unbeschränkt verfügbar sind, ist es bloß eine Frage der Zeit, bis die Wachstumsphase eingestellt werden muss. In der darauffolgenden *stationären Phase* versuchen die Bakterien bestmöglich auf die Verknappung der Nährstoffe und die steigende Konzentration an teils toxischen Abfallprodukten zu reagieren (Llorens et al., 2010). Bei einer anhaltenden Ressourcenknappheit beginnt die Anzahl der absterbenden Bakterien die Überhand zu gewinnen, was zur *Absterbephase* führt. Einige Bakterien lösen dabei zum Wohle der Kolonie den eigenen programmierten Zelltod aus (Pletnev et al., 2015). Durch den Tod der Bakterien werden gespeicherte Nährstoffe freigesetzt, was wiederum die Bildung neuer Bakterien erlaubt. Es stellt sich dabei die *langfristig stationäre Phase* ein, die geprägt ist von einem dynamischen Gleichgewicht aus absterbenden und neu gebildeten Bakterien (Finkel, 2006). Ein Überblick über die verschiedenen Wachstumsphasen ist in Abbildung 20 zu sehen.

¹⁴ Diese unterschiedlichen Enzyme dienen der Verwertung spezifischer Kohlenstoffquellen.

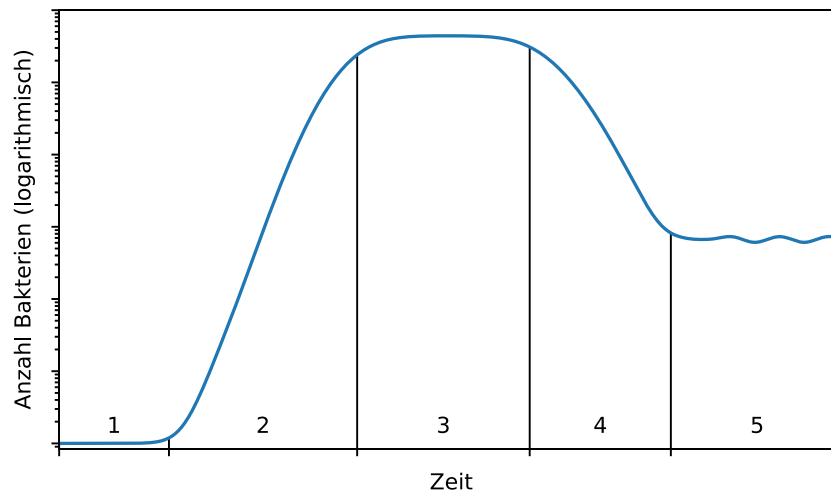


Abbildung 20 (schematisch): Wachstumskurve von Bakterien

(1): Anpassungsphase; Bakterien produzieren für das Wachstum benötigte Enzyme und Proteine.

(2): Exponentielle Phase; Wachstum durch Zellteilung findet statt.

(3): Stationäre Phase; Aufgrund der Ressourcenknappheit findet kein Wachstum, sondern eine Anpassung an den daraus resultierenden Stress statt.

(4): Absterbephase; Bakterien sterben mangels Ressourcen einerseits zufällig und andererseits durch programmierten Zelltod ab.

(5): Langfristig stationäre Phase; Es herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen absterbenden und neu gebildeten Bakterien.

Abbildung nach (Finkel, 2006) und (Llorens et al., 2010)

4.1.2 Antibiotika

Um bakterielle Infektionskrankheiten zu bekämpfen, ist heutzutage der Einsatz von Antibiotika üblich. Deren Funktionsprinzip unterscheidet sich im Allgemeinen, gemeinsam ist aber allen Antibiotika, dass sie auf den unterschiedlichen Aufbau bakterieller und menschlicher Zellen abzielen. Dadurch ist es möglich, das Wachstum der Bakterien zu unterbinden oder sie abzutöten, während die Zellen des menschlichen Körpers nicht angegriffen werden.

Eine Gruppe von Antibiotika sind die Chinolone, welche die Wirkung der DNA-Gyrase hemmen. Bei DNA-Gyrase handelt es sich um ein in Bakterien vorkommendes Enzym, welches für die vor der Zellteilung notwendige DNA-Replikation essenziell ist. Die DNA liegt in Bakterien nicht als lineare Doppelhelix vor, sondern ringförmig. Um die Kompaktheit der DNA zu erhöhen, ist der ringförmige Doppelstrang in sich verdrillt¹⁵ und verknotet. Die DNA-Gyrase induziert temporäre Doppelstrangbrüche so, dass die ringförmigen DNA-Moleküle entknotet und entwirrt werden. Dies ist für die Transkription und Replikation der DNA notwendig (Watson et al., 2011). Gyrasehemmer wie Ciprofloxacin (das Molekül ist in Kapitel 1.1 zu sehen) sorgen dafür, dass die Gyrase an der DNA stecken bleibt (Hiasa et al., 1996). Dies kann bei Kollision mit dem für die Transkription zuständigen Komplex dazu führen, dass in der DNA ein dauerhafter Doppelstrangbruch entsteht (Drlica et al., 2009). Treten diese Brüche schneller auf, als sie durch zellinterne Mechanismen repariert werden können, kommt es letzten Endes,

zum programmierten Zelltod. Dieser Mechanismus kann, von der Exposition mit Ciprofloxacin bis zum Zelltod, mehrere Stunden dauern (Mason et al., 1995).

Ein Maß für die Wirksamkeit eines Antibiotikums ist zum einen die minimal notwendige Konzentration, um bakterielles Wachstum zu hemmen (minimal inhibitory concentration, MIC), und zum anderen die minimale für ein Absterben der Bakterien notwendige Konzentration (minimal bactericidal concentration, MBC).

4.1.3 *Escherichia coli*

Bei *Escherichia coli* (*E. coli*) handelt es sich um natürlich vorkommende, stäbchenförmige Bakterien mit einer Größe von wenigen Mikrometern (siehe Abbildung 21). Die kurze Generationszeit in Kombination mit den geringen Anforderungen und der Ungefährlichkeit einiger Stämme für Menschen haben dafür gesorgt, dass *E. coli* als Modellorganismus dient und eines der besterforschten Bakterien ist (Blount, 2015). Diese drei Punkte¹⁶ zusammen mit einer niedrigen MIC zwischen 0,004 µg/ml und 0,016 µg/ml gegenüber dem Antibiotikum Ciprofloxacin (CLSI, 2017) sind der Grund, weshalb für die folgenden Versuche *E. coli*, konkret der Stamm *ATCC 25922*, genutzt wurde.

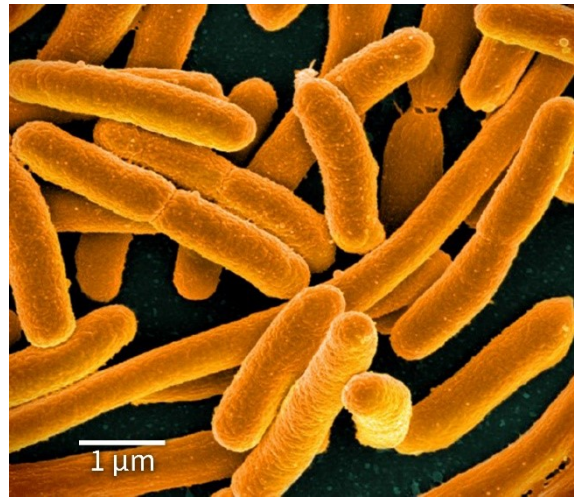


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* (koloriert)
Quelle: National Institute of Allergy and Infectious Diseases

4.1.4 Auswirkungen der Austrocknung

Um die Bakterien unmittelbar mit dem Interferenzmuster aus Ciprofloxacin bedampfen zu können, ist es unvermeidlich, sie der lebensfeindlichen Umgebung des Vakuums auszusetzen. Die schädigende Wirkung des Vakuums auf Bakterien stammt hauptsächlich von der dabei stattfindenden Austrocknung (Bücker et al., 1969). Diese sorgt für eine strukturelle Änderung sowohl der Lipidmembranen der Zellen als auch der Kohlenhydrate, Proteine und Nukleinsäuren. Bei der DNA spielt Wasser eine stabilisierende Rolle, wodurch bei Austrocknung die Formung kovalenter Bindungen mit anderen Komponenten der Zelle bis hin zu Doppelstrangbrüchen möglich ist (Dose et al., 1995). Diese Veränderungen können nach Flüssigkeitszufuhr oft durch zellinterne Mechanismen während einer verlängerten Anpassungsphase wieder korrigiert werden.

¹⁶ Die Ungefährlichkeit ergibt sich auch aus der Klassifikation als Biosafety Level 1 (ATCC, 2018). Aus diesem Grund genügt die Einhaltung einfacher Hygienevorschriften, weshalb der Stamm *ATCC 25922* in unserem Quantenphysiklabor verwendet werden durfte.

Die Reparatur wird allerdings umso schwerer, je länger die Bakterien der Austrocknung ausgesetzt waren (Cox, 1993).

Um die auftretenden Schäden so gering wie möglich zu halten, kann man verschiedene Ansätze wählen (Horneck et al., 2010): Eine Möglichkeit ist, den Zellen im Vorhinein wasserbindende Additive zuzusetzen. Eine andere Option ist, Polyalkohole beizugeben, die etwa im Fall der DNA die stabilisierende Wirkung der Wassermoleküle übernehmen können. Es wurde bereits gezeigt, dass eine 5%ige Glukoselösung die Überlebenswahrscheinlichkeit von *E. coli* im Vakuum von weniger als einem Prozent auf über 10 % steigern kann (Bücker et al., 1969). Durch eine Mischung mit 10 % Glukose und 5 % Polyethylenglykol wurden bei 6-stündiger Austrocknung an Luft sogar 44 % erreicht (Record et al., 1962). Angesichts dieser Resultate erscheint die Realisierung eines aus Bakterien bestehenden Detektors möglich und Vakuumtests daran sinnvoll.

4.2 Bakterienzucht

Die Reproduzierbarkeit der Experimente wird auch durch die Reaktion der Bakterien auf äußere Faktoren bestimmt. Ein solcher Faktor ist die Wachstumsphase, in der sich die Bakterienkultur befindet (Niven et al., 2008). Zusätzlich kann im Falle einer Änderung der Phase auch ausschlaggebend sein, in welcher Phase sich die Kultur davor befunden hat (Roostalu et al., 2008).

Aus diesem Grund und um natürlichen Mutationen vorzubeugen, wurden die Bakterienkulturen für die folgenden Versuche wöchentlich frisch aus einer tiefgefrorenen Urprobe hergestellt. Ausgehend von der glyzerinhaltigen Kryokultur wurde dabei mittels eines sterilen Zahnstochers eine Petrischale mit TS¹⁷-Agar beimpft. Diese wurde dann ein bis zwei Tage lang bei 37 °C inkubiert und anschließend im Kühlschrank gelagert (siehe Abbildung 22). Mit den darauf wachsenden Kulturen wurde schließlich eine TSB-Nährlösung in einem 1 ml großen Reaktionsgefäß inokuliert¹⁸ und je nach erwünschter Phase entweder für 4 h oder über Nacht weiterinkubiert. Nach vier Stunden erreicht man unter optimalen Bedingungen und einer Zellteilung pro 20 Minuten mathematisch bereits eine Vervielfachung um das 4000-fache. Unter anderem aufgrund der Dauer der Lag-Phase befinden sich die Bakterien in der Praxis nach dieser Zeit allerdings immer noch in der exponentiellen Phase. Vergleicht man eine solche Probe mit anderen, welche sich bereits in der stationären Phase befinden, ist die unterschiedlich starke Lichtabsorption¹⁹ mit freiem Auge deutlich sichtbar. Nach einer Nacht hingegen ist der Unterschied in der Absorption nur mehr gering, es ist der Übergang zur stationären Phase erreicht²⁰.

¹⁷ Bei der Casein-Soja-Pepton-Bouillon (englisch „Tryptic Soy Broth“) handelt es sich um ein spezielles, in der Mikrobiologie häufig eingesetztes, Nährmedium, welches oft in Kombination mit Agar eingesetzt wird.

¹⁸ inokulieren = mit (in diesem Fall) Bakterien beimpfen

¹⁹ Die Absorption bei 600 nm korreliert positiv mit der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (McFarland, 1907).

²⁰ Geht man von anhaltend optimalen Wachstumsbedingungen aus, würde sich ein Milligramm an Bakterien nach 10 Stunden bereits zu 1000 kg vermehrt haben.

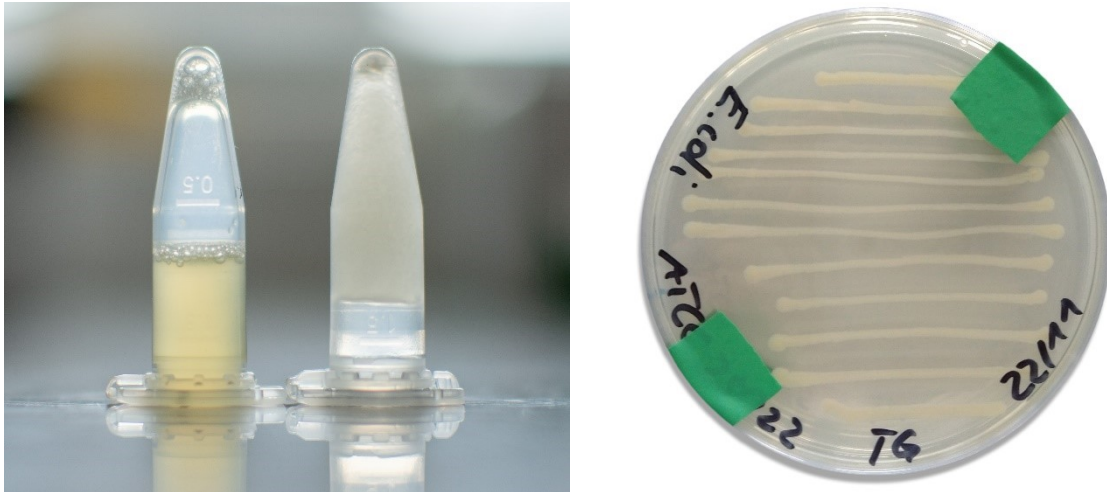


Abbildung 22: Von der Kryo- zur Übernachtskultur

Ausgehend von einer tiefgefrorenen *E. coli*-Kryokultur (l, recht Probe) wird eine Zahnstocherspitze voll an Bakterien entnommen und auf eine TS-Agarplatte aufgetragen. Diese wird für ein bis zwei Tage bei 37 °C inkubiert (r). Bei Bedarf wird mittels Zahnstocher ein kleiner Teil der neuen Kulturen entnommen und damit ein mit TSB-Nährlösung gefülltes Reaktionsgefäß beimpft, welches wieder inkubiert wird (l, linke Probe).

Im Anschluss an die Experimente wurden die Bakterien und sämtliche potenziell mit Bakterien in Kontakt gekommene Flächen mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Verbrauchsmaterialien wie Agarplatten, Deckgläser, kontaminierte Wischtücher, Handschuhe, Zahnstocher und Reagenzgefäße wurden in Müllsäcken gesammelt und abschließend autoklaviert.

4.3 Vakuumexposition auf Glas

Da bereits früher gezeigt wurde, dass *E. coli*-Bakterien eine direkte Vakuumexposition mit einer Wahrscheinlichkeit von einigen Promille überleben (Bücker et al., 1969), wurden Glasplättchen mit der Bakterienlösung beschichtet, um in einer Vakuumkammer ihr Überleben zu testen. Hierzu wurde die Lösung – einmal ohne, einmal mit dem Zusatz von 0,25 % Glucose – auf Objektträger aufgetropft und an Luft getrocknet. Die resultierende Verteilung der Bakterien war inhomogen, da die Form des Flüssigkeitsfilms von der Oberflächenspannung bestimmt wird. Anschließend wurden die Glasplättchen in Petrischalen in eine Vakuumkammer gelegt und der Druck auf etwa 10^{-6} mbar gesenkt, was einige Stunden langes Pumpen benötigte. Nach Entnahme aus der Vakuumkammer wurden die Glasplättchen mit jeweils 1 ml destilliertem Wasser²¹ abgespült und die Lösung zur Detektion auf *Compact Dry ECO*-Platten gesammelt. Bei *Compact Dry ECO* handelt es sich um einen getrockneten Selektivnährboden, welchem unter anderem das farblose Glycosid X-Gluc beigemischt ist. Dieses wird vom in *E. coli* erzeugten Enzym β -Glucuronidase hydrolysiert, wobei eines der dabei entstehenden Produkte an Luft zu einem blauen Farbstoff oxidativ dimerisiert wird (Guivarc'h et al., 1996). Da durch das Spülen der gesamte matte Schimmer der eingetrockneten Bakterienlösung verschwand, ist davon auszugehen, dass dabei der Großteil der auf den

²¹ Um eine nachträgliche Kontamination der Proben mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurde speziell gereinigtes „Wasser für Injektionszwecke“ benutzt.

Glasplättchen befindlichen Bakterien transferiert wurde. Die auf diese Weise befeuchteten Nährböden in den *Compact Dry*-Platten wurden über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen war ein so starkes Wachstum feststellbar (siehe die durch die *Compact Dry*-Platten bedingte Färbung in Abbildung 23), dass die Anzahl der (überlebenden) koloniebildenden Einheiten gar nicht bestimmt werden konnte. Offensichtlich hat eine substantielle Zahl an Bakterien das Vakuum überlebt.



Abbildung 23: Detektion von lebenden *E. coli* nach mehrstündiger Vakuumexposition

Blaugrün gefärbt sind die Bakterien, welche die Vakuumexposition auf Glas überlebt haben und nach Inkubation in *Compact Dry* ECO-Platten über Nacht Kolonien gebildet haben. In der linken Probe befand sich die Bakterienkultur dabei in einer reinen Nährlösung, während der mittleren und der rechten Probe zusätzlich noch Glucose beigemischt war. Die Anzahl der gefärbten Kolonien ist allerdings zu hoch, um die beiden Proben typen vergleichen zu können.

4.4 Herstellung einer Agarschicht

Um das Beugungsbild des Antibiotikums Ciprofloxacin mittels Bakterien zu detektieren, ist eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien auf der Oberfläche unabdingbar. Auf Glas erfolgt aber selbst nach Aktivierung der Oberfläche durch Plasmabehandlung²² eine starke Tropfenbildung der Bakterienlösung, insbesondere beim Austrocknen eines Flüssigkeitsfilms, was zu einer sehr inhomogenen Bakterienverteilung auf dem Substrat führt. Das Auflösungsvermögen eines aus Bakterien bestehenden Detektors gegenüber Ciprofloxacin wäre dabei durch zwei unterschiedliche Effekte limitiert: In sehr dünn besiedelten Regionen wäre die effektive „Pixelgröße“ sehr groß und die Statistik dementsprechend schlecht. Befinden sich hingegen zu viele Bakterien an einem Ort, so würde die lokale Menge an Antibiotikum nicht mehr ausreichen, um alle Zellen am Wachstum zu hindern. Dadurch könnten angrenzende Bakterien das Beugungsbild überwuchern und auswaschen.

Um die Homogenität der Bakterienverteilung zu erhöhen, kann die Glasplatte mit Polylysin beschichtet werden. Dabei handelt es sich um ein Polymer mit Molekülmassen um 100 000 amu, welches polykationisch wirkt (Mazia et al., 1975). Es bindet sowohl an Oberflächen wie Glas und manche Kunststoffe, als auch an die teils mit negativen Oberflächenladungen ausgestatteten Membranen von Mikroorganismen (Yeagle, 2016).

²² Durch die Plasmabehandlung von Glas wird dessen Oberflächenenergie erhöht, was zu einer verbesserten Benetzbarkeit mit Wasser führt.

In der Praxis wird dabei zuerst ein Glasplättchen mit Polylysin benetzt und anschließend mit reichlich Wasser gespült. Durch die starke Adhäsion an die Oberfläche bleibt eine dünne Schicht aus Polylysin zurück (Mazia et al., 1975). Wird das derart beschichtete Glasplättchen in eine Bakterienlösung gelegt, kann ein Film aus immobilisierten Bakterien entstehen. Polylysin wirkt allerdings antimikrobiell (Colville et al., 2010), wobei dieser Effekt kann durch die Verwendung einer Pufferlösung mit niedrigerer Ionenstärke²³ und zusätzlichen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen kompensiert werden (Lonergan et al., 2014).

Eine noch bessere Immobilisierung der Bakterien kann mit Gelatine erreicht werden (Doktycz et al., 2003). Gelatine wurde in frühen Zeiten oft zur Kultivierung von Mikroorganismen verwendet, unter anderem jedoch aufgrund ihrer Verdaubarkeit durch diese nach und nach durch Agar ersetzt (Zimbro et al., 2009). Da viele Eigenschaften von Gelatine und Agar ähnlich sind, kann zur Immobilisierung auch ein Agarfilm verwendet werden. Sowohl die Bakterien als auch das Agarsubstrat müssen das Vakuum überstehen. Ein feuchtes Substrat verlängert dabei einerseits durch sein Austrocknen die Pumpzeit der Vakuumkammer, andererseits treten gerade bei dickeren Schichten durch den ausströmenden Wasserdampf strukturelle Veränderungen und Verformungen auf. Aus beiden Gründen wurde der Agarfilm möglichst dünn und trocken gewählt.

Zur Herstellung eines solchen Films gibt es in der Biologie verschiedene Methoden: Es ist etwa häufig gebräuchlich, Deckglas oder Objektträger in geschmolzenen Agar einzutauchen (Taschdjian, 1954). Alternativ kann man den flüssigen Agar auch auf eine stark geneigte Oberfläche tropfen oder die Oberfläche rotationsbeschichten (Larisch et al., 2011). All die genannten Verfahren wurden von uns getestet. Bei der Rotationsbeschichtung gab es Haftungsprobleme zwischen Agar und Objektträger und dadurch bloß inhomogene Schichten. Mittels Eintauchens oder Auftropfens auf geneigte Glasplättchen war es hingegen möglich, Filme zu erzeugen, die Newton'sche Ringe zeigten. Diese Ringe sind ein Indiz für eine wenige Mikrometer dicke und relativ gleichmäßige Schicht. Es war allerdings nicht möglich, die Schichtdicke entlang einer auf dieser Weise präparierten Probe konstant zu halten. Noch größere Unterschiede traten im Vergleich der einzelnen Proben auf.

Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, wurde Agar zwischen zwei Glasplättchen gefüllt, ein Abstandhalter zwischen diesen sorgte für eine vordefinierte Schichtdicke. Die genaue Vorgehensweise war wie folgt:

1. Als erstes wird der Agar zubereitet: Hierfür werden die Zutaten aus Tabelle 1 in einem 25 ml Becherglas vermischt. Agar und/oder TSB-Pulver lösen sich dabei für gewöhnlich nicht vollständig auf, es bleiben unzählige Körner über.
2. Das 25 ml Becherglas mitsamt Agar-Lösung wird in einem Wasserbad auf 100 °C erhitzt.

- 0,15 g Agar
- 0,20 g Tryptic-Soy-Broth in Pulverform
- 8 ml Wasser

Tabelle 1: Zutaten für das Nährmedium zur Beschichtung von Glasplättchen als Bakterienträger im Vakuum

²³ Die Ionenstärke ist ein Maß für die Konzentration und Ladung der gelösten Ionen.

Die Öffnung des Becherglases wird etwa mittels einer Petrischale verschlossen, um das Eintrocknen der Agarlösung zu verlangsamen.

3. Anschließend wird die Leistung der Heizplatte reduziert, sodass die Temperatur des Wasserbades unter den Siedepunkt fällt. Vor der Verwendung der Lösung ist es wichtig abzuwarten, bis sich alle Körner und Luftbläschen aufgelöst haben, da ansonsten gerade bei dünnen Agarschichten deren Qualität und Homogenität leiden.

Um auf die Glasplättchen eine reproduzierbare Agarschicht auftragen zu können, wurde mit Abstandshaltern gearbeitet. Zum einen wurden 1 mm dicke feuchte „Agar-Pads“, zum anderen vakuumkompatible 150 µm dünne getrocknete Agar-Schichten erzeugt. Die Herstellung dieser Typen unterscheidet sich wie folgt:

A 1 mm dicke „Agar-Pads“

Hierbei werden Objektträger als Abstandhalter verwendet (siehe Abbildung 24), zusätzlich ist die Agarschicht durch die Glasflächen gegen Austrocknung geschützt. Aufgrund der Dicke ist es außerdem möglich, die Agarschicht nachträglich in kleinere „Agar-Pads“ zu teilen und mit glatter Oberfläche vom Glas abzulösen.

1. Um ein zu rasches Abkühlen des flüssigen Agars zu verhindern, wird ein Objektträger im Wasserdampf erwärmt.
2. Dieser wird auf die Arbeitsfläche gelegt, links und rechts daneben kommen parallel dazu zwei weitere Objektträger. Darauf werden wieder parallel zwei Objektträger so positioniert, dass sie leicht mit dem mittleren überlappen (Skinner et al., 2013).
3. In die dadurch entstehende Vertiefung wird in einem Guss Agar eingefüllt. Dabei gilt es zu beachten, dass einerseits ausreichend Agar verwendet wird und andererseits die Kanten der angrenzenden Objektträger benetzt werden, um den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden.
4. Leicht verkippt (um allfällige Lufteinschlüsse an den Rand drücken zu können) wird ein weiterer vorgewärmter Objektträger auf den Agar gedrückt bis er auf den beiden obersten Objektträgern aufliegt. Diese müssen dabei festgehalten werden, um zu verhindern, dass sie vom überschüssigen Agar beiseitegeschoben werden.
5. Während sich die Anordnung mit der Zeit abkühlt, verfestigt sich der Agar. Durch die Objektträger ist er relativ gut vor Austrocknung geschützt und kann auch über Nacht aufbewahrt werden.
6. Vor Gebrauch werden die drei obersten Objektträger entlang des Agars weggeschoben (ansonsten kann der Agar reißen oder eine texturierte Oberfläche erhalten). Auf dem verbleibenden Objektträger kann der nun feste Agar in kleinere „Agar-Pads“ zerteilt werden. Diese können anschließend je nach Bedarf einfach vom Objektträger (herunter-) geschoben werden.

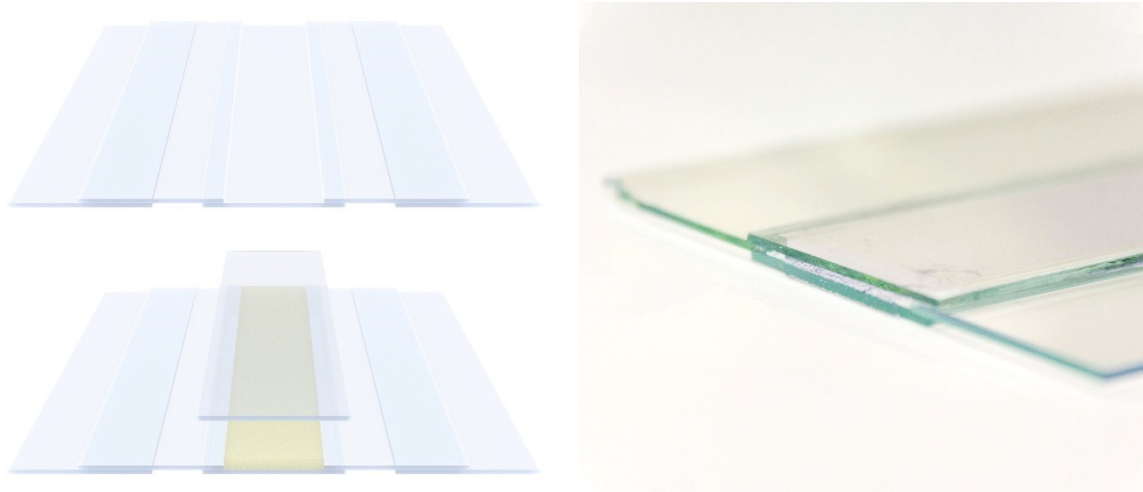


Abbildung 24: Herstellung von Agar-Pads mittels Objektträger

Links oben (schematisch): Fünf Objektträger werden so aufgelegt, dass sie eine Vertiefung bilden.

Links unten (schematisch): In die Vertiefung wird Agar gegossen, von oben wird ein weiterer Objektträger gepresst.

Rechts: Getrockneter Agar zwischen den Objektträgern.

B 150 µm dicke Beschichtung von Deckgläsern

Will man Deckgläser vollflächig dünn mit Agar beschichten, ist voriges Verfahren mangels Auflagefläche nur mäßig geeignet. Stattdessen bietet es sich an mit einer Vertiefung eines eigenen Halters zu arbeiten (siehe Abbildung 25), in welche man das Deckglas einlegen kann. Die Tiefe muss dabei auf die Dicke des Deckglases plus die gewünschte Dicke der Beschichtung (im feuchten Zustand) abgestimmt sein, im Falle von 150 µm Schichtdicke und Deckgläsern der Stärke #1, was etwa 150 µm entspricht, in Summe rund 300 µm. Um den überflüssigen Agar aufzufangen bietet es sich außerdem an, die Einkerbung an zwei Enden weiter zu vertiefen.

1. In die Vertiefung des Halters wird ein Deckglas gelegt, weiters werden seitlich auf den Halter ein paar Tropfen Wasser aufgebracht, welche später als Temperaturindikator dienen. Zusätzlich wird ein Objektträger im Wasserdampf des Becherglases vorgewärmt.
2. Der Halter wird direkt auf die Heizplatte gelegt. Sobald das Wasser auf ihm zu sieden beginnt, wird er zurück auf die Arbeitsfläche gelegt.
3. Der flüssige Agar wird auf das Deckglas aufgetragen, wobei zu beachten ist, dass an allen vier Kanten auch der darunterliegende Metallhalter benetzt wird (siehe Abbildung 25).
4. Der überschüssige Agar wird mittels eines Objektträgers gleichmäßig abgezogen.
5. Um beim Mikroskopieren ein saubereres Bild zu erhalten, wird die Rückseite des Deckglases nach der Beschichtung geputzt und Reste überstehenden Agars entfernt.

Soll die Agarschicht vakuumbeständig sein oder später mit einer Bakterienlösung beschichtet werden, sind folgende Schritte hilfreich:

6. Das beschichtete Deckglas wird bei erhöhter Temperatur getrocknet. Da die Temperatur der Heizplatte für diesen Zweck zu hoch ist, wird eine mehrmals

gefaltete Alufolie auf die Heizplatte und darauf das Deckglas gelegt, bis der kreisförmige Flüssigkeitsmeniskus auf dem Deckglas geschrumpft verschwunden ist.

7. Um dem Agar die restliche Flüssigkeit zu entziehen, wird das Deckglas für wenige Minuten einem Vakuum von rund 0,5 mbar ausgesetzt.

Die mit dieser Methode erzeugten Agarschichten können zur Immobilisierung der Bakterien genutzt werden. Im Falle der dicken Agar-Pads würden die Bakterien zudem mit Feuchtigkeit und Nährstoffen versorgt werden.



Abbildung 25: Halter zur Herstellung dünner Agarfilme

In die Vertiefung des erwärmten Aluminiumblocks wird zuerst ein Deckglas gelegt. Darauf kommt ausreichend flüssiger Agar um die gesamte Fläche des Deckglases sowie dessen Kanten zu bedecken. Quer über ein Ende des Metallblocks wird anschließend ein Objektträger gelegt und seitlich, über das komplette Deckglas hinweg, gleichmäßig abgezogen. Der überflüssige Agar wird dabei in die tieferen Senken links und rechts verdrängt.

4.5 Auftragung der Bakterien

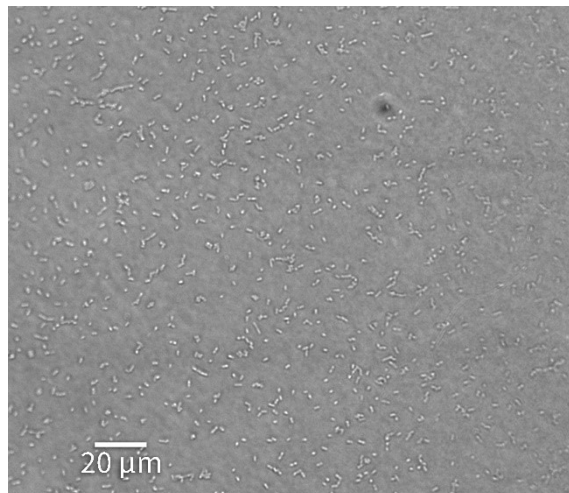
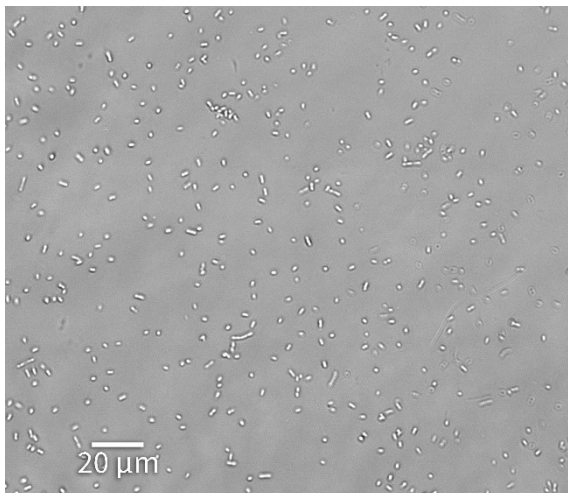


Abbildung 26: Durchlichtaufnahmen von *E. coli* in Nährlösung

Die linke Aufnahme zeigt *E. coli* auf einem Objektträger, die rechte auf einer Agarschicht. In beiden Fällen wurden die Bakterien durch ein 150 μm dickes Deckglas mikroskopiert. Der wesentliche Unterschied ist, dass sich die Bakterien im linken Bild durch Flüssigkeitsströme stark bewegten, während sie im rechten Bild durch den Agar vollständig immobilisiert wurden. In beiden Fällen sind die Bakterien ähnlich gleichmäßig verteilt.

Um die flüssige Probe dünn und gleichmäßig aufzutragen, wird sie auf ein Substrat aufgetropft und ein Deckglas aufgelegt. Dieses Vorgehen wurde mit der Bakterienlösung getestet, sowohl direkt auf einem Objektträger als auch auf Agar (siehe Abbildung 26). In beiden Fällen endeten die Bakterien etwa gleichmäßig verteilt. Im Gegensatz zur Variante mit Objektträger und Deckglas waren sie bei Benutzung von Agar zusätzlich noch immobilisiert. Da im Interferenzexperiment eine vollflächige Vakuumexposition erforderlich ist, wurde auch getestet, ob die Bakterienverteilung während des Ablösens des Deckglases erhalten bleibt. Es zeigte sich dabei, dass ein Ablösen des Deckglases durch Verkipfung aufgrund der Oberflächenspannung zur Tropfenbildung und damit zu einer Inselbildung der Bakterien führt²⁴. Zieht man das Deckglas hingegen parallel zur Oberfläche seitlich ab, bleiben manchmal gleichmäßig verteilte Bakterien zurück. Selbst nach einigen Optimierungen bedarf diese Methode aber einer Kontrolle per Mikroskop und unter Umständen mehrfacher Wiederholung. Die reproduzierbarsten Resultate wurden mit folgenden Arbeitsschritten erzielt:

1. Die gesamte Agarschicht wird mit Bakterienlösung benetzt.
2. Ein Objektträger wird auf den Agar mit Bakterien gelegt.
3. Mittels eines saugstarken Tuches wird entlang des Agarrandes überschüssige Flüssigkeit abgesaugt.
4. Der Objektträger wird seitlich, parallel zur Agarschicht, abgezogen. Hierbei ist es wichtig gleichmäßig zu ziehen, damit keine Streifen verschiedener Bakterienkonzentration entstehen.

Dünne Agarschichten müssen vollständig getrocknet sein, etwa durch eine wie in Kapitel 4.4 erwähnte Vakuumexposition. Andernfalls können sich beim Ablösen in der Agarschicht Risse bilden oder ganze Teile der Beschichtung ablösen.

Alternativ können die Bakterien auch mittels Rotationsbeschichtung (Spin-Coating) auf dem Agar verteilt werden. Hierbei werden die Deckgläser vollflächig mit Agar beschichtet und in den Spin-Coater gelegt. Anschließend wird dieser auf 3600 – 7200 U/min beschleunigt und die Bakterienlösung aufgetropft. Die Zentrifugalkraft verteilt die Lösung über die gesamte Agarfläche. Die Bakterien bleiben dabei am Agar haften, die überschüssige Flüssigkeit wird entfernt.

Im Rahmen von diversen Wachstumsversuchen wurde der Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit auf die Bakterienverteilung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass für eine gleichmäßige Verteilung eine Mindestgeschwindigkeit zwischen 30 s^{-1} und 60 s^{-1} erforderlich ist, da bei niedrigeren Rotationsgeschwindigkeiten der Agar nicht gleichmäßig, sondern spiralförmig benetzt wird. Mit höheren Umdrehungsgeschwindigkeiten kommt es zu dann einer Verringerung der Bakteriendichte (siehe Abbildung 27). Weniger Einfluss scheint hingegen die Menge der aufgetropften Bakterienlösung zu haben. Zwischen $100 \mu\text{l}$ und rund $20 \mu\text{l}$ großen Tropfen war kein signifikanter Unterschied in der Bakteriendichte zu sehen.

²⁴ Zusätzlich kann außerdem die Oberfläche des Agars in Mitleidenschaft gezogen werden.

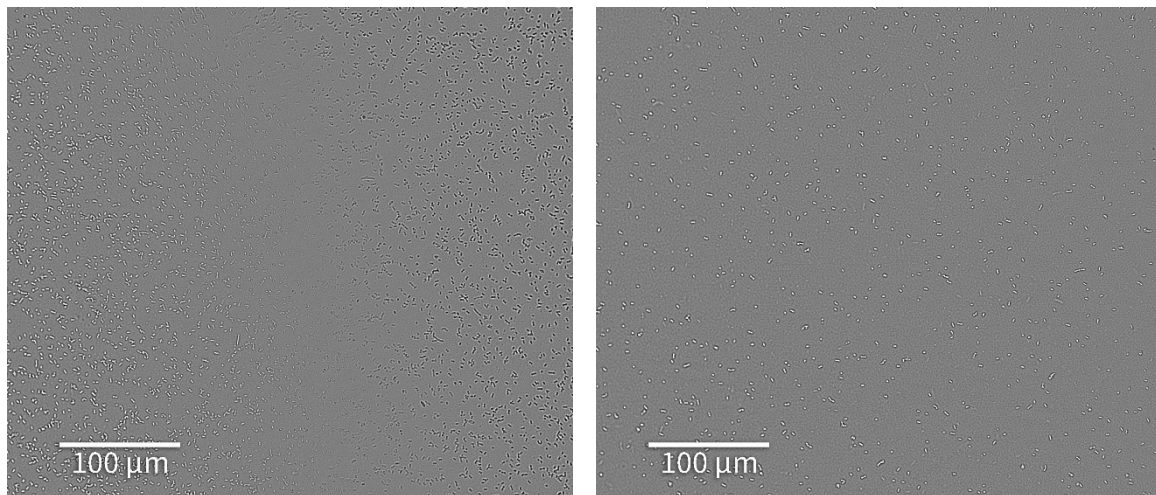


Abbildung 27: Bakterienverteilung nach Rotationsbeschichtung

Mit Agar beschichtete Deckgläser wurden bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 60 s^{-1} (l) bzw. 120 s^{-1} (r) mit der Bakterienlösung rotationsbeschichtet. Um die Bakterien besser vom Hintergrund abzuheben, wurden die Aufnahmen nachträglich in Adobe Photoshop mit einem Hochpassfilter mit einer Filterlänge von $1\text{ }\mu\text{m}$ bearbeitet. Deutlich zu sehen ist in den Aufnahmen, dass bei einer niedrigeren Umdrehungsgeschwindigkeit eine höhere Flächendichte an Bakterien erreicht wurde. Der Farbverlauf im linken Bild ist dadurch bedingt, dass die Oberfläche des Agars nicht ausreichend parallel zur Fokusebene des Mikroskops gelegen ist.

Sowohl die Rotationsbeschichtung als auch das etwas aufwändigere manuelle Auftragen der Bakterienlösung kann genutzt werden, um die Bakterien gleichmäßig und isoliert oder in kleinen Gruppen über den Agar zu verteilen. Dies ermöglicht es, die Auswirkungen von unterschiedlichen Umgebungsbedingungen an den jeweiligen Bakterien getrennt zu evaluieren, was die Statistik verbessert.

4.6 Wachstum von *E. coli* in der Feuchtigkeitskammer

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, wirkt das Antibiotikum Ciprofloxacin bei der Zellteilung der Bakterien. Um Ciprofloxacin nachzuweisen, müssen die Bakterien daher nach der Vakuumexposition wieder in einer vitalen Umgebung aktiviert werden. Dazu muss den Bakterien Wasser zugeführt werden. Dies kann nicht wie bei Agarplatten sonst üblich über das Substrat erfolgen, da dieses zusammen mit den Bakterien dem Vakuum ausgesetzt ist. Man könnte stattdessen die getrocknete Agarschicht mitsamt den Bakterien mit einem Wasserfilm überziehen. Unsere Versuche zeigten allerdings, dass sobald die Agarschicht mit einem freien Flüssigkeitsfilm überzogen wird, Strömungen auftreten, die einen Teil der Bakterien mitnehmen und somit die Ortsauflösung des bakteriellen Detektors zerstören und auch das Interferenzmuster des Antibiotikums verwaschen.

Um diese Probleme zu lösen, können die Bakterien nach der Vakuumexposition, statt im Flüssigkeitsfilm, in einer abgeschlossenen Umgebung erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert werden. Hierfür wurde eine Feuchteammer gebaut: In den Deckel einer Petrischale wird dafür ein Loch mit einem Durchmesser von 1,6 cm gebohrt, über welches die auf einem Glasplättchen befindliche Probe mit der zu befeuchtenden Seite nach unten gelegt wird. Die hohe Luftfeuchtigkeit wird dabei durch im Boden der Petrischale befindliches Wasser erzeugt. Da beim Mikroskopieren der Bakterienproben

die besten Resultate mittels Durchlicht erzielt werden können, muss der zentrale Bereich des Bodenbereichs der Petrischale wasserfrei bleiben. Für diesen Zweck wurde ein kreisringförmiges Stück aus saugstarkem Papier in den Boden der Petrischale gelegt und befeuchtet (siehe Abbildung 28).

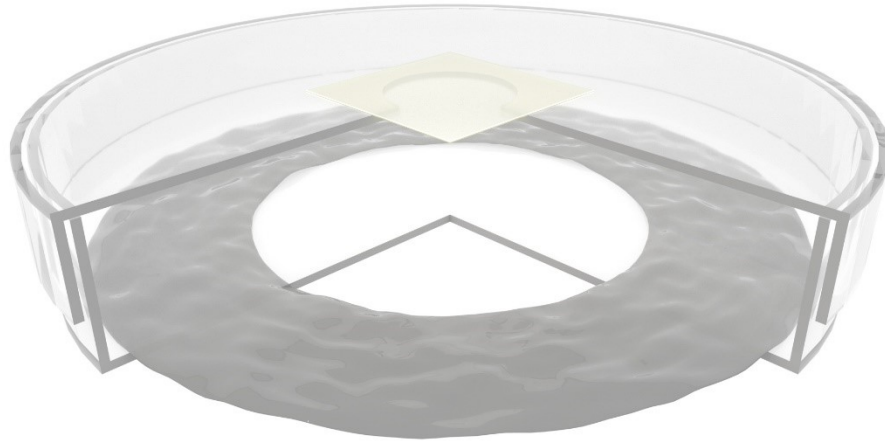


Abbildung 28 (schematisch): Feuchtigkeitskammer aus einer Petrischale

In eine Petrischale mit Loch im Deckel (schematisch) wird ein befeuchtetes kreisringförmiges Papier platziert. Über das Loch wird ein mit Agar und Bakterien beschichtetes Glasplättchen, mit der beschichteten Seite nach unten, gelegt. Auf diese Weise können die Bakterien von oben mit Durchlicht von unten mikroskopiert werden, ohne sie dafür aus der feuchten Atmosphäre entnehmen zu müssen.

In einem ersten Test wurden auf einen mit Agar beschichteten und getrockneten Objektträger Bakterien aus einer Übernachtskultur aufgetragen. Der Objektträger wurde mit den Bakterien nach unten auf das Loch der Petrischale gelegt und inkubiert. Nach einer Stunde war eine kreisringförmige Kondensation der Luftfeuchtigkeit am Deckel der Petrischale sichtbar (ähnlich Abbildung 29 links). Die Bakterien wurden stündlich mikroskopiert, wobei exemplarisch Aufnahmen zweier verschiedener Stellen in Abbildung 30 zu sehen sind. Auf der Agarschicht fand starkes Wachstum statt, wobei in ähnlichen Experimenten bei ausreichender Feuchtigkeitszufuhr eine geschlossene Monolage aus Bakterien erzielt werden konnte²⁵.

Auffallend ist außerdem, dass sich nach wenigen Stunden Flüssigkeit um einige Bakterien(-kolonien) sammelte, was wahrscheinlich das Bakterienwachstum verstärkt. Die vorliegenden Aufnahmen lassen aber keinen eindeutigen Schluss zu, ob sich der Großteil der Flüssigkeitsansammlung erst bildete nachdem die Bakterien mit der Koloniebildung begonnen haben (wie die oberen Aufnahmen in Abbildung 30 vermuten ließen), ob die Ansammlung die Ursache für die Bildung der Kolonien war, oder ob Koloniebildung und die Entstehung der Flüssigkeitsansammlung unabhängig voneinander erfolgten (da in Abbildung 30 unten die Flüssigkeitsansammlung bereits vor

²⁵ Falls die Viabilität der Bakterien nach der Exposition gegenüber Ciprofloxacin nicht per Wachstum, sondern mittels eines speziellen Farbstoffes detektiert werden sollte, wäre eine solche Monolage an Bakterien testenswert um Auflösung und Statistik des bakteriellen Detektors zu erhöhen.

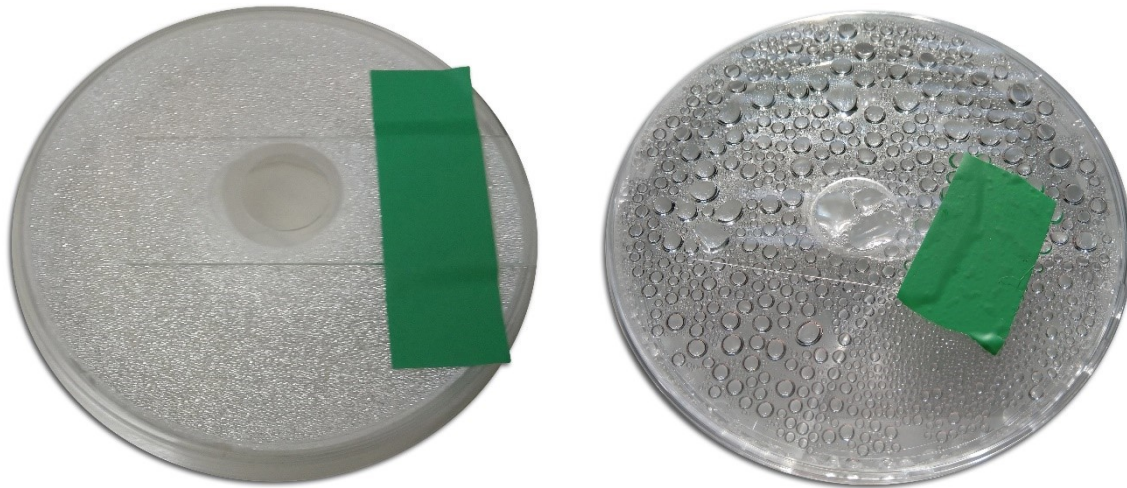


Abbildung 29: Kondensation am Deckel der Feuchtigkeitskammer

Während der Inkubation in der Feuchtigkeitskammer aus Abbildung 28 kam es regelmäßig zu Wasserkondensation am Deckel der Petrischale, wobei in der Mitte meist ein kreisförmiger Bereich ohne Kondensation lag (l). Manchmal trat jedoch eine vollflächige Kondensation auf (r), welche auch die Probe über dem Loch betraf.

dem Wachstum vorhanden ist). Diese Frage ist insofern wichtig, als dass das Wachstum der Bakterien am Detektor unabhängig von zufälliger Kondensation von Wasser ablaufen muss.

Bei mehrmaligen Versuchen zeigte sich, dass die Feuchtigkeit nicht kontrollierbar war. In einigen Fällen wurde im Inkubator bei 37 °C eine makroskopische Tropfenbildung auf dem Agar beobachtet (siehe Abbildung 29 rechts). In anderen Fällen hingegen fand, je nach Lage der Feuchtigkeitskammer innerhalb des Inkubators, aufgrund mangelnder Feuchtigkeit überhaupt kein Wachstum statt. Um zu starke Kondensation zu vermeiden, wurde statt des feuchten Tuches eine übersättigte Lösung aus Kaliumsulfat (K_2SO_4) bzw. Natriumchlorid (NaCl) in die Petrischale eingefüllt, wodurch die relative Luftfeuchtigkeit über der Lösung konstant auf 97 % bzw. 75 % gehalten wird (Greenspan, 1977). Im Falle von Kochsalz ist die Herstellung einer übersättigten Lösung aufgrund der kleinen Korngröße und der damit verbundenen schnellen Lösbarkeit einfach. Kaliumsulfat hingegen lag in rund 1 cm großen Schuppen vor, welche sich nahe der Sättigung bei Raumtemperatur nicht mehr auflösten und dadurch das Mikroskopieren mit Durchlicht erschwerten. Die Löslichkeit von Kaliumsulfat in Wasser ist außerdem viel stärker temperaturabhängig als von Natriumchlorid. Dies muss bei der Herstellung der übersättigten Lösung beachtet werden, um auch nach der Erwärmung noch eine gesättigte Lösung zu haben. Deshalb wird bei Raumtemperatur eine deutlich übersättigte Lösung von Kaliumsulfat in Wasser angesetzt. Anschließend wird das Becherglas auf einer Heizplatte auf über 60 °C erhitzt, wodurch sich aufgrund seiner steigenden Löslichkeit der Großteil des verbliebenen Salzes auflöst. Lässt man die Lösung anschließend auf der Arbeitsfläche stehen, so kühlt die Lösung am Boden des Becherglases und der Oberfläche am schnellsten ab. Entsprechend fällt dort zuerst das Salz aus. Bei rund 45 °C wurde dann mit einer Spritze Lösung aus dem mittleren Bereich

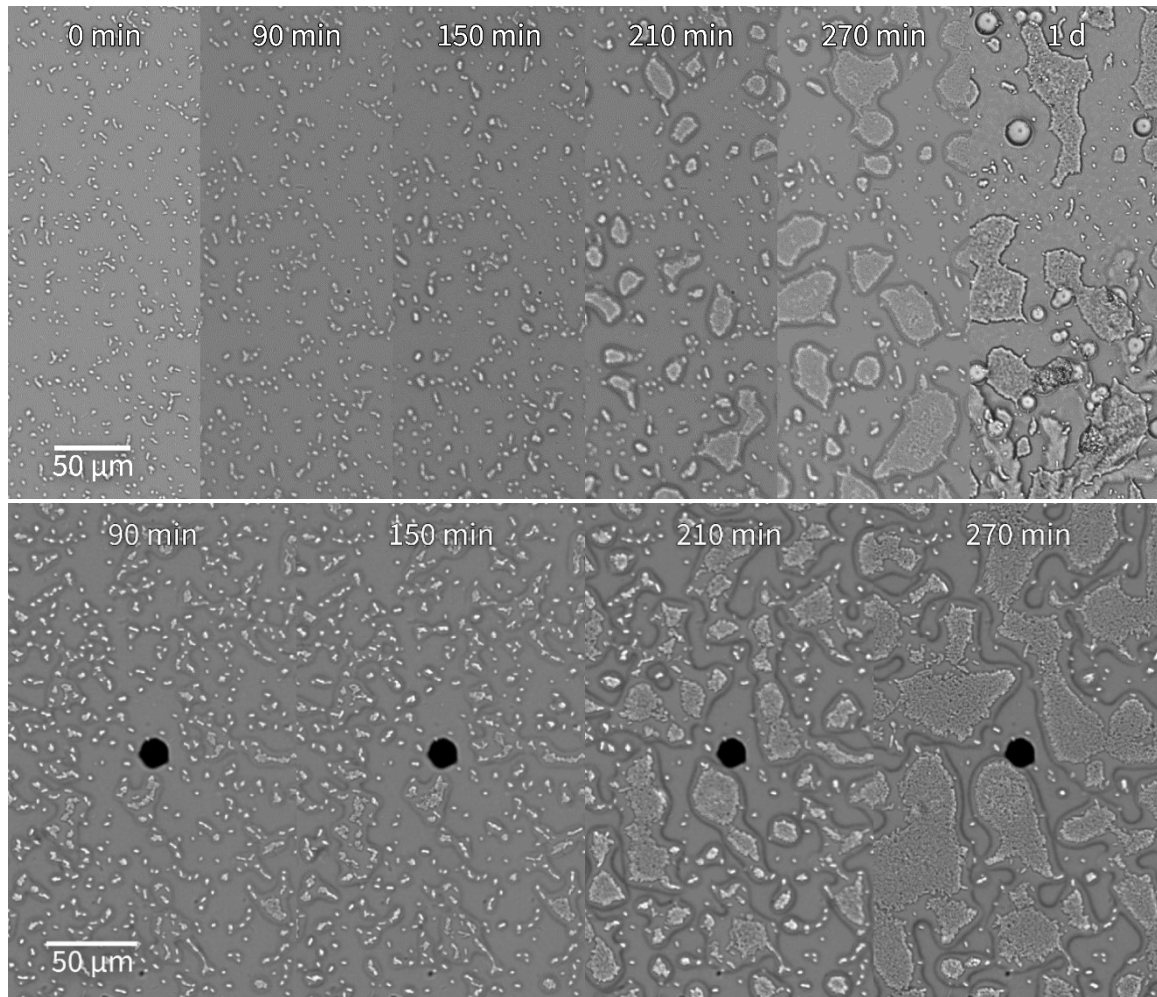


Abbildung 30: Wachstum auf Agar in der Feuchtigkeitskammer

E. coli-Bakterien wurden auf ein mit Agar beschichtetes Deckglas aufgetragen und durch die Feuchtigkeitskammer aus Abbildung 28 einer relativen Luftfeuchtigkeit von rund 100 % bei 37 °C ausgesetzt. Die Aufnahmen zeigen den zeitlichen Verlauf des Wachstums an zwei verschiedenen Orten des Deckglases. Nach zwei bis drei Stunden erfolgte die erste Zellteilung, nach weiteren ein bis zwei Stunden bildeten sich bereits größere Kolonien. Zu erwähnen sind einige offensichtlich nicht wachsende Bakterien. Dies könnte zum Teil aber auch daran liegen könnte, dass als Ausgangspunkt eine Übernachtskultur verwendet wurde, in der nicht mehr alle Bakterien wachstumsfähig waren.

der Lösung entnommen und in die Petrischale transferiert. Da bei dieser Temperatur die Lösung gesättigt ist, ist auch sicher, dass bei den Temperaturen im Inkubator eine übersättigte Lösung vorliegt.

Auch mit Kaliumsulfat- und Natriumchloridlösung kam es bei der Mikroskopie zur Kondensation an Petrischale und Probe. Um diesen Effekt genauer zu verstehen, bedarf es der Berechnung der Luftfeuchtigkeit. Dafür notwendig ist der Sättigungsdampfdruck e_w von Wasser, welcher in Pascal über einer Wasseroberfläche mit Temperatur T in Kelvin näherungsweise gegeben ist durch (Sonntag, 1990):

$$e_w(T) = \exp(A \cdot T^{-1} + B + C \cdot T + D \cdot T^2 + E \cdot \ln T) \quad (4.6.1)$$

$$A := -6096,9385$$

$$B := 16,635794$$

$$C := -2,711193 \cdot 10^{-2}$$

$$D := 1,673952 \cdot 10^{-5}$$

$$E := 2,433502$$

Daraus kann eine kritische Temperaturänderung ΔT_{crit} berechnet werden, ab der eine Kondensation an der Probe zu erwarten ist. Diese hängt von der relativen Luftfeuchtigkeit φ bei einer Temperatur T_0 über der Salzlösung:

$$e_w(T_0 - \Delta T_{crit}) = \varphi \cdot e_w(T_0) \quad (4.6.2)$$

Löst man diese Gleichung numerisch, ergibt sich bei einer Ausgangstemperatur von 37 °C für Kaliumsulfat ($\varphi = 97\%$) ein ΔT_{crit} von 0,5 °C, während es für Natriumchlorid ($\varphi = 75\%$) bei 5 °C liegt. Dies bedeutet, dass beim Mikroskopieren im ersten Fall bereits ein Temperaturunterschied von weniger als 1 °C zwischen Luft im Inneren und Deckel der Petrischale ausreichen kann, um Kondensation hervorzurufen. Auch im Falle der Kochsalzlösung scheint eine Abkühlung der Petrischale auf unter 32 °C plausibel genug, um die Kondensation zu erklären.

Als Gegenmaßnahme wurde deshalb in weiteren Versuchen nach der Entnahme einer Feuchtigkeitskammer aus dem Inkubator deren Deckel inklusive Probe mit dem einer leeren, trockenen Petrischale getauscht. Zu beachten ist bei dieser Methode allerdings, dass beim Rücktausch der Probenhalter nicht kälter als Flüssigkeit und Dampf der Lösung ist, was wieder zur Kondensation führen würde. Der Deckel mitsamt Probe wurde vor dem Rücktausch deshalb immer im Inkubator vorgewärmt. Unter anderem durch dieses Prozedere wird die Methode allerdings umständlich und fehleranfällig, zusätzlich benötigt es längere Zeit, bis sich ein Gleichgewicht der Luftfeuchtigkeit eingestellt, was wiederum das Bakterienwachstum negativ beeinflussen kann.

Aus den durchgeführten Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass durch die Feuchtigkeitskammer Bakterienwachstum auf einer davor ausgetrockneten Agarschicht prinzipiell möglich ist. Für einen Einsatz in der Praxis reagiert dieser Aufbau allerdings zu empfindlich gegenüber Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen.

Dieses Problem könnte umgangen werden, indem man die Petrischale mit einer mobilen Heizkammer umgibt, wie in Abbildung 31 illustriert ist. Die Besonderheit dabei ist, dass die Temperatur des Wasserbades in der Petrischale getrennt von der Temperatur der Probe reguliert werden könnte, wobei man außerdem nicht auf den Inkubator angewiesen ist und somit die Probe jederzeit und auch durchgehend mikroskopieren könnte. Auch wenn dieser Plan testenswert erscheint, wurde er nie in die Praxis umgesetzt, da stattdessen an einer alternativen Methode experimentiert wurde.

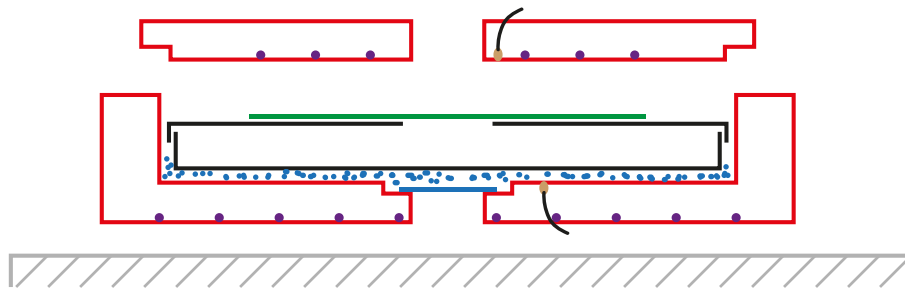


Abbildung 31: Metallene Heizkammer für die Feuchtigkeitskammer im Querschnitt

Der untere topfförmige Metallteil (rot) ist auf der Unterseite mit einem versenkten Heizdraht (violett) und an der Oberseite mit einem Temperatursensor (golden) ausgestattet. Für Arbeiten mit Durchlicht befindet sich in der Mitte eine Bohrung, welche mit einem Glasplättchen (blau) bedeckt ist. Im Topf befindet sich etwas Wasser, um die Wärmeleitung zwischen Metall und der Petrischale (samt darin befindlicher Flüssigkeit) zu erhöhen. Der Metalldeckel (rot) besitzt an seiner Unterseite einen vom Topf getrennt regulierbaren Heizdraht (violett) mitsamt Temperatursensor (golden). Falls notwendig, könnte zwischen Topf und Deckel eine thermische Isolierung angebracht werden. Zur thermischen Isolierung vom metallischen Mikroskopisch befindet sich die ganze Anordnung auf einem Block aus Styropor (grau).

4.7 Wachstum auf Agar-Pads

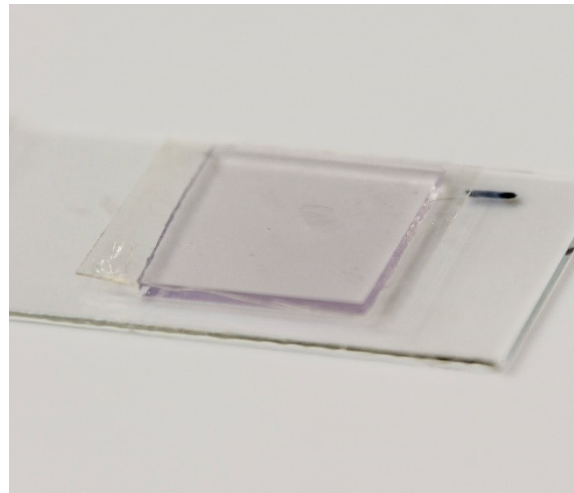
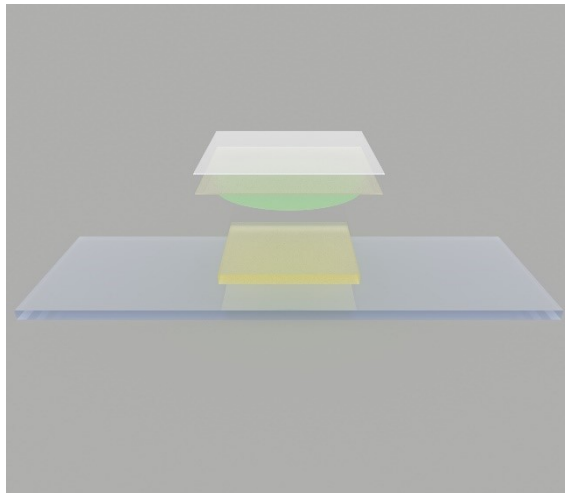


Abbildung 32: Mit Agar und Bakterien beschichtetes Deckglas auf Agar-Pad

Ein Deckglas wird mit Agar und Bakterien beschichtet und später mit der beschichteten Seite nach unten auf ein Agar-Pad gelegt, welches sich auf einem Objektträger befindet.

(l): Schematische Explosionszeichnung, der Agar ist dabei gelb gefärbt, die Bakterien grün.

(r): Foto nach Kombination von Deckglas und Agar-Pad, wobei der Agar des Pads mit dem Farbstoff Resazurin angereichert ist, was für die violette Färbung sorgt.

Als Alternative zur Feuchtigkeitskammer wurde die Flüssigkeitszufuhr durch ein Agar-Pad getestet. Hierfür wird als erstes ident zu den vorigen Versuchen ein Deckglas mit Agar und Bakterien beschichtet. Dieses Deckglas wird dann, nach der Vakuumexposition, mit der beschichteten Seite nach unten auf ein Agar-Pad gelegt (siehe Abbildung 32). Auf diese Weise werden die Bakterien durch das im Agar-Pad gespeicherte Wasser befeuchtet und mit Nährstoffen versorgt. Zusätzlich könnte man dem Agar-Pad auch noch weitere Inhaltsstoffe beifügen. Ein Beispiel dafür wäre ein Farbstoff wie Resazurin, mit dem man die Viabilität der Bakterien nach der Vakuumexposition bestimmen könnte. Kombiniert man dies mit weiteren Farbstoffen,

welche man teils bereits vor der Exposition zusetzt, könnte man im Optimalfall unterscheiden zwischen Bakterien, welche bereits vor der Vakuumexposition tot waren, solchen, die bloß das Vakuum nicht überlebt haben und schlussendlich denjenigen, die durch das Antibiotikum getötet wurden. Durch den unterschiedlichen Zeitpunkt der Zugabe würden die Farbstoffe dabei die Viabilität in den unterschiedlichen Phasen des Versuchs indizieren. Besitzen die Farbstoffe unterschiedliche Farben, lassen sie sich auch im Nachhinein noch voneinander unterscheiden.

Um das generelle Prinzip zu testen, wurde ein Tropfen einer Übernachtskultur verwendet und auf die Vakuumexposition verzichtet. Bereits 90 Minuten nach Auflegen auf das Agar-Pad war deutliches Wachstum feststellbar (siehe Abbildung 33), deutlich früher als bei den Versuchen aus Kapitel 4.6.

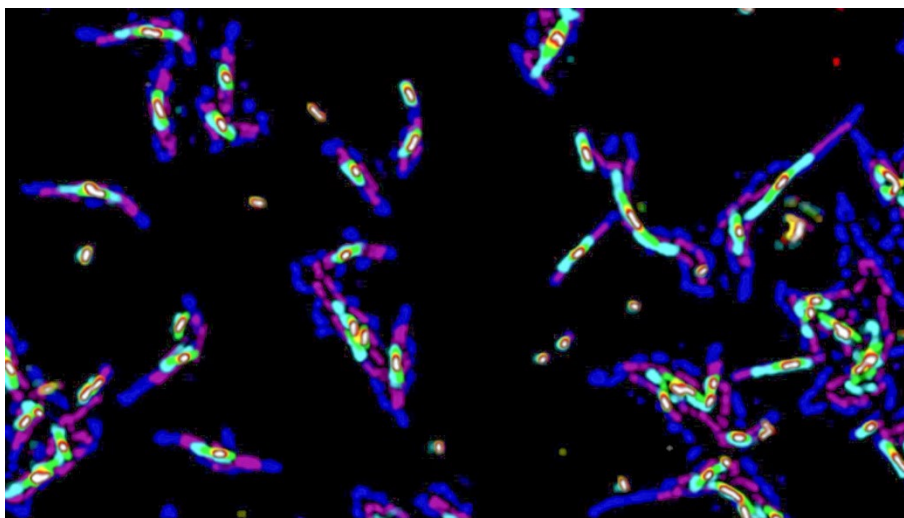


Abbildung 33: Bakterienwachstum zwischen Agar-Pad und Deckglas (Kompositum)

Bakterien wurden im Aufbau von Abbildung 32 bei 37 °C inkubiert und regelmäßig mikroskopiert. Auf die Aufnahmen wurde ein Hochpassfilter und ein Binarizer angewandt, für Details hierzu siehe Kapitel 5.2.1. Die Bilder wurden anschließend gefärbt und übereinandergelegt, wobei rot das Wachstum nach 30 min, gelb nach 60 min, hellblau nach 90 min und blau nach 180 min markiert.

Man kann eindeutig sehen, dass beim Großteil der Bakterien Wachstum stattgefunden hat. Warum einzelne Bakterien kein Wachstum zeigten, ist unklar. Möglicherweise sind sie allerdings bereits in der ursprünglichen Bakterienlösung abgestorben, da sich die Übernachtskultur in der stationären Phase befunden haben muss.

In einem ähnlichen Experiment wurden die Bakterien zwischen Agar-Pad und beschichtetem Deckglas 16 Stunden lang inkubiert. Von zwei Proben war auf einer im Vergleich zum vorigen Versuch nach den 16 Stunden bloß vereinzelt Wachstum sichtbar (siehe Abbildung 34). Auf der anderen Probe hingegen war der Agar teilweise so flächendeckend besiedelt, dass die Bakterien nicht mehr einzeln ersichtlich waren.

Beide Proben hatten gemeinsam, dass das Agar-Pad zwischenzeitlich an den Rändern wenige Millimeter tief ausgetrocknet war. Um diese Austrocknung bei längeren Inkubationszeiten zu verhindern, besteht die Möglichkeit, die Objektträger samt Proben wie in Abbildung 35 gezeigt in eine befeuchte Petrischale zu legen.

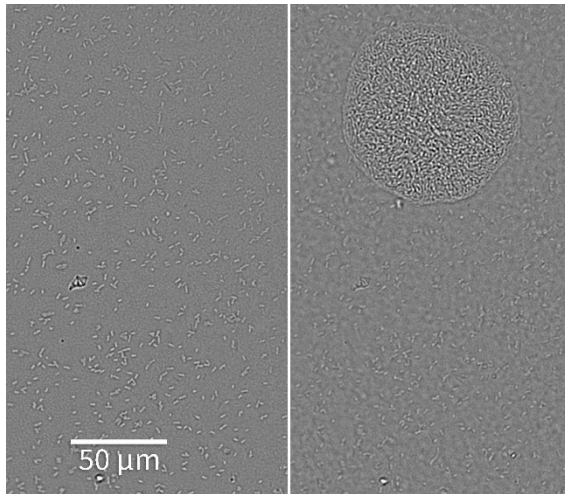


Abbildung 34: Wachstum einer einzelnen Kolonie

Die Bakterien wurden 16 Stunden lang zwischen Agar und Deckglas inkubiert, wobei bei dieser Probe abgesehen von vereinzelter Koloniebildung annähernd kein Wachstum stattfand.

(l): Ausgangssituation

(r): nach 16-stündiger Inkubation

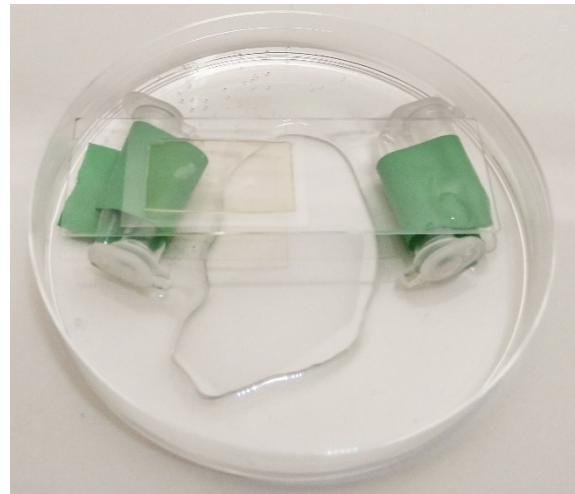


Abbildung 35: Abgedecktes Agar-Pad in Feuchtigkeitskammer

Um das zwischen Objektträger und Deckglas befindliche Agar-Pad über Nacht gegen Austrocknung zu schützen, wurde es auf zusammengeklebten Reaktionsgefäßen in eine (geschlossene) Petrischale gelegt, welche mit Wasser befeuchtet war.

Als nächster Schritt wurde die Auswirkung der Vakuumexposition getestet. Hierzu wurde erneut ein Deckglas präpariert, welches anschließend einem Vakuum von rund 10^{-6} mbar ausgesetzt wurde. Nach der Entnahme wurde es auf ein frisch hergestelltes Agar-Pad gelegt und inkubiert. Es war dabei bereits nach 90 Minuten ein ähnlich starkes Wachstum feststellbar wie im Falle fehlender Vakuumexposition (siehe Abbildung 36). Da es sich hierbei jedoch um eine andere Übernachtskultur gehandelt hat, lassen sich die beiden Resultate nur bedingt miteinander vergleichen.

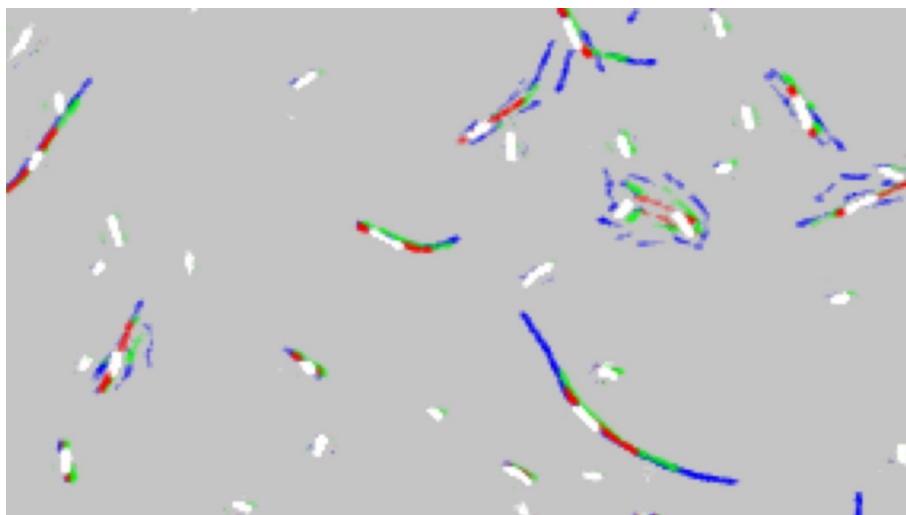


Abbildung 36: Bakterienwachstum nach Vakuumexposition (Kompositum)

Probenpräparation und Auswertung erfolgten – von der zusätzlichen Vakuumexposition abgesehen – äquivalent zu Abbildung 33.

Zumindest näherungsweise lässt sich aus den Aufnahmen des Wachstums eine Überlebensrate²⁶ für die Vakuumexposition errechnen, indem man den Anteil der wachsenden Bakterien aus Abbildung 36 und Umgebung mit dem aus Abbildung 33 vergleicht. Auf diese Weise endet man bei ungefähr 35 %, was verglichen mit Literaturwerten von bis zu 20 % (Bücker et al., 1969) relativ hoch ist, aber weitere Versuche zur Bestätigung erfordert.

Zusammenfassend ist die Kombination von Agar-Pads mit den beschichteten Deckgläsern der momentan wohl aussichtsreichste Kandidat, um Bakterien im Vakuum am Leben zu halten und danach zum Wachstum zu bringen. Es bedarf allerdings noch einiger weiterer Tests, um die Faktoren zu identifizieren, welche derzeit die Reproduzierbarkeit limitieren, und um zu beobachten, wie sich das Agar-Pad auf das Beugungsmuster aus Ciprofloxacin auswirkt.

²⁶ In diesem Fall wurde Überleben mit Wachstum gleichgesetzt. Es ist davon auszugehen, dass es – ähnlich zur stationären Phase – ein paar Bakterien geben wird, welche einen aktiven Stoffwechsel haben, allerdings kein Wachstum aufweisen. Da diese mangels Zellteilung allerdings kaum auf Ciprofloxacin ansprechen, sind sie beim Nachweis von Ciprofloxacin nicht von Interesse. Nichtsdestotrotz wäre es interessant, mittels zusätzlichem Farbstoff festzustellen, welcher Anteil der Bakterien sich in einem solchen Zustand befindet.

4.8 Bakterielle Detektion von Ciprofloxacin an Luft

Nachdem gezeigt wurde, dass *E. coli*-Bakterien auf einem mit Deckglas bedeckten Agar-Pad gut wachsen können, wird ihre Ansprache auf Ciprofloxacin getestet. Ein Glasplättchen wird dazu mit einem Streifen aus Ciprofloxacin beschichtet. An Luft werden die auf einem Agar befindlichen Bakterien in Kontakt mit dem Streifen gebracht, um die Auswirkung des Ciprofloxacin auf die Bakterien zu untersuchen.

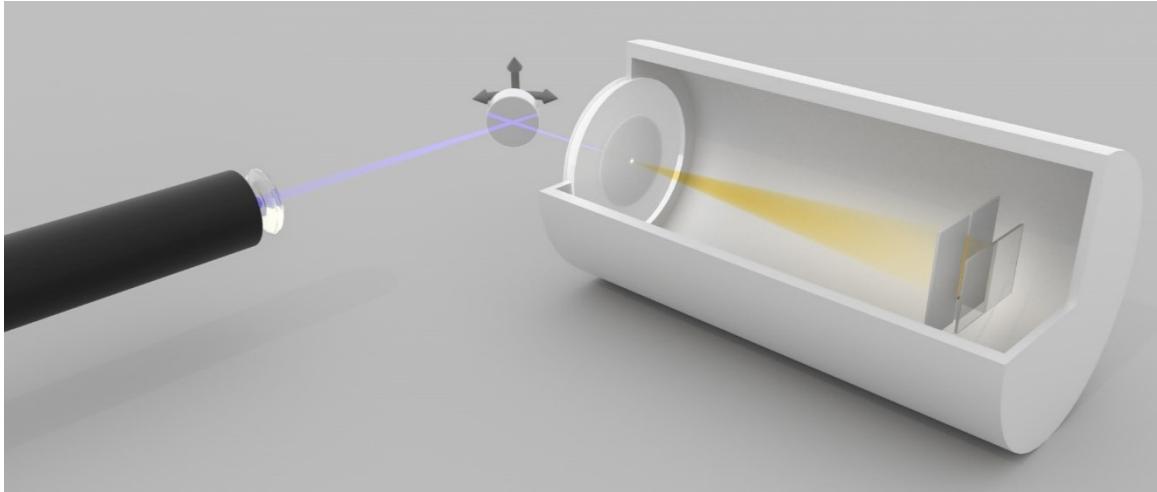


Abbildung 37: Testkammer zur Bedampfung mit Ciprofloxacin (schematisch)

Links in der Illustration befindet sich ein schwarzer Laser, dessen Strahl direkt nach dem Austritt mittels Linse fokussiert, anschließend durch einen Spiegel umgelenkt wird und durch ein Vakuumfenster tritt. Auf dessen Innenseite wiederum befindet sich aufgetropftes Ciprofloxacin (hellgrauer Fleck), welches sich im Vakuum von rund 10^{-6} mbar durch den fokussierten Laserstrahl verdunstet und sich in der Kammer ausbreitet, was teils durch den gelben Strahl angedeutet ist. Der Molekülstrahl wird nach 15 cm mittels zweier Rasierklingen kollimiert und 1 cm später auf einem Glasplättchen aufgefangen.

Die Wirkung des Antibiotikums auf Bakterien in Lösung ist gut dokumentiert (Chalkley et al., 1985), für das Experiment relevant ist aber die Wirkung nach Verdampfung per Laser und Niederschlag auf einem Glasplättchen. Da die in Kapitel 3 beschriebene Molekülbeugung geometrisch bedingt eine Mindestlänge von rund 1,5 m benötigt, um ausreichende Kohärenz der Materiewellen zu erzeugen und die Beugungsordnungen voneinander zu trennen, eignet es sich aufgrund der geringen Flussraten nur bedingt für rasche Bedampfungstests. Aus diesem Grund wurde eine kleine Vakuumkammer mit einem Spalt²⁷ und einem Halter für ein Glasplättchen ausgestattet und aufgetropftes Ciprofloxacin per fokussiertem Laser verdunstet (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38). Die Position des Laserstrahls wurde mittels eines Spiegels manuell verfahren. Dies hat

²⁷ Die Schwerkraft sorgt für eine vertikale Trennung der unterschiedlich schnell fliegenden Moleküle. Um den am Glasplättchen ankommenden Streifen des Molekularstrahls dadurch nicht zu verbreitern, wurde der Spalt vertikal ausgerichtet.

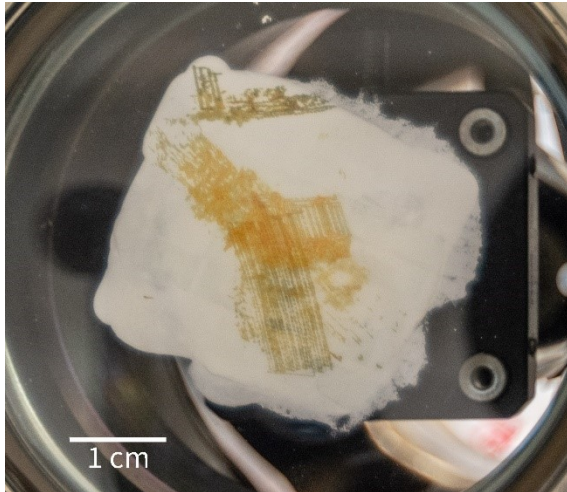


Abbildung 38: Foto des betropften Vakuumfensters
In der weißen Schicht aus Ciprofloxacin deutlich zu sehen sind dabei die Spuren des bereits verdampften Materials.

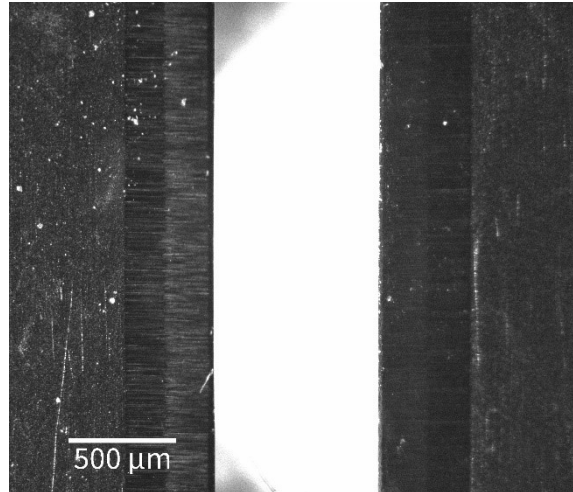


Abbildung 39: Mikroskopaufnahme des benutzten Spaltes
Zu sehen sind dabei links und rechts die aufgeklebten Rasierklingen, welche einen 0,76 mm breiten Spalt bilden.

zwar den Nachteil, dass aufgrund des dadurch entstehenden Parallaxenfehlers das Abbild des Spaltes am Glasplättchen verwischt, doch ist das Verfahren rasch und einfach durchführbar.

Ein blauer Diodenlaser (*wicked lasers Arctic blue*, $\lambda = 445 \text{ nm}$, $P = 1 \text{ W}$) wurde für die Verdampfung verwendet. Ein entsprechend breiter Spalt (0,76 mm, siehe Abbildung 39) erlaubt es, den Einfluss des Antibiotikums auf die Bakterien relativ einfach sichtbar zu machen. Dieses Experiment hat vor allem einen qualitativen Charakter, denn die Konzentration des auf dem Glasplättchen ankommenden Antibiotikums lässt sich mit diesem Aufbau nicht ohne weiteres bestimmen – weder absolut, noch im Vergleich zum Fernfeld.

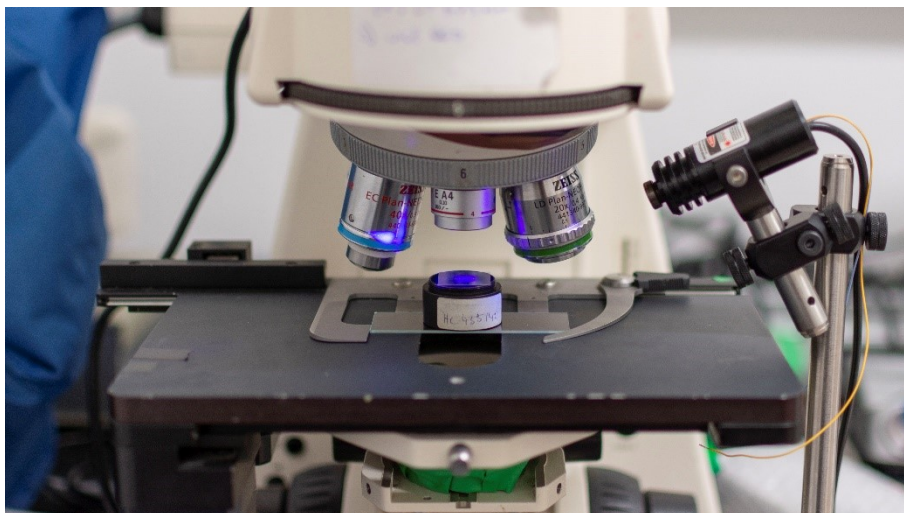


Abbildung 40: Aufbau Fluoreszenzmikroskopie

Der auf ein Deckglas aufgedampfte Streifen aus Ciprofloxacin wird mithilfe des Lasers rechts im Bild bei einer Wellenlänge von 405 nm angeregt, zusätzlich befindet sich ein 550/80 nm Bandpassfilter im Strahlengang des Mikroskops. Um einerseits an die hohe Fokusposition des 4-fach-Objektivs zu kommen und andererseits die Fluoreszenz des Objektträgers darunter zu minimieren, wurde die Probe auf einen Abstandshalter platziert.

Das derart beschichtete Glasplättchen wurde anschließend per Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierfür wurde die Probe seitlich mittels des bereits zur Verdampfung benutzten Laser ($\lambda = 445 \text{ nm}$, $P = 1 \text{ W}$) unter einem Winkel von rund 30° beleuchtet (siehe Abbildung 40) und in den Strahlengang des Mikroskops ein $550/80 \text{ nm}$ Bandpassfilter eingebracht. Obwohl einzelne Flocken von Ciprofloxacin, welche testweise auf einen Objektträger aufgetragen wurden, deutlich fluoreszierten, war am bedampften Glasplättchen keine Fluoreszenz feststellbar. Bei Beleuchtung mit einer 405 nm -Laserdiode ($P < 100 \text{ mW}$, Strahlbreite am Deckglas rund 3 mm) war die Fluoreszenz des aufgedampften Streifens hingegen sogar mit freiem Auge sichtbar. Das Ergebnis ist in Form einer mikroskopischen Aufnahme in Abbildung 41 zu sehen.



Abbildung 41: Aufgedampfter Ciprofloxacinstreifen unter Fluoreszenzmikroskop

Die Aufnahme erfolgte durch ein 4-fach Objektiv ($NA = 0,1$) bei 15 s Belichtungszeit. Währenddessen wurde die Position des Laserstrahls manuell variiert, um Inhomogenitäten im Strahl wegzumitteln.

Da das Deckglas beim Bedampfen parallel zum Spalt und im Mikroskop parallel zur Kamera ausgerichtet war, kann die Aufnahme vertikal summiert werden, um das Profil zu erhalten. Um den Einfluss von Staubpartikeln und Verunreinigungen, die in der Fluoreszenzaufnahme deutlich sichtbar waren, zu minimieren, wurden die hellsten $0,1 \%$ aller Pixel und deren Umgebung mit einem Radius von $16 \mu\text{m}$ wurden von der Summierung ausgeschlossen. Der dazugehörige Quellcode ist in Kapitel 7.3 angefügt. Das resultierende Profil ist in Abbildung 42 zu sehen. Als Funktion zum Fitten kann man entweder eine physikalisch motivierte Überlagerung zweier Rechtecksfunktion²⁸ wählen

²⁸ Der rechteckige Spalt allein würde zu einer rechteckigen Intensitätsverteilung führen. Der anfangs erwähnte Parallaxenfehler sorgt durch das gleichmäßige Abrastern des beschichteten Vakuumfensters für eine in erster Näherung rechteckige Verbreiterung. Gefaltet ergeben die Verteilungen eine symmetrische Trapezverteilung.

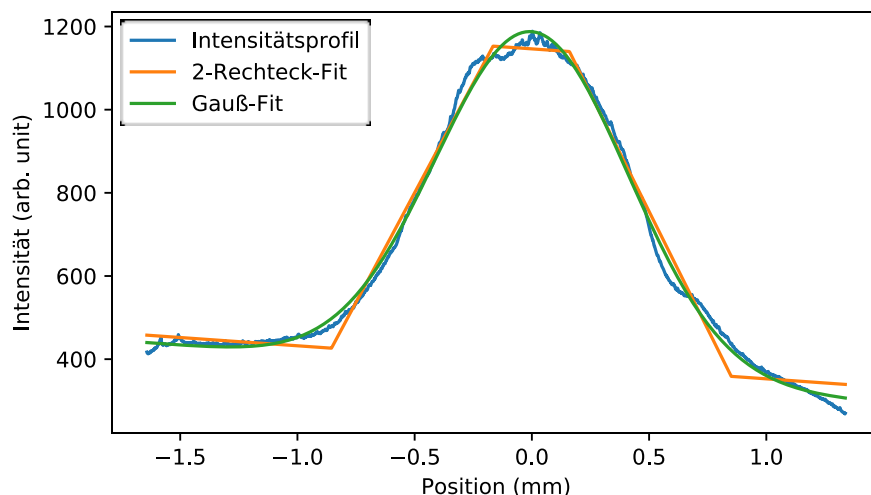


Abbildung 42: Intensitätsprofil der Fluoreszenz aus Abbildung 41 vertikal gemittelt

Das Profil wurde einerseits mit einer Faltung zweier verschiedener Rechtecksfunktionen und andererseits mit einer Gauß-Verteilung gefittet. In beiden Fällen wurde dabei ein linearer Untergrund angenommen.

Breite der beiden gefalteten rechtecksförmigen Verteilungen: 0,7 mm und 1,0 mm ($\pm 0,1$ mm)

Breite der Gauß-Verteilung (FWHM): 1,0 mm ($\pm 0,1$ mm)

oder eine Gaußfunktion. Der ersten Fall führt gefittet zu Breiten von 0,7 mm und 1,0 mm bei einer geschätzten Unsicherheit²⁹ von 0,1 mm, was grob mit den erwarteten Werten³⁰ übereinstimmen würde. Nimmt man als Modellverteilung eine Normalverteilung an, erreicht bei einer FWHM von 1,0 mm mit einer Unsicherheit von 0,1 mm eine höhere Übereinstimmung als mit dem physikalisch motivierten Modell.

Unabhängig von der genauen Form der Verteilung des Antibiotikums gilt es, diese auf die Bakterien zu übertragen. Da diese für das Wachstum allerdings eine feuchte Umgebung benötigen, ist es notwendig, das Glasplättchen mit dem Muster aus Ciprofloxacin letzten Endes in Kontakt mit Wasser zu bringen (siehe Kapitel 4.7). Um zu testen, ob dieser Kontakt für ein Verschwimmen des Musters sorgen würde, wurde ein auf einem Glasplättchen aufgedampfter Streifen aus Ciprofloxacin in Kontakt mit einer rund 0,15 mm dicken Agarschicht³¹ gebracht. Beim Aufbringen des Glasplättchens auf den Agar entstanden jedoch Strukturen im Agar, die unter dem Fluoreszenzmikroskop für einen unruhigen Untergrund sorgten. Aufgrund dieses Untergrundes konnte der möglicherweise veränderte Streifens jedoch nicht beobachtet werden.

²⁹ Die Unsicherheit des Fits per se wäre zwar um zwei Größenordnungen kleiner, jedoch liegt man bereits außerhalb dieser Schranken, sobald man den Untergrund etwas anders – beispielsweise quadratisch – modelliert.

³⁰ Erwartet wurden einerseits die Breite des verwendeten Spaltes und andererseits die Breite des abgerasterten Bereichs am Vakuumfenster, projiziert auf das Glasplättchen.

³¹ Um die Autofluoreszenz des Agars zu reduzieren, wurde anstatt der 1 mm dicken Agar-Pads eine 150 μ m dünne, feuchte Schicht auf einen Objektträger aufgetragen. Die Herstellung erfolgte ähnlich zu Kapitel 4.4, wobei zwecks Erhalts der Feuchtigkeit Variante A gewählt wurde, die Agarschicht also zwischen zwei Objektträgern mit zwei Deckgläsern als Abstandhalter gegossen wurde.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte somit die Form des antibiotischen Streifens nach Aufdampfung im Vakuum vermessen werden. Offen blieb, wie sich diese verändert, wenn der Streifen in Kontakt mit der Feuchtigkeit des Agars kommt. Unabhängig davon wurde die unmittelbare Auswirkung des Antibiotikastreifens auf *E. coli*-Bakterien untersucht. Hierzu wurde ein 1 mm dickes Agar-Pad mit Bakterien beschichtet und auf dieses das bedampfte Glasplättchen gelegt. Um die Auswirkung der zwischen Agar und Glasplättchen befindlichen Flüssigkeit auf den Streifen möglichst gering zu halten, wurde das Glasplättchen dabei leicht gekippt aufgelegt, sodass ein Ende des Streifens vor dem anderen in Kontakt mit der im Agar enthaltenen Flüssigkeit kam und das Ciprofloxacin somit maximal längs des Streifens verwischt werden würde. Nach der Kontrolle mithilfe des Mikroskops wurde diese Anordnung in einer Petrischale mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % bei 37 °C inkubiert (die befüllte Petrischale ist in Abbildung 35 zu sehen). Vier Stunden später wurde die Probe wieder herausgenommen und das Wachstum untersucht. Bakterien wuchsen dabei auf der ganzen anfangs mit Bakterien bedeckten Fläche, auch dort, wo diese in Kontakt mit Ciprofloxacin kommen hätten sollen. Zusätzlich war anhand einzelner, frei beweglicher Bakterien erkennbar, dass der Agar bei 100 % Luftfeuchtigkeit so viel Feuchtigkeit aufgenommen haben muss, dass ein Flüssigkeitsstrom zwischen Agar-Pad und Deckglas auftrat³². In dieser Hinsicht empfiehlt es sich verschiedene Luftfeuchtigkeiten in der Petrischale zu versuchen, um sowohl Austrocknung als auch Kondensation an der Probe möglich lange zu vermeiden³³.

Auch wenn keine weiteren, wesentlichen Änderungen mehr zu erwarten waren, wurde die Probe für zwölf weitere Stunden in den Inkubator gegeben und anschließend erneut untersucht. Das Wachstum war dabei erwartungsgemäß fortgeschritten, diesmal war allerdings zusätzlich eine Region reduzierten Wachstums identifizierbar, welche mit der ursprünglichen Lage des Ciprofloxacin-Streifens übereinstimmte.

³² Dieser Effekt wurde mit den bedeckten Agar-Pads zuvor noch nie beobachtet.

³³ Es sei dabei darauf hingewiesen, dass die Luftfeuchtigkeit im Falle der mit Glas bedeckten Agar-Pads eine wesentlich geringere Rolle spielt als beim Aufbau aus Kapitel 4.6.

5 Datenverarbeitung

5.1 Mikroskopie

Für sämtliche mikroskopischen Untersuchungen wurde ein *Zeiss Axioskop 2* verwendet, an welches eine *Andor Neo 5.5 sCMOS*-Kamera angeschlossen war. Das Fluoreszenzmikroskop war dabei einerseits mit einer Auflicht- (100 W Quecksilberdampf Lampe), als auch mit einer Durchlichtbeleuchtung (LED) ausgestattet. Um eine intensivere Ausleuchtung der Probe zu erzielen, wurde für die Durchlichtbeleuchtung ein Kondensor aus zwei plankonvexen Linsen ($f = 20\text{ mm}$) gebaut. Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mittels des Programms *Andor SOLIS* getätigt. Das umfasst neben den reinen Aufnahmen auch Hintergrundbilder und im Falle von Durchlichtaufnahmen Referenzbilder. Durch Subtraktion des Hintergrundbildes ist es dabei möglich den auftretenden Untergrund aus der Aufnahme zu subtrahieren. Dieser besteht einerseits aus thermisch bedingtem Rauschen und andererseits aus dem technisch bedingten Offset, der im kamerainternen Vorverstärker addiert wird. Dividiert man das Resultat durch die Differenz von Referenzaufnahme und Hintergrundbild, ist es zusätzlich möglich, Helligkeitsschwankungen³⁴ innerhalb der Aufnahme zu kompensieren.

5.2 Automatisierte Auswertung

Um die mikroskopischen Aufnahmen der Bakterien objektiv auswerten zu können, ohne die einzelnen Bakterien von Hand identifizieren zu müssen, wurde eine eigene Programmbibliothek entwickelt. Es gibt bereits einige vorgefertigte Lösungen³⁵, doch wurden unter anderem für zukünftige Weiterentwicklungen eigene Algorithmen entwickelt.

5.2.1 Detektion der Bakterien

Um Bakterien auf einem Foto, beispielsweise aus Abbildung 43/1, zu detektieren, ist der erste Schritt, den Bildhintergrund zu entfernen. Auch wenn mittels Referenzaufnahmen ein Teil der Störungen entfernt wird, trifft dies nicht auf in der Probe auftretende Strukturen zu, wie etwa Inhomogenitäten des Agars. Aus diesem Grund wird als erstes ein Hochpassfilter auf die Aufnahme angewandt, indem vom Bild eine per Gauß-Filter weichgezeichnete Version subtrahiert wird. Dadurch werden großskalige Strukturen abgezogen, während kleinräumige Strukturen wie einzelne Bakterien erhalten bleiben. Als nächstes werden die verbleibenden Graustufen unter Festlegung eines Schwellenwertes in ein Schwarz-Weiß-Bild konvertiert. Da unter anderem aufgrund von Rauschen im Bild nicht nur Bakterien überbleiben, muss das Bild noch einem sogenannten Erosions- und Dilationsfilter unterzogen werden. Der Erosionsfilter schrumpft vorhandene Strukturen, wodurch Strukturen, die durch das Rauschen bedingt

³⁴ Bei diesen Schwankungen handelt es sich einerseits um sensor- und staubbedingte Schwankungen der Empfindlichkeit, andererseits führt die ungleichmäßige Beleuchtung zu einer unterschiedlichen Ausleuchtung des Sensors.

³⁵ Ein Beispiel dafür wäre die Open-Source-Software *OpenCFU* (Geissmann, 2013).

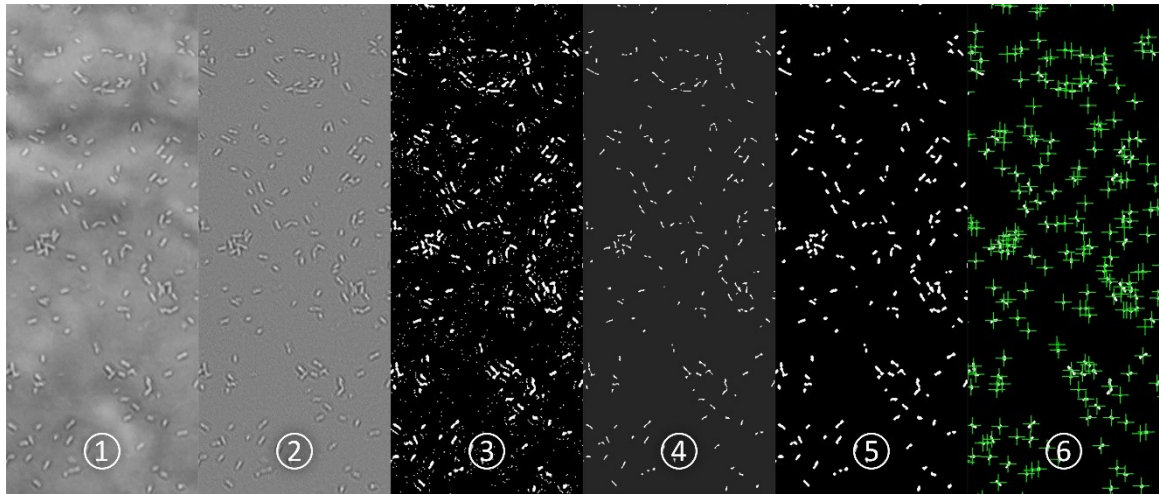


Abbildung 43: Vom mikroskopischen Foto zu den detektierten Bakterien

Ausgehend von der ursprünglichen Aufnahme (1) wird als erstes ein Hochpassfilter angewandt (2) und die Aufnahme per Schwellenwert binarisiert (3). Mittels eines Erosionsfilters werden die Strukturen anschließend verkleinert (4), wobei die kleinsten Strukturen, welche hauptsächlich vom Rauschen kommen, verloren gehen. Die übrigen Strukturen werden mittels Dilatationsfilter wieder vergrößert (5) und die Objekte anschließend detektiert (6).

sind, aufgrund ihrer kleinen Größe verschwinden. Mittels des Dilatationsfilters werden die verbleibenden Strukturen wieder auf deren ursprüngliche Größe erweitert. Zur Detektion der Bakterien kann man die Konturen der resultierenden Strukturen extrahieren (Suzuki et al., 1985) um daraus die einzelnen zusammenhängenden Elemente zu erhalten, wie etwa in *OpenCV* (Bradski, 2000) implementiert ist. Bei diesen Elementen handelt es sich entweder um einzelne oder zu Kolonien zusammengewachsenen Bakterien. Im Falle einer Bakterienkolonie kann man aus der Fläche bei Kenntnis der durchschnittlichen Bakteriengröße die Anzahl der Bakterien in der Kolonie bestimmen. Bei Beobachtungsserien ließe sich so das Wachstum der jeweiligen Bakterienkolonien quantifizieren.

5.2.2 Focus stacking

Da die Oberflächen der Agar-Pads nicht immer ausreichend parallel sind, besteht beim Mikroskopieren oft das Problem, dass es nicht möglich ist, auf alle Bakterien im Blickfeld gleichzeitig scharf zu stellen. In solch einem Fall ist es sinnvoll, von derselben Stelle mehrere Aufnahmen mit unterschiedlicher Fokussierung aufzunehmen. Um diese Aufnahmen zusammenzufügen, benötigt es einen Algorithmus, welcher die Schärfe der einzelnen Bereiche des Bildes beurteilt und die schärfsten Teile der Aufnahmen miteinander kombiniert. Die quantifizierte Schärfe der einzelnen Bildbereiche kann man dabei als Bild mit gleicher Größe wie die ursprüngliche Aufnahme darstellen, dem „Schärfebild“.

Als Maß für die Schärfe könnte die Änderung der Intensität zwischen den einzelnen Pixel herangezogen werden. Bei scharfen Aufnahmen ändert sich die Intensität in einem kleinen Bereich stark, während sie sich im Fall von unscharfen Aufnahmen über einen weiten Bereich langsam ändert. Wählt man als Schärfebild die pixelweise Änderung der Intensität der ursprünglichen Aufnahme, würde man im zusammengefügt Bild zwar scharfe Kanten erhalten, die allerdings von Halos der unscharfen Aufnahmen umgeben

sind. Deshalb wäre es sinnvoll, das Schärfebild mittels eines Weichzeichners zu verschmieren. Dadurch würde aber der Unterschied zwischen scharfen und unscharfen Kanten verschwinden. Um sowohl den Wert der Änderung als auch die Größe des Bereiches, über den sich die Intensität ändert, miteinzubeziehen, wurde der Ansatz gewählt, den Weichzeichner auf das pixelweise logarithmierte Bild anzuwenden und anschließend pixelweise die Exponentialfunktion auszuwerten. Die Berechnung wird dadurch im Vergleich zu einfachen Faltungsmatrizen sehr rechenintensiv. Da der Algorithmus allerdings nicht in Echtzeit laufen muss, stellt dies kein Problem dar. Abschließend wird das auf diese Weise berechnete Schärfebild weichgezeichnet, um beim anschließenden pixelweisen Vergleich der Schärfebilder zwischen den einzelnen Aufnahmen möglichst geradlinige Trennungen zu erzeugen.

Alternativ zu dem eigenen Algorithmus wurde auch die Focus stacking-Funktion von *Adobe Photoshop* getestet. Im Falle der Bakterienaufnahmen lieferte der oben beschriebene Algorithmus jedoch wesentlich bessere Ergebnisse.

5.2.3 Ausrichtung der Bilder

Für Aufnahmen größer als das mikroskopische Sichtfeld benötigt es einen Algorithmus, mit dessen Hilfe mehrere Aufnahmen zu einem großen Bild nahtlos zusammengefügt werden können. Das Problem kann dabei auf die Zusammenfügung zweier Aufnahmen reduziert werden. Der wichtigste Teil dabei ist die Bestimmung der Ausrichtung der Bilder zueinander. Die allgemeine Vorgehensweise dabei ist, als erstes in den Bildern die Position charakteristischer Punkte sowie eine Beschreibung ihrer Umgebung zu finden. Die Beschreibungen werden verglichen und die dominantesten Übereinstimmungen zwischen den Bildern ausgesucht. Anschließend wird versucht, eine Transformation zwischen den Bildern zu finden, welche den Großteil der Übereinstimmungen abdeckt.

Im Falle der Bakterienaufnahmen wurde als Ausgangsbild der 2D-Laplaceoperator auf die hochpassgefilterten Aufnahmen angewandt, wodurch die Kanten hervorgehoben werden. Alternativ wurde auch versucht die hochpassgefilterten Aufnahmen oder deren per Schwellenwert binarisierte Variante zur Übereinstimmung zu bringen, doch zeigten sich hierbei deutliche Probleme, falls die beiden Bilder unterschiedlich gut fokussiert aufgenommen wurden³⁶. Als charakteristische Punkte werden mittels *OpenCV* die prominentesten Ecken in den Konturen erfasst (Shi et al., 1994). Zur Beschreibung der Umgebung dieser Ecken wurde der Algorithmus ORB (Oriented FAST and Rotated BRIEF) verwendet (Rublee et al., 2011). Mittels FLANN (Fast Approximate Nearest Neighbor) wird anschließend nach Übereinstimmungen gesucht (Muja et al., 2009) und mittels RANSAC (Random Sample Consensus) (Fischler et al., 1981) versucht, eine Transformation bestehend aus Drehung, Skalierung und Verschiebung zwischen den beiden Aufnahmen zu finden. Wendet man diese Transformation auf eines der beiden Bilder an und führt im überlappenden Bereich Focus stacking durch, erhält man ein nahtloses Panoramabild. Damit ist es möglich, das Verhalten von Bakterien auf einem Bereich zu quantifizieren, der größer als das Sichtfeld des Mikroskops ist.

³⁶ Je nach Lage des Fokus relativ zu den Bakterien erscheinen sie im Durchlicht heller oder dunkler als ihre Umgebung.

5.2.4 Bestimmung des Wachstums

Um das stattgefunden Wachstum der Bakterien zu dokumentieren, werden in regelmäßigen Abständen Aufnahmen getätigt. Es bietet sich an, das zwischen den Aufnahmen stattgefunden Wachstum farblich zu codieren, um einen visuellen Überblick über diese Aufnahmen zu erhalten (siehe Abbildung 33 und Abbildung 36). Hierfür werden als erster Schritt die Aufnahmen anhand des in Kapitel 5.2.3 besprochenen Algorithmus zueinander ausgerichtet. Es zeigt sich dabei, dass der Algorithmus sich zur Ausrichtung automatisch an den nicht wachsenden Bakterien orientiert. Die Aufnahmen werden anschließend wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben binarisiert. Mit der jüngsten Aufnahme beginnend werden die als Bakterien erkannten Bereiche farblich ins fertige Bild eingetragen. Dabei ist es vorteilhaft, für die älteste Aufnahme, also dem Ursprung des Wachstums, Weiß oder Schwarz zu wählen. Eine manuelle Auswertung dieser Überlagerung ist einfach möglich, da der Unterschied zwischen nicht wachsenden und wachsenden Bakterien im Allgemeinen deutlich erkennbar ist.

Bei einer Zunahme der auszuwertenden Datenmenge ließe sich diese Auswertung auch relativ einfach automatisieren. Hierfür werden als erstes mittels der in *OpenCV* implementierten Algorithmen Lage und Fläche der als Bakterien erkannten Bereiche extrahiert. Zwischen je zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen wird überprüft, ob eine 1:1 Korrespondenz vorliegt: Ein in der Aufnahme $n + 1$ erkannter Bereich sollte mit genau einem in Aufnahme n erkannten Bereich überlappen. In diesem Fall genügt es, die Änderung der Fläche zu beobachten. Falls ein Überlapp mit mehreren Bereichen vorliegt, handelt es sich um ein Zusammenwachsen mehrerer Bakterienkolonien. Das Wachstum der ursprünglich einzelnen Kolonien kann in diesem Fall nicht mehr individuell quantifiziert werden.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals Bragg-Beugung von Molekülen erzielt. Diese Form der Beugung könnte in einer optimierten Version genutzt werden, um ein geschlossenes Molekülinterferometer mit zwei räumlich voneinander getrennten Armen zu entwickeln. Dies wiederum würde die Messung von topologischen Effekten wie dem Aharonov-Bohm-Effekt (Aharonov et al., 1959) mit Molekülen ermöglichen, die sich in Chiralität, innerer Anregung oder Konformation unterscheiden

Zudem wurde ein aus Bakterien bestehender ortsauflösenden Detektor entwickelt, der für mehrere Stunden Hochvakuum ausgesetzt werden kann. Gezeigt wurde auch, dass rund ein Drittel der Bakterien diese Vakuumexposition überleben und anschließend ihr Wachstum fortsetzen. In einem Versuch wurde weiters qualitativ eine Sensitivität dieses Detektors gegenüber dem Antibiotikum Ciprofloxacin festgestellt.

Theoretisch sollte es somit bereits jetzt möglich sein, das Beugungsbild von Ciprofloxacin im Vakuum auf dem Detektor zu deponieren und mittels Wachstumes nachzuweisen. In der Praxis ist es allerdings aufgrund der langen Laufzeit dieses Experimentes sinnvoll, davor die Reproduzierbarkeit und Effizienz des bakteriellen Detektors weiter zu erhöhen.

Dieses Experiment trägt mit dem dabei gewonnenen Know-how dazu bei, weitere Experimente an der Schnittstelle zwischen Quantenphysik und Biologie zu ermöglichen. Für die nähere Zukunft wäre ein solches die Beugung um Lebewesen, im speziellen Bakterien. Langfristig könnte es möglich sein, Lebewesen wie Bakterien nicht nur zur Detektion oder der Formung einer Beugungsstruktur zu nutzen, sondern anstelle des Molekularstrahls zur Interferenz zu bringen. Damit hätte man ein mikrobiologisches Pendant zu Schrödingers Katze geschaffen.

Literaturverzeichnis

- Abo-Shaeer, J. R. et al. 2005.** Coherent molecular optics using ultracold sodium dimers. *Phys Rev Lett.* 2005, Bd. 94 (4), S. 040405.
- Aharonov, Yakir und Bohm, David. 1959.** Significance of Electromagnetic Potentials in the Quantum Theory. *Phys. Rev.* 1959, Bd. 115 (3), S. 485-491.
- Andor. 2008.** *iXon+ 885 - Features & benefits.* 2008.
- Arndt, Markus et al. 1999.** Wave-particle duality of C60 molecules. *Nature.* 1999, Bd. 401 (6754), S. 680-682.
- ATCC. 2018.** *Escherichia coli (ATCC 25922) - Product Sheet.* <https://www.atcc.org/~ps/25922.ashx>: American Type Culture Collection, 2018.
- Bar-On, Yinon M., Phillips, Rob und Milo, Ron. 2018.** The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018, Bd. 115 (25), S. 6506-6511.
- Blount, Zachary D. 2015.** The unexhausted potential of E. coli. *eLife.* 2015, Bd. 4, S. e05826.
- Bordé, Ch.J. 1989.** Atomic interferometry with internal state labelling. *Physics Letters A.* 1989, Bd. 140 (1), S. 10-12.
- Bradski, G. 2000.** The OpenCV Library. *Dr. Dobb's Journal of Software Tools.* 2000.
- Bragg, William Henry und Bragg, William Lawrence. 1913.** The reflection of X-rays by crystals. *Proc. Royal Soc. Lond. Series A.* 1913, Bd. 88 (605), S. 428-438.
- Brand, Christian et al. 2015.** An atomically thin matter-wave beamsplitter. *Nat. Nanotechnol.* 2015, Bd. 10, S. 845-848.
- Brand, Christian et al. in Vorb..** Bragg diffraction of large organic molecules. in Vorb.
- Bücker, H. und Horneck, G. 1969.** Untersuchungen über die Wirkung von Vakuum und Strahlung auf Escherichia coli. *Biophysik.* 1. Auflage, 1969, Bd. 6, S. 69-75.
- Bucksbaum, P. H., Schumacher, D. W. und Bashkansky, M. 1988.** High-Intensity Kapitza-Dirac Effect. *Phys. Rev. Lett.* 1988, Bd. 61 (10), S. 1182-1185.
- Chalkley, L. J. und Koornhof, H. J. 1985.** Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985, Bd. 28 (2), S. 331-342.
- CLSI. 2017.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27, 2017, (CLSI supplement M100), S. 163. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colville, Keegan et al. 2010.** Effects of Poly(l-lysine) Substrates on Attached *Escherichia coli* Bacteria. *Langmuir.* 2010, Bd. 26 (4), S. 2639-2644.
- Cotter, J. P. et al. 2015.** Coherence in the presence of absorption and heating in a molecule interferometer. *Nat. Commun.* 2015, Bd. 6, S. 7336.

- Cotter, Joseph P. et al. 2017.** In search of multipath interference using large molecules. *Science Advances*. 2017, Bd. 3 (8).
- Cox, C. S. 1993.** Roles of water molecules in bacteria and viruses. *Orig. Life Evol. Biospheres*. 1993, Bd. 23 (1), S. 29-36.
- Davisson, C. und Germer, L. H. 1927.** Diffraction of Electrons by a Crystal of Nickel. *Phys. Rev.* 1927, Bd. 30 (6), S. 705-740.
- de Broglie, Louis. 1923.** Waves and Quanta. *Nature*. 1923, Bd. 112, S. 540.
- Delgado, Eduardo J. 2018.** A Computational Chemistry Approach for the Catalytic Cycle of AHAS. [Buchverf.] Takashiro Akitsu. *Symmetry (Group Theory) and Mathematical Treatment in Chemistry*. Rijeka: IntechOpen, 2018, 8.
- Doktycz, M.J. et al. 2003.** AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy*. 2003, Bd. 97 (1), S. 209-216.
- Dörre, Nadine et al. 2014.** Photofragmentation Beam Splitters for Matter-Wave Interferometry. *Phys. Rev. Lett.* 2014, Bd. 113 (23), S. 233001.
- Dose, Klaus und Gill, Markus. 1995.** Dna stability and survival of bacillus subtilis spores in extreme dryness. *Orig. Life Evol. Biospheres*. 1995, Bd. 25 (1-3), S. 277-293.
- Drlica, Karl et al. 2009.** Quinolones: Action and Resistance Updated. *Curr. Top. Med. Chem.* 2009, Bd. 9 (11), S. 981-998.
- Dürr, Stephan, Kunze, Stefan und Rempe, Gerhard. 1996.** Pendellösung oscillations in second-order Bragg scattering of atoms from a standing light wave. *J Opt B Quantum Semiclassical Opt.* 1996, Bd. 8 (3), S. 531-539.
- Eibenberger, Sandra et al. 2013.** Matter-wave interference of particles selected from a molecular library with masses exceeding 10 000 amu. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, Bd. 15 (35), S. 14696-14700.
- Estermann, I. und Stern, O. 1930.** Beugung von Molekularstrahlen. *Z. Phys.* 1930, Bd. 61 (1-2), S. 95-125.
- Finkel, Steven E. 2006.** Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006, Bd. 4 (113), S. 113-120.
- Fischler, Martin A. und Bolles, Robert C. 1981.** Random sample consensus: a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Commun. ACM*. 1981, Bd. 24 (6), S. 381-395.
- Freimund, Daniel L. und Batelaan, Herman. 2002.** Bragg Scattering of Free Electrons Using the Kapitza-Dirac Effect. *Phys. Rev. Lett.* 2002, Bd. 89 (28), S. 283602.
- Geissmann, Quentin. 2013.** OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects. *PLOS ONE*. 2013, Bd. 8 (2), S. 1-10.
- Gould, Phillip L., Ruff, George A. und Pritchard, David E. 1986.** Diffraction of atoms by light: The near-resonant Kapitza-Dirac effect. *Phys. Rev. Lett.* 1986, Bd. 56 (8), S. 827-830.

- Greenspan, Lewis. 1977.** Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sec. A.* 1977, Bd. 81A (1), S. 89-96.
- Guivarc'h, A. et al. 1996.** In situ detection of expression of the *gus* reporter gene in transgenic plants: ten years of blue genes. *Transgenic Res.* 1996, Bd. 5 (5), S. 281-288.
- Hackermüller, Lucia et al. 2004.** Decoherence of matter waves by thermal emission of radiation. *Nature.* 2004, Bd. 427, S. 711-714.
- Haslinger, Philipp et al. 2013.** A universal matter-wave interferometer with optical ionization gratings in the time domain. *Nature Physics.* 2013, Bd. 9, S. 144-148.
- Hiasa, Hiroshi, Yousef, Diana O. und Mariani, Kenneth J. 1996.** DNA Strand Cleavage Is Required for Replication Fork Arrest by a Frozen Topoisomerase-Quinolone-DNA Ternary Complex. *J Biol. Chem.* 1996, Bd. 271 (42), S. 26424-26429.
- Horneck, Gerda, Klaus, David M. und Mancinelli, Rocco L. 2010.** Space Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010, Bd. 74 (1), S. 121-156.
- Juffmann, Thomas et al. 2012.** Real-time single-molecule imaging of quantum interference. *Nat. Nanotechnol.* 2012, Bd. 7, S. 297-300.
- Kapitza, P. L. und Dirac, P. A. M. 1933.** The reflection of electrons from standing light waves. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* 1933, Bd. 29 (2), S. 297-300.
- Knobloch, Christian et al. 2017.** On the role of the electric dipole moment in the diffraction of biomolecules at nanomechanical gratings. *Fortschr. Phys.* 2017, Bd. 65 (6-8), S. 1600025.
- Kozuma, M. et al. 1999.** Coherent Splitting of Bose-Einstein Condensed Atoms with Optically Induced Bragg Diffraction. *Phys. Rev. Lett.* 1999, Bd. 82 (5), S. 871-875.
- Kunze, S., Dürr, S. und Rempe, G. 1996.** Bragg scattering of slow atoms from a standing light wave. *Europhys. Lett.* 1996, Bd. 34 (5), S. 343-348.
- Larisch, Wolfgang et al. 2011.** Proton beam writing of microstructures in Agar gel for patterned cell growth. *Nucl Instrum Methods Phys Res B.* 2011, Bd. 269 (20), S. 2444-2447.
- Llorens, Juana María Navarro, Tormo, Antonio und Martínez-García, Esteban. 2010.** Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010, Bd. 34 (4), S. 476-495.
- Lonergan, N.E., Britt, L.D. und Sullivan, C.J. 2014.** Immobilizing live *Escherichia coli* for AFM studies of surface dynamics. *Ultramicroscopy.* 2014, (137), S. 30-39.
- Madar, Daniel et al. 2013.** Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC Syst. Biol.* 2013, Bd. 7, S. 136.
- Martin, Peter J. et al. 1988.** Bragg scattering of atoms from a standing light wave. *Phys. Rev. Lett.* 1988, Bd. 60 (6), S. 515-518.
- Mason, D J et al. 1995.** Antibacterial Action of Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, Bd. 39 (12), S. 2752-2758.

Mazia, D, Schatten, G und Sale, W. 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 1975, Bd. 66 (1), S. 198-200.

McFarland, Joseph. 1907. The Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*. 1907, Bd. XLIX (14), S. 1176-1178.

Muja, Marius und Lowe, David G. 2009. Fast approximate nearest neighbors with automatic algorithm configuration. In *VISAPP International Conference on Computer Vision Theory and Applications*. 2009, S. 331-340.

Nairz, Olaf et al. 2001. Diffraction of Complex Molecules by Structures Made of Light. *Phys. Rev. Lett.* 2001, Bd. 87 (16), S. 160401.

Niven, Gordon W. und El-Sharoud, Walid M. 2008. Ribosome Modulation Factor. [Buchverf.] Walid M. El-Sharoud. *Bacterial Physiology: A Molecular Approach*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008, 10, S. 297.

piezosystem jena GmbH. 2017. *Datenblatt PSH x/2*. https://www.piezosystem.de/fileadmin/redakteure/datenblatt/Piezo%20Aktoren%20Nano-Positioniersysteme/Spiegelkippsysteme/PSH%20x%202/PSH_5-10_2_db_Rev03_2017_10_05.pdf: piezosystem jena GmbH, 2017.

Pletnev, P et al. 2015. Survival guide: Escherichia coli in the stationary phase. *Acta Naturae*. 2015, Bd. 7 (4), S. 22-33.

Ramprasad, R. und Shi, N. 2006. Polarizability of phthalocyanine based molecular systems: A first-principles electronic structure study. *Appl Phys Lett*. 2006, Bd. 88, S. 222903.

Record, B. R., Taylor, R. und Miller, D. S. 1962. The Survival of Escherichia coli on Drying and Rehydration. *Microbiology*. 1962, Bd. 28 (4), S. 585-598.

Roostalu, Johanna et al. 2008. Cell division in Escherichia colicultures monitored at single cell resolution. *BMC Microbiology*. 2008, Bd. 8, S. 68.

Rublee, Ethan et al. 2011. ORB: an efficient alternative to SIFT or SURF. *Proc. Int. Conference Computer Vision*. 2011, S. 2564-2571.

Schultz, Daniel und Kishony, Roy. 2013. Optimization and control in bacterial Lag phase. *BMC Biology*. 2013, Bd. 11 (120).

Sclafani, Michele et al. 2013. Quantum coherent propagation of complex molecules through the frustule of the alga *Amphipleura pellucida*. *New J. Phys.* 2013, Bd. 15 (083004).

Shi, J. und Tomasi, C. 1994. Good Features to Track. *Proc IEEE Comput Soc Conf Comput Vis Pattern Recognit.* 1994, S. 593-600.

Skinner, Samuel O et al. 2013. Measuring mRNA copy number in individual Escherichia coli cells using single-molecule fluorescent in situ hybridization. *Nat. Protoc.* 2013, Bd. 8, S. 1100-1113.

- Sonntag, Dieter. 1990.** Important new Values of the Physical Constants of 1986, Vapour Pressure Formulations based on ITS-90, and Psychrometer Formulae. *Z Meteorol.* 1990, Bd. 40 (5), S. 340-344.
- Suzuki, Satoshi und Abe, Keiichi. 1985.** Topological structural analysis of digitized binary images by border following. *Comput. Gr. Image Process.* 1985, Bd. 30 (1), S. 32-46.
- Szigeti, S S et al. 2012.** Why momentum width matters for atom interferometry with Bragg pulses. *New J. Phys.* 2012, Bd. 14, S. 023009.
- Talbot, H.F. 1836.** Facts relating to optical science. No. IV. *London, Edinb. Dubl. Phil. Mag.* 1836, Bd. 9 (56), S. 401-407.
- Taniguchi, Masahiko und Lindsey, Jonathan S. 2018.** Database of Absorption and Fluorescence Spectra of >300 Common Compounds for use in PhotochemCAD. *Photochem. Photobiol.* 2018, Bd. 94, S. 290-327.
- Taschdjian, Claire L. 1954.** Simplified Technique for Growing Fungi in Slide Culture. *Mycologia.* 1954, Bd. 46 (5), S. 681-683.
- von Halban, H. und Preiswerk, P. 1936.** Preuve Expérimentale de la Diffraction des Neutrons. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 1936, Bd. 203, S. 73-75.
- Watson, James D. et al. 2011.** *Molekularbiologie.* 6. Auflage, München: Pearson Studium, 2011. S. 149-151. ISBN 978-3-86894-029-9.
- Yeagle, Philip. 2016.** *The Membranes of Cells.* 3. Auflage, New York: Academic Press, 2016. S. 32-33.
- Zimbro, Mary Jo et al. 2009.** *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media.* 2. Auflage, Sparks, Maryland: BD Diagnostics - Diagnostic Systems, 2009. S. 3.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (schematisch): Gitterbeugung im Fernfeld	6
Abbildung 2 (schematisch): Gitterbeugung im Nahfeld	6
Abbildung 3 (schematisch): Übergang vom Nah- zum Fernfeld	7
Abbildung 4 (schematisch): Intensitätsverteilung einer stehenden Lichtwelle	8
Abbildung 5: Versuchsaufbau für die Bragg-Beugung im Überblick	11
Abbildung 6: Quelle des verwendeten Molekularstrahls.....	12
Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen des beschichteten Vakuumfensters.....	13
Abbildung 8: Funktionsprinzip der Geschwindigkeitsaufspaltung	14
Abbildung 9: Detektion der Moleküle durch Fluoreszenzmikroskopie.....	15
Abbildung 10: Strahlentrennung des rückreflektierten Strahls	17
Abbildung 11: Optik für den Gitterlaser	17
Abbildung 12: Spiegelhalter für das Bragg-Lichtgitter, Foto (l) und schematisch (r).....	18
Abbildung 13: Justage des Molekularstrahls (Ansicht von oben)	19
Abbildung 14: Optimierung der Spiegelausrichtung relativ zum Molekularstrahl.....	20
Abbildung 15: Winkelabhängigkeit der Beugung	23
Abbildung 16: Bragg-Beugung von Phthaloyanin	23
Abbildung 17: Bragg-Beugung von Ciprofloxacin	24
Abbildung 18: Querschnitte der Bragg-Beugung	24
Abbildung 19: Änderung der Intensität von transmittiertem und gebeugtem Strahl	24
Abbildung 20 (schematisch): Wachstumskurve von Bakterien.....	26
Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme von E. coli (koloriert)	27
Abbildung 22: Von der Kryo- zur Übernachtskultur	29
Abbildung 23: Detektion von lebenden E. coli nach mehrstündiger Vakuumexposition	30
Abbildung 24: Herstellung von Agar-Pads mittels Objektträger.....	33
Abbildung 25: Halter zur Herstellung dünner Agarfilme	34
Abbildung 26: Durchlichtaufnahmen von E. coli in Nährlösung	34
Abbildung 27: Bakterienverteilung nach Rotationsbeschichtung	36
Abbildung 28 (schematisch): Feuchtigkeitskammer aus einer Petrischale	37
Abbildung 29: Kondensation am Deckel der Feuchtigkeitskammer.....	38
Abbildung 30: Wachstum auf Agar in der Feuchtigkeitskammer.....	39
Abbildung 31: Metallene Heizkammer für die Feuchtigkeitskammer im Querschnitt ..	41
Abbildung 32: Mit Agar und Bakterien beschichtetes Deckglas auf Agar-Pad	41
Abbildung 33: Bakterienwachstum zwischen Agar-Pad und Deckglas (Kompositum)...	42
Abbildung 34: Wachstum einer einzelnen Kolonie	43
Abbildung 35: Abgedecktes Agar-Pad in Feuchtigkeitskammer.....	43
Abbildung 36: Bakterienwachstum nach Vakuumexposition (Kompositum)	43
Abbildung 37: Testkammer zur Bedampfung mit Ciprofloxacin (schematisch)	45
Abbildung 38: Foto des betropften Vakuumfensters	46
Abbildung 39: Mikroskopaufnahme des benutzten Spaltes.....	46
Abbildung 40: Aufbau Fluoreszenzmikroskopie	46
Abbildung 41: Aufgedampfter Ciprofloxacinstreifen unter Fluoreszenzmikroskop	47
Abbildung 42: Intensitätsprofil der Fluoreszenz aus Abbildung 41 vertikal gemittelt ...	48
Abbildung 43: Vom mikroskopischen Foto zu den detektierten Bakterien	51

Anhang

7.1 Berechnung Geschwindigkeitsaufspaltung

Um den Zusammenhang zwischen der Position eines Moleküls am Detektor (y_d) und dessen Ausgangsgeschwindigkeit v zu ermitteln, benötigt es nur der Berechnung der Wurfparabel (siehe Abbildung 8). $y = 0$ wird dabei zweckdienlicher Weise so gewählt, dass es durch die auf gleicher Höhe liegende Molekülquelle und dem horizontalen Spalt läuft. Bezeichnet man mit v_y die Ausgangsgeschwindigkeit in y-Richtung, ergibt sich für die Zeitabhängigkeit der Höhe y der einzelnen Moleküle im Flug:

$$y(t) = v_y t - \frac{1}{2} g t^2 \quad (7.1.1)$$

Da die Detektorgröße gering im Vergleich zur Länge L der Distanz zwischen Quelle und Detektor ist, muss bei den Molekülen, welche den Detektor erreichen, für die Ausgangsgeschwindigkeit in x-Richtung (v_x) gelten, dass $v_x \gg v_y$. Bezeichnet man den Abstand zwischen Quelle und Spalt mit L_1 , so folgt mit der Näherung $x(t) = v_x t \approx vt$ und durch $y(x = L_1) = 0$:

$$v_y \frac{L_1}{v} - \frac{1}{2} g \frac{L_1^2}{v^2} = 0 \quad (7.1.2)$$

was in weiterer Folge in Gleichung 7.1.1 eingesetzt zu folgendem Zusammenhang führt:

$$y_d := y(x = L) = -\frac{1}{2} g \frac{L(L-L_1)}{v^2} \quad (7.1.3)$$

7.2 Simulation der Bragg-Beugung

Bragg-Beugung von Molekülen am Lichtgitter kann simuliert werden, indem man in Beugungsrichtung die zeitabhängige Schrödingergleichung für die Moleküle löst:

$$i\hbar \frac{\partial |\psi\rangle}{\partial t} = \hat{H} |\psi(t)\rangle \quad (7.2.1)$$

Der Hamiltonoperator $\hat{H}$ ist bei einer Molekülmasse m durch Gleichung 7.2.2 gegeben. Das Potenzial, welches durch das Lichtgitter mit Intensität I und der Polarisierbarkeit des Moleküls α zustande kommt, ist dabei durch Gleichung 2.2.3 gegeben.

$$\hat{H} = \frac{\hat{p}^2}{2m} + V(\hat{x}) \quad (7.2.2)$$

In der Ortsdarstellung erhält man somit für die Schrödingergleichung:

$$i\hbar \frac{\partial \psi(x,t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \psi(x,t)}{\partial x^2} + \frac{2\alpha}{c\epsilon_0} I(x,t) \psi(x,t) \quad (7.2.3)$$

t entspricht dabei der Flugzeit des Moleküls, welche mittels der Fluggeschwindigkeit v gemäß Gleichung 7.2.4 auch durch die Position z entlang des Molekularstrahls ausgedrückt werden kann, was in Gleichung 7.2.5 resultiert.

$$z = vt \quad (7.2.4)$$

$$i\hbar v \frac{\partial \psi(x,z)}{\partial z} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \psi(x,z)}{\partial x^2} + \frac{2\alpha}{c\epsilon_0} I(x,z) \psi(x,z) \quad (7.2.5)$$

$$I(x,y,z) = \frac{8P}{\pi w_y w_z} \exp\left(-2\frac{y^2}{w_y^2} - 2\frac{z^2}{w_z^2}\right) \cos^2(2k_L x) = \quad (7.2.6)$$

$$\underbrace{\frac{2P}{\pi w_y w_z} \exp\left(-2\frac{y^2}{w_y^2} - 2\frac{z^2}{w_z^2}\right)}_{=: A(z)} [e^{-4ik_L x} + 2 + e^{4ik_L x}]$$

Da die für das Lichtgitter durch Gleichung 2.2.1 bzw. 7.2.6 gegebene Intensität periodisch in x ist, ist es vorteilhaft, Gleichung 7.2.5 in einer Fourierreihe gleicher Periode zu entwickeln:

$$\psi(x,z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} c_n(z) e^{2ik_L n x} \quad (7.2.7)$$

In der Praxis entspricht dies ebenen Wellen mit Wellenzahlen $2k_L n$ und Intensitäten $|c_n|^2$. Will man sich allerdings nicht nur auf diskrete Winkel spezialisieren, kann man die Fourierreihe leicht abweichend definieren (Szigeti et al., 2012):

$$\psi(x,z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} c_n(z) e^{2ik_L (n+\delta n)x} \quad (7.2.8)$$

In Gleichung 7.2.5 eingesetzt liefert es:

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} i\hbar v \frac{\partial c_n(z)}{\partial z} e^{2ik_L n x} = \quad (7.2.9)$$

$$= \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left[\frac{2\hbar^2 k_L^2}{m} (n + \delta n)^2 c_n(z) e^{2ik_L n x} + \frac{2\alpha}{c\epsilon_0} A(z) c_n(z) (e^{2ik_L (n-2)x} + 2e^{2ik_L n x} + e^{2ik_L (n+2)x}) \right]$$

Durch partielle Verschiebung der Summe auf der rechten Seite von Gleichung 7.2.9 um ± 2 und anschließendem Koeffizientenvergleich ergibt sich:

$$i\hbar v \frac{\partial c_n}{\partial z} = \frac{2\hbar^2 k_L^2}{m} (n + \delta n)^2 c_n + \frac{4\alpha P}{\pi c \epsilon_0 w_y w_z} \exp\left(-2 \frac{y^2}{w_y^2} - 2 \frac{z^2}{w_z^2}\right) (c_{n+2} + 2c_n + c_{n-2}) \quad (7.2.10)$$

Diese Gleichung lässt sich numerisch leicht lösen. Um von einem einlaufenden Strahl im Winkel β auszugehen, benötigt man als erstes den entsprechenden Wert von $n + \delta n$. Hierfür genügt es, die Wellenzahl in x -Richtung ($2k_L(n + \delta n)$) mit der in Ausbreitungsrichtung des Molekularstrahls ($k = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{mv}{\hbar}$) zu vergleichen. Setzt man der Einfachheit halber $n = 0$, erhält man daraus Gleichung 7.2.11, durch welche δn fixiert ist:

$$\beta = \frac{2\hbar k_L \delta n}{mv} \quad (7.2.11)$$

Anschließend genügt es mit $c_n = \delta_{n,0}$ zu starten und c_n gemäß Gleichung 7.2.10 entlang der z -Achse numerisch zu integrieren. Man erhält so die Intensitäten $|c_n|^2$ in den jeweiligen Beugungsordnungen, wobei deren Winkel $\delta\beta$ relativ zum einfallenden Strahl gegeben sind durch:

$$\delta\beta_n = \frac{2\hbar k_L n}{mv} \quad (7.2.12)$$

7.3 Auswertung Ciprofloxacinstreifen (Python)

```
import numpy as np
import cv2
from scipy.optimize import curve_fit
import matplotlib.pyplot as plt

mm_per_pixel = 1 / 812 # measured; in theory pixel size divided by magnification

# load the image and throw away the outer regions containing the unusable edges
img = np.loadtxt('cipro stripe.asc')[70:-70, :]

mask = img < np.quantile(img, 0.999) # mask all oversaturated spots

# expand the mask by 10 pixels
structure = cv2.getStructuringElement(cv2.MORPH_ELLIPSE, (10, 10))
mask = cv2.erode(np.uint8(mask), structure)

# use the mask for calculating the weighted mean
profile = np.sum(img * mask, axis=1) / np.sum(mask, axis=1)

def fitfunc_background(x, d, k):
    '''Models a linear background'''
    return k * x + d

def fitfunc_2rect(x, w1, w2, x0, I, *param_bg):
    '''
    Convolution of two rects of widths `w1` and `w1 + dw` with a
    maximum of `I`, centered around `x0`, sitting on a background
    '''
    if w2 < w1:
        (w2, w1) = (w1, w2)
    two_rects = I * np.clip(((w1 + w2) / 2 - np.abs(x - x0)) / w1, 0, 1)
    return two_rects + fitfunc_background(x, *param_bg)

def fitfunc_gauss(x, w, x0, I, *param_bg):
    '''A Gaussian function with FWHM of `w`, sitting on a background'''
    sig = w / np.sqrt(8 * np.log(2)) # convert FWHM to sigma
    gauss = I * np.exp(-((x - x0) / sig)**2 / 2)
    return gauss + fitfunc_background(x, *param_bg)

x = np.arange(len(profile)) * mm_per_pixel # position in mm

par_gauss, cov_gauss = curve_fit(
    fitfunc_gauss,
    x,
    profile,
    [x[-1] / 2, x[-1] / 2, np.max(profile), np.min(profile), 0],
    bounds=(0, 0, 0, -np.inf, -np.inf, np.inf)
)
uncert_gauss = np.sqrt(np.diag(cov_gauss))

par_2rect, cov_2rect = curve_fit(
    fitfunc_2rect,
    x,
    profile,
    [par_gauss[0] * 2, *par_gauss],
    bounds=(0, 0, 0, 0, -np.inf, -np.inf, np.inf)
)
uncert_2rect = np.sqrt(np.diag(cov_2rect))
if par_2rect[1] < par_2rect[0]:
    (par_2rect[1], par_2rect[0]) = (par_2rect[0], par_2rect[1])
    (uncert_2rect[1], uncert_2rect[0]) = (uncert_2rect[0], uncert_2rect[1])
```

```
x_centered = x - par_gauss[1]
plt.figure(figsize=(16 * 0.4, 9 * 0.4))
plt.xlabel('Position (mm)')
plt.ylabel('Intensität (arb. unit)')
plt.plot(x_centered, profile, label='Intensitätsprofil')
plt.plot(x_centered, fitfunc_2rect(x, *par_2rect), label='2-Rechteck-Fit')
plt.plot(x_centered, fitfunc_gauss(x, *par_gauss), label='Gauß-Fit')
plt.legend(loc='upper left')
plt.savefig('cipro_stripe_plot.svg', bbox_inches='tight')

print('Gaussian FWHM: ({:.4f} +- {:.4f}) mm'.format(par_gauss[0], uncert_gauss[0]))
print('Rect width 1: ({:.4f} +- {:.4f}) mm'.format(par_2rect[0], uncert_2rect[0]))
print('Rect width 2: ({:.4f} +- {:.4f}) mm'.format(par_2rect[1], uncert_2rect[1]))
```

7.4 Verarbeitung Bakterienaufnahmen (Python)

```

import numpy as np
import cv2
from matplotlib import pyplot as plt

def readimages(filenamees, flatten=False):
    imgs = [np.float32(cv2.imread(f, cv2.IMREAD_GRAYSCALE)) for f in filenamees]
    if not flatten:
        return imgs
    imgs = np.array(imgs, dtype=float)
    imgs /= np.mean(imgs, axis=(1, 2))[:, np.newaxis, np.newaxis]
    return [highpass(img, 10) for img in imgs]

def highpass(src, sigma):
    return src - cv2.GaussianBlur(src, (0, 0), sigma)

def evaluate_features(src):
    src = src - cv2.GaussianBlur(src, (0, 0), 2)
    dx = np.abs(cv2.Sobel(src, -1, 1, 0))
    dy = np.abs(cv2.Sobel(src, -1, 0, 1))
    result = np.exp(cv2.GaussianBlur(np.log(
        np.hypot(dx, dy) + 1e-5
    ), (0, 0), 4))
    return result

def evaluate_sharpness(src, smoothing=10):
    clipped = evaluate_features(src)
    resized = cv2.resize(clipped, (100, 100))
    sharpness = cv2.GaussianBlur(resized, (0, 0), smoothing)
    return cv2.resize(sharpness, (src.shape[1], src.shape[0]))

def focus_stitch(images, images_to_display=None, return_sharpest_image=False,
    smoothing=10):
    if images_to_display is None:
        images_to_display = images
    sharpnesses = [evaluate_sharpness(img, smoothing) for img in images]
    sharpest_image = np.argmax(sharpnesses, axis=0)
    if return_sharpest_image:
        return sharpest_image
    return np.choose(sharpest_image, images_to_display)

def convert_to_uint8(images):
    min_val = np.min(images)
    max_val = np.max(images)
    return np.uint8((images - min_val) / (max_val - min_val) * 255)

def get_edges(image):
    src = image - cv2.GaussianBlur(image, (0, 0), 2)
    dx = np.abs(cv2.Sobel(src, -1, 1, 0))
    dy = np.abs(cv2.Sobel(src, -1, 0, 1))
    return np.hypot(dx, dy)

def get_features(image):
    orb = cv2.ORB_create(nfeatures=50000)
    features = cv2.goodFeaturesToTrack(image, 50000, 0.01, 10)
    kp = [cv2.KeyPoint(f[0, 0], f[0, 1], 1, 0) for f in features]
    kp, desc = orb.compute(image, kp)
    return (kp, desc)

```

```

def match_features(f1, f2):
    (kp1, desc1) = f1
    (kp2, desc2) = f2

    matcher = cv2.FlannBasedMatcher(
        dict(
            algorithm=6, #FLANN_INDEX_LSH
            table_number=6,
            key_size=12,
            multi_probe_level=1
        ), dict(
            checks=50
        )
    )
    matches = matcher.knnMatch(desc1, desc2, k=2)

    src_pts = []
    dst_pts = []
    for m, n in matches:
        if m.distance < 0.7 * n.distance:
            src_pts.append(kp1[m.queryIdx].pt)
            dst_pts.append(kp2[m.trainIdx].pt)
    if len(src_pts) < 5:
        return None
    src_pts = np.float32(src_pts).reshape(-1, 1, 2)
    dst_pts = np.float32(dst_pts).reshape(-1, 1, 2)
    (M, mask) = cv2.estimateAffinePartial2D(
        dst_pts, src_pts, method=cv2.RANSAC, ransacReprojThreshold=5)
    # the transformation should be a pure translation, lets therefore estimate the error:
    error = np.linalg.norm(M[:, :2] - np.eye(2))
    if error > 0.01:
        return None
    return M

def stitch_images(image1, image2):
    im1 = get_edges(np.array(image1, dtype=np.float))
    im2 = get_edges(np.array(image2, dtype=np.float))
    im1, im2 = convert_to_uint8([im1, im2])
    f1 = get_features(im1)
    f2 = get_features(im2)
    return match_features(f1, f2)

```

Danksagungen

Ein großer Dank gilt Markus Arndt für seine Unterstützung sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch darüberhinausgehend. Er hat es schon bei unserer ersten Begegnung geschafft, in mir ein neues Feuer zu entfachen, das seither, auch dank zahlreicher wertvoller Unterhaltungen, stets gewachsen ist.

Ebenso gebührt mein Dank Christian Brand, der nicht nur ein hervorragender Laborkollege ist, sondern der mich nebenbei noch an die Laborarbeiten herangeführt hat, bei Problemen mit Rat, Tat und Humor zur Seite gestanden ist und auch diese Arbeit von den Anfängen an begleitet, korrekturgelesen und mit seinen Anmerkungen bereichert hat.

Auf der biologischen Seite bedanke ich mich bei Tom Grunert, der stets dafür gesorgt hat, dass es uns nicht an Bakterien mangelt, der uns auch mit den biologischen Arbeitsvorgängen vertraut gemacht hat und der in vielen Gesprächen für neue Ansätze gesorgt hat.

Dank gebührt auch meinen Vorgängern am Fernfeld, ohne deren Arbeit das Experiment nicht das wäre, was es heute ist. Da Arbeit allerdings bekanntlich nicht alles ist, gilt ein spezieller Dank auch allen aktiven und ehemaligen „Molecoolis“, meinen Gruppenkollegen, denen ich einerseits eine spaßige und interessante Zeit zu verdanken habe, die mich andererseits aber auch fachlich stets bei meinen Fragen unterstützt haben.

Blickt man abseits der Universität, gibt es zahlreiche Personen, die durch ihre eigenen Interessen die meinigen beflügelt haben und die meinen Lebensweg, ob bewusst oder unbewusst, so beeinflusst haben, dass ich heute genauso hier stehe, wie ich bin.

Aber der wohl größte Dank gilt meiner Familie, die mich seit jeher bei allem unterstützt hat und mir besonders in letzter Zeit ständig das geschenkt hat, was mir oft gefehlt hat: Zeit zur richtigen Zeit.

*So unbedeutend ein einzelner Schritt auch wirken mag,
so sind es doch nur die Schritte, die die Perspektive verändern.*

