

1 | Einleitung

Bakterien sind allgegenwärtig und erfüllen essenzielle Rollen für das Leben. Ihre vielseitigen Funktionen reichen von ökologischen Prozessen über medizinische Anwendungen bis hin zu industriellen und landwirtschaftlichen Nutzen. Der Großteil der enormen Artenvielfalt ist für den Menschen harmlos. Nur ein geringer Anteil ist humanpathogen und kann Krankheiten wie Lebensmittelvergiftungen, Lungenentzündungen und Infektionen des Magen-Darm-Traktes hervorrufen. Typische Infektionsursachen sind neben der direkten Kontaktübertragung, kontaminierte Lebensmittel und kontaminiertes Wasser. Zur Prävention und zielgerichteten Behandlung bakterieller Erkrankungen ist ein schneller, spezifischer Bakteriennachweis entscheidend. Ein Bakteriennachweis ist auch in der Forschung, Pharmazie, Biotechnologie und Forensik unverzichtbar.[1, 2]

Eine relativ einfache Möglichkeit zur direkten Bakterienidentifikation bietet das Kulturverfahren mit einem Selektivnährmedium. Je nach Bakterienart bedarf die Kultivierung Tage bis Wochen, bis der Nachweis anhand der gewachsenen Kolonien optisch erfolgen kann. Der Nachweis von toten oder nicht vermehrungsfähigen Zellen ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Weitere gängige bakterielle Nachweisverfahren der Bioanalytik basieren auf biochemischen, serologischen, immunologischen Tests oder genetischen Analysen, die jedoch mit einem erheblichem Zeitaufwand und hohen Kosten für Labortechnik und Material verbunden sind.[3, 4, 5]

Um den bakteriellen Nachweis zu beschleunigen, kann das Verfahren in eine spezifische Sortierung und einen unspezifischen Nachweis unterteilt werden. Gängige Sortiermethoden wie FACS (engl. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) oder MACS (engl. *Magnetic-Activated Cell Sorting*) basieren auf fluoreszierenden bzw. magnetischen Markermolekülen,

1 Einleitung

die sich selektiv an die Zellen binden. Die Separation erfolgt dann in einer Durchflusszelle über die Ladung oder Magnetisierung unter Anwendung elektrischer oder magnetischer Felder. Diese Methoden erfordern jedoch eine aufwendige Probenpräparation, teure Reagenzien und Laborausrüstung. Die Durchführung erfordert Fachpersonal und eignet sich nicht für mobile Anwendungen.[6, 7, 8, 9]

Mikrofluidische Plattformen bieten die Möglichkeit, Bakterien über integrierte Filterstrukturen zu separieren. Die technologische Entwicklung der mikro- und nanotechnologischen Verfahren in den letzten Jahrzehnten beschleunigte die Forschung an mikrofluidischen Systemen und ermöglicht ein Handling von Probenvolumina bis in den Pikoliterbereich. Mittlerweile können kostengünstige, vielfältige und bedarfsorientierte Systeme zur Probenmanipulation und Bioanalyse als mikrofluidische Chiplabore (engl. *Lab-on-a-Chip*, LOC) realisiert werden, in denen die Manipulation von Mikro- und Nanopartikeln, Zellen, Viren, subzellulären Organellen, Proteinen und DNA-Molekülen erfolgen kann. Aufgrund der geringen Flüssigkeitsvolumina in mikrofluidischen Systemen können physikalische Limitierungen, beispielsweise bedingt durch die Schwerkraft oder Trägheit, häufig vernachlässigt werden. Damit ergeben sich neue Möglichkeiten zur Flüssigkeitsmanipulation.[10, 11]

Eine Trennung von Zellen innerhalb mikrofluidischer Systeme kann über mechanische, hydrodynamische, akustische, optische, elektrische oder magnetische Kräfte herbeigeführt werden. Beispielsweise kann eine mechanische Filtration durch den Fluss durch geometrisch definierter Hindernisstrukturen erfolgen. Bakterienzellen bestimmter Größe oder Form werden damit aus einer heterogenen Zellprobe extrahiert. Allerdings ist die Spezifität der mechanischen Filtration durch die Beschränkung auf die Zellgeometrie als Unterscheidungsmerkmal eingeschränkt. Zudem lassen sich damit vitale nicht von toten Zellen unterscheiden, was beispielsweise für die Qualitätssicherung von Trinkwasser notwendig ist.[6, 12, 13]

Die elektrokinetische Methode der Dielektrophorese (DEP) hat sich als eine der populärsten Technologien zur Manipulation und Separation von Mikropartikeln und Zellen entwickelt. Die Selektion beruht auf der Polarisierbarkeit der Zellen. Die vielseitige,

komplexe Morphologie, die Zellgeometrie und die materiellen, elektrischen Eigenschaften der Bakterienzellen haben Einfluss auf die Polarisierbarkeit. Dies ermöglicht eine spezifische Adressierung diverser Zellmerkmale. Neben einer artspezifischen ist auch eine vitalitätsspezifische Manipulation der Zellen möglich. Die Methode funktioniert markierungsfrei. Die Zellen können für eine Separation in ihrem Zustand belassen werden. Teure Reagenzien wie Antikörper oder Farbstoffe entfallen, ebenso der Aufwand der Präparation. Die Dielektrophorese ist über die Frequenz des elektrischen Feldes adaptiv auf das Zielpartikel abstimmbare. Damit ist eine Zellmanipulation per Dielektrophorese eine schnelle, kostengünstige und präzise Methode. Die sortierten Zellen bleiben dabei intakt und sind für weitere Analysen oder biotechnologische Anwendungen einsetzbar.[9, 14, 15]

Es gibt bereits Sortier- bzw. Filtersysteme, die auf der Dielektrophorese beruhen. Die Systeme sind häufig auf eine Partikel- bzw. Zellart beschränkt und nicht adaptiv einsetzbar. Die elektrolytischen Eigenschaften des umgebenden Suspensionsmediums haben Einfluss auf die Polarisation der Zellen. Dafür muss bei den meisten Systemen vorbereitend eine Substitution des Mediums durch eine Pufferlösung erfolgen. Der Großteil der Systeme basiert auf konvektiver Mikrofluidik, die hydraulischer Peripherie bedarf und damit einen kompakten Aufbau als LOC und einen mobilen Einsatz, z.B. als point-of-care-Test (POC), erschwert.[16, 6, 5]

In dieser Arbeit wird ein Konzept eines neuartigen, modularen Sortierverfahrens auf Basis der Dielektrophorese vorgestellt. Dafür wird die Dielektrophorese mit einer digitalen Mikrofluidik und einer elektrolytischen Sensorik kombiniert. Ein EWOD-Array (engl. *Electrowetting on Dielectrics*) dient als digitaler mikrofluidischer Transporter. Durch den sequentiellen, tröpfchenweisen Transport lässt sich das Timing und das Volumen der Probenzuführung exakt steuern. Die programmierbaren Transportpfade ermöglichen eine einfache Skalierung und Parallelisierung des Systems. Der mikrofluidische Transport bedarf lediglich einer kompakten, miniaturisierbaren elektronischen Ansteuerung. Als weiteres Modul wird ein EGOFET (engl. *Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistor*) als elektrolytischer Sensor eingesetzt. Dieser kann die mediale ionische Konzentration der

1 Einleitung

Probe vor einer dielektrophoretischen Manipulation ermitteln. Damit lässt sich der Einfluss der medialen Umgebung auf die Dielektrophorese berücksichtigen und kompensieren. Eine Sortierung lässt sich dadurch direkt in unterschiedlichen medialen Umgebungen ohne zusätzliche Vorbereitungen durchführen.

Mit diesem Verfahren ist eine adaptive Sortierung multipler Zellpopulationen aus einer heterogen zusammengesetzten, bakteriellen Probe in separate, diskrete Tropfen ohne eine notwendige Probenpräparation möglich.

Das Konzept des gesamten Sortiersystems wird in Kapitel 2 erläutert. Die Entwicklung des EGOFETs als elektrolytischer Sensor wird in Kapitel 3, die der DEP-Zelle als Filterstufe in Kapitel 4 und die des EWOD-Arrays als digitaler mikrofluidischer Transporter in Kapitel 5 beschrieben.

2 | Konzept - Verfahren zur adaptiven Bakteriensortierung

In dieser Arbeit wird die Entwicklung verschiedener mikroelektronischer Bauteile beschrieben, deren funktionelle Verknüpfung einen adaptiven, art- und zustandspezifischen Sortiermechanismus für Bakteriensuspensionen ermöglicht.

Die drei elektronischen Module Dielektrophoresezelle (DEP-Zelle), EGOFET (engl. *Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistor*), und EWOD-Array (engl. *Electrowetting on Dielectrics*) wurden auf Basis von Nano- und Mikrotechnologien für das Verfahren entwickelt und hinsichtlich eines kombinatorischen Einsatzes als Bakteriensortierer modifiziert und optimiert.

Das zentrale Element ist eine Dielektrophoresezelle. Dielektrophorese beschreibt eine elektrokinetische Kraft, mit der Bakterien in einem wässrigen Umgebungsmedium getrennt und selektiv temporär fixiert werden. In dem Modul werden über Mikroelektroden inhomogene elektrische Wechselfelder in der Suspension erzeugt. Dadurch wirkt auf die suspendierten Zellen eine dielektrophoretische Kraft, wodurch die Bakterienzellen in der umgebenden Flüssigkeit in die Bereiche hoher oder niedriger Feldstärken hingezogen und dort fixiert werden. Ob eine negative Kraftwirkungsrichtung (nDEP) oder eine positive Kraftwirkungsrichtung (pDEP) vorherrscht, kann über die Feldfrequenz eingestellt werden. In salinen wässrigen Umgebungen wirken bei kleinen Frequenzen negative dielektrophoretische Kräfte (nDEP), bei hohen Frequenzen positive dielektrophoretische Kräfte (pDEP) auf die Zellen. Die Cross-Over-Frequenz (f_{CO}) beschreibt den Wechsel der Richtung der Kraftwirkung. Bei dieser Frequenz wirkt keine Kraft auf die Zellen,

2 Konzept - Verfahren zur adaptiven Bakteriensortierung

eine Bewegung und Fixierung bleibt aus. Der spektrale Verlauf der Kraftwirkung wird durch die CLAUSIUS-MOSSOTTI-Funktion beschrieben und hängt von den dielektrischen Eigenschaften der Bakterienzellen ab. Diese werden durch materialspezifischen, geometrischen und morphologischen Parameter bestimmt. In den Untersuchungen wurde die spektrale Kraftwirkung auf die Modellbakterien *Priestia megaterium* und *Escherichia coli* bei unterschiedlichen Bedingungen analysiert. Anhand der extrahierten Spektren kann eindeutig eine artspezifische Unterscheidung vorgenommen werden. Darüber hinaus unterscheiden sich auch artintern die Spektren von toten und lebendigen Zellen. Aufgrund der spezifischen CLAUSIUS-MOSSOTTI-Funktionen können in heterogenen Proben simultan unterschiedliche Kraftwirkungen auf die verschiedenen Zellpopulationen bei einer konstanten Anregungsfrequenz hervorgerufen werden. Neben den dielektrischen Eigenschaften der Bakterienzellen hat auch die Leitfähigkeit der Suspensionslösung einen Einfluss auf die CLAUSIUS-MOSSOTTI-Funktion. Aus diesem Grund wurden in den spektralen Untersuchungen unterschiedlich konzentrierte Natriumchloridlösungen ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ bis $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) mit Leitfähigkeiten von $3 \cdot 10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ bis $1 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ eingesetzt und in der DEP-Zelle validiert. Auf Basis dieser Daten kann eine Separation der Bakterien unmittelbar in der nativen, wässrigen Probe durchgeführt werden, ohne die Notwendigkeit das Medium durch eine Pufferlösung zu substituieren. Dazu muss die mediale elektrolytische Leitfähigkeit der Probe bekannt sein, um eine präzise, reproduzierbare Trennung zu gewährleisten.

Für die Messung der elektrolytischen Leitfähigkeit wurde das Bauelement EGOFET entwickelt. In diesem speziellen Transistor wird die elektrolytische Umgebungslösung als Gatedielektrikum eingesetzt. Dabei wird die Abhängigkeit des Feldeffekts von der Konzentration der freien Ionen in der Lösung ausgenutzt. Mit steigender Salzkonzentration, bzw. steigender elektrolytischer Leitfähigkeit, sinkt die Gatekapazität. Die sensorische Funktionalität konnte im gesamten Löslichkeitsbereich von Natriumchlorid (Deionisiertes Wasser bis gesättigter Natriumchloridlösung), entsprechend einer Leitfähigkeit von $2 \cdot 10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ bis $2 \cdot 10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$, gezeigt werden. Dafür wurden verschiedene elektrische Arbeitspunkte untersucht. Für die Arbeitspunkte wurde die sensorische Einschwingzeit determiniert,

die der Dauer zur Akkumulation der Ionen in den elektrochemischen Doppelschichten der Übergänge Gate/Elektrolyt und Elektrolyt/Halbleiter entspricht.

Für die Injektion der Probe sowie zur Extraktion der spezifisch gefilterten Suspension mit den Zielzellen wurde ein EWOD-Array entwickelt. Dieses besteht aus einer Anordnung von planaren Elektroden, die mit einem hydrophoben, elektrisch isolierenden Material beschichtet sind. Dieses Dielektrikum isoliert den zu transportierenden Tropfen von den spannungsführenden Elektroden. Das Anlegen einer elektrischen Spannung an der tropfenführenden Elektrode bewirkt unter Ausnutzung des elektrostatischen Effekts der Elektrobenetzung ein Heranziehen des Tropfens an die Elektrode. Durch simultanes Umschalten der Spannung von benachbarten Elektroden lässt sich der Tropfen zwischen den Elektroden weitergeben. Durch eine Ansteuerung von sequentiellen Spannungsfolgen kann bei einem Elektrodenarray die Richtung und über die Verweilzeit der Tropfen auf einer Elektrode die Geschwindigkeit des Tropfentransports programmiert werden. Dieser programmierbare Tropfentransport wird als digitale Mikrofluidik (DMF) bezeichnet. Durch die konvektiven Flüssigkeitsströmungen bedingten Kräfte, die die dielektrophoretischen Kräfte überlagern, würde der Einsatz einer kontinuierlichen Mikrofluidik die Zellfixierung und damit die Sortierung beeinträchtigen. Ein temporär stationäres System ist, neben dem Vorgang der dielektrophoretischen Trennung der Zellen, auch bei der Messung der elektrolytischen Leitfähigkeit vorteilhaft, um ionische Fluktuationen im Medium zu vermeiden.

In dieser Arbeit wurde ein offenes EWOD-System entwickelt. Damit ist im Gegensatz zum geschlossenen System eine ungehinderte Applikation, Manipulation, Extraktion und Analyse der Probe während der Entwicklungsphase möglich. Bei der Entwicklung wurden Modifikationen und Optimierungen bezüglich der elektrischer Stabilität, Transportgeschwindigkeit und -zuverlässigkeit unternommen. Dazu wurden die Materialien CYTOP-CTL-M, Parylene-C und SU-8 hinsichtlich eines Einsatzes als hydrophobe, dielektrische Beschichtung der EWOD-Elektrodenpads untersucht. Dabei wurde zunächst deren Fähigkeit zur Elektrobenetzung eines wässrigen Tropfens durch spannungsabhängige Kontaktwinkelmessungen bewertet. Neben den hydrostatischen Eigenschaften wurde die

2 Konzept - Verfahren zur adaptiven Bakteriensortierung

elektrische Stabilität des Materialsystems, unter Variation der Beschichtungsdicke sowie der Einfluss von Plasmabehandlungen überprüft. Unter Verwendung des optimierten Materialsystems wurde ein EWOD-Transporter auf Basis eines 8×2 -Elektroden-Arrays aufgebaut. Dieses wurde bezüglich der Transportgeschwindigkeit, der Transportzuverlässigkeit und des transportierbaren Tropfenvolumens charakterisiert. Es wurde anhand weiterer Untersuchungen gezeigt, dass bei dem Transport von bakteriellen Suspensionen die beinhaltenden Zellen zusammen mit dem Tropfen transportiert werden.

In Abbildung 2.1 ist eine mögliche Realisierung des Gesamtsystems veranschaulicht. Hier ist ein minimalistisches Beispiel einer unidirektionalen, sequentiellen, nicht parallelierten Applikation in einer schematischen Seitenansicht dargestellt. In diesem Konzept werden die Zielbakterien antifixiert, während die anderen Zellen bzw. Partikel der Suspension in der Dielektrophoresezelle fixiert und dadurch nicht weitertransportiert werden. Nach der Sortierung sind die Zielbakterien sortenrein extrahiert, wodurch eine spezifische qualitative oder quantitative Analyse oder eine biotechnologische Verwendung der isolierten Zellen ermöglicht wird. Ein qualitativer Zellenachweis der sortierten Zellen kann optisch, beispielsweise durch Mikroskopie, erfolgen. Alternativ kann das System durch ein zusätzliches integriertes, elektrisches Detektionsmodul, wie beispielsweise einen modifizierten Feldeffekttransistor, erweitert werden.[17] Eine weitere Trennmethode besteht darin, die Zielzellen zu fixieren und die anderen Zellen abzutransportieren. Die Selektivität durch die spektrale Überlappung der nDEP- bzw. pDEP-Bereiche verschiedener Zellen ist dabei jedoch eingeschränkt.[18]

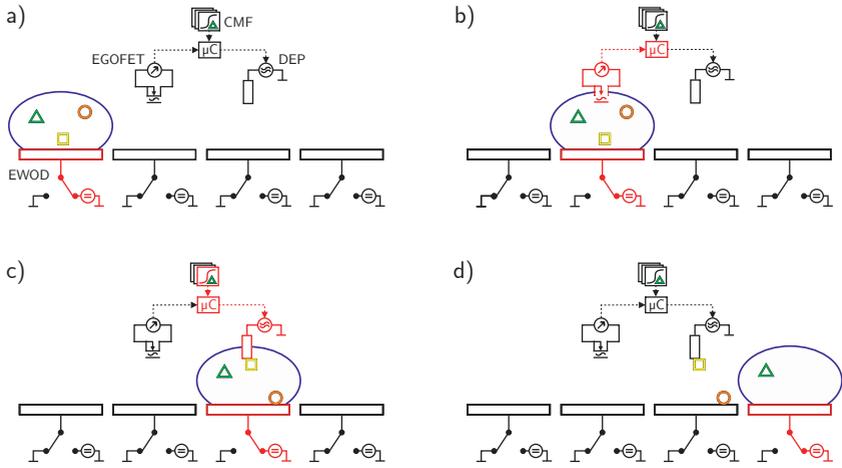


Abbildung 2.1: Verfahren zur Extraktion von Zielbakterien aus einer heterogenen Bakteriensuspension mit dem modularen System. a) Die wässrige Probe (blau) wird mit unterschiedlichen Zellen, Zellzuständen oder anderen Partikeln (grünes Dreieck, oranger Kreis, gelbes Quadrat) auf der ersten EWOD-Elektrode appliziert und die Elektrodenspannung angelegt, wodurch der Tropfen lokal fixiert ist. b) Ein Umschalten der EWOD-Spannung auf das zweite Elektrodenpad des Arrays bewirkt eine Weitergabe des Suspensionstropfens zu diesem. Auf diesem Elektrodenpad ist der EGOFET integriert. Dieser misst die mediale elektrolytische Ionenkonzentration und gibt die Information an einen Mikrocontroller (μC) weiter. c) Der Suspensionstropfen wird über das EWOD-Array weiter zu dem Elektrodenpad mit der integrierten Dielektrophoresezelle (DEP) transportiert. Der Mikrocontroller berechnet unter Zuhilfenahme einer Datenbank mit den spezifischen Clausius-Mossotti-Funktionen (CMF) die Cross-Over-Frequenz des Zielpartikels (hier: grünes Dreieck) und stellt die entsprechende Frequenz an einem Signalgenerator ein, mit dem die Dielektrophoresezelle versorgt wird. Während auf die anderen Partikel in der heterogenen Suspension pDEP (gelbes Quadrat) oder nDEP (oranger Kreis) wirken und dadurch zu den entsprechenden Elektroden gezogen und dort fixiert werden, erfährt das Zielpartikel keine Kraft. Es ist antifixiert. d) Bei der Tropfenweitergabe auf das letzte Elektrodenpad bleiben die fixierten Partikel in der Dielektrophoresezelle zurück und ausschließlich das antifixierte Zielpartikel wird mit dem Tropfen transportiert.

2 Konzept - Verfahren zur adaptiven Bakteriensortierung

Generell erlaubt das modulare System aufgrund der einfachen Skalierbarkeit mit zweidimensionalen EWOD-Arrays parallele oder wiederholende Filtrierungen, sodass anwendungsspezifisch eine Optimierung hinsichtlich des Probendurchsatzes oder der Spezifität der Sortierung erfolgen kann. Mit dem adaptiven Filtersystem in Kombination mit einem zweidimensionalen digitalen Mikrofluidik-Array können außerdem mehrere Zellen aus heterogenen Mischungen iterativ gefiltert und separiert werden. Das Prinzip des iterativen Sortierverfahrens ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt. Bei Anpassung der Größe des EWOD-Arrays kann die Anzahl der Zielzellen beliebig erweitert werden.

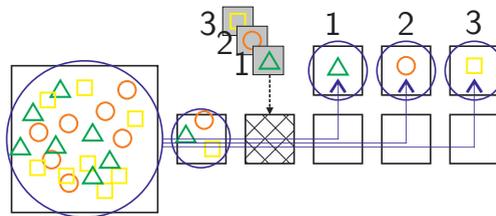


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung in Draufsicht des iterativen Verfahrens zur Sortierung verschiedener Zellpopulationen (grüne Dreiecke, orange Kreise, gelbe Quadrate) aus einer wässrigen Probe. Ein Tropfen (blau) wird aus der voluminösen, heterogenen Probe über das EWOD-Array (schwarze Quadrate) entnommen. Im ersten Iterationsschritt wird die Filterstufe (schraffiertes Quadrat) auf die erste Zielzelle (grünes Dreieck) eingestellt und der Tropfen über den ersten digitalen mikrofluidischen Pfad zum ersten Zielpfad geleitet. Im zweiten Schritt wird erneut ein Tropfen aus der Probe entnommen und über die Filterstufe, adaptiert auf die zweite Zelle (oranger Kreis), geleitet. Hier werden auch die Zellen des gleichen Typs aus dem Filtrückstand des ersten Iterationsschritt mitgenommen und folgen dem zweiten programmierten Pfad. Wie für die zweite Targetzelle erfolgt im nächsten Iterationsschritt die Separierung der dritten Targetzelle (gelbes Quadrat). Durch einen sich wiederholenden, rotierenden Ablauf kann damit die gesamte Probe sortiert werden.

Durch die Kombination der entwickelten elektronischen Module kann ein elektrisch einstellbares Bakterienfilter aufgebaut werden, das selektiv aus einer heterogenen bakteriellen Probe mit unterschiedlichen wässrigen Medien zwischen Bakterienstamm und Vitalzustand der Zellen unterscheiden und die spezifischen Zellpopulationen in separate Tropfen extrahieren kann.