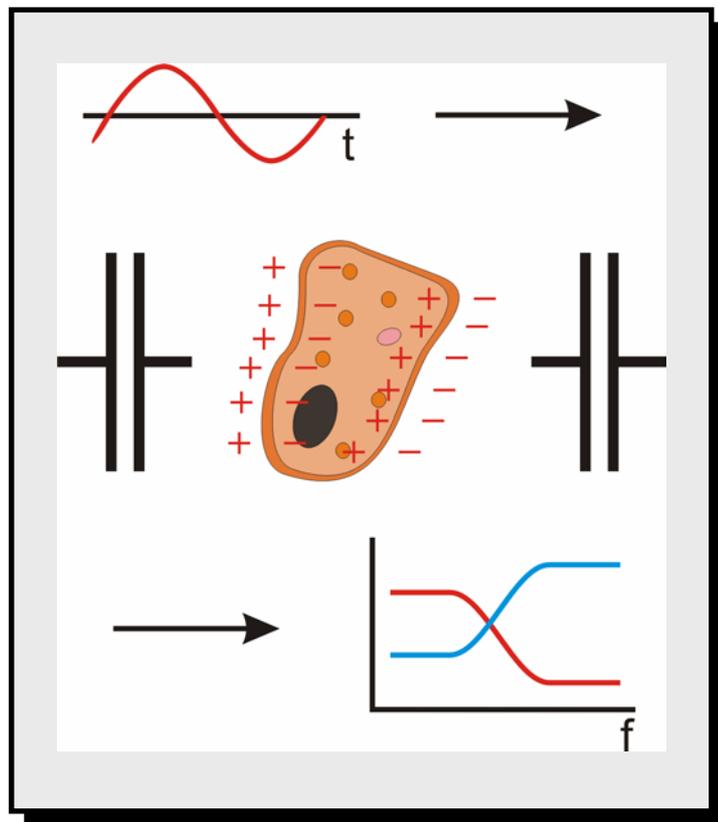


Dipl.-Ing.  
Mirko Hofmann,  
Aachen

# Integrierte Impedanzspektroskopie aerober Zellkulturen in biotechnologischen Hochdurchsatzscreenings

Dissertation RWTH-Aachen, 2009



---

„Integrierte Impedanzspektroskopie aerober Zellkulturen in  
biotechnologischen Hochdurchsatzscreenings“

Von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Ingenieurwissenschaften,  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Dipl.-Ing.  
Mirko Hofmann

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. W. Mokwa  
Universitätsprofessor Dr. G. Urban

**Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2009**

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online  
verfügbar.**

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Motivation.....	1
1.2. Stand der Technik.....	3
1.2.1. Optische Messverfahren .....	3
1.2.2. Elektrische Messverfahren.....	5
1.2.3. Einsatz in Hochdurchsatzuntersuchungen (HTS) .....	9
1.3. Zielsetzung.....	11
<b>2. Theorie</b> .....	<b>13</b>
2.1. Bioimpedanz .....	13
2.1.1. Die $\beta$ -Dispersion.....	15
2.2. Grundlagen der Elektrochemie .....	23
2.2.1. Metall-Elektrolyt-Kontakte .....	23
2.2.2. Platin, Platin-schwarz und Iridiumoxid.....	28
2.3. Galvanisch entkoppelte Elektroden.....	30
2.4. Vierpunktmessung flüssiger Medien .....	31
<b>3. Sensorherstellung</b> .....	<b>41</b>
3.1. Galvanisch entkoppelte Sensoren .....	41
3.2. Vierpunktsensoren .....	44
3.3. Seitenwandintegrierte Sensoren.....	48
3.4. Aufbau und Verbindungstechniken .....	49
3.4.1. Bodenintegrierte Sensoren .....	49
3.4.2. Seitenwandintegrierte Sensoren .....	50
<b>4. Galvanisch entkoppelte Sensoren</b> .....	<b>53</b>
4.1. Analytische Modelle .....	53
4.2. Versuchsaufbau .....	55
4.2.1. Multiplexereinheit .....	56
4.2.2. Versuchsaufbau für Fermentationsmessungen.....	57
4.2.3. Fehlerkorrektur der Messwerte .....	58
4.3. Versuchsdurchführung.....	61
4.3.1. Versuche mit definierten Kaliumchloridlösungen .....	61
4.3.2. Fermentationsmessungen.....	61
4.4. Messungen mit galvanisch entkoppelten Sensoren.....	62
4.4.1. Messungen in KCl-Lösungen zur Verifikation der Theorie.....	62

---

4.4.2.	Auswertung der Messungen und Vergleich mit der Theorie.....	64
4.4.3.	Messungen zur Charakterisierung der Sensoreigenschaften.....	64
4.4.4.	Auswertung der Sensoreigenschaften.....	68
4.4.5.	Messung der zeitlichen Einlaufphase .....	70
4.4.6.	Auswertung der zeitlichen Einlaufphase.....	71
4.4.7.	Fermentationsmessungen .....	71
4.4.8.	Auswertung der Fermentationsmessungen.....	73
4.5.	Diskussion .....	76
<b>5.</b>	<b>Vierpunktsensoren.....</b>	<b>77</b>
5.1.	FEM-Simulationen der Bodenelektroden .....	77
5.1.1.	Funktionsweise der Finite-Elemente-Methode .....	77
5.1.2.	Simulation der Zellkonstanten .....	77
5.1.3.	Simuliertes Schüttelverhalten .....	81
5.2.	Versuchsaufbauten .....	84
5.2.1.	Multiplexereinheit.....	85
5.2.2.	Vorverstärker .....	85
5.2.3.	Aufbau für CV-Messung und Elektrodenimpedanz .....	88
5.3.	Versuchsdurchführung .....	89
5.3.1.	CV-Messung.....	89
5.3.2.	Elektrodenimpedanz.....	89
5.3.3.	Versuche mit definierten Kaliumchloridlösungen.....	89
5.3.4.	Messungen an definierten Zellkulturen.....	90
5.3.5.	Fermentationsmessungen .....	90
5.4.	Messungen mit Vierpunktsensoren .....	91
5.4.1.	CV-Messungen.....	91
5.4.2.	Messungen der Elektrodenimpedanz .....	93
5.4.3.	Auswertung der CV- und Impedanzmessungen.....	94
5.4.4.	Messungen des Schüttelverhaltens verschiedener Sensoren.....	96
5.4.5.	Auswertung des sensorspezifischen Schüttelverhaltens.....	97
5.4.6.	Messungen des Frequenzverhaltens in Kaliumchloridlösungen .....	98
5.4.7.	Auswertung der Kaliumchloridmessungen .....	106
5.4.8.	Messungen der Lösungskapazitäten mit Vierpunktsensoren .....	107
5.4.9.	Auswertung der gemessenen Lösungskapazitäten .....	109

5.4.10.	Ergebnisse der Messungen an definierten Zellkulturen .....	110
5.4.11.	Auswertung der Frequenzspektren .....	113
5.4.12.	Fermentationsmessungen .....	114
5.4.13.	Auswertung der Fermentationsmessungen .....	119
5.5.	Diskussion .....	123
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>127</b>
<b>7.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>129</b>
<b>8.</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>131</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>136</b>
9.1.	Definitionen von Impedanz und Admittanz .....	136
9.2.	Debye Relaxation .....	137
9.3.	Bemerkungen zur Sensorherstellung .....	139
9.4.	Verwendete Nährlösungen für die Versuche mit lebenden Zellen .....	141
9.5.	Lebenslauf .....	143

---

Verwendete Formelzeichen

A	Fläche
$C_D$	Doppelschichtkapazität
$C_{GD}$	Gouy-Chapman-Kapazität
$C_I$	Kapazität über Isolationsschicht
d	Dicke
$d_k$	Diffusionskoeffizient
f	Elektrische Frequenz [Hz]
$f_c$	charakteristische Frequenz
$g_k$	Geometriekonstante [cm]
k	Zellkonstante [cm]
$n_0$	Schüttelfrequenz eines orbitalen Schüttlers [U/min]
$\sigma$	Spez. Leitfähigkeit [S/m] häufiger verwendet in [mS/cm]
$\epsilon_0$	Permittivität von Vakuum 8,845e-12 As/Vm
$\epsilon_r$	Relative Permittivität
$\Psi$	Elektrodenpotenzial

### Verwendete Abkürzungen

ASCII	American Standard Code for Information Interchange
CV	Zyklovoltamogramm
EIS	Elektrische Impedanzspektroskopie
ESB	Elektrisches Ersatzschaltbild
geS	Galvanisch entkoppelte Sensoren
HTS	High Throughput Screening (Hochdurchsatzanalyse)
MTP	Mikrotiterplatte
NADH	ein Enzym aus der Klasse der Oxidoreduktasen und wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
SFB	Sonderforschungsbereich
TB	Terrific Broth (komplexes Kulturmedium für E.Coli)
YNB	Yeast Nitrogen Base (synthetisches Minimalmedium für Hefekulturen)
YPG	Yeast Peptone Galactose (komplexes Kulturmedium für Hefen)
YPD	Yeast Peptone Dextrose (komplexes Kulturmedium für Hefen)

## 1. Einleitung

### 1.1. Motivation

Proteine oder Enzyme, die ihre Anwendung zum Beispiel in der Waschmittel oder der Pharmaindustrie finden, können über zwei sehr unterschiedliche Wege hergestellt werden: chemisch und biologisch.

Während man chemische Prozesse schnell kontrollieren und verstehen kann, erweisen sich biologische Abläufe oft als schwer vorhersehbar. Das gute Verständnis über die chemischen Prozesse erlaubt eine verhältnismäßig kurze Entwicklungszeit und eine frühe Optimierung der späteren Produktionsprozesse. Aufgrund meist extremer Prozessbedingungen, wie hoher Druck und extreme Temperaturen, und oft toxischer Nebenprodukte, die aufwendig ausgefiltert werden müssen, sind chemische Prozesse in der eigentlichen Produktion gegenüber den biologischen oft im Nachteil.

Viele Firmen setzen daher auf die biologische Produktion und wollen bereits laufende Prozesse weiter optimieren und neue Verfahren entwickeln. Weiterhin zeichnet sich der Trend ab, dass in den kommenden Jahren mehr und mehr chemische Prozesse durch kostengünstigere und effizientere biologische Prozesse substituiert werden sollen.

Um die benötigten Biomoleküle, wie Proteine oder Enzyme, zu gewinnen, nutzt man einfache mikrobielle Zellen wie E.Coli, Hefen und auch Pflanzenzellen. Diese werden Expressionssysteme genannt. Die enormen Fortschritte und Entwicklungen im Bereich der Gentechnik und der Molekularbiologie haben dazu geführt, dass bereits riesige Gen- und Proteinbibliotheken aufgebaut wurden. Auch ist weiterhin mit einem starken Zuwachs an Gen-, Protein- und Molekülinformationen zu rechnen. Um die Inhalte der Bibliotheken überhaupt noch bewältigen zu können und geeignete Zellen bzw. Expressionssysteme zu identifizieren, sind gezielte Hochdurchsatz-Screening-Verfahren (engl. HTS, high-throughput-screening) mit einhergehender Automatisierung und aussagekräftigen Online-Messtechniken unumgänglich.

Die meist aeroben Prozessabläufe erfordern jedoch eine ständige Zuführung von Sauerstoff oder frischer Luft. Mit den heute verwendeten Kultivierungssystemen, wie Schüttelkolben und Reagenzgläser, die eine kontrollierte Luftzufuhr gewährleisten, ist man jedoch nicht in der Lage, dem steigenden Bedarf an Expressionsstudien gerecht zu werden. Hier kann nur die konsequente Miniaturisierung eine Lösung schaffen. Die Entwicklung von Mikroreaktoren, die auf kleinstem Raum eine geeignete Umgebung für die biologische Kultivierung liefern, wird daher stark voran getrieben. Geschüttelte Mikroreaktoren bieten dabei eine ideale Plattform, um einen hohen Parallelisierungsgrad bei gleichzeitig kontrollierbarer Luftzufuhr zu erreichen.

Heutzutage besteht jedoch noch immer die Herausforderung, sinnvolle Prozessinformationen aus dem Kleinmaßstab zu erhalten. Hier bedarf es eines besseren Verständnisses für die biologischen, chemischen und physikalischen Vorgänge in den Mikroreaktoren. Miniaturisierte Messmethoden zur Charakterisierung sowie eine entsprechende Online-Analytik der Prozesse sind hierfür unumgänglich.

Im Bereich der Aufreinigung (downstream processing) bzw. Analytik wird der Markt bereits mit einer Vielzahl von intelligenten Techniken auf Basis des Mikrotiterplattenformats (MTP) bedient. Es stehen miniaturisierte Filtrationseinheiten, Chromatographie-Säulen und Gel-Elektrophoreseeinheiten zur Verfügung. Darüber hinaus werden Mikrotiterplatten für die Lagerung und Replikation von Organismen eingesetzt. MTPs bieten daher eine hervorragende und etablierte Plattform für hochparallele Mikroreaktorsysteme.

Die Aufgabenstellungen in der Chemie- und Pharmaforschung erfordern heute Proben-durchsätze von einigen 100.000 Proben pro Tag und werden in Zukunft zu noch größeren Probenaufkommen führen. Darüber hinaus besteht ein großes Interesse daran, die Prozess-entwicklungszeiten für neue biotechnologische Produkte wesentlich zu verkürzen. Ausgehend von diesem Hintergrund ist Ziel dieser Arbeit, eine Online-Sensorik zur Impedanzmessung zu entwickeln und zu charakterisieren, die bereits in einem sehr frühen Prozessentwicklungssta-dium in hochparallelen Mikrobioreaktoren wichtige Informationen über das biologische Reaktionssystem gewinnen lässt.

## 1.2. Stand der Technik

Die derzeitigen Analyseverfahren im biotechnologischen Bereich sollen hier grob in zwei Klassen unterteilt werden: optische und elektrische Verfahren. Während beide Verfahren bei der Produktion in Großfermentern und auch im Labormaßstab von zirka 1 l Fermentationsvolumen bereits etabliert sind, so ist ihre Verwendung im Bereich der HTS-Verfahren noch sehr selten und beschränkt sich meist auf die Forschungsebene.

Im Folgenden werden derzeit gängige Verfahren vorgestellt und bezüglich ihrer Anwendbarkeit in HTS-Verfahren auf MTPs basierend untersucht.

### 1.2.1. Optische Messverfahren

Neben der Online-Überwachung von Standardfermentationsparametern wie pH-Wert und O<sub>2</sub>-Konzentration mittels herkömmlicher pH-Messsonden und Sauerstoffsonden wie Clark-Zellen kommt immer mehr die Fluoreszenzmesstechnik zum Einsatz. Aktuelle Messtechniken wie die der Firma PreSens (Precision Sensing GmbH) bauen auf den Einsatz der Fluoreszenzmesstechnik mit Fluorophoren, die sensitiv auf die genannten Parameter reagieren und durch Immobilisierungstechniken in den jeweiligen Reaktoren fixiert werden können. Diese immobilisierten Fluorophore werden auch Optoden genannt. Sie lassen sich mittels einer vom Reaktor unabhängigen Optik auslesen und auswerten. Durch die Entkopplung der Messeinheit vom Reaktor kann auf eine ständige zeit- und kostenintensive Sterilisation oder Autoklavierung der Messeinheit verzichtet werden. Die derzeit angebotenen Optodentechniken lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Intensitätsmessung und Messung einer Phasenverschiebung.

Bei der Messung der Intensität wird einfach die Menge des fluoreszierten Lichtes gemessen (Zen 1991). Die Intensität ist ein direktes Maß des pH-Wertes oder der O<sub>2</sub>-Konzentration. Die Technik für einen derartigen Messaufbau ist sehr einfach und bedarf keiner komplizierten Elektronik. Jedoch muss dieses System vor jeder Messung kalibriert werden. Eine kleine Abweichung in der Größe der Optode oder eine leichte Fehljustierung der Optik bezogen auf die Optode führt zu einem veränderten Intensitätssignal. Dieser Umstand macht das Verfahren sehr fehleranfällig und aufwändig in der Handhabung.

Das Messverfahren der Phasenverschiebung hingegen benötigt keine ständige Kalibrierung oder eine exakte Justage der Optik bezüglich der auszulesenden Optode. Bei diesem Messverfahren werden die unterschiedlichen Abklingzeiten verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe genutzt. Im Gegensatz zu dem Verfahren der Intensitätsmessung wird ein sich periodisch veränderndes Lichtsignal verwendet, um die Optode anzuregen. Hierfür wird eine Anregungsdiode mit einem Gleichstrom versorgt, der mit einem Sinussignal überlagert wird. Für die Messung des pH-Wertes werden Dioden mit einer Wellenlänge von zirka 470 nm (Blaues Licht) mit einer modulierten Sinusfrequenz von 40 bis 50 kHz eingesetzt. Die Optoden zur Messung des Gelöstsauerstoffs werden mit einer Wellenlänge ab 590 nm und einer Frequenz von 5 bis 10 kHz angeregt. Das fluoreszierte Licht wird detektiert und mit der Anregungswelle verglichen. Aufgrund der endlichen Abklingzeiten der Fluoreszenzfarbstoffe ist ein Phasenunterschied der beiden Signale detektierbar. Durch die geschickte Zusammenset-

zung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, die teils abhängig und teils unabhängig von der zu messenden Größe sind, lassen sich Abklingzeiten einstellen, die direkt proportional zum pH-Wert oder zur O<sub>2</sub>-Konzentration sind. Die sich verändernden Abklingzeiten resultieren in einer messbaren Phasenverschiebung des gemessenen Fluoreszenzsignals bezogen auf das Anregungssignal. Da die Abklingzeiten unabhängig von den Lichtintensitäten sind, ist eine ständige Kalibrierung der Messeinheit bezogen auf die Optoden nicht erforderlich.

Optische Verfahren bieten zudem noch die Möglichkeit der Messung von Biomassekonzentrationen. Hierzu werden Eigenfluoreszenzmessungen, Messungen der optischen Dichte oder Streulichtmessungen eingesetzt. Um die Eigenfluoreszenz der Zellen anzuregen ist ein Anregungssignal im Ultraviolettbereich notwendig. Das für die Fluoreszenz verantwortliche Enzym NADH (Nicotinamid-AdeninDinucleotid-Hydrooen), oder auch Co-Enzym 1 genannt, ist Bestandteil jeder Zelle und wird von diesen zur Energieerzeugung benötigt. Das NADH-Signal ist jedoch nur sehr schwach und schlecht zu detektieren. In den meisten Fällen wird die Messung der optischen Dichte zur Biomassebestimmung verwendet. Bei dieser Messung wird mit einer Wellenlänge von meist zirka 600 nm durch die Fermentationslösung geleuchtet und auf der anderen Seite das transmittierte Licht gemessen. Je mehr Zellen bzw. Schwebstoffe in der Lösung vorhanden sind, desto mehr Licht wird gestreut und nicht zum Detektor geleitet. Besonders gut ist dieses Verfahren bei kleinen Zelldichten einzusetzen. Um das Verfahren jedoch sinnvoll einsetzen zu können, sind sehr kurze Wegstrecken des Lichtes durch die Zelllösung erforderlich. Da dies innerhalb eines großen Reaktors oder eines Laborfermenters mit 1 l Volumen nicht zu realisieren ist, wird in der Regel ein Pumpkreislauf angeschlossen, der ständig die Fermentationslösung aus dem Reaktor durch dünne Schläuche an dem Sensor vorbeipumpt. Dieser sogenannte Bypass ist meist aufwendig und eine ständige Gefahr für Kontaminationen. Weiterhin weist das Verfahren starke Querempfindlichkeiten auf und zeigt bei höheren Zelldichten Nichtlinearitäten.

Die Messung des Streulichtes beruht auf dem gleichen Prinzip. An Stelle des transmittierten Lichtes wird hier das durch Zellen und Schwebstoffe reflektierte Licht gemessen. Diese Methode hat den Vorteil der Möglichkeit, Lichtquelle und Detektor zu vereinen, und somit das Verfahren flexibler zu gestalten. Untersucht wurde diese Methode in Kombination mit 96er Mikrotiterplatten 2005 von Samorski et al. (Samorski 2005).

Die Verfolgung der Biomassekonzentration in Fermentern (ab 1 l) mittels der Streulicht- oder Eigenfluoreszenzmessung wurde schon in verschiedenen Lösungsansätzen von Wehnert, Lindemann und Marose untersucht (Lindemann 1998; Marose 1999; Wehnert 1990).

Einen Nachteil haben jedoch sowohl die Messung der optischen Dichte als auch das Verfahren der Streulichtmessung gemeinsam: Es ist keine Aussage über die Viabilität der Zellen möglich, da sowohl lebende als auch tote Zellen das Signal beeinflussen.

## 1.2.2. Elektrische Messverfahren

Einen alternativen Ansatz zu den optischen Messverfahren bieten elektrische. Am bekanntesten sind die elektrochemische pH-Wertmessung und die Messung des gelösten Sauerstoffs mittels einer Clarkzelle. Beides sind in größeren Maßstäben etablierte und erprobte Verfahren. Einen völlig anderen Ansatz bietet die elektrische Impedanzspektroskopie. Die Methode der elektrochemischen Impedanzmessung in der Fermentationflüssigkeit wird für Zelllösungen anschaulich unter anderem in den Arbeiten von Schwan und Asami & Yonezawa beschrieben (Asami 1999; Asami 2002a; Schwan 1968; Schwan 1980; Schwan 1983; Schwan 1994; Schwan 1999; Schwan 2000). Hierbei ist es sogar möglich, die aktive also lebende Biomasse von ruhender oder absterbender zu unterscheiden. Die Firmen Aber Instruments und Fogale Nanotech bieten entsprechende Kapazitätssonden für Fermenter ab 1 l Größe seit einigen Jahren kommerziell an. Die von den Firmen vertriebenen Messgeräte beruhen alle auf dem Prinzip der elektrischen Vierpunktmessung. Es wird bei Frequenzen im Bereich von 100 kHz bis zu 10 MHz ein Wechselstrom über zwei Platinelektroden in die zu messende Lösung eingeprägt. Über ein weiteres Elektrodenpaar wird quasi stromlos ein Spannungsabfall gemessen (Abbildung 1.2.1).

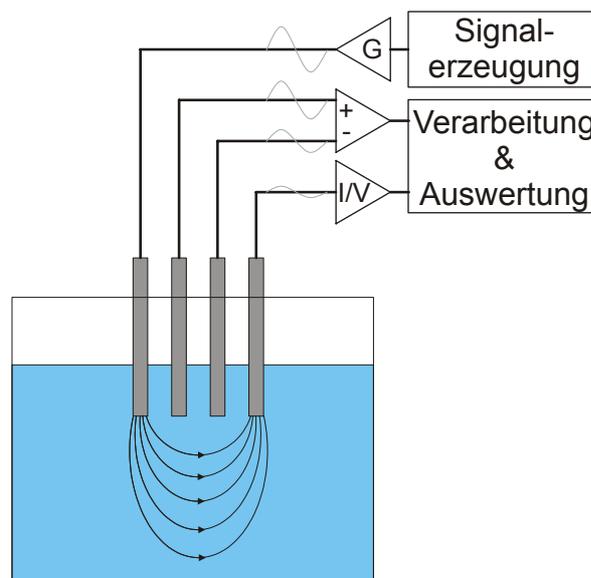


Abbildung 1.2.1: Prinzip der Vierpunktmessung

Die an den beiden inneren Elektroden gemessene Spannungsdifferenz wird mit dem über einen Strom-Spannungswandler gemessenen Stromsignal verrechnet. Aus der Differenz beider Werte ergibt sich das Impedanzsignal.

Ein Nachteil dieser Anordnung ist die derzeit nach unten hin eingeschränkte Bandbreite. Bei niedrigen Frequenzen unterhalb von 10 kHz verfälschen nichtlineare Eigenschaften der Elektroden-Elektrolytübergänge (siehe Kapitel 2.2.1) das Messsignal. Im Bereich hoher Frequenzen ab 10 MHz ist es nur eine technische Herausforderung, auswertbare Messsignale zu erhalten. Durch die Möglichkeit ein ganzes Frequenzspektrum aufnehmen zu können, ist der Informationsgehalt dieser Messmethode sehr hoch (siehe Kapitel 2.1).

Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) 238 wurde an der TU Hamburg-Harburg ein erweitertes Impedanzspektroskopieverfahren zur Charakterisierung von Biomasse entwickelt (Hautmann 2001). Der prinzipielle Aufbau der entwickelten Messsonde ist in Abbildung 1.2.2 dargestellt.

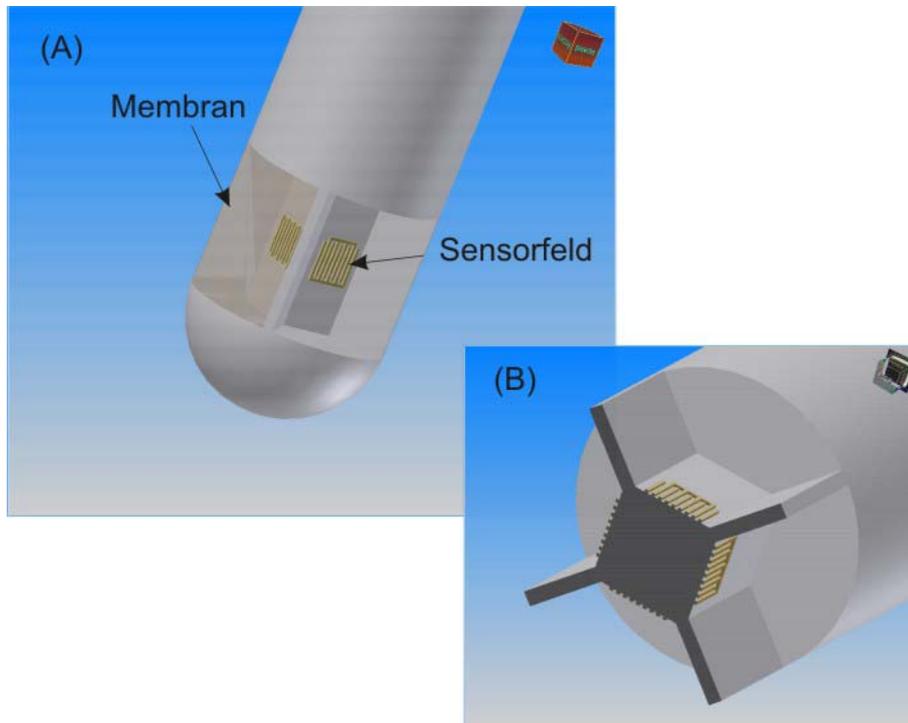


Abbildung 1.2.2: Messsonde aus einem Teilprojekt des Sonderforschungsbereichs (SFB) 238  
Spitze der Tauchsonde (A) und Querschnitt durch den Sensorfeldbereich (B)

Die Messsonde besteht aus vier unterschiedlichen Sensorfeldern. Jedes Sensorfeld besteht aus einer Vierelektrodenanordnung in Form einer Kammstruktur. Alle vier Sensorfelder sind in Brückenschaltung angeordnet. Zwei Sensorelemente dienen der Zellmessung, während die anderen beiden durch eine zellundurchlässige Membran vom Medium getrennt das Referenzsignal liefern. Die Membran verhindert, dass Zellen in den Messbereich der Sensoren gelangen, lässt jedoch das Zellmedium oder die Zelloösung hindurch an das Sensorfeld. Somit ist es möglich, das kapazitive Signal (siehe Kapitel 2.1) der Zellen von der Umgebungsflüssigkeit zu trennen. Um eine gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Sensorfelder zu vermeiden, müssen diese durch Trennstege, wie in Abbildung 1.2.2 gezeigt, separiert werden. Ein Vorteil dieser Brückenschaltung ist das von Temperatureinflüssen bereinigte Messsignal. Mit Hilfe dieser Kapazitätsmessbrücke sollen auch sehr kleine kapazitive Signale bei hohen Leitwerten messbar sein.

Die Firma Hewlett Packard vertrieb bis vor wenigen Jahren ein Messsystem zur Impedanzbestimmung flüssiger Medien, das auf der elektromagnetischen Induktionsmethode beruhte (HP E5050A). Bei dieser Methode wird durch eine doppelte Ringspulenordnung ein elektrisches Kreisfeld innerhalb der Versuchslösung erzeugt und ausgelesen.

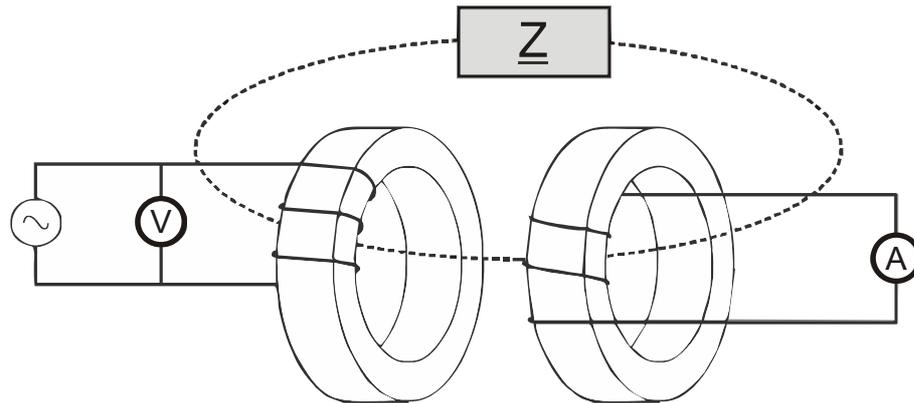


Abbildung 1.2.3: Prinzipskizze des induktiven Messverfahrens mit Hilfe von Doppelringspulen

Über die Kopplung der beiden Spulen durch die Lösung kann deren elektrische Impedanz  $Z$  bestimmt werden (siehe Abbildung 1.2.3). Der sofort einsichtige Vorteil dieser Anordnung ist das elektrodenfreie Messprinzip, das die Probleme mit möglichen Elektrode-Elektrolytkontakten umgeht. Allerdings führen Nichtlinearitäten der Permeabilität der Ringspulenkern zu Messungenauigkeiten. Der teure und komplexe Aufbau und die hohe Störanfälligkeit dieser Systeme führten daher vor Jahren zu einer Einstellung dieses Produktes.

Einen zunächst elegant erscheinenden Ansatz wählte eine Forschergruppe um Grimes von der Pennstate University in Pennsylvania. Ihr Ziel war es, einen einfachen Resonanzschwingkreis in eine zu messende Lösung zu geben und mittels einer Sende-Empfangsspule die Resonanzfrequenz des Schwingkreises berührungslos auszulesen. Ong et al. untersuchten das Prinzip dieser Impedanzmessungen, indem sie einen aus Leiterplattenmaterial hergestellten passiven Resonanzschwingkreis verschiedenen mikrobiellen Kulturen zusetzten und von außen die Änderung der Resonanzfrequenz mit ändernder Zellkonzentration bestimmten. Mit Hilfe der ermittelten Frequenzen schien es möglich, die komplexe Permittivität der zu untersuchenden Lösung zu ermitteln und diese mit der optischen Dichte der Zellsuspension zu korrelieren.

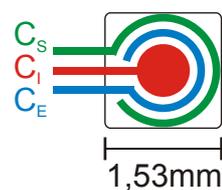
Eigene Versuche zeigten jedoch, dass gravierende Fehler in der zugrunde liegenden Theorie gemacht wurden. Bei denen von Ong et al. verwendeten elektrischen Ersatzschaltbildern zur Auswertung und Umrechnung der gemessenen Resonanzfrequenzen wurde ein entscheidender Teil des Resonanzkreises vernachlässigt. Da der Schwingkreis durch eine dünne Isolationsschicht von der Zelllösung getrennt sein muss, ergibt sich eine rein kapazitive Kopplung des Resonanzkreises zu dem flüssigen Medium. Wie kritisch sich diese Kapazität bei der Messung auswirkt, konnte in eigenen Arbeiten dargestellt werden (Hofmann 2005).

Vorteile dieses Verfahrens sind vor allem die berührungslose Kopplung des Sensors und der Auswertelektronik über ein hochfrequentes Magnetfeld und die Vermeidung eines galvanischen Kontaktes zur Lösung durch die Passivierung der Elektroden. Das Verfahren ist aber aufgrund der Auswertmethode über die Bestimmung der Resonanzen auf hohe Frequenzen

angewiesen, bei denen die Zellen wegen ihrer Relaxationseigenschaften keinen großen Einfluss auf die Permittivität haben. Daher ist nur eine stark begrenzte Empfindlichkeit zu erreichen.

Bereits mit dem Ziel des HTS beschäftigt sich schon seit geraumer Zeit ein Team um Urban aus Freiburg (Spiller 2003). In diesen Projekten wird die Bestimmung der Impedanz über ein kapazitives Referenzverfahren ermittelt. Letzte Veröffentlichungen zeigen bereits eine Realisierung des Verfahrens für 1536-Well-MTP. Hierzu wird der herkömmliche Folienboden der MTP durch eine spezielle Sensor- und Membrananordnung ersetzt (Abbildung 1.2.4).

Aufsicht:



Querschnitt:

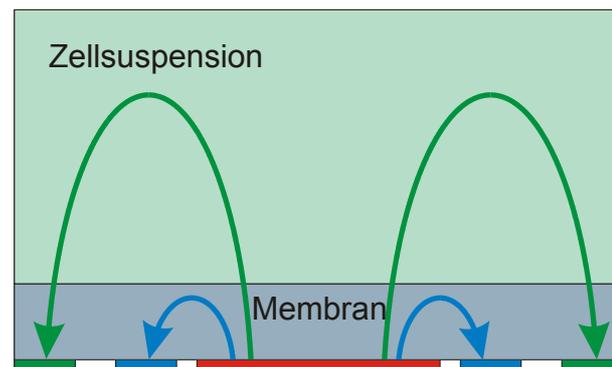


Abbildung 1.2.4: Kapazitives Referenzverfahren nach Spiller et al.

Die Membran dient als Zellbarriere und lässt nur das reine Nährmedium in den unteren Bereich der MTP. Ein Wechselstrom von 150 kHz wird in die mittlere Elektrode  $C_I$  eingepreßt und bezogen auf die äußeren Ringelektroden  $C_E$  und  $C_S$  ausgewertet. Durch die unterschiedlichen Streufelder kann die Impedanz der Lösung ohne Zellen über  $C_E$  und mit Zellen über  $C_S$  bestimmt werden. Über die Maxwell-Fricke Beziehung kann man daraufhin die aktive Biomasse bestimmen (Spiller 2003):

$$\frac{\sigma_S}{\sigma_E} = \frac{1 - \frac{P}{F}}{1 + \frac{P}{F}} \quad (1)$$

In dieser Gleichung (Formel (1)) wird der Quotient der Leitfähigkeiten durch die Zellsuspension  $\sigma_S$  und der Leitfähigkeit durch den zellbereinigeten Elektrolyten in der Membran  $\sigma_E$

mit den Größen P und F ins Verhältnis gesetzt. Hierbei beschreibt P das Volumenverhältnis von lebenden Zellen zu reinem Medium und F ist ein zelltypischer Formfaktor. Durch die Messung der Leitfähigkeiten und dem Wissen des Zelltyps und seines spezifischen Formfaktors F kann mit Hilfe der Formel (1) auf das Volumenverhältnis P und damit auf die Biomasse geschlossen werden.

Ein Problem hierbei sind jedoch die Doppelschichtimpedanzen, die bislang nur über eine geeignete Wahl des Elektrodenmaterials minimiert werden konnten. Aufgrund der rein differenziellen Auswertung über die Maxwell-Fricke Gleichung wird bislang darauf verzichtet tatsächliche kapazitive Signale und Leitwerte zu bestimmen. Die innovative differenzielle Art der Auswertung stellt nur geringe Ansprüche an die Messelektronik und ist daher einfach umzusetzen. Dennoch ist der Informationsgehalt nicht so hoch wie bei einer Vierpunktmessung über einen weiten Frequenzbereich.

Andere Entwicklungen von Impedanzmessungen in Kleinstmaßstäben beschränken sich fast ausschließlich auf adherente Zellkulturen, die unbeweglich auf der Elektrodenstruktur festgewachsen sind und sich nicht frei in der Lösung bewegen. Die Firma Bionas GmbH aus Rostock bietet bereits kommerzielle Geräte für zum Beispiel toxikologische Untersuchungen an.

### **1.2.3. Einsatz in Hochdurchsatzuntersuchungen (HTS)**

Der von der Biotechnologie zukünftig geforderte Bedarf an hohen Probendurchsätzen bei der Entwicklung neuer Fermentationsprozesse erfordert eine drastische Miniaturisierung der Probenansätze vom ml- in den  $\mu$ l-Maßstab. Nicht jedes der aufgeführten Verfahren bietet sich für diese kleinen Maßstäbe an.

Eine weitere wichtige Anforderung an HTS-Verfahren ist die kostengünstige Vermeidung von (Quer-) Kontaminationen. Dies bedeutet, dass die Reaktionskammern steril gehalten werden müssen. Wegen der bedingt kleinen Abmessungen der einzelnen Reaktoren ist eine Reinigung und ständige Aufbereitung der Reaktionskammern meist teurer als die Verwendung einfacher steriler Einwegprodukte. Nicht zuletzt aus diesem Grund bieten MTPs hervorragende Eigenschaften für den Einsatz in HTS-Verfahren (Kensy 2005). Die Integration optischer Messsysteme bietet sich hier an. Die Optoden können kostengünstig innerhalb der einzelnen Wannen der MTP immobilisiert werden und sind somit Teil des Einwegproduktes. Die teure und komplexe Ausleseeinheit hat keinen Kontakt zur Lösung und bedarf daher keiner Sterilisation.

Schwieriger erweisen sich bei diesem Ansatz die elektrischen Verfahren. Sie benötigen zumeist einen Elektrodenkontakt zum flüssigen Medium oder einen komplexen Aufbau aus Mess- und Referenzbereichen. Um diese Verfahren dennoch sinnvoll in HTS einsetzen zu können, müssen sie möglichst leicht und damit kostengünstig in eine MTP integrierbar sein.

In den Arbeiten von Urban wurde bereits eine technische Machbarkeit auch für den Mikroliterbereich (1536-Well MTP) nachgewiesen. Die kleinen Geometrien einer 1536er MTP verschlechtern jedoch die Sauerstoffversorgungsbedingungen der Organismen drastisch, da die Kapillarkräfte und die Oberflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Kunststoff in klei-

neren Geometrien immer stärker an Bedeutung zunehmen. Eine weitere Herausforderung stellt die möglichst kostengünstige Applikation der semipermeablen Membran in jede einzelne Wanne der MTP. Ziel dieser Arbeiten ist auch nicht die Beobachtung von Fermentationsprozessen mikrobieller Zellen wie Hefen oder E.Coli. Die mikrobiellen Zellen sollen in erster Linie für toxikologische Untersuchungen eingesetzt werden. Dabei soll die Abnahme der Lebendmasse in Abhängigkeit der zudosierten Konzentration des zu untersuchenden Mediums gemessen werden.

Ein Resonanzverfahren für HTS in MTPs zu etablieren erweist sich als äußerst schwierig. Um Resonanzfrequenzen im gewünschten Frequenzband zu erreichen müssten die Schwingkreise bedingt durch den geringen Platz in einer Wanne der MTP sehr komplex bzw. geschichtet aufgebaut werden. Des Weiteren ist der Informationsgehalt nicht sehr hoch, da man auf eine einzelne Frequenz festgelegt ist (Verweis Kapitel 2.1).

Die elektromagnetische Induktionsmethode scheidet schon aufgrund des extrem komplexen Aufbaus der Messsonde aus.

Eine kapazitive Messbrücke, wie sie in den Arbeiten zum SFB 238 entwickelt wurde, benötigt auch einen 3-dimensionalen Aufbau (Abbildung 1.2.2) um mögliche Beeinflussungen der unterschiedlichen Messbereiche zu vermeiden bzw. zu minimieren. Ein Aufbau solcher Strukturen für den Einsatz in MTPs ist nur mit höchstem Aufwand und hohen Kosten möglich.

Die klassische Vierpunktmessung bietet neben dem hohen Informationsgehalt auch die Möglichkeit einer einfachen planaren Herstellung der Sensorelektroden, die im Boden der MTP integriert werden können. Aufgrund des einfachen Aufbaus der Elektroden- bzw. Sensorgeometrie bietet das Verfahren interessante Eigenschaften für die Verwendung in MTPs. Eine Herausforderung bildet in jedem Fall eine zuverlässige und genaue Auswertung der Sensoren. Die Auswertung kleinster Phasenwinkel bei der Messung der Impedanz in Verbindung mit einer Vielzahl an Reaktionskammern stellt die größte Herausforderung dar.

### 1.3. Zielsetzung

Aus den vorgestellten Techniken und der zitierten Literatur wird ersichtlich, dass heutzutage noch Kulturvolumina von mehreren hundert Millilitern zur Online-Messung der Biomassekonzentration benötigt werden. Untersuchungen in 96-Well Mikrotiterplatten haben jedoch gezeigt, dass hier schon bei moderaten Schüttelfrequenzen ein ausreichender Sauerstoffeintrag gewährleistet werden kann. Da sich dieses gängige Format in HTS-Verfahren als geeignet zur Fermentation aerober Zellkulturen erwiesen hat, soll als Basis für alle zu entwickelnden Elektroden eine 96-er MTP dienen.

Ziel dieser Arbeit ist es nicht, zu zeigen, dass es möglich ist alle diese 96 Wells parallel anzusteuern, da es sich hierbei um eine entwicklungstechnische Fragestellung handelt. Es sollen vielmehr in einzelnen Wells einer 96er MTP verschiedene Verfahren untersucht und charakterisiert werden. Hierzu zählen das galvanisch entkoppelte Verfahren und die integrierte Vierpunktmessung. Das galvanisch entkoppelte Verfahren beruht auf einer einfachen Zweipunktmessung, bei der die Elektroden durch eine dünne Isolationsschicht von der zu messenden Lösung getrennt sind. Nichtlineare oder nichtreproduzierbare Elektroden-Elektrolytübergänge werden somit verhindert. Die integrierte Vierpunktmessung beruht auf dem bereits im großen Maßstab etablierten Verfahren der Vierpunktmessung flüssiger Medien (1.2.2 Elektrische Messverfahren).

Des Weiteren wird Iridiumoxid als Elektrodenmaterial für die Vierpunktmessung der Zelllösungen untersucht. Die Auswirkungen der geringen Übergangsimpedanzen von gesputterten porösen Iridiumoxidschichten auf die Genauigkeit und Empfindlichkeit der Impedanzmessung sollen erarbeitet werden.

Um über die einfache Messung der Impedanz hinaus auch die angestrebte Messung des Impedanzspektrums zu ermöglichen, sind fundierte Kenntnisse notwendig, sowohl über die Elektrodenanordnung und das –material als auch über die fluiddynamischen Einflüsse des Schüttelvorgangs auf die Messung mit verschiedenen Elektrodendesigns. Hierzu sollen verschiedene Elektrodendesigns entworfen und aufgebaut werden. Simulationen über ihr Messverhalten werden mit entsprechenden Messungen verglichen und ausgewertet.



## 2. Theorie

### 2.1. Bioimpedanz

Ein Pionier in der Untersuchung elektrischer Signale biologischer Proben ist Hermann P. Schwan. In zahlreichen Veröffentlichungen beschreibt er das elektrische Verhalten biologischer Systeme und die Zusammenhänge der Signale mit Bestandteilen biologischer Lösungen oder biologischem Gewebe (Schwan 1962; Schwan 1980; Schwan 1988; Schwan 1994; Schwan 1999; Schwan 2000). Betrachtet man das weitreichende elektrische Frequenzspektrum von Gewebe oder biologischen Zelllösungen, so lassen sich deutlich unterschiedliche Phasen erkennen und unterscheiden.

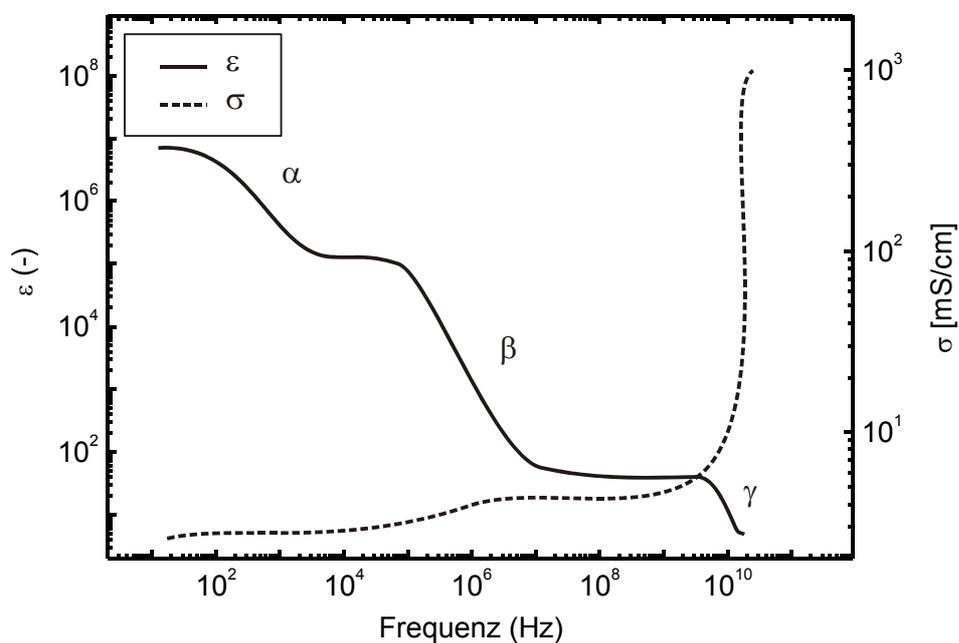


Abbildung 2.1.1. Frequenzspektrum biologischer Zelllösungen mit den drei charakteristischen Relaxationen. Die durchgezogene Linie beschreibt den Verlauf der relativen Permittivität, während die gestrichelte Linie das frequenzabhängige Verhalten der Leitfähigkeit beschreibt.

Die in Abbildung 2.1.1 dargestellten Verläufe beschreiben das Verhalten der relativen Permittivität und der Leitfähigkeit als Funktion der Messfrequenz. Die bei niedrigen Frequenzen auftretende  $\alpha$ -Dispersion wurde erst sehr spät entdeckt. 1948 wurde sie das erste Mal eher zufällig an Muskelgewebe nachgewiesen (Schwan 1994). Die Mechanismen, die sie beeinflussen sind bis heute noch nicht alle geklärt. Derzeit akzeptierte Erklärungsversuche sind unter anderem (Schwan 1994):

- „Counterion Polarisation“
- Sarkoplasmatisches Retikulum des Muskelgewebes“
- Aktivität der Proteinkanäle in der Zellmembran

Die Theorie der „counterion polarisation“ beschreibt die Ladungsverteilung der Ionen nahe der polarisierten Zellmembran. Bei diesen Ladungsträgern solle es zu einer zusätzlichen Verschiebung in Richtung des elektrischen Feldes kommen, was zu einer Erhöhung der Gesamtpolarisation führen würde.

Da der Effekt zunächst an Muskelgewebe entdeckt wurde und dieses eine besonders starke Dispersion aufweist, wird auch das sarkoplasmatische Retikulum mit der  $\alpha$ -Dispersion in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich um ein weit verzweigtes Membrannetzwerk zur Speicherung von Calciumionen. Mit Hilfe dieses Calciumspeichers kann die Aktivität der Muskelzelle kontrolliert werden.

Des Weiteren werden die, sich in der Zellmembran befindlichen, Proteine, die für einen Ionenaustausch des Zellinneren mit der Umgebung verantwortlich sind, mit der  $\alpha$ -Dispersion in Verbindung gebracht. Ihre Leitfähigkeit verändert sich stark mit der angelegten Frequenz. Dies ist auch den Formeln von Hodgkin und Huxley zu entnehmen, die bereits 1952 Theorien zu elektrischen Aktionspotenzialen und Membranströmen von Nervenzellen veröffentlichten (Hodgkin 1952).

Dennoch ist die  $\alpha$ -Dispersion in weiten Teilen nicht ausreichend erklärbar. Die Theorien der „counterion polarisation“ und der Proteinkanäle in den Zellmembranen lässt den Effekt bei deutlich niedrigeren Frequenzen vermuten als er bislang in praktischen Versuchen nachgewiesen wurde. Da auch Zellen ohne sarkoplasmatisches Retikulum, wie zum Beispiel die Bakterien *Escherichia Coli*, teils starke  $\alpha$ -Dispersionen zeigen, konnte bislang auch diese Theorie nicht überzeugen. Weiterhin gibt es Zellen wie Erythrozyten, die aus bislang ungeklärten Gründen keine  $\alpha$ -Dispersion aufweisen (Schwan 1994). Es wird daher deutlich, dass noch vieles auf dem Gebiet der  $\alpha$ -Dispersion untersucht werden muss, um diese besser verstehen zu können. Aufgrund der geringen Frequenzen und den meist sehr leitfähigen Zelllösungen ist eine kapazitive Auswertung dieses Phänomens sehr anspruchsvoll. Meist werden die Signale auch durch Nichtlinearitäten der Messelektroden in den Zelllösungen überlagert. Der galvanische Kontakt herkömmlicher Elektroden wird bei niedrigen Frequenzen sehr hochohmig und aufgrund von Diffusionsprozessen nahe den Elektrodenoberflächen stark nichtlinear (siehe Kap. 2.2).

Die bei höheren Frequenzen stattfindende  $\beta$ -Dispersion wurde schon deutlich früher entdeckt und ist mittlerweile in der Literatur vielfach beschrieben (Asami 1999; Asami 2002a; Asami 2002b). Die  $\beta$ -Dispersion resultiert aus der Polarisation der einzelnen Zellen über ihre nichtleitende Membran. Die Ionen oder Ladungsträger in der extrazellulären Zelllösung und dem Zytoplasma im Zellinneren bilden über die nur wenigen Nanometer dicke Zellmembran eine Kapazität aus. Diese Kapazität und die Zeitkonstante der  $\beta$ -Dispersion sind Funktionen der Zellmembrankapazität der Biomasse, mittleren Zellgröße und einiger Eigenschaften der Zelllösung. Da die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen auf den Effekten der  $\beta$ -Dispersion beruhen und in dem dafür relevanten Frequenzbereich von 100 kHz bis 10 MHz stattfinden, werden im folgenden Kapitel die Mechanismen und Hintergründe dieses Frequenzverhaltens noch genauer untersucht und vorgestellt (siehe Kapitel 2.1.1).

Bei der  $\gamma$ -Dispersion handelt es sich um die molekulare Relaxation von Wasser. Bei Frequenzen im Bereich von 10 bis 100 GHz. Diese Relaxation ist keine Besonderheit biologischer Zelllösungen, sondern ist schon lange auch bei reinem Wasser bekannt (Spiridonov 1982). Das Dipolmoment der H<sub>2</sub>O-Moleküle ist bei diesen Frequenzen zu langsam, um den schnellen Wechselfeldern folgen zu können. Der Zusammenhang zwischen molekularer Beweglichkeit und Dispersionsverhalten äußert sich auch in einer starken Temperaturabhängigkeit. So findet die  $\gamma$ -Dispersion schon bei deutlich niedrigeren Frequenzen statt, sobald die Temperatur sinkt (Escorihuela 2007).

*Tabelle 2.1.1. Übersicht verschiedener biologisch relevanter Substanzen mit den ihnen Verbundenen Dispersionseffekten*

Medium oder Substanz	Dispersionen		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Wasser und Elektrolyte			+
Biologische Makromoleküle:			
Aminosäuren			+
Proteine		+	+
Nukleinsäuren	+	+	+
Blasen			
ohne Oberflächenladung		+	+
mit Oberflächenladung	+	+	+
Zellen mit Membranen:			
in proteinfreien Lösungen		+	+
mit Proteinen		+	+
mit Oberflächenladungen	+	+	+
mit Membranrelaxation	+	+	+
mit Organellen		+	+
Zellen mit Membranen, Oberflächenladungen, Organellen und Proteinen	+	+	+

Tabelle 2.1.1 zeigt eine Auflistung einiger in einer Zelllösung vorkommenden Bestandteile und die Dispersionseffekte, die durch sie hervorgerufen werden. Bei einem komplexen Nährmedium aus verschiedenen Proteinen, Nuklein- und/oder Aminosäuren handelt es sich also bei den Dispersionen um überlagerte Mischsignale verschiedenster Anteile. Bei einer Fermentation in diesen Medien kann somit auch der reine Stoffwechsel der Zellen ohne eine weitere Zunahme der Biomasse zu deutlichen Änderungen im Impedanzsignal führen, wenn Proteine oder andere Bestandteile verändert werden.

### 2.1.1. Die $\beta$ -Dispersion

Die messbare Kapazitätserhöhung bei der  $\beta$ -Dispersion im Radiofrequenzbereich wird durch die Anlagerung von Ladungsträgern (meist gelöste Ionen) an der semipermeablen

Zellmembran hervorgerufen. Wird von außen ein elektrisches Wechselfeld angelegt, so wandern die Ladungsträger in der Zelllösung und dem Zellinneren an die Zellmembran, die für die Ionen eine Barriere darstellt. Diese dünne und sehr komplex aufgebaute Membran ist in der Lage durch entsprechende Proteine, die in ihr eingebettet sind, gelöste Ionen wie Kalium und Natrium sowohl in die Zelle einzuschleusen als auch aus ihr heraus zu transportieren. Mit Hilfe dieser Ionenkanäle kann eine Zelle ihren osmotischen Druck aufrecht erhalten. Abbildung 2.1.2 zeigt den Querschnitt durch eine typische Zellmembran bestehend aus einer Lipid-Doppelschicht mit eingebauten und peripheren Proteinen.

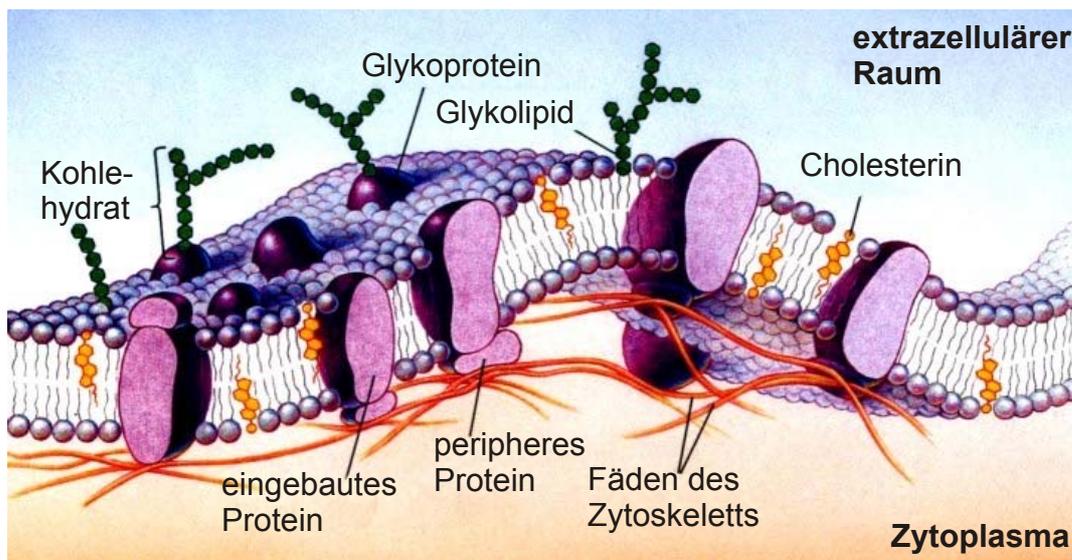


Abbildung 2.1.2. Querschnitt einer Zellmembran\*

Typisch ist ein solcher Zellmembranaufbau (Abbildung 2.1.2) für Eukaryonten, also Zellen mit vollständigem Zellkern. Die Zellmembran besteht aus einer Doppellipidschicht mit Cholesterinanteilen. Eingebaute Proteine sorgen für einen Stoffaustausch zwischen extra- und intrazellulärem Raum. Die teils an periphere Proteine gebundenen Kohlehydrate, auch Glykoproteine genannt, haben vielfältige Aufgaben. Zu diesen Aufgaben können sowohl Schleimbildung als auch komplexere Zellinteraktionen zählen. Das Zytoskelett im Zellinneren gibt der Zelle ihre Stabilität und ist verantwortlich für den Formerhalt der Zellstruktur.

Prokaryonten (Bakterien) hingegen weisen einen abweichenden Aufbau der Zellmembran auf. Der wesentliche Bestandteil prokaryotischer Zellwände ist das Peptidoglykan. Dieses Biopolymer wird auch Murein genannt und sorgt für die Festigkeit und Stabilität bakterieller Zellwände. Prokaryonten verfügen im Gegensatz zu Eukaryonten über keinen vollständigen Zellkern.

\* Quelle: Universität Graz

Um nun den Effekt der  $\beta$ -Dispersion mathematisch beschreiben zu können, kann die kompliziert aufgebaute Zellmembran näherungsweise als ideale Schale mit der Dicke  $d_m$  und dem Radius  $R$  definiert werden.

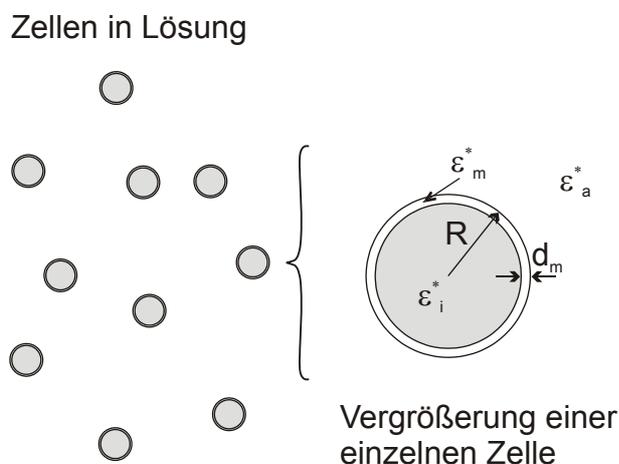


Abbildung 2.1.3. Prinzipskizze des Schalenmodells einer Zelle in Zelllösung

Das einfache Modell einer kugelförmigen Schale zur Beschreibung einer einzelnen Zelle ist in Abbildung 2.1.3 dargestellt (Asami 1994; Asami 1999; Asami 2005; Asami 2006). Die zu berücksichtigenden Größen sind die komplexen Permittivitäten der Zelllösung selber  $\epsilon_a^*$ , der Zellmembran  $\epsilon_m^*$  und des Zellinneren  $\epsilon_i^*$ . Des Weiteren haben auch der Zellradius  $R$  und die Membrandicke  $d_m$  einen Einfluss auf das dielektrische Verhalten der Gesamtlösung. Die resultierende Polarisierbarkeit oder Permittivität der einzelnen Zelle  $\epsilon_z$  berechnet sich wie folgt (Asami 2006):

$$\epsilon_z^* = \epsilon_m^* \frac{2(1-v)\epsilon_m^* + (1+2v)\epsilon_i^*}{(2+v)\epsilon_m^* + (1-v)\epsilon_i^*} \quad \text{mit} \quad v = (1-d_m/R)^3 \quad (2)$$

Hierbei ist die komplexe Permittivität definiert als:

$$\epsilon^* = \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} \quad (3)$$

Der imaginäre Verlustterm wird bestimmt durch die Leitfähigkeit  $\sigma$  und ist eine Funktion der Frequenz ( $\omega = 2\pi f$ ). Um von der Permittivität einer einzelnen Zelle auf die resultierende und messbare Permittivität der Gesamtlösung zu schließen, muss der zelluläre Volumenanteil der Zelllösung berücksichtigt werden. Dieser Volumenanteil wird durch den Faktor  $P$  beschrieben (Asami 2006):

$$\epsilon^* = \epsilon_a^* \frac{2(1-P)\epsilon_a^* + (1+2P)\epsilon_z^*}{(2+P)\epsilon_a^* + (1-P)\epsilon_z^*} \quad (4)$$

Durch die Kombination beider Gleichungen ((2) und (4)) ergeben sich theoretisch zwei sich überlagernde Debye-Relaxationen. Eine Debye-Relaxation beschreibt die elektrische Antwort eines dipolaren Systems auf ein äußeres elektrisches sich veränderndes Feld (Arlt

1989). Dieses System wird durch eine Zeitkonstante  $\tau$  charakterisiert. Die Relaxationszeit  $\tau$  benötigt das System nach einer Anregung um wieder in den Gleichgewichtszustand zurückzukehren. Im Fall dass alle Dipole des Systems die exakt gleiche Relaxationszeit aufweisen und unabhängig voneinander sind, spricht man von einem Debye-Verhalten (siehe Anhang).

Unter der Annahme dass der Zellradius wesentlich größer ist als die Dicke der Zellmembran ( $d_m \ll R$ ) und dass die Leitfähigkeit der Zellmembran vernachlässigbar klein gegenüber den nahezu identischen Leitwerten innerhalb und außerhalb der Zelle ( $\sigma_m \ll \sigma_i \approx \sigma_a$ ) ist, lässt sich das Verhalten auf nur eine Relaxation vereinfachen, die man mit folgender Gleichung beschreiben kann (Asami 2006):

$$\varepsilon^* = \varepsilon_h + \frac{\varepsilon_l - \varepsilon_h}{1 + j\omega\tau} + \frac{\sigma}{j\omega\varepsilon_0} \quad (5)$$

Bei dieser Darstellung der komplexen Permittivität handelt es sich um die Beschreibung einer einfachen Debye-Relaxation. Hierbei beschreiben die Permittivitäten  $\varepsilon_l$  und  $\varepsilon_h$  jeweils die reale Permittivität bei niedrigen ( $l = \text{low}$ ) und hohen ( $h = \text{high}$ ) Frequenzen.

Eine anschaulichere Darstellung des Relaxationsverhaltens bietet die Darstellung der frequenzabhängigen verlustfreien Permittivität ( $\text{Re}(\varepsilon^*)$ ) und der frequenzabhängigen realen Leitfähigkeit  $\sigma$ . Der Realteil der Permittivität  $\varepsilon^*$  ergibt durch die konjugiert-komplexe Erweiterung des ersten Nenners in Gleichung (5).

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_h + \frac{\varepsilon_l - \varepsilon_h}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (6)$$

Die Leitfähigkeit  $\sigma$  ist ebenfalls eine Funktion der Frequenz und kann mit folgender Formel beschrieben werden (Hauttmann 2001):

$$\sigma(\omega) = \sigma_l + (\sigma_h - \sigma_l) \frac{\omega^2 \cdot \tau^2}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (7)$$

Auch hier (Formel (7)) symbolisieren die Indizes  $l$  und  $h$  die Werte bei Frequenzen deutlich unterhalb ( $\sigma_l$ ) und weit oberhalb ( $\sigma_h$ ) der Relaxationsfrequenz. Für die charakteristischen Größen in den Formeln (6) und (7) lassen sich mit den oben getroffenen Annahmen folgende Näherungen vereinbaren:

$$\varepsilon_1 \approx \varepsilon_a + \frac{9}{4\varepsilon_0} \cdot P \cdot R \cdot C'_m \quad (8)$$

$$\sigma_1 \approx \sigma_a \frac{1-P}{1+0,5 \cdot P} \quad (9)$$

$$\sigma_h \approx \sigma_a \left[ 1 + 3P \cdot \frac{\sigma_i - \sigma_a}{\sigma_i + 2\sigma_a} \right] \quad (10)$$

$$\tau \approx R \cdot C'_m \frac{\sigma_i + 2 \cdot \sigma_a}{2\sigma_i \sigma_a} \quad (11)$$

Die Permittivität  $\varepsilon_h$  entspricht der Mischung der Permittivitäten des Mediums  $\varepsilon_a$  und des Zellinneren  $\varepsilon_i$ . Da der Wert beider, bedingt durch den hohen Wasseranteil, zirka 80 beträgt kann die Permittivität  $\varepsilon_h$  näherungsweise auf diesen Wert festgelegt werden. Die Größe  $C'_m$  beschreibt die Polarisation der Zellwände in der Form eines Kapazitätsbelags. Die Größe dieses Kapazitätsbelages beträgt zirka  $1 - 2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Pauly 1963).

Simuliert man nun das Verhalten der dielektrischen Größen mittels der Formeln (6) und (7), erhält man die Kurven aus Abbildung 2.1.4. In der Abbildung sind die Permittivitäten und die Leitfähigkeiten einer Zelllösung mit drei unterschiedlichen Zellkonzentrationen gezeigt. Für die Berechnung wurde angenommen, dass die Leitfähigkeiten des Mediums und des Zellinneren  $10 \text{ mS}/\text{cm}$  betragen ( $\sigma_i = \sigma_a = 10 \text{ mS}/\text{cm}$ ). Der Membrankapazitätsbelag  $C'_m$  betrug  $10 \text{ mF}/\text{m}^2$  und der Zellradius  $R$  wurde auf  $2,5 \mu\text{m}$  festgelegt. Die für die  $\beta$ -Dispersion charakteristische Frequenz  $f_\beta$  lässt sich über die Zeitkonstante  $\tau$  berechnen:

$$f_\beta = \frac{1}{2\pi \cdot \tau} \quad (12)$$

Diese charakteristische Frequenz der  $\beta$ -Dispersion betrug bei den in Abbildung 2.1.4 gezeigten Simulationen zirka  $4,244 \text{ MHz}$ .

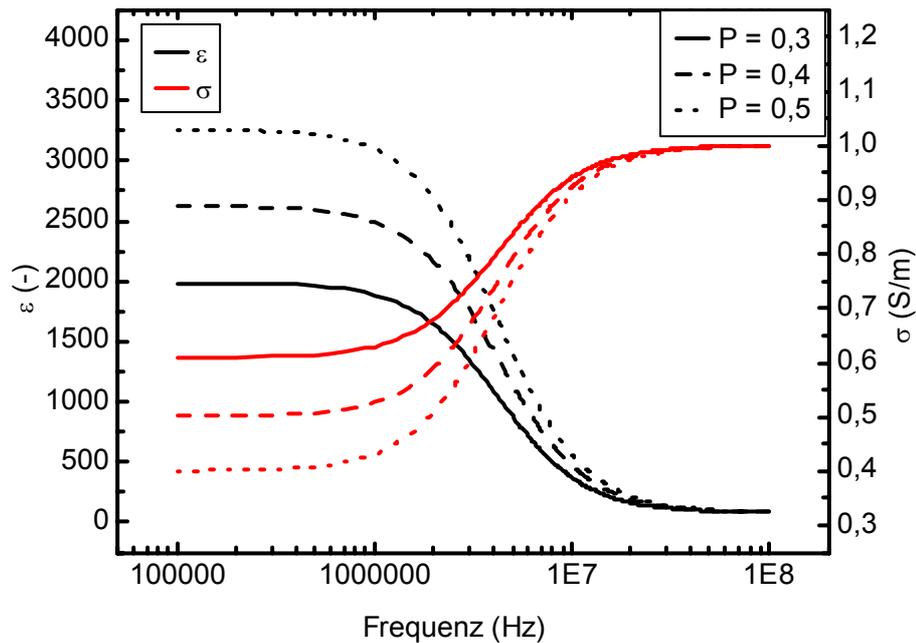


Abbildung 2.1.4. Berechnete Werte der Permittivität und der Leitfähigkeit mittels der Formeln (6) und (7) für verschiedene Zellkonzentrationen

Den Graphen aus Abbildung 2.1.4 ist deutlich zu entnehmen, dass die Höhe der Dispersionsstufe von dem Volumenanteil  $P$  der Zellen und damit von der Zellkonzentration abhängt. Die Werte sowohl der Leitfähigkeit als auch der Permittivität bei hohen Frequenzen hingegen sind konstant. Diese Werte werden durch die Größen  $\sigma_i$ ,  $\sigma_a$ ,  $\epsilon_i$  und  $\epsilon_a$  bestimmt. Im niedrigen Frequenzbereich stellen die Zellen mit ihrer Membran eine unüberwindliche Barriere für die Ladungsträger dar. Durch die hohen Frequenzen werden die Zellmembranen quasi kurzgeschlossen und die Zellen vom elektrischen Feld durchdrungen (siehe Abbildung 2.1.5).

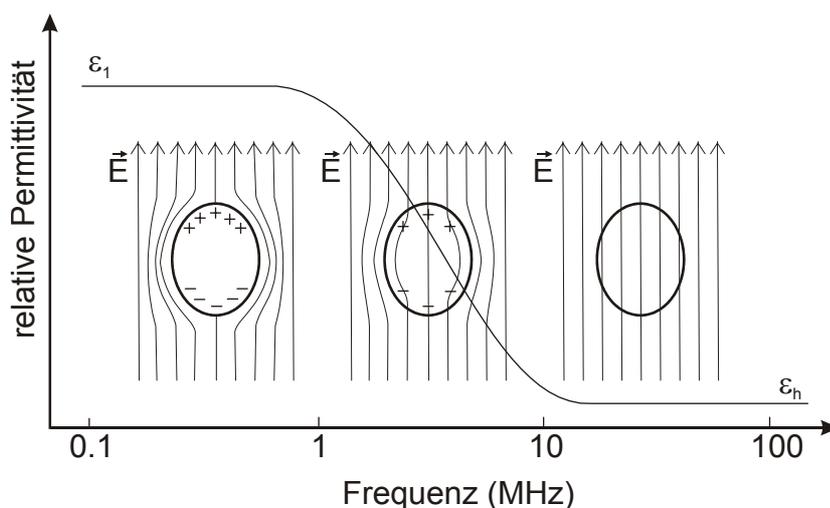


Abbildung 2.1.5. Polarisation einer Zelle durch Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes bei unterschiedlichen Frequenzen

So wie die Polarisierbarkeit der Zellen mit steigender Frequenz abnimmt, so steigt die effektive Leitfähigkeit an (Abbildung 2.1.4). Die Zellen hindern als kleine Barrieren den Stromfluss bei niedrigen Frequenzen. Dieses Verhalten wird auch als Indikator der aktiven Biomasse verwendet und beruht auf der Maxwell-Fricke-Formel (Spiller 2003). Bei hohen Frequenzen, bei denen die Membranen der Zellen kein Hindernis mehr darstellen (Abbildung 2.1.5) ist die resultierende Leitfähigkeit zusammengesetzt aus den Leitfähigkeiten der Lösung und des Zellinneren (Formel (10)).

Die Zeitkonstante  $\tau$  und damit auch die charakteristische Frequenz  $f_\beta$  wiederum sind linear abhängig von dem Zellradius  $R$  (siehe Formel (11)). Aber auch die Leitfähigkeiten der Zelllösung und des Zellinneren haben einen Einfluss auf die Zeitkonstante. Der Kapazitätsbelag  $C'_m$  hingegen ist eine Eigenschaft der Membranen und als konstant anzusehen. Daraus ergibt sich ein Zusammenhang zwischen der Frequenz  $f_\beta$  und der Zellgröße. Je größer die Zellen sind desto niedriger ist  $f_\beta$ . Für kleinere Zellen hingegen wandert die Dispersionsstufe im Frequenzspektrum zu höheren Frequenzen hin.

Diese mathematische Beschreibung der Zelllösung und deren Frequenzverhalten durch ein Debye-Verhalten sind idealisiert und berücksichtigen keine Variation der Zellen in Größe oder Form. Um eine Streuung der Zellgrößen in die Berechnung mit aufzunehmen, kann der Cole-Cole  $\alpha$ -Faktor eingeführt werden (Asami 2002b):

$$\varepsilon^* = \varepsilon_h + \frac{\varepsilon_l - \varepsilon_h}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} + \frac{\sigma}{j\omega\varepsilon_0} \quad \text{mit } 0 < \alpha < 1 \quad (13)$$

Mit Hilfe dieses Faktors wird einer Varianz der Relaxationszeiten Rechnung getragen. Es können mit dieser Formel nun dipolare Systeme beschrieben werden, deren einzelne Dipole sich leicht voneinander unterscheiden. Im Falle einer Zelllösung könnte dies bedeuten, dass unterschiedliche Zellgrößen und Formen in der Lösung vorkommen. Die Einführung des  $\alpha$ -Faktors in die Formel zur Berechnung der komplexen Permittivität hat jedoch zu Folge, dass die mathematische Beschreibung des Realteiles der Permittivität, also die verlustfreie Polarisierbarkeit oder Kapazität der Zelllösung, sich wesentlich komplizierter darstellt als in Gleichung (6) für den Fall der einfachen Debye-Relaxation (Asami 2002b):

$$\varepsilon' = \varepsilon_h + \frac{(\varepsilon_l - \varepsilon_h) \cdot \left[ 1 + (\omega\tau)^{(1-\alpha)} \cos\left(\pi \frac{1-\alpha}{2}\right) \right]}{1 + 2 \cdot (\omega\tau)^{(1-\alpha)} \cos\left(\pi \frac{1-\alpha}{2}\right) + (\omega\tau)^{2(1-\alpha)}} \quad \text{mit } 0 < \alpha < 1 \quad (14)$$

Weitere Ansätze zur mathematischen Modellierung einer endlichen Zellradienvarianz sind durch Asami et al. beschrieben (Asami 2002b). Auch tiefer gehende Modelle zur Simulation der Effekte sich teilender Zellen oder einander anhaftender Zellen werden in der Literatur beschrieben (Asami 2007).

Bei den vorgestellten Gleichungen und Modellen (Formeln (2) bis (12)) bleibt zu beachten, dass die Zellen lediglich als sphärische Kugeln in einer homogenen Lösung beschrieben wer-

den. Bakterien, die eine stabähnliche Form aufweisen, sind mathematisch wesentlich komplizierter zu beschreiben. Das prinzipielle Dispersionsverhalten bleibt zwar erhalten, da jedoch stark unterschiedliche Zellradien zusammen auftreten, erstreckt sich die messbare Stufe der  $\beta$ -Dispersion über einen größeren Frequenzbereich. Diese Größenvarianz kann mit Hilfe der Gleichungen (13) und (14) beschrieben werden. Weiterhin werden Einflussfaktoren durch komplexe Moleküle vernachlässigt, die ebenfalls ein Dispersionsverhalten im Radiofrequenzbereich aufweisen können. Die mathematischen Modelle zur Beschreibung der  $\beta$ -Dispersion konnten bislang nur an sehr dichten Zelllösungen verifiziert werden. In den meisten Fällen werden Volumenverhältnisse von 30% ( $P = 0,3$ ) und höher angesetzt.

Zulässig sind solche Verhältnisse vor allem bei Einzelzellmessungen in Lab-on-Chip Ansätzen (Gómez 2001; Morgan 2007; Sun 2007a; Sun 2007b). Hierbei nimmt die Zelle einen Großteil des Messbereiches ein und es stellen sich Volumenverhältnisse vom Zellinneren zum Zelläußeren von bis zu 50% ein.

Bei Fermentationen unter normalem Umgebungsdruck, ohne aktive Regelung des pH-Wertes und ohne Zufütterung weiterer Nährstoffe (Batch-Verfahren) werden solch hohe Zelldichten nicht erreicht. Bei diesen sogenannten Batch-Fermentationen ist mit maximalen Zelldichten von 10 – 15 g/l zu rechnen.

## 2.2. Grundlagen der Elektrochemie

Die klassische Elektrochemie betrachtet Vorgänge, bei denen eine gegenseitige Umwandlung von chemischer und elektrischer Energie stattfindet. Damit sind Vorgänge gemeint, bei denen chemische Reaktionen mit einer Wanderung von elektrischen Ladungen oder dem Auftreten von elektrischen Potenzialen einhergehen (Falbe 1990). Die bei der Elektrochemie am häufigsten auftretende Versuchsanordnung ist eine metallische Elektrode in einem flüssigen Elektrolyten. Diese typische Anordnung wird in der Chemie als Halbzelle definiert. In den meisten Fällen steht die Phasengrenze zwischen Metall und Elektrolyt im Vordergrund. So können die Phasengrenzen für sensortechnische Anwendungen eingesetzt werden, bei denen entweder die Übergangsströme als Messgröße dienen (amperometrische Verfahren) oder die über der Phasengrenze auftretende Spannung stromlos gemessen wird (potenziometrische Verfahren). Mit Hilfe dieser Verfahren können zum Beispiel der gelöste Sauerstoff (Clarkzelle) oder der pH-Wert gemessen werden. Eine weitere Anwendung ist das kontrollierte Abscheiden von Metallen an einer stromführenden Elektrode. Diese galvanischen Prozesse finden in weiten Bereichen der Industrie Anwendung. Neben klassischen Anwendungen, wie dem Veredeln von metallischen Oberflächen wie beispielsweise Hart- oder Dekorverchromung, werden galvanische Prozesse auch in der Mikrosystemtechnik eingesetzt, um metallische Schichten von mehreren Mikrometern Dicke abzuscheiden. Eine zentrale Funktion nehmen die Elektrode-Elektrolyt-Phasengrenzen auch in Batterien oder speziellen Kondensatoren (Elektrolytkapazitäten oder SuperCap) ein.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit hingegen sollte sein, die elektrischen Eigenschaften flüssiger Medien also nur der Elektrolyten zu bestimmen. Dabei sind Fehler durch die Phasengrenzen der Elektroden in den Elektrolyten zu vermeiden bzw. zu minimieren. Um zu verstehen, welche Effekte bei einem Kontakt zwischen Metallen und flüssigen Medien (Elektrolyten) auftreten können, und welche Einflüsse sie auf die elektrischen Signale haben, sollen diese Metall-Elektrolyt-Kontakte im folgenden Kapitel genauer betrachtet werden.

### 2.2.1. Metall-Elektrolyt-Kontakte

Bei der Kombination metallischer Elektroden in einem flüssigen Elektrolyten kommt es zu einer spontanen Ausbildung elektrischer Potenziale über der Phasengrenze. Der elektrische Ladungstransport erfolgt in metallischen Leitern ausschließlich durch freie Elektronen. Im Elektrolyten hingegen sind gelöste, frei bewegliche Ionen für den Ladungstransport verantwortlich. Da die Ladungsträger der unterschiedlichen Phasen (Elektrode und Elektrolyt) ohne Zufuhr äußerer Energie nicht ausgetauscht werden können, bilden sich starke Konzentrationsgradienten und damit verbundene Potenzialgradienten in der Nähe der Phasengrenze aus.

Bereits 1879 beschrieb Helmholtz die Phasengrenze von Elektrode zu Elektrolyt als einfaches Doppelschichtmodell. Das Modell beschreibt die Anlagerung orientierter Wassermoleküle und absorbierter Ionen direkt an der Elektrodenfläche. Diese Schicht wird auch innere Helmholtzschicht genannt. Die zweite oder auch äußere Helmholtzschicht besteht aus solvatisierten, also gelösten, Ionen mit Hydrathülle. In dieser Schicht kommt es zu einem

linearen Potenzialabfall. Über beiden Schichten bildet sich die so genannte Helmholtzkapazität oder Doppelschichtkapazität  $C_D$  aus.

$$C_D' = \varepsilon \cdot \frac{1}{d} \quad (15)$$

Formel (15) zeigt die Berechnung des Kapazitätsbelages  $C_D'$  dieser Doppelschichtkapazität als Funktion der dielektrischen Konstante  $\varepsilon$  und des effektiven Ladungsträgerabstandes  $d$ . Durch die direkte Anlagerung der Wassermoleküle und der Ionen, ohne dass diese in das Metall als Ladungsträger eindringen können, entsteht eine Kapazität mit einem extrem kleinen effektiven Ladungsträger- oder Plattenabstand von zirka 3 – 10 nm. Ein Problem dieses Modells ist, dass nur die dielektrische Konstante, die theoretisch nicht von der von Vakuum abweichen sollte, oder aber der Ladungsträgerabstand für eine Änderung der Kapazität verantwortlich sein können. Diese Annahme widerspricht jedoch praktischen Messungen.

Um andere Einflüsse wie Temperaturabhängigkeiten und Ionenkonzentrationen zu berücksichtigen, beschrieben Gouy und Chapman in den Jahren 1909 bzw. 1913 metallische Elektroden in einem flüssigen Elektrolyten als von einer Ionenwolke umhüllt. Polarisations- und Organisationsgrad der Ionen nehmen in dieser „diffusen“ Schicht mit der Entfernung von der Elektrode exponentiell ab und hängen stark von der Beweglichkeit der Ionen und damit von der Temperatur des Elektrolyten ab.

$$C_{GC} = \sqrt{\frac{\varepsilon z^2 e_0^2 n}{2\pi kT}} \cdot \frac{\cosh(ze_0\Psi)}{kT} \quad (16)$$

Die mathematische Beschreibung dieser Gouy-Chapman-Kapazität ( $C_{GC}$ ) ist in Formel (16) gegeben. Dabei beschreibt  $\varepsilon$  wieder die dielektrische Konstante,  $z$  ist die Ladungszahl der relevanten Ionen,  $e_0$  ist die Elementarladungszahl und  $n$  ist die Ionenkonzentration. Des Weiteren ist die Kapazität eine Funktion des Elektrodenpotenzials  $\Psi$ , der Boltzmannkonstanten  $k$  und der Temperatur  $T$ . Dieses Modell beschreibt eine eindeutige Abhängigkeit der Kapazität von der Ionenstärke im Elektrolyten. Versuche haben jedoch früh gezeigt, dass auch dieses Modell der Phasengrenze nur eingeschränkt anwendbar ist. So ist es möglich das Verhalten von Elektrolyten mit geringer Ionenkonzentration (z.B. < 0,001 M NaCl) (Noble 1999) sehr exakt zu beschreiben, jedoch wird der Einfluss der Ionenkonzentration bei höheren Konzentrationen zu stark berücksichtigt. Messbare Kapazitäten bei hochkonzentrierten ionischen Lösungen liegen weit unter denen, die das Modell beschreibt.

1924 kombinierte Stern beide Theorien und beschrieb die Phasengrenze als aus zwei verschiedenen Bereichen bestehend. Nahe der Elektrode bilden sich die von Helmholtz beschriebenen hohen Kapazitäten aus, die durch Anlagerung der Wassermoleküle und gelöster Ionen entstehen. Die zweite Region ist die von Gouy und Chapman beschriebene „diffuse“ Schicht. Zur Beschreibung der entstehenden Gesamtkapazität beschrieb Stern diese als einfache Reihenschaltung der zuvor beschriebenen Einzelkapazitäten:

$$C_s^{-1} = C_D^{-1} + C_{GC}^{-1} \quad (17)$$

Für Lösungen mit geringer Ionenkonzentration wird die Gesamtkapazität dominiert durch die von Gouy und Chapman eingeführte Kapazität  $C_{GC}$  der „diffusen“ Schicht. Bei höher konzentrierten ionischen Elektrolyten spielt diese Kapazität jedoch kaum noch eine Rolle und die von Helmholtz beschriebene Doppelschichtkapazität dominiert. Typische Kapazitätsbeläge dieser Doppelschicht reichen von 10 bis 100  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

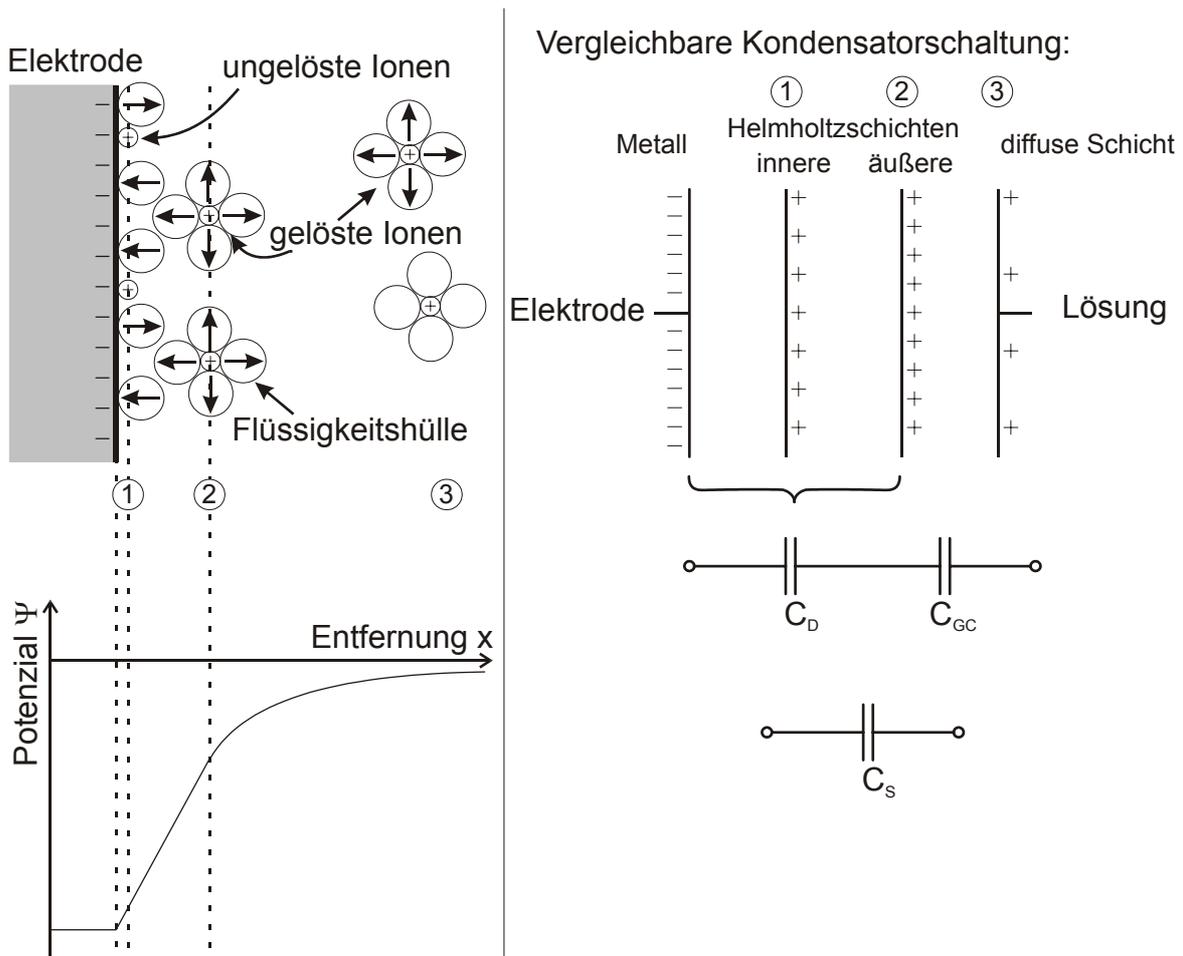


Abbildung 2.2.1. Helmholtzschicht und diffuse Schicht bei einem Kontakt zwischen metallischer Elektrode und flüssigem Elektrolyt

Abbildung 2.2.1 zeigt den modellhaften Aufbau der Helmholtz Doppelschicht und der diffusen Gouy-Chapman-Schicht. Das kapazitive Verhalten lässt sich wie in Gleichung (17) gezeigt durch eine Reihenschaltung der Einzelkapazitäten beschreiben. Der Potenzialverlauf innerhalb der Helmholtz Doppelschicht verläuft linear, während das Potenzial in der diffusen Schicht exponential abnimmt.

Für eine vollständige Beschreibung des elektrochemischen Verhaltens einer metallischen Elektrode in einem flüssigen Elektrolyten ist eine rein kapazitive Betrachtung jedoch nicht ausreichend (Fritz 2002; Ragheb 1990). Neben der Anlagerung geladener Elektrolytteilchen wie Ionen, kommt es auch zu einem Ladungsträgeraustausch und damit zu einem tatsächlichen Stromfluss. Bei hohen Potenzialen oder Stromdichten setzen sogenannte

Elektrolyseprozesse ein. Bei der Elektrolyse von Wasser entstehen je nach angelegtem Potenzial entweder Wasserstoff oder Sauerstoff an der Elektrodenoberfläche. Bleibt man mit den Versuchen unterhalb dieser Grenzpotenziale, kann man das elektrische Verhalten durch einfache elektrische Ersatzschaltbilder (ESB) beschreiben. Bei der Beschreibung der elektrochemischen Phasengrenze mit Hilfe eines ESB sind zwei verschiedene Elektrodenreaktionstypen zu unterscheiden: die durchtrittskontrollierte und die diffusionskontrollierte Elektrodenreaktion (Fritz 2002).

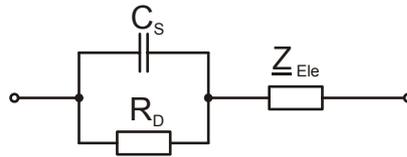


Abbildung 2.2.2. Ersatzschaltbild einer durchtrittskontrollierten Elektrodenreaktion

Bei einer Elektrodenreaktion, die durchtrittskontrolliert abläuft, wird der Ladungsträgertransport durch den Ladungsaustausch an der Elektrodenoberfläche bestimmt. Elektronen der metallischen Elektrode sowie Ladungsträger des Elektrolyten sind zu jeder Zeit und quasi verzögerungsfrei an der Phasengrenze vorhanden. Der hier stattfindende Ladungsaustausch kann im ESB durch einen einfachen ohmschen Widerstand  $R_D$  berücksichtigt werden, der parallel zu der zuvor beschriebenen Kapazität  $C_S$  liegt (Abbildung 2.2.2). In Reihe zu der Phasengrenze muss noch die Leitfähigkeit des Elektrolyten beachtet werden. In den meisten Fällen wird diese auch als einfacher ohmscher Widerstand bewertet. Da in dieser Arbeit aber gerade die komplexe Impedanz der Lösung oder des Elektrolyten im Vordergrund steht, wird an dieser Stelle der Elektrolyt durch die komplexe Impedanz  $\underline{Z}_{Ele}$  beschrieben.

Wird der Ladungsträgertransport nicht durch den Ladungsaustausch an der Phasengrenze limitiert, sondern verlangsamt durch eine Ladungsträgerverarmung, so spricht man von einer diffusionskontrollierten Elektrodenreaktion. Die für den Ladungsträgertransport notwendigen Ladungsträger des Elektrolyten müssen erst aus der Lösung zu den Elektroden diffundieren. Dieses diffusive Verhalten der Ladungsträger wird in dem ESB mit Hilfe der Warburgimpedanz  $\underline{Z}_W$  dargestellt.

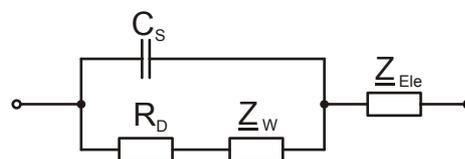


Abbildung 2.2.3. Ersatzschaltbild einer diffusionskontrollierten Elektrodenreaktion mit Warburgimpedanz

$$\underline{Z}_W = \frac{d_k}{\sqrt{\omega}} - i \frac{d_k}{\sqrt{\omega}} = \text{Re}(\underline{Z}_W) - i \cdot \text{Im}(\underline{Z}_W) = R_W + \frac{1}{i\omega C_W} \quad \text{mit } \omega = 2\pi f \quad (18)$$

Die Warburgimpedanz wird beschrieben als Funktion des Diffusionskoeffizienten  $d_k$  und der Frequenz  $f$ . Das elektrische Verhalten der Warburgimpedanz wird also durch die Reihen-

Schaltung eines Widerstandes  $R_W$  mit einer Kapazität  $C_W$  beschrieben. Beide Größen sind wiederum eine Funktion der elektrischen Frequenz und ergeben sich zu:

$$R_W = \operatorname{Re}(Z_W) = \frac{d_k}{\sqrt{\omega}} \quad (19)$$

bzw.

$$C_W = \frac{1}{d_k \cdot \sqrt{\omega}} \quad (20)$$

Betrachtet man die Ortskurven (Nyquist-Diagramm) der verschiedenen Phasengrenzen, so lassen sich bereits dort charakteristische Werte ablesen.

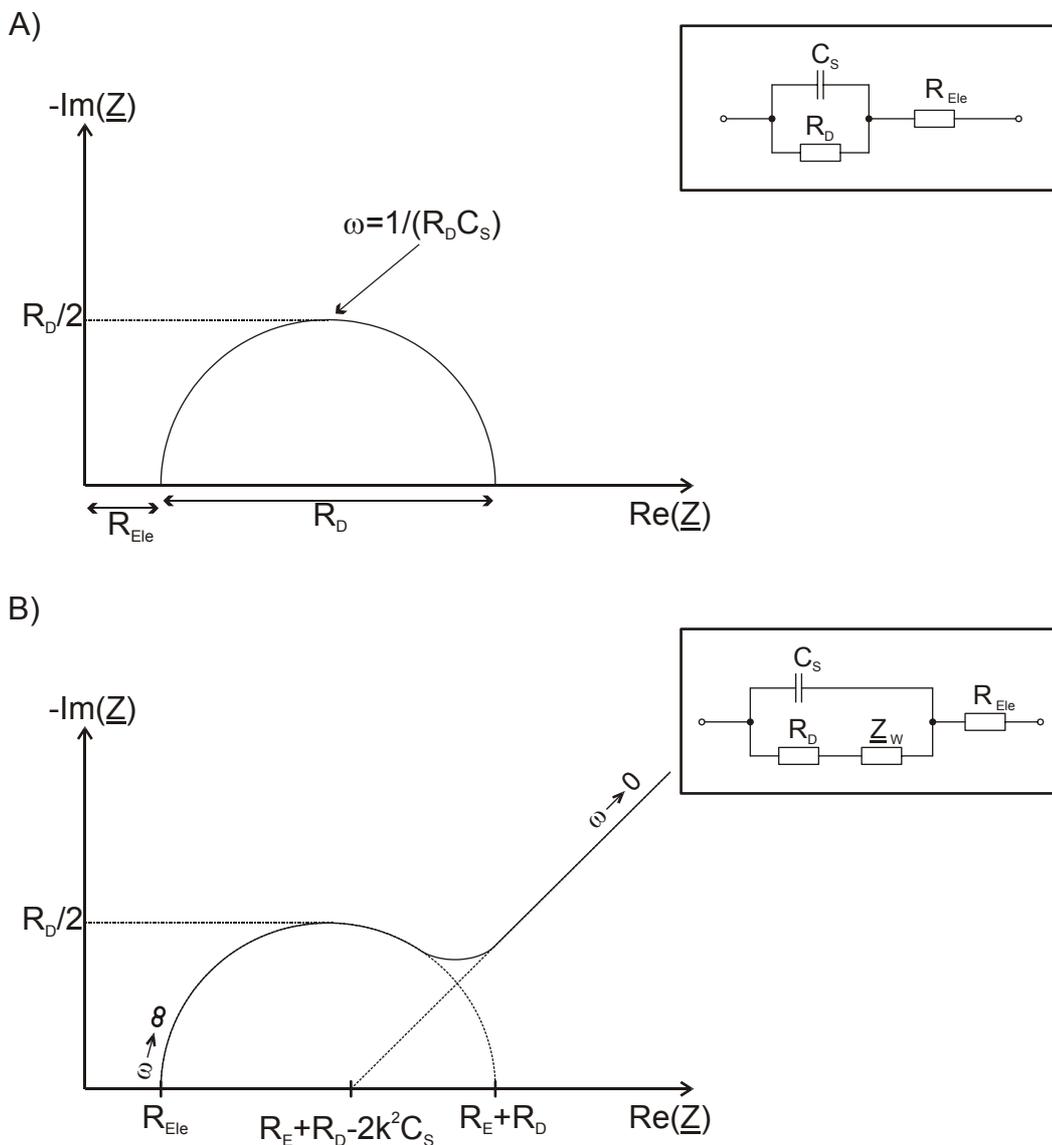


Abbildung 2.2.4. Nyquist-Diagramme der beiden Phasenübergänge  
 A): durchtrittskontrolliert und B): diffusionsorientiert

In Abbildung 2.2.4 sind die Ortskurven für beide Fälle dargestellt. Trägt man den negativen Imaginärteil der gemessenen Impedanz als Funktion des Realteils auf, so ergibt sich für

das einfache Ersatzschaltbild durchtrittskontrollierter Elektrodenreaktionen (Abbildung 2.2.2) ein einfacher Halbkreis (Abbildung 2.2.4 A). Der Abstand des Halbkreises zur Ordinate entspricht dem Widerstand, der durch den Elektrolyten hervorgerufen wird. In den in Abbildung 2.2.4 gezeigten Graphen wird aus Gründen der Übersichtlichkeit auf eine Betrachtung der komplexen Elektrolytimpedanz verzichtet.  $R_{\text{Ele}}$  repräsentiert den ohmschen Widerstand des Elektrolyten. Der Durchmesser des in Abbildung 2.2.4 A gezeigten Halbkreises entspricht dem Durchtrittswiderstand  $R_D$ . Der höchste Punkt des Halbkreises wird bei der Frequenz erreicht, die sich aus dem Kehrwert der Multiplikation von der Kapazität  $C_S$  und dem Widerstand  $R_D$  ergibt. Erhöht sich die Frequenz, läuft man auf der Ortskurve in die Richtung der Ordinate und verringert man die Frequenz, so entfernt man sich entlang der Kurve von der Ordinate.

Das Nyquist-Diagramm der diffusionskontrollierten Elektrodenreaktionen sieht für hohe Frequenzen identisch aus. Der Ordinatenabstand wird auch hier durch den Widerstand  $R_{\text{Ele}}$  bestimmt. Zu niedrigeren Frequenzen hin knickt die Kurve jedoch ab und geht in eine Gerade mit einer Steigung von  $45^\circ$  über. Dieser Bereich der Kurve wird auch als Warburggerade bezeichnet. Der Diffusionskoeffizient  $k$  kann über die in der Abbildung 2.2.4 B angegebene Formel graphisch ermittelt werden.

### 2.2.2. Platin, Platin-schwarz und Iridiumoxid

Der Name Platin leitet sich ab aus dem spanischen Wort „platina“, einer Verkleinerungsform von „plata“ (Silber). Es ist ein chemisches Element und befindet sich als Übergangsmetall im Periodensystem in der Gruppe 10 und der Periode 6. Seine Ordnungs- oder Kernladungszahl beträgt 78. Es zeichnet sich auf der einen Seite durch eine enorme Korrosionsbeständigkeit aus, wirkt auf der anderen Seite aber auch als starker Katalysator anderer chemischer Reaktionen (Schwan 1985; Yazawa 2002c; Yazawa 2002b; Yazawa 2002a). Vor allem das chemisch stabile, und korrosionsbeständige Verhalten machen das Platin zu einem idealen Werkstoff für zuverlässige elektrochemische Kontakte.

Um die Eigenschaften einer Platinelektrode noch zu verbessern verwendet man in der Elektrochemie häufig ein sehr poröses Platin (Platin-schwarz), das sich durch eine stark vergrößerte aktive Oberfläche auszeichnet. Diese größere aktive Oberfläche im Vergleich zu glänzenden glatten Platinelektroden der gleichen Größe hat eine deutlich verringerte Übergangsimpedanz in den Elektrolyten. Zur Herstellung von Platin-schwarz wird normales Platin in einer chlorhaltigen Bleiacetatlösung mit einer angelegten Gleichspannung gegenüber einer Gegenelektrode platinisiert (Ilic 2000; Toyama 2001). Ein großes Problem dieser Platin-schwarz-Elektroden ist ihre Instabilität. Das poröse Platin-schwarz hält nur sehr schlecht auf anderen Materialien und fällt schon bei geringsten mechanischen Belastungen ab.

Ein anderes Material, dass in den letzten Jahren als Elektrodenmaterial für elektrochemische Anwendungen immer weiter in Fokus der Wissenschaft gerückt ist, ist oxidiertes Iridium. Iridiumoxid lässt sich ebenfalls auf verschiedene Weisen herstellen. Durch einfache elektrochemische Aktivierungsprozesse lassen sich ebenfalls stark poröse nahezu fraktale Oberflächen erzeugen, die eine enorm niedrige Übergangsimpedanz zeigen. Der Vorteil des

Iridiumoxides gegenüber herkömmlichem Platin-schwarz ist die vergleichsweise einfache Herstellung und die höhere mechanische Stabilität. Während das Platin in bleihaltigen, meist toxischen Lösungen elektrochemisch aktiviert werden muss, reichen für die Aktivierung einer reaktiv gesputterten (sputtern = (engl.) Kathodenzerstäubungsverfahren zur Abscheidung dünner Schichten) Iridiumoxidschicht wenige Spannungszyklen in einem Bereich von -1,5 V bis +1,5 V gegenüber eine Referenzelektrode aus, um einen deutlichen Aktivierungseffekt zu erzielen. Diese Schichten und die genauen chemischen Abläufe und Hintergründe der Aktivierung waren vor allem in Hinblick auf eine Anwendung als Stimulationselektroden in medizinischen Implantaten Schwerpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten in den letzten Jahren (Slavcheva 2006a; Wessling 2006b; Wessling 2007; Wessling 2008b; Wessling 2008a).

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, wie sich Iridiumoxid als Elektrodenmaterial für die Impedanzmessung eignet. Welche Vorteile die niedrigen Übergangsimpedanzen speziell für die Vierpunktmessungen bieten, stand hierbei im Vordergrund.

### 2.3. Galvanisch entkoppelte Elektroden

Das Prinzip der „galvanisch entkoppelten“ oder „kontaktlosen kapazitiven“ Messung wurde bereits 1957 (Cruse 1957) beschrieben. Ohne Elektrodenkontakt zur Versuchslösung konnte mit diesem Messprinzip die elektrische Leitfähigkeit der Lösung bestimmt werden. Bislang wurde der Ansatz jedoch nur zur Bestimmung der Leitfähigkeit verwendet. Die Bewandung des Versuchsgefäßes mit der Testlösung diente hierbei als Isolationsschicht, und ermöglichte so eine reproduzierbare kapazitive Kopplung der Messelektroden an die zu untersuchende Lösung. Durch die Vermeidung jeglicher Metall-Elektrolyt-Kontakte können so auf einfache Weise die in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Effekte umgangen werden. Das vorgestellte ESB der galvanischen Kontakte bzw. der Helmholtzschicht vereinfacht sich bei galvanisch entkoppelten Elektroden zu einer einfachen Kapazität (Abbildung 2.3.1).

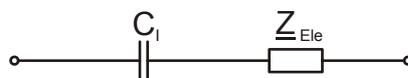


Abbildung 2.3.1. Ersatzschaltbild einer galvanisch entkoppelten Elektrode

Die durch die Isolationsschicht erzeugte Kapazität  $C_1$ , ist nur bestimmt durch die dielektrischen Eigenschaften und die Dicke des Isolationsmaterials. Im Gegensatz zu den Kapazitäten, die sich bei einem galvanischen Kontakt ausbilden, kommt es zu keinen diffusionsbedingten Nichtlinearitäten, da es zu keinem direkten Ladungsträgeraustausch kommt.

Ein Nachteil galvanisch entkoppelter Elektroden ist die vergleichsweise kleine Kopplungskapazität  $C_1$  in die Lösung hinein. Wenn sich Doppelschichtkapazitäten bilden, lagern sich die ionischen Ladungsträger in einem Abstand von nur 3 nm direkt an der Elektrode an (Kapitel 2.2.1). Die dadurch entstehende Kapazität ist so hoch, dass sie schon bei geringen Frequenzen von unter 100 kHz wie ein Kurzschluss wirkt. Die Kapazität  $C_1$  hingegen ist aufgrund der dicken Isolationsschicht ( $\gg 3$  nm) immer kleiner als die vergleichbare Doppelschichtkapazität. Ziel muss es somit sein, eine möglichst dünne aber dennoch zuverlässige Isolationsschicht herzustellen. Dessen ungeachtet weist eine nur 3  $\mu\text{m}$  dünne Isolationsschicht schon eine bis zu tausendfach kleinere Kapazität auf. Diese Kapazität stellt einen sehr hohen Widerstand bei niedrigen Frequenzen dar. Die Möglichkeit gut leitende Lösungen oder Elektrolyte bei niedrigen Frequenzen bezüglich ihrer Kapazität auswerten zu können, ist daher stark eingeschränkt.

## 2.4. Vierpunktmessung flüssiger Medien

Die Vierpunktmessung flüssiger Medien gilt weitestgehend als die genaueste und fehlerfreiste Methode zur Bestimmung von Lösungsimpedanzen. Wie in Kapitel 1.2.2 und Abbildung 1.2.1 bereits gezeigt, beruht das Verfahren auf der Anwendung vierer unabhängiger Elektroden, die in die Testlösung eingetaucht werden. Die quasi stromlose Messung der Spannung über das innere Elektrodenpaar soll die durch die galvanischen Kontakte bedingten Fehler reduzieren (Kapitel 1.2.2). Die in der Literatur beschriebenen Fehlermechanismen der Vierpunktmessung flüssiger Medien beziehen sich meist auf schaltungstechnische Probleme, Kabelinduktivitäten und Streukapazitäten (Bolton 1998). Dennoch ist ein in der Literatur immer wieder aufgegriffener Fehlermechanismus die Elektrodenpolarisation (Davey 1998a; Davey 1998b). Dabei handelt es sich um einen Effekt, der bei Frequenzen unterhalb von 1 MHz zu einer zusätzlichen Kapazität führt. Bei dieser Kapazität handelt es sich um die in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Stern-Kapazität  $C_S$ , die bei einem Kontakt zwischen einer metallischen Elektrode und einem ionischen Elektrolyten entsteht. Diese Kapazität  $C_S$  hängt über den Gouy-Chapman-Anteil (Formel (16)) auch von der Ionenkonzentration und damit von der Leitfähigkeit der Lösung ab. Obwohl die Elektrodenimpedanz durch die Verwendung einer Vierelektrodenanordnung keinen Einfluss mehr haben sollte, wird in der Literatur immer wieder auf einen Kapazitätsanstieg hingewiesen, der bei niedrigen Messfrequenzen auftritt und teilweise die  $\beta$ -Dispersion der Zellen überdeckt. Weshalb die Elektrodenpolarisation bei der Vierpunktmessung einen so starken Einfluss haben soll, ist bislang ungeklärt. Davey und Kell beschreiben einen Kapazitätsanstieg, der bei Frequenzen von wenigen MHz bereits beginnt und dann mit sinkender Frequenz steigt. Der Verlauf der Frequenz folgt in dem untersuchten Messbereich von 200 kHz bis 10 MHz folgendem Zusammenhang (Davey 1998a):

$$C(f) = C_{1\text{Hz}} \cdot f^{-2} \quad (21)$$

Hierbei repräsentiert die Kapazität  $C_{1\text{Hz}}$  die Polarisationskapazität der Elektroden-Elektrolytübergänge bei einer Messfrequenz von 1 Hz. Davey und Kell verglichen verschiedene Elektrodenmaterialien. Verwendet wurden für die publizierten Untersuchungen Elektroden aus glänzendem Platin, glänzendem Gold und mattem Gold. Die Höhe der Polarisation hing dabei stark von dem jeweils verwendeten Material ab. Selbst das Gold zeigte unterschiedliches Verhalten je nach Oberflächenbeschaffenheit. Platin zeigte eine deutlich geringere Polarisation als beide untersuchten Arten der Goldelektroden. Dennoch war auch das Polarisationsverhalten der Platinelektroden so groß, dass es einen signifikanten Einfluss auf die Messung kleiner Zellkonzentrationen haben konnte.

Mit Hilfe ihres „Power Laws“ (Gleichung (21)) konnten Davey und Kell alle gemessenen Elektroden beschreiben (Davey 1998a; Davey 1998b). Es bleibt jedoch zu bedenken, dass es lediglich ein Modell ist, um die gewonnenen Messwerte bezüglich der kapazitiven Überhöhung zu korrigieren. Eine zufriedenstellende Erklärung für die physikalischen und chemischen Hintergründe dieses Phänomens gibt es bislang nicht. Bisher gab es auch keine Arbeiten, die die Polarisationseffekte bei unterschiedlichen Elektrodengeometrien genauer

untersucht hätten. Da bei einer idealen Vierpunktmessung die Elektrodenimpedanzen und damit auch die Elektrodenpolarisationen keine Rolle spielen dürften, ist ein Zusammenhang mit der Anordnung der Elektroden und den durch Elektrodenpolarisation verfälschten Messwerten zu rechnen. Daher soll im folgenden Abschnitt ein anderer Fehlermechanismus genauer untersucht werden.

Ein meist vernachlässigter Fehler, der bei einer Vierpunktmessung auftritt, ist der parasitäre Strom innerhalb der Lösung, der nicht zum messbaren Spannungsabfall beiträgt.

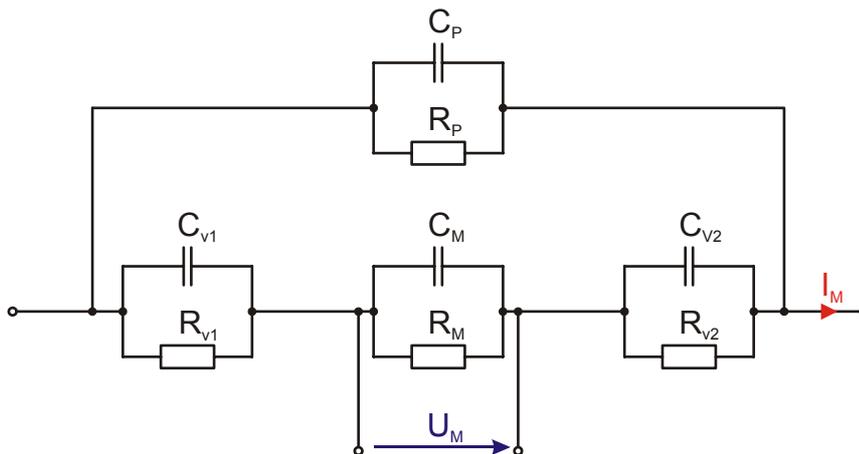


Abbildung 2.4.1 Komplettes Ersatzschaltbild der Lösungsimpedanzen bei einer Vierpunktmessung

Die Schaltung aus Abbildung 2.4.1 repräsentiert alle elektrischen Einflussparameter bei einer Vierpunktmessung. Vernachlässigt bei dieser Betrachtung wurden lediglich die Einflussfaktoren möglicher Zuleitungen durch Kabelkapazitäten und Fehlerströme bei der Spannungsmessung. Es wurde angenommen, dass die Spannungsmessung völlig stromlos stattfindet und die Messung des Stroms  $I_M$  und der Spannung  $U_M$  ideal seien.

Die Größen  $C_M$  und  $R_M$  repräsentierten den Teil der Lösung, der zur Impedanz- bzw. Admittanzmessung beiträgt. Die Elemente  $C_{V1,2}$  und  $R_{V1,2}$  beschrieben die Elektrodenübergänge und die Bereiche der Lösung, die zwischen den äußeren stromführenden und den innern Spannungselektroden liegen und somit nicht zur Messung selber beitragen. In den meisten Fällen wurde vereinfacht davon ausgegangen, dass dies die einzigen Einflussfaktoren sind. In diesem Fall hätten die Kapazitäten  $C_{V1}$  und  $C_{V2}$  und die Widerstände  $R_{V1}$  und  $R_{V2}$  keinerlei Einfluss auf die Messung. Durch die räumliche Trennung der Spannungsmesselektroden und der stromführenden Elektroden kommt es jedoch zu einem geringen Fehlerstrom durch die Lösung, der nicht in der Spannungsmessung auftritt. Der Einfluss dieses Stromes auf die Messung wurde im ESB in Abbildung 2.4.1 durch die Elemente  $C_P$  und  $R_P$  berücksichtigt.

Handelt es sich bei den Messelektroden um einen symmetrischen Aufbau, so können die Kapazitäten  $C_{V1,2}$  und die Widerstände  $R_{V1,2}$  zusammengefasst werden und es ergibt sich ein vereinfachtes ESB.

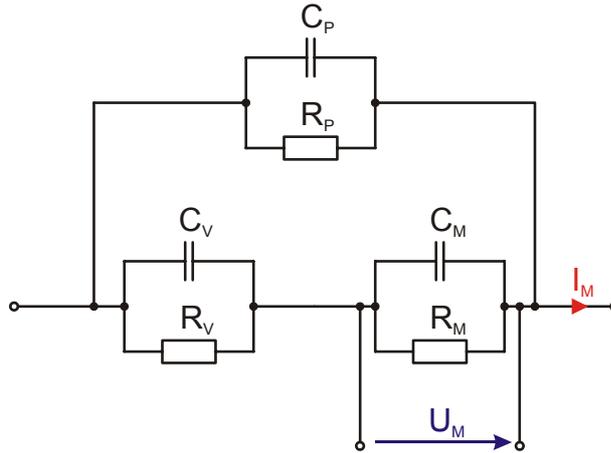


Abbildung 2.4.2 Vereinfachtes Ersatzschaltbild relevanter Lösungsimpedanzen bei einer Vierpunktmessung

Unter der Annahme, dass die parasitären Größen  $C_P$  und  $R_P$  nur durch die zu messende Lösung bestimmt werden und keine elektrischen Anteile galvanischer Kontakte beinhalten, gilt folgendes Verhältnis:

$$R_P \cdot C_P = \frac{1}{\sigma_{Ele} \cdot g_P} \cdot \varepsilon_{Ele} \cdot g_P = R_M \cdot C_M = \frac{1}{\sigma_{Ele} \cdot g_M} \cdot \varepsilon_{Ele} \cdot g_M = \frac{\varepsilon_{Ele}}{\sigma_{Ele}} \quad (22)$$

Da die Schaltungselemente  $C_P \parallel R_P$  und  $C_M \parallel R_M$  nur die elektrischen Lösungseigenschaften beschreiben, lassen sich die Elemente jeweils über die Permittivität  $\varepsilon$  und die Leitfähigkeit  $\sigma$  der Lösung mit Hilfe des jeweiligen Geometriefaktors ( $g_P$  bzw.  $g_M$ ) berechnen (Gl. (32)). Dieser Faktor entfällt bei der Multiplikation und beide Parallelschaltungen lassen sich auf den Quotienten der Permittivität und der Leitfähigkeit reduzieren.

Bei der praktischen Messung ist der Geometriefaktor  $g_P$  in der Regel um ein Vielfaches kleiner als der Geometriefaktor  $g_M$  des eigentlichen Messbereichs. Dadurch sind die entstehenden Messfehler meist zu vernachlässigen. Bei der Messung komplexer Impedanzen in einem flüssigen Elektrolyten können sich die zusätzlichen Größen des ESB jedoch deutlich bemerkbar machen. Die Konsequenzen auf das Messsignal wurden mit Hilfe einer Spice-Simulation veranschaulicht.

Für die folgenden Simulationen wurde das ESB aus Abbildung 2.4.2 verwendet. Dargestellt wird die messbare Admittanz  $Y$  (Formel (23)) in der Form von Real- und Imaginärteil als eine Funktion der Frequenz in einem Bereich von 10 kHz bis 10 MHz.

$$Y = \frac{I_M}{U_M} \quad (23)$$

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Einführung eines zusätzlichen Parallelzweiges in dem ESB auf das Frequenzspektrum der Admittanz auswirkt. Hierzu wurde die Admittanz  $Y$  ohne die Elemente  $C_P$  und  $R_P$  simuliert und verglichen mit den Werten einer Simulation, in der beide Größen enthalten waren.

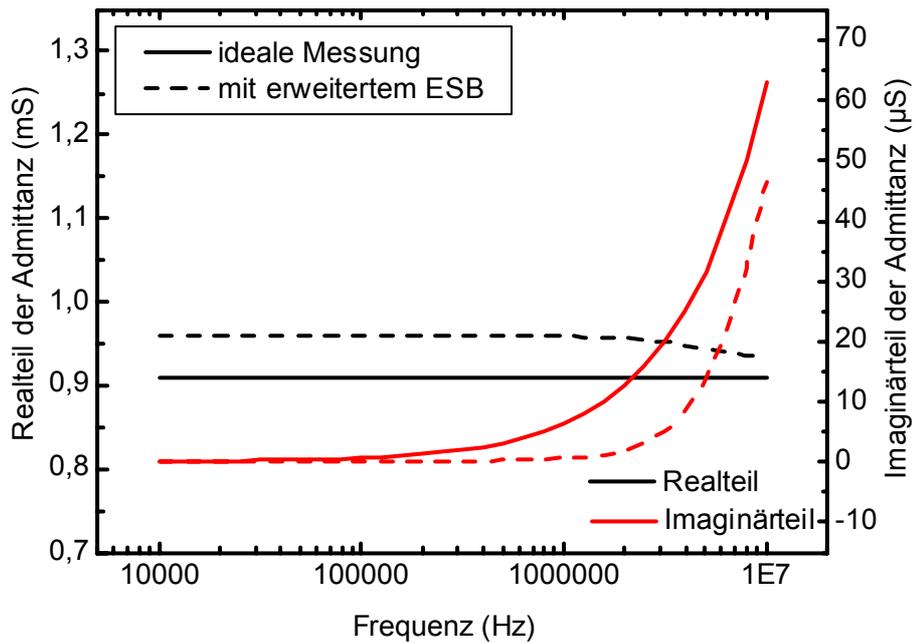


Abbildung 2.4.3. Simulierter Einfluss des erweiterten ESB auf die gemessene Admittanz

Die für die Simulation verwendeten Werte sind der folgenden Tabelle 2.4.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.4.1. Verwendete Größen bei der Simulation der Schaltung aus Abbildung 2.4.2

Element im ESB	Größe
$C_M$	1 pF
$R_M$	1,1 k $\Omega$
$C_P$	0,01 pF
$R_P$	110 k $\Omega$
$C_V$	5 pF
$R_V$	5 k $\Omega$

Die Werte aus Tabelle 2.4.1 sind so gewählt dass sie einem Sensor entsprechen mit einem Zellfaktor bezüglich  $C_M$  und  $R_M$  von zirka 0,14 cm und einer wässrigen Lösung mit einer Permittivität von 80 und einer Leitfähigkeit von 6,4 mS/cm. Die Admittanz des nicht zur Spannungsmessung beitragenden Zweiges über  $C_P$  und  $R_P$  ist um den Faktor 100 geringer. Es wurde zunächst vereinfacht davon ausgegangen, dass die Größen  $R_P$  und  $C_P$  sowie  $C_M$  und  $R_M$  nur durch die Lösungseigenschaften und den entsprechenden Geometriefaktor  $g$  bestimmt sind (siehe Formel (22)). In der Simulation aus Abbildung 2.4.3 ist der Geometriefaktor des Parallelzweiges  $g_P$  100fach kleiner als der des Messzweiges  $g_M$ . Dennoch zeigt sich schon ein deutlicher Einfluss der Größen auf die messbare Admittanz. Der messbare Leitwert (Realteil der Admittanz) steigt, während der Imaginärteil und damit die gemessene Kapazität deutlich sinken im Vergleich zum idealen Fall ohne Parallelzweig. Die Erhöhung des Leitwertes be-

trägt zirka 5% und die aus dem Imaginärteil berechnete Kapazität sinkt im niedrigen Frequenzbereich unter 70 fF.

Der folgende Graph zeigt die Frequenzverläufe bei unterschiedlich hohen Parallelzweigadmittanzen ( $R_p$ ,  $C_p$ ). Alle restlichen Größen der Simulation wurden beibehalten und entsprechen den Angaben aus Tabelle 2.4.1.

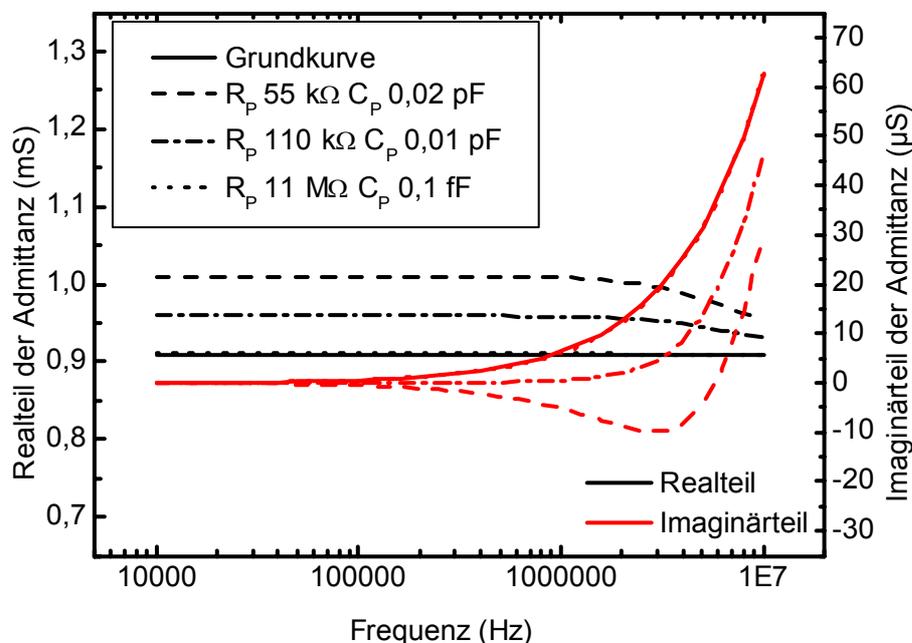


Abbildung 2.4.4. Simulierter Einfluss des Parallelzweiges von  $C_p$  und  $R_p$  auf das Frequenzspektrum der messbaren Admittanz

Wie in Abbildung 2.4.4 zu erkennen, verändern sich der gemessene Realteil und der Imaginärteil der Admittanz deutlich bei steigender Admittanz des Parallelzweiges. Während im Falle eines sehr hohen Parallelwiderstandes  $R_p$  und einer niedrigen Parallelkapazität  $C_p$  die Messwerte der idealen Messung (Grundkurve) entsprechen, so treten bei steigender Admittanz deutliche Veränderungen des Kurvenverlaufs auf. Bei einer weiteren Steigerung der Admittanz kommt es zunächst nur zu einer Erhöhung des messbaren Leitwertes und einem Absinken der Kapazität, wie bereits oben in Abbildung 2.4.3 beschrieben. Wird die Admittanz jedoch noch größer ( $R_p = 55 \text{ k}\Omega$ ,  $C_p = 0,02 \text{ pF}$ ) und damit auch der Einfluss des Parallelzweiges deutlicher, so wird ein Einbruch des messbaren Leitwertes bei höheren Frequenzen sichtbar. Noch entscheidender sind die Auswirkungen auf den messbaren Imaginärteil. Dieser wird über einen großen Frequenzbereich hin negativ und ermöglicht damit keine sinnvolle kapazitive Auswertung mehr. Der parallele Zweig der Schaltung mit den parasitären Größen  $C_p$  und  $R_p$  führt dazu, dass der Strom  $I_M$  der Spannung  $U_M$  nacheilt. Obwohl in der Simulation der Messung keine Induktivität vorhanden ist (siehe Abbildung 2.4.2), ergibt sich bei der Auswertung der Messspannung  $U_M$  und des Stromes  $I_M$  ein induktives Verhalten. Da Messungen in diesen Frequenzbereichen auf eine nicht vorhandene Induktivität hinweisen würden, wird dieses Phänomen im Folgenden „virtuelle Induktivität“ genannt. Das gleiche Phänomen wurde von Grimnes et al. an Elektroden zur Körperimpedanzmessung un-

tersucht (Grimmes 2007). Das stark ausgeprägte lokale Minimum des Imaginärteils und damit die virtuellen Induktivitäten hingen stark von den Größen  $C_V$  und  $R_V$  ab. Um diese Einflüsse genauer beschreiben zu können, wurden diese Werte für die folgenden Simulationen leicht variiert und die Simulationsergebnisse mit den bisherigen Kurvenverläufen verglichen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Simulationen wurden die Achsenunterteilungen der Graphen beibehalten.

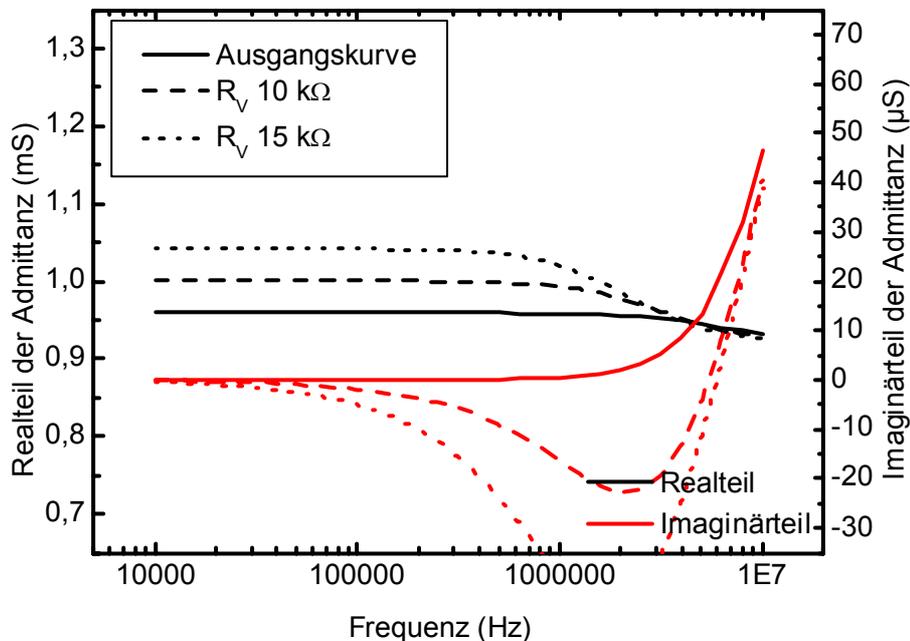


Abbildung 2.4.5. Simulierter Einfluss des Widerstandes  $R_V$  auf das Frequenzspektrum der messbaren Admittanz

Die Ausgangskurve aus Abbildung 2.4.5 wurde mit den Werten aus Tabelle 2.4.1 simuliert. Eine Erhöhung des Vorwiderstandes  $R_V$  Tabelle 4.2.1 führte hierbei zu einem drastischen Einbruch des Imaginärteils und zu hohen virtuellen Induktivitäten.

Ein ähnliches Verhalten ergab sich bei Simulationen, in denen die Kapazität  $C_V$  erhöht wurde (Abbildung 2.4.6). Auch bei diesen Graphen in Abbildung 2.4.6 zeigen sich stark ausgeprägte virtuelle Induktivitäten, die mit steigendem Wert von  $C_V$  größer werden und deren Betragsmaximum zu kleineren Frequenzen hin verschoben wird.

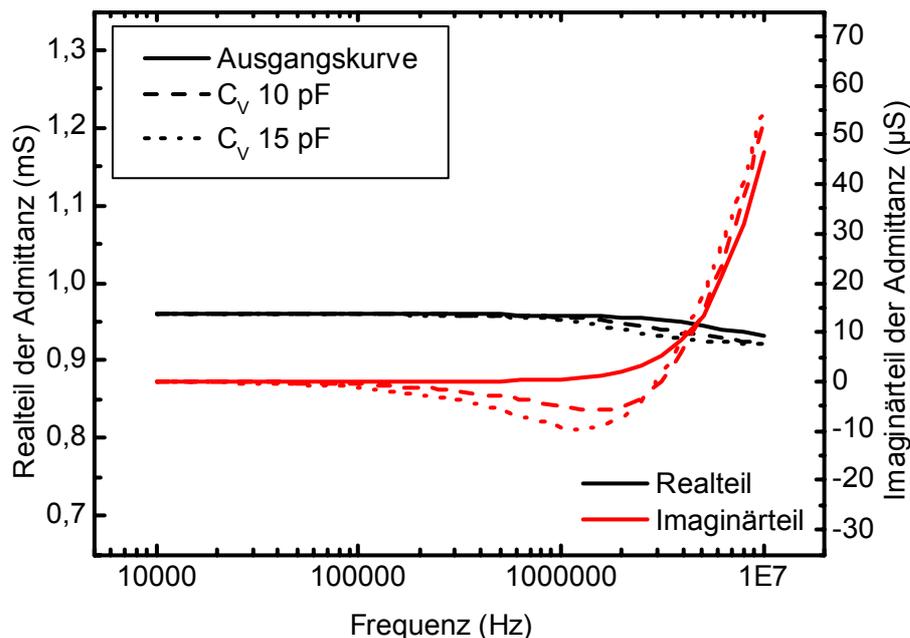


Abbildung 2.4.6. Simulierter Einfluss des Widerstandes  $C_V$  auf das Frequenzspektrum der messbaren Admittanz

Erklären lässt sich dieses Verhalten durch das Zusammenspiel der Kapazität  $C_V$  und dem Widerstand  $R_V$ . Durch ihre Parallelschaltung bilden sie ein RC-Glied mit eindeutigem Relaxationsverhalten. Ab einer charakteristischen Frequenz  $f_c$  fließt der Strom fast ausschließlich über die Kapazität und schließt damit den Widerstand quasi kurz. Bei Frequenzen unterhalb dieser Frequenz wird der Strom in erster Linie durch den Widerstand bestimmt (Debye-Relaxation). Die charakteristische Frequenz  $f_c$  einer Kapazität  $C$  und eines Widerstandes  $R$  in Parallelschaltung berechnet sich wie folgt:

$$f_c = \frac{1}{2\pi \cdot R \cdot C} \quad (24)$$

Betrachtet man nun die Graphen aus Abbildung 2.4.5 und Abbildung 2.4.6 erkennt man, dass das lokal ausgeprägte Minimum des messbaren Imaginärteils in der Nähe der charakteristischen Frequenz von  $R_V$  und  $C_V$  auftritt. Durch den Einfluss der anderen Größen im ESB wie vor allem  $C_M$  steigt der Imaginärteil bei höheren Frequenzen stark an. Dieser Anstieg überlagert sich mit der beschriebenen Relaxation der Größen  $C_V$  und  $R_V$  und verschiebt daher das resultierende Minimum des Imaginärteils zu niedrigeren Frequenzen hin. Es bleibt aber eindeutig zu erkennen, dass das resultierende Minimum des messbaren Imaginärteils bei steigenden Werten von  $R_V$  oder  $C_V$  zu niedrigeren Frequenzen hin verschoben wird.

Die Größe des resultierenden Fehlers bzw. der Abweichung von der idealen Messung wird in erster Linie durch den Widerstand  $R_V$  bestimmt. Die Lage dieser Abweichung innerhalb des Spektrums wird bestimmt durch das Produkt der Größen  $C_V$  und  $R_V$ .

Die Auswirkungen auf die Messung sind nicht zuletzt so groß, weil der Widerstand  $R_V$  gegenüber dem Widerstand  $R_P$  nicht zu vernachlässigen ist (5-15 kΩ und 110 kΩ).

Mit weiteren Simulationen wurde untersucht, wie sich weitere parasitäre Kapazitäten auf die messbaren Größen der Admittanz auswirken können. Unter der Annahme, dass der Parallelzweig aus  $C_p$  und  $R_p$  nicht nur die Lösung beschreibt, sondern auch parasitäre Kapazitäten, die durch die Anordnung der Elektroden zueinander entstehen, musste für die folgenden Simulationen von dem Zusammenhang aus Formel (22) abgewichen werden. Der Graph aus Abbildung 2.4.7 beschreibt das Frequenzverhalten der messbaren Admittanz bei einer Erhöhung der Kapazität  $C_p$ .

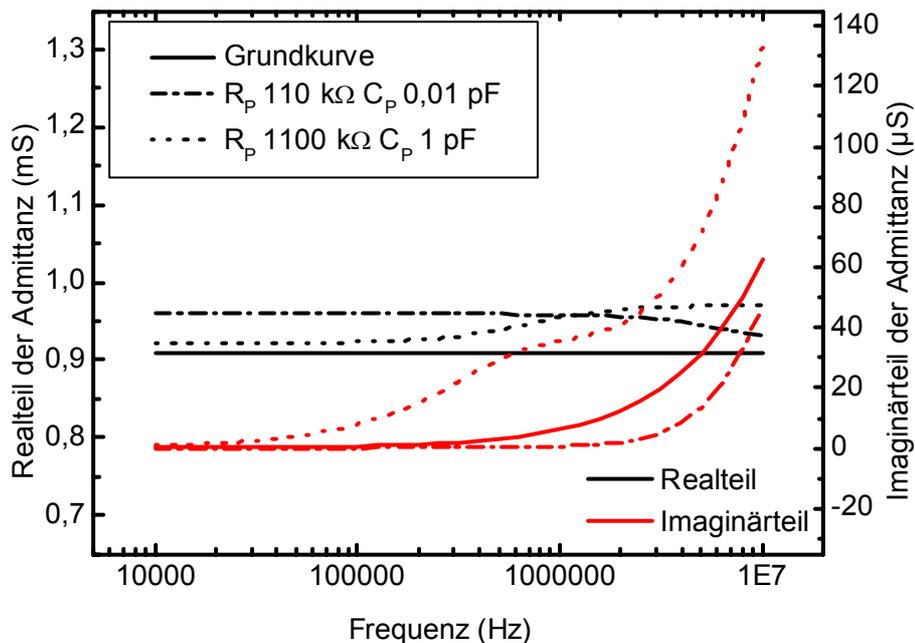


Abbildung 2.4.7. Simulierte Veränderung des Frequenzspektrums der Admittanz bei Erhöhung der Parallelkapazität  $C_p$

In Abbildung 2.4.7 ist der Einfluss der Parallelkapazität erkennbar. Bei der im Graphen gezeigten Grundkurve handelt es sich um die ideale Messung ohne Parallelzweig. Die zweite simulierte Kurve entspricht den Messungen bei Werten wie in Tabelle 2.4.1. Erhöht man nun den Widerstand des Parallelzweiges  $R_p$ , gleichzeitig jedoch auch die Kapazität  $C_p$ , so kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Imaginärteiles. Während der messbare Realteil durch den hohen Parallelwiderstand  $R_p$  bei niedrigen Frequenzen von unter 200 kHz fast der idealen Grundkurve entspricht und damit nur einen sehr kleinen Fehler aufweist, wird dieser Fehler größer bei steigenden Frequenzen. Der messbare Imaginärteil bildet im selben Frequenzbereich ebenfalls eine Stufe aus.

Zusammenfassend konnte man aus den Simulationen schließen, dass bei der Entwicklung einer Elektrodenanordnung zur Vierpunktmessung darauf geachtet werden muss, dass die galvanischen Kontakte bezogen auf die Zellkonstante der Anordnung keine hohen Impedanzen aufweisen. Des Weiteren sollte der Messbereich der spannungsmessenden Elektroden möglichst den gesamten vom Strom durchflossenen Bereich abdecken und gleichzeitig hohe parasitäre Kapazitäten zwischen den Stromelektroden vermieden werden. Bei ungünstigen Verhältnissen der elektrischen Größen des Parallelzweiges und der galvanischen Kontakte

können die Messfehler entweder zu einer Erhöhung der gemessenen Kapazität (Abbildung 2.4.7) oder gar zu virtuellen Induktivitäten (Abbildung 2.4.4 und Abbildung 2.4.5) führen.



### 3. Sensorherstellung

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Sensorprinzipien untersucht:

- Galvanisch entkoppelte Sensoren
- Vierpunktsensoren

Die Sensoren sollten mit Hilfe mikrosystemtechnischer Prozesse herstellbar und in eine 96er Mikrotiterplatte integrierbar sein. Bei der Herstellung der verschiedenen Sensortypen sind in erster Linie Standardprozesse des Institutes für Werkstoffe der Elektrotechnik 1 (IWE-1) der RWTH-Aachen verwendet worden. Daher sollen in diesem Kapitel nur kurz die relevanten Prozessschritte vorgestellt werden. Auf detaillierte Prozessbeschreibungen wird bewusst verzichtet.

#### 3.1. Galvanisch entkoppelte Sensoren

Ziel bei der Herstellung der galvanisch entkoppelten Sensoren war ein möglichst einfacher Aufbau. Es sollten Elektroden realisiert werden, die durch eine nichtleitende Schicht hindurch eine rein kapazitive Kopplung in die Zellsolution aufweisen (siehe Kapitel 1.1). Die Sensorelemente mussten von außen kontaktierbar sein und mittels eines Trägersubstrates unter der MTP anzubringen sein. Der einfachste sich anbietende Aufbau ist daher eine dünne Trägerfolie, auf der die Elektroden aufgebracht sind und die gleichzeitig als Dielektrikum bzw. Isolationsschicht zur Lösung dient.

Das biokompatible Polyimid 2610 der Firma HD-MicroSystems bietet schon bei extrem dünnen Schichten von unter 10  $\mu\text{m}$  eine hohe Stabilität und weist, verglichen mit anderen Polyimiden, eine geringe Wasseraufnahme auf. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das Polyimid 2610 zur Herstellung der Sensorfolien verwendet. Im Folgenden werden die einzelnen Prozessschritte vorgestellt, mit denen die Sensorfolien hergestellt und diese dann unter den MTPs angebracht wurden.

Die herzustellenden Sensorfolien wurden mit mikrotechnologischen Herstellungsverfahren auf Siliziumwafern gefertigt. Eine 4<sup>+</sup>Waferlinie stand während der Arbeit zur Verfügung. Um alle Prozessschritte auf der Basis dieser Technologie durchführen zu können, mussten die Sensorfolien auf einem festen Substratwafer gefertigt und später von diesem wieder beschädigungsfrei entfernt werden. Hierzu wurde eine Opferschichttechnik angewendet. In einem ersten Schritt wurde hierfür eine Titan-Aluminium-Titan-Schicht abgeschieden. Die erste nur zirka 50 nm dicke Titanschicht wurde als Haftvermittlerschicht für das darauf folgende Aluminium abgeschieden. Das zirka 1  $\mu\text{m}$  dicke Aluminium diente als spätere Opferschicht. Die zweite Titanschicht wurde ebenfalls nur mit 50 nm Schichtdicke prozessiert und deckte das Aluminium für spätere Prozessschritte ab. Dies war vor allem für nasschemische Prozesse, in denen das Aluminium mit der Ätzlösung reagieren würde, notwendig. Die Reaktion des Aluminiums mit diesen Lösungen und die damit verbundenen Verunreinigung der Prozessmedien führt andernfalls zu nicht reproduzierbaren und schlechten Prozessergebnissen.

Als erste sensorrelevante Schicht wurde mittels eines Spin-Coating-Verfahrens eine 5  $\mu\text{m}$  dicke Polyimidschicht auf den Wafer geschleudert. Nach einem kurzen Temperierungsschritt wurde diese Schicht fotolithographisch strukturiert, bevor sie in einem zweiten Heizschritt bei Temperaturen bis zu 400°C vollständig ausgeheizt wurde. Auf diese Weise sind die Grundfolien hergestellt worden, die die Elektroden tragen. Sie wurden mit einer Kantenlänge von jeweils 20 mm definiert und bieten Platz für vier unabhängige Sensorbereiche. Auf diese Wafer wurde in einem nächsten Schritt eine ganzflächige Platingbase aus 30 nm Titan und 100 nm Gold gesputtert. Diese dünne Titan-Gold-Schicht diente als Startschicht für den folgenden Galvanisierungsschritt. Da die Elektroden bzw. die mit ihnen verbundenen Kontaktpads über Federkontaktstifte mit der Auswertelektronik angeschlossen werden müssen, ist es notwendig, dass das Gold eine Dicke aufweist, die einem mechanischen Abrieb bei der Kontaktierung standhält. Abscheidungen mittels Verdampfungsverfahren oder Sputterprozessen sind hierfür nicht geeignet. Vor der Galvanik wurde ein zirka 15  $\mu\text{m}$  dicker Positivlack auf den Wafer geschleudert und mittels Fotolithographie strukturiert. Die Dicke der galvanisch abgeschiedenen Schicht betrug 2 – 3  $\mu\text{m}$ . Nach der Entfernung des Lackes mit Aceton, wurden in verschiedenen nasschemischen Prozessschritten sowohl die Platingbase als auch die Titan-Aluminium-Titan-Opferschicht geätzt und entfernt. Die so hergestellten Sensorfolien waren dann bereit, mit entsprechenden Aufbau- und Verbindungstechniken (AVT) am Boden der Mikrotiterplatten angebracht zu werden (siehe Kapitel 3.4.1).

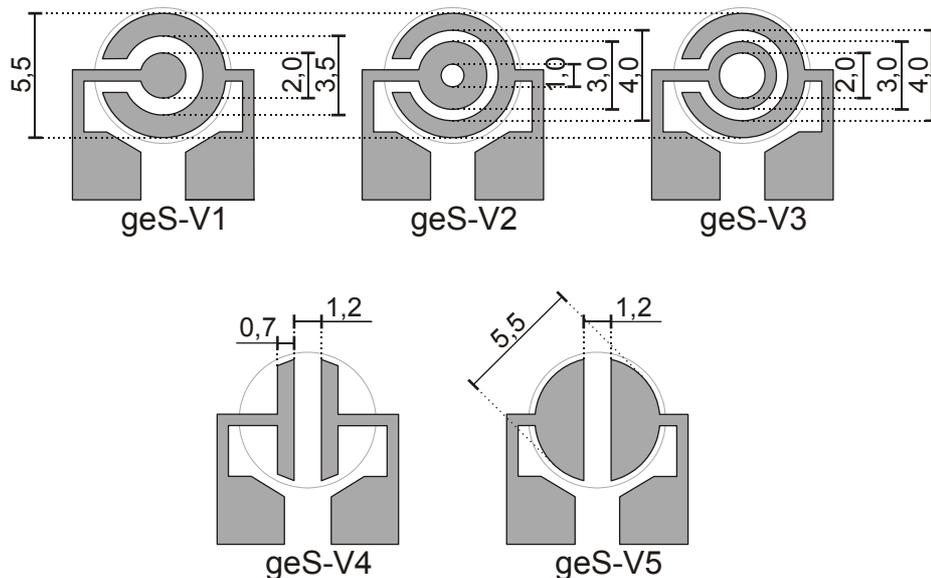


Abbildung 3.1.1. Darstellung der hergestellten Strukturen für galvanisch entkoppelte Messungen  
(alle Längen sind in der Einheit mm angegeben)

In Abbildung 3.1.1 sind die hergestellten Strukturen mit ihren Abmessungen angegeben. Der Umriss der Mikrotiterplattenwanne ist mit einem grauen Ring angedeutet. Insgesamt wurden 5 verschiedene Designs hergestellt und getestet. Die Designs geS-V1 bis V3 waren möglichst rotationssymmetrisch aufgebaut. Das rotationssymmetrische Design wurde für optimale Messeigenschaften während des Schüttelns gewählt. Sie hatten jeweils eine innere und eine äußere Elektrode. Während die innere Elektrode von geS-V1 geschlossen war, befand

sich ein Loch in der Elektrode bei geS-V2 und V3. Diese Löcher ermöglichten einen optischen Zugang zur Lösung in der Mitte der MTP-Wanne. Damit wäre das optische Auslesen einer Optode zur pH-Wert oder  $pO_2$ -Messung an dieser Stelle denkbar. Der Durchmesser des Loches variierte von 1 mm bei geS-V2 und 2 mm bei geS-V3. Die Designs geS-V4 und V5 bestanden aus jeweils zwei identischen Elektroden. Die Designs unterschieden sich lediglich in der absoluten Fläche der einzelnen Elektroden und wurden als bewusst nicht rotations-symmetrische Elektrodendesigns hergestellt und untersucht.

### 3.2. Vierpunktsensoren

Die zur Herstellung der Vierpunktsensoren verwendeten Prozessschritte beruhen auf den gleichen Prozessen, wie die zur Herstellung der galvanisch entkoppelten Sensoren (siehe Kapitel 3.1). Da diese Prozesse jedoch für den speziellen Aufbau der Vierpunktsensoren leicht verändert werden mussten und die gesamte Prozesskette wesentlich komplexer ist, wird in diesem Kapitel noch einmal gesondert auf die Herstellungsprozesse eingegangen.

Die ersten Schichtabfolgen und die damit verbundenen Prozessschritte sind identisch zu denen aus Kapitel 3.1. Der Aufbau der Opferschicht (Abbildung 3.2.1.A) und die Strukturierung der ersten Polyimid- und Goldschicht gleichen den Prozessen die bereits zuvor beschrieben wurden. Eine Besonderheit beim Aufbau dieser Sensoren im Vergleich zu den galvanisch entkoppelten Sensoren (geS) ist der, dass in der ersten Polyimidschicht bereits Öffnungen vorgesehen wurden, die die späteren Kontaktpads bilden, da die Elektroden und die Kontaktpads bei diesen Sensoren auf den gegenüber liegenden Seiten der Folie realisiert werden müssen (Abbildung 3.2.1.B). Mit der ersten Goldgalvanik wurden nur diese Kontaktpads und Verbindungsleiterbahnen zu den einzelnen Elektroden hergestellt (Abbildung 3.2.1.C). Daraufhin folgte ein zweiter Prozessschritt zur Polyimidabscheidung. Mit dieser Schicht wurden die Kontaktpads von oben stabilisiert und die Leiterbahnen abgedeckt (Abbildung 3.2.1.D). Um kleinere Justageungenauigkeiten bei der lithographischen Prozessierung ausgleichen zu können, wurden die Außenmaße der Gesamtfolien um wenige Mikrometer reduziert. Um eine Kontaktierung der Verbindungsleiterbahnen, die mit der ersten Goldgalvanik hergestellt wurden und den Elektroden gewährleisten zu können, wurden kleine Löcher mit einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  über den Leiterbahnen in der Polyimidschicht vorgesehen (Abbildung 3.2.1.D). In einem zweiten Goldgalvanikschritt folgte dann die Strukturierung der Elektroden (Abbildung 3.2.1.E). Das Aufdampfen einer dünnen Goldschicht hätte keine zuverlässige Durchkontaktierung zu den unteren Verbindungsleiterbahnen gewährleisten können. Die Aufgalvanisierung auf eine Dicke von 2  $\mu\text{m}$  hingegen ermöglicht eine sichergestellte Kontaktierung der Elektroden zu den Verbindungsleiterbahnen zwischen den beiden Polyimidschichten. In Abbildung 3.2.2 ist deutlich die über die Kante der Durchkontaktierung hinweggehende Metallisierung zu erkennen. In einem letzten Sputterprozess wurden die Goldelektroden mit einer zirka 200 nm dicken Platinschicht bedeckt (Abbildung 3.2.1.F). Diese soll den galvanischen Kontakt zu der Lösung herstellen und als eigentliches Elektrodenmaterial dienen.

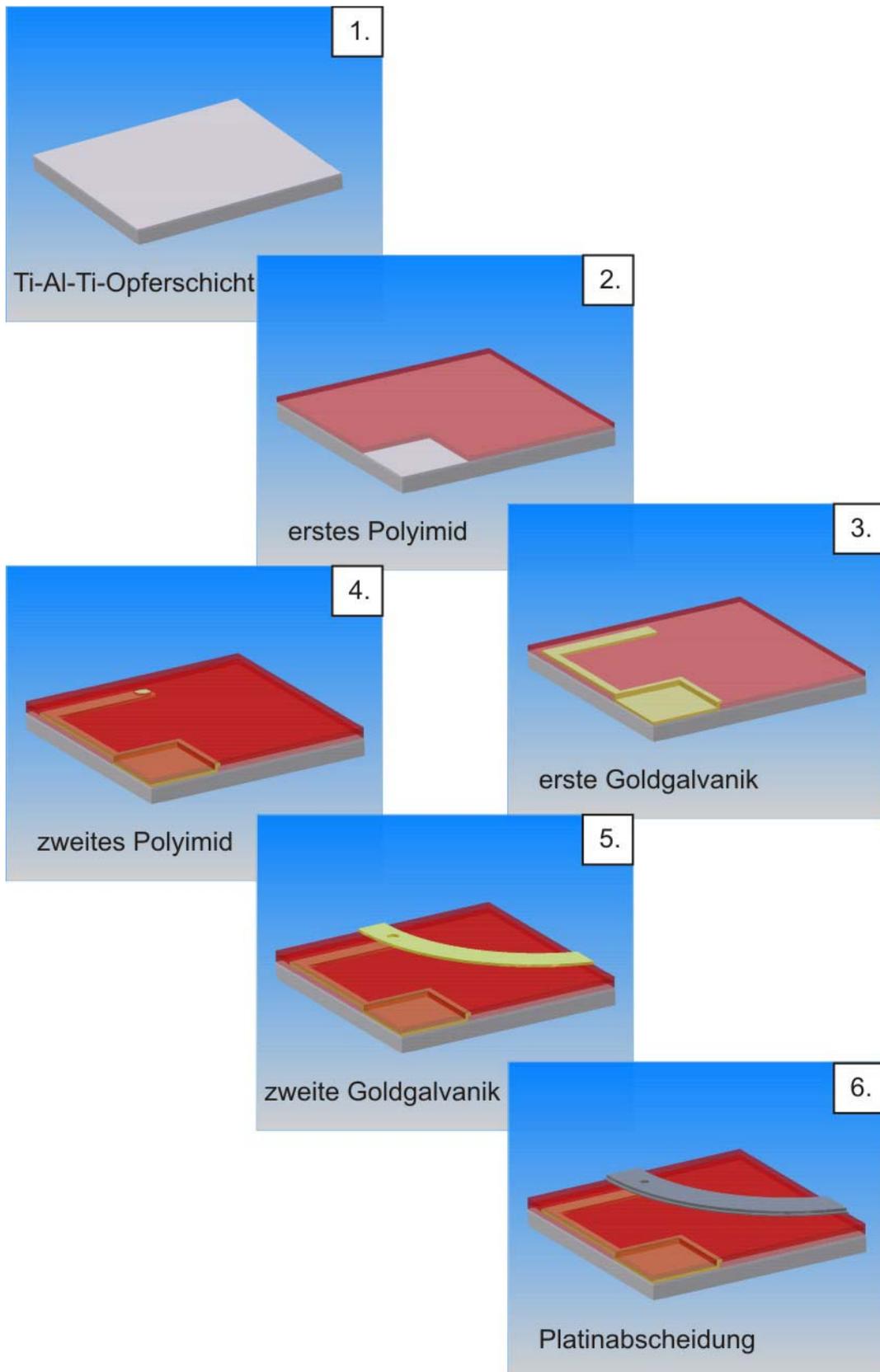


Abbildung 3.2.1. Schichtabfolge bei der Herstellung der Vierpunktsensoren

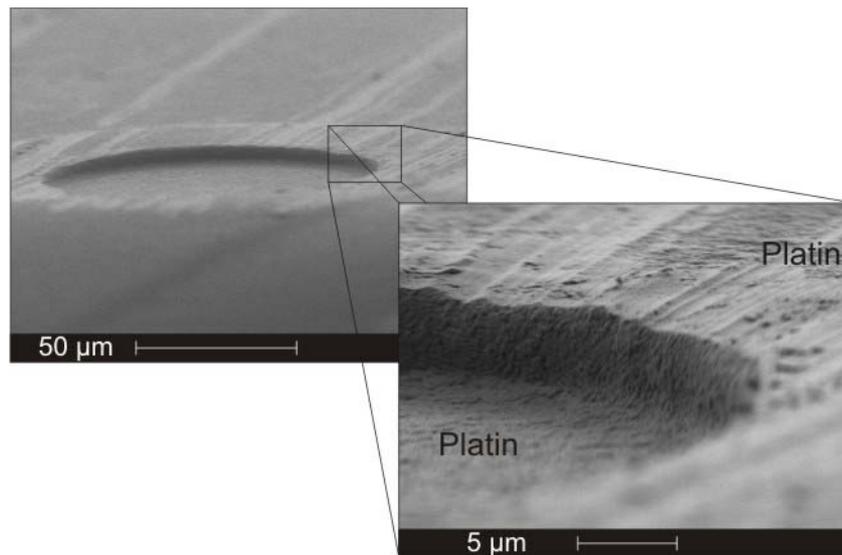


Abbildung 3.2.2. Rasterelektronenmikroskopaufnahme der Durchkontaktierung einer Elektrode durch die zweite Polyimidschicht hindurch auf die Verbindungsleiterbahnen bei einem fertigen Sensor

Damit das Gold vollständig abgedeckt werden kann, wurde das Platin mit einem Überstand von 25 µm über die Kanten der Goldelektroden abgeschieden. Die Strukturierung wurde über einen Lift-Off-Prozess realisiert. Um eine gute Haftung des Platins auf dem Polyimid zu gewährleisten, wurde eine zirka 30 nm dicke Titanschicht vor der eigentlichen Platinschicht aufgesputtert. Um eine vollständige Abdeckung der Goldschicht sicher zu stellen, müssen weitere spezielle Anforderungen bezüglich der galvanischen Goldschicht berücksichtigt werden.

Positivlacke, die wegen ihrer einfachen Prozessführung meistens zur Strukturierung der Galvanik eingesetzt werden, bilden bei ihrer Entwicklung eine positive Lackkante aus. Dies führt in der Galvanik zu negativen, also überhängenden, Goldkanten. Im darauf folgenden Sputterprozess werden daher die Seiten der Goldschicht durch den Überhang abgeschattet. In der Folge können die Platinteilchen das Gold an dieser Stelle nicht erreichen und es kommt zu einem Abriss der Platinschicht an den Kanten der Goldschicht. Um diesen Effekt zu verhindern, wurde zur Strukturierung der zweiten Galvanikschicht ein Negativlack verwendet. Durch die Einstellung geeigneter Prozessparameter, konnte eine negative Lackkante erzeugt werden, an der sich die galvanisch aufwachsende Goldschicht orientieren konnte. Die auf diese Weise hergestellte Goldschicht wies keine Überhänge auf, an denen es zu Platinabrissen kommen konnte.

Nach den in diesem Kapitel beschriebenen Herstellungsverfahren wurden fünf verschiedene Elektrodendesigns hergestellt. Die genauen Abmessungen der einzelnen Elektroden sind der Abbildung 3.2.3 zu entnehmen.

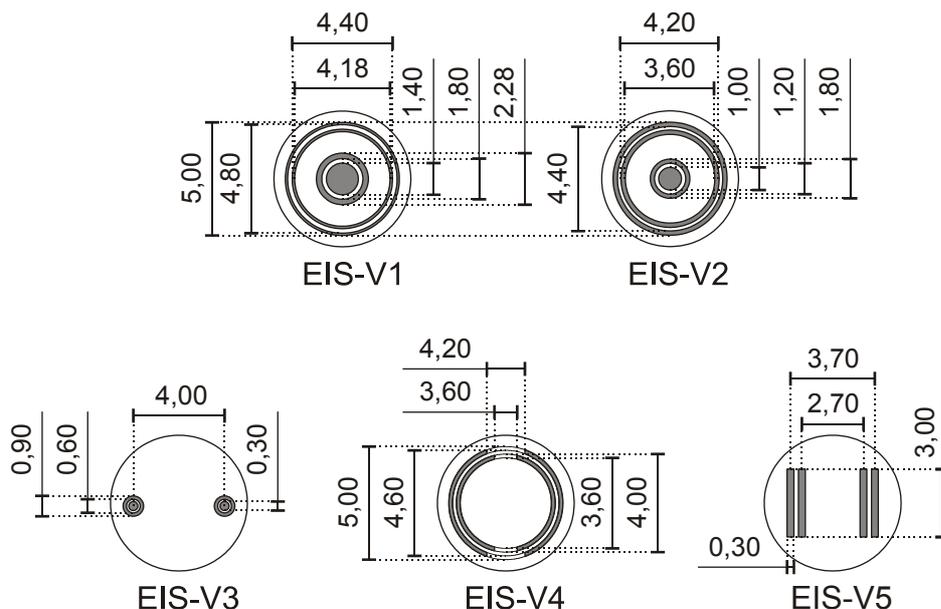


Abbildung 3.2.3. Übersicht der hergestellten Elektrodendesigns für die Vierpunktmessung

Bei den Designs EIS-V1 und V2 handelte es sich um rotationssymmetrische Elektroden. Das Design V1 wurde so gewählt, dass alle Elektroden annähernd die gleiche Fläche aufwiesen, während sich Design V2 durch die immer gleiche Elektrodenbreite der drei Ringelektroden von 0,6 mm auszeichnete. Diese rotationssymmetrischen Designs wurden entwickelt, da von ihnen die besten Messeigenschaften bei orbital geschüttelten Mikrotiterplatten zu erwarten waren. Die EIS-V3-Sensoren sollten einen vollkommen neuen Ansatz bieten. Hierbei wurden die stromführenden Elektroden von den Elektroden zur Spannungsmessung vollständig umschlossen. Diese Sensoren bestanden aus zwei Punktelektroden mit einem Durchmesser von 300  $\mu\text{m}$ , die jeweils von einer kleinen Ringelektrode umgeben wurden. Diese Elektroden hatten einen Abstand zu den inneren Elektroden von nur 150  $\mu\text{m}$  und eine Breite von 300  $\mu\text{m}$ . Der Mittenabstand der beiden Punktelektroden belief sich auf 4 mm. Design EIS-V4 bestand aus zwei „unterbrochenen“ Ringelektroden. Der äußere und der innere Ring bildeten dabei jeweils zwei Elektroden. Dieses Design sollte eine Annäherung an ein herkömmliches Vierelektrodendesign sein. Die Elektroden wurden der Wannenform entsprechend gebogen. Das letzte Elektrodendesign EIS-V5 bestand aus vier identischen rechteckigen Elektroden mit einer Länge von 3 mm und einer Breite von 300  $\mu\text{m}$ . Der Abstand der inneren Elektroden betrug 2,7 mm während der Abstand der äußeren Elektroden 3,7 mm maß. Dieses Design entsprach der Elektrodenform der früheren Messsonden der Firma Aber Instruments aus England. Auch wenn die Längen und Abstände nicht übereinstimmten, so entsprach doch zumindest die Elektrodenanordnung der der Sonden.

### 3.3. Seitenwandintegrierte Sensoren

Zur Herstellung der seitenwandintegrierten Sensoren wurden alle die bereits in den Kapiteln zuvor beschriebenen Prozesse verwendet. Sowohl für die ge-Sensoren als auch für die Vierpunktsensoren wurde die gleiche Schichtabfolge gewählt. Zunächst wurde die Trägerfolie als 5  $\mu\text{m}$  dünne PI-Schicht strukturiert. Diese bestand aus einem länglichen Teil, der in die Wanne hineingefaltet wurde und einem Teil, der die Kontaktpads enthielt und unter die MTP geklebt wurde. Der erste Teil, der in die Wanne gefaltet wurde, war in seiner Länge so gewählt, dass der komplette innere Umfang der Wanne abgedeckt wurde. Durch die Falttechnik war darauf zu achten, dass im Gegensatz zu den Bodensensoren bei den seitenwandintegrierten Vierpunktsensoren Kontaktpads und Elektroden auf der gleichen Seite der Folie realisiert werden mussten. Daher waren Öffnungen in der ersten PI-Schicht für die Kontaktpads nicht notwendig. Diese mussten dafür in der zweiten PI-Schicht strukturiert werden.

Bei den seitenwandintegrierten geS waren größere Änderungen notwendig. Ein einfacher Zweischichtaufbau reichte für diese Sensoren nicht mehr aus. Um die langen an der Wand entlang führenden Elektroden mit den Kontaktpads zu verbinden, waren auch bei den geS ein mehrschichtiger Aufbau und Durchkontaktierungen notwendig. Bis auf den letzten Platin- bzw. Platin-IrOx-Sputterprozess sind Herstellungsverfahren identisch zu denen der Vierpunktsensoren. Da nach Fertigstellung die Goldelektroden der geS nicht mit Polyimid bedeckt sind, wurden sie nach der Fixierung in der MTP in einer Vakuumkammer mit einer dünnen Parylenschicht passiviert.

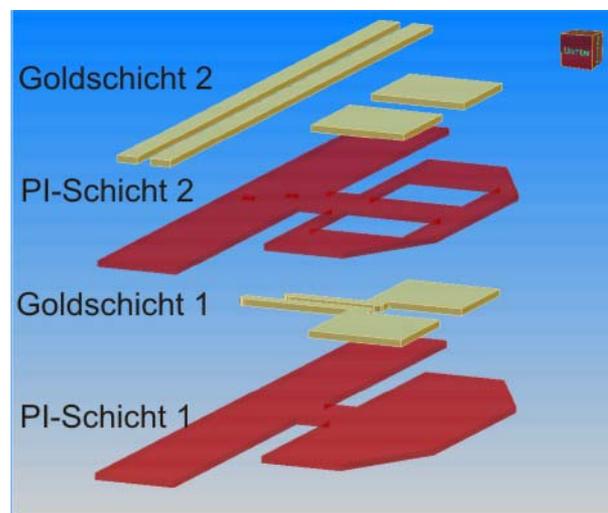


Abbildung 3.3.1. Explosionsansicht des Schichtaufbaus eines seitenwandintegrierten galvanisch entkoppelten Sensors

In Abbildung 3.3.1 ist die Schichtabfolge für einen geS noch einmal schematisch dargestellt. Die PI-Schicht 2 weist die erwähnten Öffnungen für die Kontaktpads und die Durchkontaktierungen zu den länglichen Elektroden auf. Die Goldschicht 2 war die letzte Schicht. Durch sie wurden die Form der Elektroden definiert und die Kontaktpads weiter in ihrer Dicke verstärkt.

### 3.4. Aufbau und Verbindungstechniken

Nach der Herstellung der Sensorfolien mussten diese zur endgültigen Verwendung an einer Mikrotiterplatte angebracht werden. Für alle in dieser Arbeit aufgebauten Sensoren wurde das Format einer 96er Mikrotiterplatte gewählt. Die verwendeten Platten mit offenem Boden waren Produkte der Firmen NUNC und GreinerBioOne. Die Durchmesser von 6 mm und Abstände zueinander von 9 mm der einzelnen 96 Wannern sind genormt und für alle Mikrotiterplatten dieses Typs gleich. Bei der Integration der hergestellten Sensorfolien lassen sich zwei verschiedene Verfahren aufgrund ihrer Anforderungen unterscheiden. So werden in den folgenden Unterkapiteln zunächst die Aufbau und Verbindungstechniken für die bodenintegrierten Sensoren aufgezeigt und im Anschluss die speziellen Techniken für die seitenwandintegrierten Sensoren erläutert.

#### 3.4.1. Bodenintegrierte Sensoren

Bei den bodenintegrierten Sensoren mussten diese einfach nur unter die fertigen bodenlosen Mikrotiterplatten geklebt werden. Die Trägerfolien aus Polyimid dienten hierbei als Bodenersatz. Die Anforderungen an die Klebeverbindung waren unter anderem die zuverlässige Fügung der Polyimidfolie und der aus Polystyrol bestehenden MTP, die Verwendung biokompatibler Materialien und eine Vermeidung jeglicher Verunreinigungen des Sensorbereiches durch den Klebstoff.

Es wurden verschiedene biokompatible Kleber getestet und die Ergebnisse untersucht. Im Vergleich zu epoxidbasierten und UV-aushärtenden Klebstoffen erwies sich der silikonbasierte Zweikomponentenkleber MED-2-4013 von der Firma Nusil als sehr zuverlässig. Er wurde mit einer Stempeltechnik mittels eines 5 mm dicken Silikonlappens auf die Unterseite der MTP aufgetragen. Für eine reproduzierbare Haftung an der glatten PS-Oberfläche musste diese vorher mit Aceton abgerieben werden. Auch eine Oberflächenbehandlung mit einer Nanoflame führte zu besseren Haftungseigenschaften. Nachteile bei der Anwendung der Nanoflame waren der niedrige Schmelzpunkt von PS, das daraus resultierende Aufschmelzen und die damit verbundene Verformung der MTP. Eine Vorbehandlung der Polyimidfolie war nicht notwendig. Bei der Applizierung der PI-Folien musste diese direkt richtig justiert angepresst werden. Eine nachträgliche Korrektur der Position war nur begrenzt möglich, ohne die Sensorbereiche mit Klebstoffresten zu verunreinigen. Waren die Folien an der korrekten Stelle wurden sie durch ein Reinraumtuch mit einer kleinen Walze unter leichtem Druck angepresst.

Um den Kleber und damit die Verbindung blasenfrei aushärten zu lassen, wurden die MTPs in einem Polyethylenbeutel verpackt, der mit einem Schlauch an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Durch das Absaugen der Luft zog sich der Beutel zusammen und presste die Polyimidfolien ganzflächig und blasenfrei an die MTP. Die vakuumverpackten MTPs wurden dann bei 50°C mehrere Stunden ausgeheizt. Um ein Verformen der MTPs bei diesem Heizschritt zu verhindern, wurde ein Kunststoffrahmen um die MTPs mit in den Vakuumbbeutel gepackt.

Diese Vorgehensweise wurde sowohl für die geS als auch für die Vierpunktsensoren angewendet (Abbildung 3.4.1).

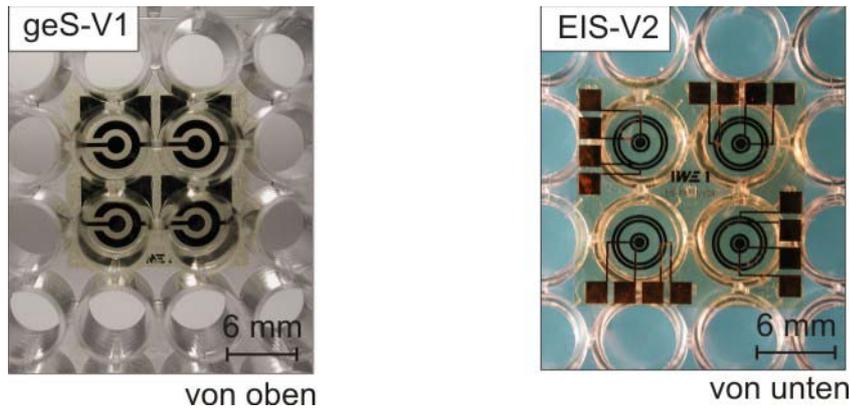


Abbildung 3.4.1. Fotos fertig verklebter bodenintegrierter Sensoren

### 3.4.2. Seitenwandintegrierte Sensoren

Die Fixierung der seitenwandintegrierten Sensoren war wesentlich aufwendiger. Die Folien konnten nicht wie bei den bodenintegrierten Sensoren einfach flächig angedrückt werden, sondern mussten sowohl am Boden der MTP als auch an den Innenwänden der Wannen verklebt werden (siehe Abbildung 3.4.2).

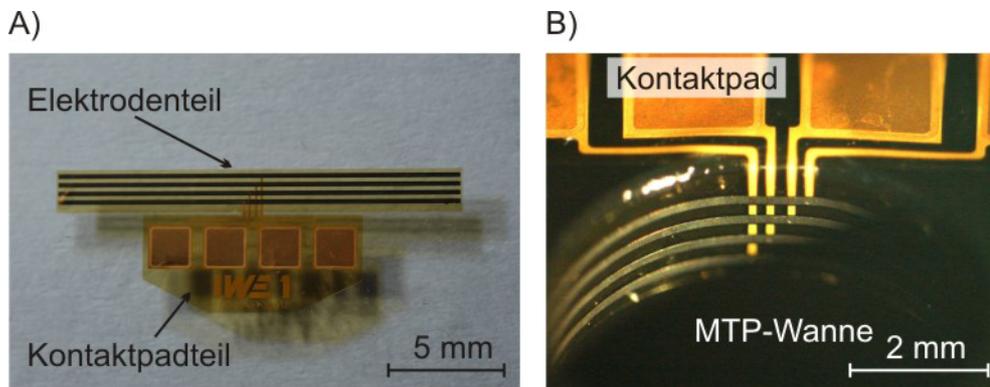


Abbildung 3.4.2. Aufbau der seitenwandintegrierten Sensoren mit Elektroden- und Kontaktpadteil A) fixierte Sensorfolie in MTP-Wanne B)

Hierzu wurde zunächst der Silikonkleber MED-2-4013 dünn auf eine Plexiglasplatte aufgetragen. Die Sensorfolien wurden mit ihrer Rückseite auf den Kleberfilm gelegt und mit einem sauberen Silikonstempel angedrückt. Da sowohl Elektroden als auch Kontaktpads auf der Oberseite der Folien lagen, kam es zu keiner kritischen Verunreinigung durch Kleberrückstände. Die nun auf der Rückseite ganzflächig mit Kleber bedeckten Sensorfolien wurden auf die Unterseite der MTP gelegt. Der Teil der Folien mit den Kontaktpads wurde zuerst an den Boden der MTP angedrückt (Abbildung 3.4.2). Der längliche Teil mit den Elektroden ragte in die entsprechende Wanne. Zur Fixierung an den Innenwänden wurde der mittlere Bereich des Elektrodenteils mit Hilfe eines zirka 4-5 mm breiten Gummistiftes in die Wanne gedrückt.

Dabei bogen sich die äußeren Enden des Elektrodenteils und falteten sich automatisch in die Wanne. Durch die leichte Steifigkeit der PI-Folie legte diese sich sofort an die Innenwände der Wanne. Mit dem Gummistift konnten letzte Justierungen vorgenommen und die Folie fester an die Wand angedrückt werden. Die Sensorfolien wurden so unter der MTP ausgerichtet, dass sie die gleiche Anordnung der Kontaktpads aufwiesen wie die Boden integrierten. In Abbildung 3.4.2 B) ist auch deutlich erkennbar, dass die Goldleiterbahnen, die die Kontaktpads mit den Elektroden verbinden, an der Knickstelle am Rand der MTP-Wanne nicht beschädigt sind. Nach der endgültigen Justage und Platzierung der Sensorfolien wurden die präparierten MTPs wie bei den bodenintegrierten Sensoren in einen PE-Beutel unter Vakuum verpackt in einem Ofen bei 50°C ausgeheizt.

Da die hergestellten Sensorfolien in die Wannen der MTP hineingefaltet wurden, blieb der Boden zunächst offen. Diesen dicht zu verkleben ohne dabei die Kontaktpads zu verunreinigen oder gar vollständig zu verkleben war die zu lösende Herausforderung. Zur Lösung wurde ein Stanzklebwerkzeug entwickelt, mit dem eine 0,25 mm dicke Polymethylmethacrylatfolie (PMMA) gezielt mit Kleber benetzt und gleichzeitig strukturiert werden konnte (siehe Abbildung 3.4.3). Das Werkzeug bestand aus drei Hauptteilen: der Schnittplatte, dem Schnittstempel und einer Fixierungsplatte (Abbildung 3.4.3).

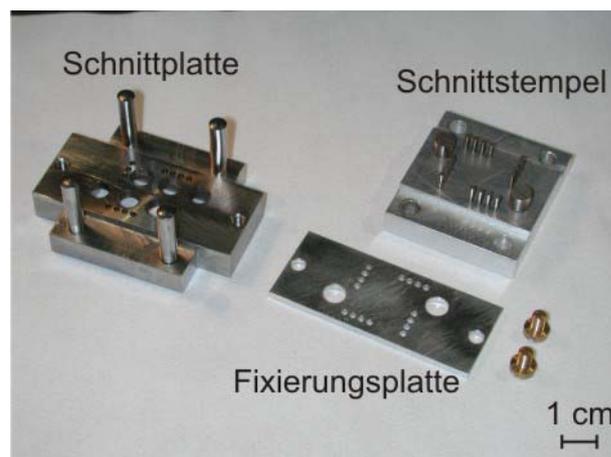


Abbildung 3.4.3. Übersicht der einzelnen Komponenten des Stanzklebwerkzeugs für die seitenwandintegrierten Vierpunktsensoren

Im ersten Schritt wurde das mittlere exponierte Teil der Schnittplatte mit der bekannten Stempeltechnik dünn mit Kleber versehen. Auch für diese Klebung wurde der bereits erwähnte silikonbasierte Kleber MED-2-4013 der Firma Nusil verwendet. Auf die Schnittplatte wurde eine PMMA-Folie gelegt und mit Hilfe der Fixierungsplatte und zweier Schrauben eingeklemmt. Dadurch wurde ein Verrutschen der PMMA-Folie verhindert. Über vier 5 mm dicke Führungsstifte konnte dann der Schnittstempel bezüglich der Schnittplatte justiert werden. Mittels eines herkömmlichen Schraubstockes wurde die benötigte Kraft aufgebracht, um das Schnittwerkzeug durch die PMMA-Folie zu treiben. Dabei wurden neben den 16 Löchern (bzw. 8 Löchern für die seitenwandintegrierten geS) für die Kontaktpads auch zwei Löcher mit einem Durchmesser von 6 mm ausgestanzt. Diese zusätzlichen Löcher lagen genau unter zwei dem Sensorarray benachbarten MTP-Wannen. Diese Löcher konnten zur vereinfachten

Justage der PMMA-Folie verwendet werden, indem die Folie über Führungsstifte in den entsprechenden Wannern bezogen auf den MTP-Boden ausgerichtet wurde. Zusätzlich zu den zu stanzenden Löchern wies die Schnittplatte noch vier weitere 6 mm große Löcher auf. Diese Löcher verhinderten, dass bei der Übertragung des Klebers von der Schnittplatte auf die PMMA-Folie die vier für die Sensoren verwendeten MTP-Wannen am Boden mit Kleber verunreinigt wurden.

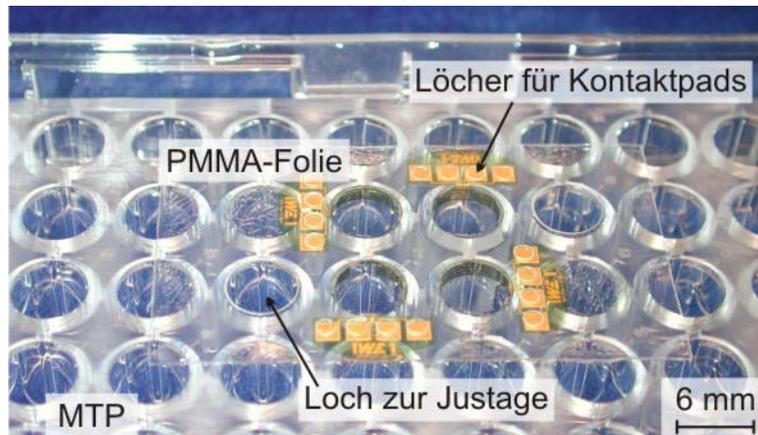


Abbildung 3.4.4. Foto eines fertig gestellten Sensorarrays seitenwandintegrierter Vierpunktsensoren

In Abbildung 3.4.4 ist gut zu erkennen dass die verklebte PMMA-Folie durch kleine Löcher den Zugang zu den Kontakt pads der Sensorfolien frei gibt. Die Böden der vier verwendeten Wannern sind nicht durch den Kleber verunreinigt und bieten daher einen optimalen optischen Zugang zur späteren Testlösung. Die Löcher zur Justage liegen genau auf den benachbarten Wannern. Nach der Justage wurden die MTPs erneut in einem Vakuumbbeutel bei 50°C ausgeheizt.

## 4. Galvanisch entkoppelte Sensoren

### 4.1. Analytische Modelle

Das einfache analytische Modell zur Beschreibung galvanisch entkoppelter Elektroden wurde bereits in Kapitel 2.3 beschrieben. Hierbei wurde die ideale Isolationsschicht durch eine Kapazität  $C_I$  beschrieben (siehe Abbildung 2.3.1). Um den dielektrischen Verlusten innerhalb der Isolationsschicht Rechnung zu tragen, musste zur Auswertung der tatsächlichen Messungen das ESB erweitert werden.

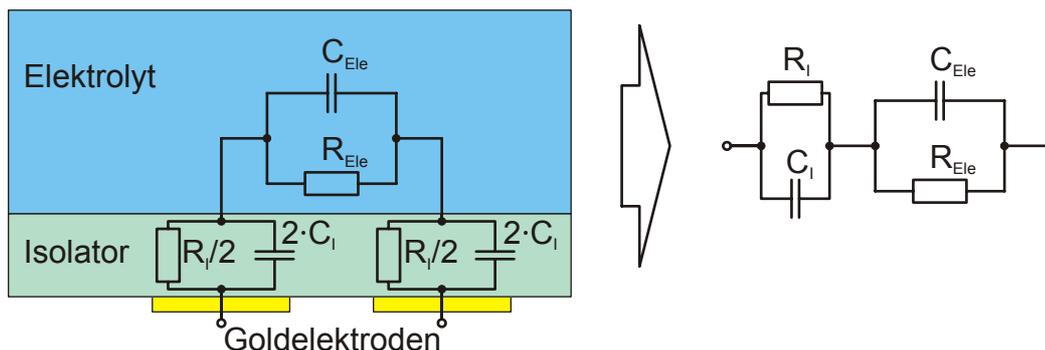


Abbildung 4.1.1. Modell eines galvanisch entkoppelten Sensors mit elektrischem Ersatzschaltbild

Die elektrische Kopplung in die Lösung geschieht, wie in Abbildung 4.1.1 gezeigt, über die Isolationsschicht. Bei den hergestellten Sensoren diente die Polyimidträgerschicht als Isolator. Diese wurde im Modell mit der Kapazität  $C_I$  und dem Widerstand  $R_I$  dargestellt. Die Kopplungswerte beider Elektroden-Isolator-Elektrolyt-Übergänge lassen sich im ESB zusammenfassen. Das endgültige ESB zur vollständigen Beschreibung der geS besteht demnach nur aus zwei Widerstands-Kapazitäts-Gliedern ( $C_I$ ,  $R_I$  und  $C_{Ele}$ ,  $R_{Ele}$ ).  $C_I$  und  $R_I$  sollten als Materialkonstanten der Polyimidschicht konstant und unabhängig von den Elektrolyteigenschaften sein. Die Größen  $C_{Ele}$  und  $R_{Ele}$  repräsentieren die elektrischen Eigenschaften der Lösung und damit die gesuchten Messgrößen.

Da die Berechnung der elektrischen Größen  $C_I$  und  $R_I$  nicht nur von geometrischen Parametern, sondern auch von materialspezifischen Größen abhängt, ließen sich die Werte im ESB nur schwierig voraussagen. Die zu erwartende Kapazität  $C_I$  ließ sich am genauesten abschätzen, da die Werte der Permittivität nur geringen Abweichungen zwischen  $\epsilon = 3-4$  unterliegen (Kim 2008). Bei der Abschätzung des Widerstandswertes  $R_I$  erweist sich die große Streuung der spezifischen Widerstandswerte von Polyimidfilmen als besonders schwierig. Diese werden in Bereichen von  $10^6$  bis  $10^{16} \Omega\text{cm}$  angegeben.

Da die Elektrodenfläche um ein vielfaches größer ist als die Dicke der Polyimidschicht, konnte die Kapazität  $C_I$  durch die Formel eines einfachen Plattenkondensators angenähert werden.

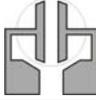
$$C_{I-1Ele} = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \frac{A}{d} \quad (25)$$

Nach Formel (32) berechnet sich die Kapazität einer Elektrode  $C_{I-1Ele}$  aus dem Produkt der dielektrischen Konstanten  $\varepsilon_0$ , der relativen Dielektrizitätszahl  $\varepsilon_r$  und dem Quotienten aus der Elektrodenfläche  $A$  und der Polyimidschichtdicke  $d$ . Zur Beschreibung des Sensors musste beachtet werden, dass sich diese Kapazität auf beiden Elektroden ausbildet und beide Kapazitäten in Reihe zu betrachten sind, um die resultierende Kapazität  $C_I$  zu erhalten:

$$C_I = \frac{C_{I-1Ele} \cdot C_{I-2Ele}}{C_{I-1Ele} + C_{I-2Ele}} \quad (26)$$

Mit einer konstanten Polyimidschichtdicke von  $5 \mu\text{m}$ , einer relativen Dielektrizitätszahl von 3,5 und den jeweiligen Elektrodenflächen ließen sich bei den hergestellten Sensoren folgende Kopplungskapazitätswerte abschätzen:

Tabelle 4.1.1. Berechnete Kopplungskapazitäten  $C_I$  der galvanisch entkoppelten Sensoren

Sensortyp	$C_{I-1}$ [pF]	$C_{I-2}$ [pF]	$C_I$ [pF]
geS-V1 	19,5	87,6	15,9
geS -V2 	38,9	69,4	24,9
geS -V3 	24,3	69,4	18,0
geS -V4 	23,9	23,9	11,9
geS -V5 	53,2	53,2	26,6

In Tabelle 4.1.1 sind die berechneten Kapazitäten aller ge-Sensoren aufgelistet. Hierbei beschreibt die Kapazität  $C_{I-1}$  bei den Sensoren geS-V1 bis V3 jeweils die Kapazität der inneren Elektrode und  $C_{I-2}$  die Kapazität der äußeren. Die Gesamtkapazität  $C_I$  wurde nach Formel (26) berechnet.

Eine Abschätzung der Widerstandswerte  $R_I$  ließ sich aus bereits genannten Gründen nur sehr grob vornehmen. Aufgrund der Elektrodengeometrien ließen sich Werte abschätzen im Bereich von  $20 \text{ k}\Omega$  bis weit über  $20 \text{ G}\Omega$ . Da der Widerstand  $R_I$  in einem Wertebereich von nur wenigen  $\text{M}\Omega$  schon deutliche Einflüsse auf das Elektrodenverhalten zeigt, konnte er im Ersatzschaltbild (Abbildung 4.1.1) nicht vernachlässigt werden.

## 4.2. Versuchsaufbau

Da es sich bei der Messung mit den galvanisch entkoppelten Sensoren um eine einfache Zweipunktmessung handelt, waren nur zwei Messkabel zum Messgerät hin notwendig. Der Anschluss dieser Messkabel ist in Abbildung 4.2.1 dargestellt. Als Messgerät wurde der Impedance Analyser 1260 der Firma Solartron verwendet. Jeweils eine Elektrode der geS wurde mittels eines Multiplexers mit den Eingängen „Generator“ und „ $V_{HIGH}$ “ des Messgerätes verbunden. Dieses Signal wird im Folgenden mit  $V_{HIGH}$  bezeichnet. Die andere Elektrode wurde über denselben Multiplexer mit den Geräteeingängen „ $V_{LOW}$ “ und „ $I_{INPUT}$ “ verbunden.

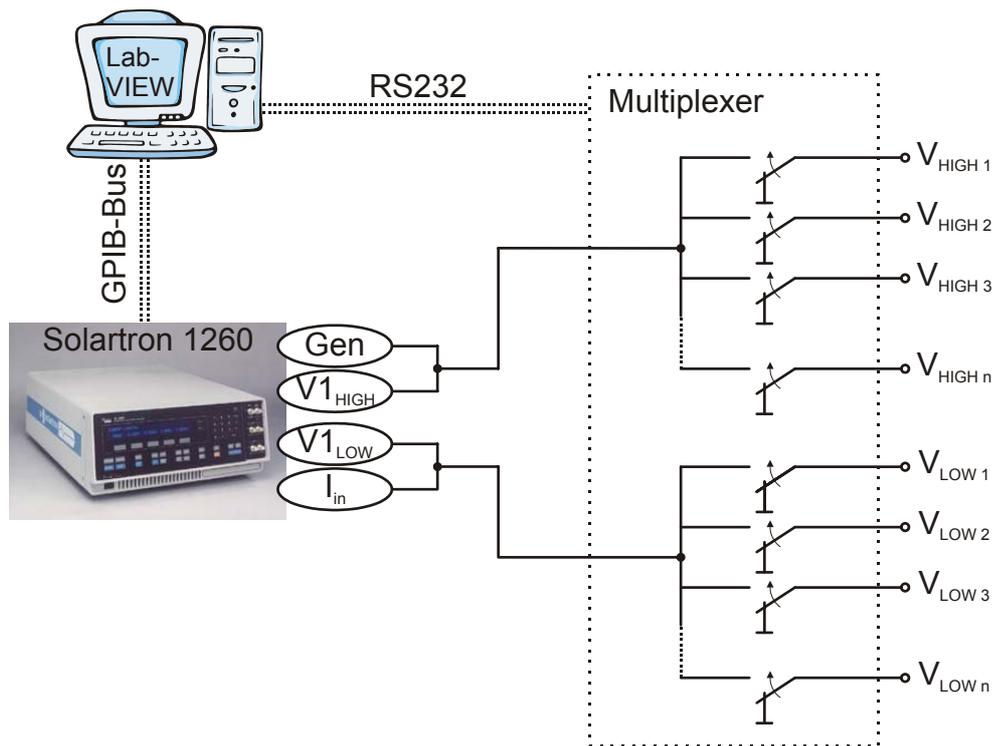


Abbildung 4.2.1. Prinzipskizze des Versuchsaufbaus für die Messungen mit den galvanisch entkoppelten Sensoren

Der „Generator“-Anschluss des Solartron 1260 stellt das Anregungssignal für die Messung zur Verfügung. Es können Frequenz und Amplitude des Anregungssignals in Bereichen von wenigen mHz bis zu 32 MHz bzw. bis maximal 3 V Amplitude eingestellt werden. Für die Messung wurde das eingestellte Anregungssignal direkt mit dem Messeingang  $V_{HIGH}$  verbunden. Der Strom, der durch die Sensoren floss wurde am Eingang „ $I_{INPUT}$ “ gemessen. Die Spannung, die zur Berechnung der Impedanz verwendet wurde, war die Differenzspannung von „ $V_{HIGH}$ “ und „ $V_{LOW}$ “, am Eingang „ $I_{INPUT}$ “ (Abbildung 4.2.1).

Sowohl das Messgerät als auch der Multiplexer wurden über einen PC mit Hilfe eines LabVIEW-Programms gesteuert. Hierzu wurde der Solartron 1260 über einen GPIB-IEEE488 Bus und der Multiplexer über die serielle Schnittstelle RS232 angeschlossen.

Der Aufbau der Multiplexerschaltung wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

### 4.2.1. Multiplexereinheit

Um mehr als eine Wanne der zu messenden Mikrotiterplatten mit den hergestellten Sensoren auslesen zu können, musste eine Multiplexereinheit entwickelt werden. Bei der Zu- und Abschaltung der einzelnen Sensorelektroden, war ein guter niederohmiger Kontakt bzw. eine zuverlässige Trennung der Signale das entscheidende Kriterium. Um beide Kriterien zuverlässig erfüllen zu können, wurden Hochfrequenzrelais des Typs G6K-2P der Firma Omron verwendet. Diese Umschaltrelais können bei einer Steuerspannung von 5 V Gleichspannung jeweils zwei Kanäle gleichzeitig umschalten. Hierbei weist der geschlossene Kontakt laut Datenblatt einen Kopplungswiderstand von nur 50 m $\Omega$  auf.

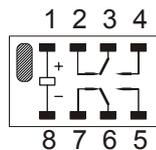


Abbildung 4.2.2. Ansicht von unten der verwendeten Relais

In Abbildung 4.2.2 sind die Anschlüsse der verwendeten Relais dargestellt. Bei einer Spannung von 5 V an den Anschlüssen 1 und 8 wurden die Kontakte 3 von dem Anschluss 2 auf 4 und 6 von Abschluss 7 auf 5 geschaltet. Der Multiplexer wurde nun so aufgebaut, dass die verwendeten Relais mit den Anschlüssen 3 und 6 jeweils an ein Elektrodenpaar angeschlossen wurden. Um die Elektroden zu kontaktieren wurden spezielle SMD-Federkontaktstifte verwendet. Diese vergoldeten Kontaktstifte wurden direkt auf der Multiplexerplatine verlötet, um längere Zuleitungen zu verhindern. Die Kontakte, die ohne äußere Spannung mit den Anschlüssen 3 und 6 verbunden waren (Anschlüsse 2 und 7), lagen auf Masse. Die Anschlüsse 4 und 5 führten zum Ausgang des Multiplexers und damit zu den Eingängen des Messgerätes. Es wurden acht Relais für den Aufbau des Multiplexers verwendet, so dass acht verschiedene Wannen der MTP angesteuert werden konnten.

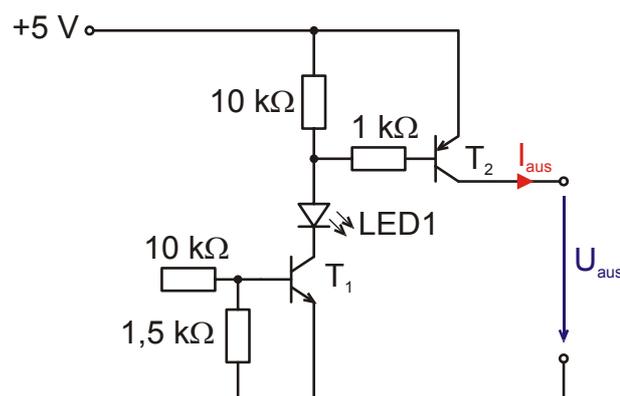


Abbildung 4.2.3. Transistorschaltung als Verstärkerstufe für den Multiplexer

Um die Relais zu schalten musste neben den 5 V Versorgungsspannung auch ein Strom von zirka 200 mA pro Relais zu Verfügung gestellt werden. Da diese Leistung nicht durch die digitalen Schnittstellen des Computers geliefert werden können, musste eine Verstärkerstufe

aufgebaut werden, die es ermöglichte, die digitalen Ansteuersignale des Computers für die Relais zu verstärken.

Eine einfache zweistufige Transistorschaltung diente als Verstärkerstufe für den Multiplexer (Abbildung 4.2.3). Die durch ein Netzteil zu Verfügung gestellte Spannung von 5 V konnte mit einer Eingangsspannung  $U_{\text{ein}}$  von ebenfalls 5 V über den npn-Transistor  $T_1$  und den pnp-Transistor  $T_2$  an den Ausgang  $U_{\text{aus}}$  weitergeleitet werden. Hierbei floss am Ausgang der durch die Spannungsquelle bereitgestellte Strom  $I_{\text{aus}}$ . Der Eingangsstrom  $I_{\text{ein}}$  wurde durch die hohen Eingangswiderstände von 10 k auf unter 5 mA beschränkt. Dieser Strom konnte von jeder beliebigen digitalen Schnittstellenkarte des PCs zur Verfügung gestellt werden. Der für diese Arbeit verwendete Multiplexer verfügte über einen eigenen Mikrocontroller, der sowohl über die serielle Schnittstelle RS232 als auch über USB vom PC angesteuert werden konnte. Die digitalen Ausgänge des Mikrocontrollers wiederum lieferten die benötigten Spannungen für die Verstärkerstufe ( $U_{\text{ein}}$ ). Die Leuchtdiode LED1 diente lediglich der Anzeige, dass der Kanal gerade aktiv und das entsprechende Relais geschaltet waren.

### 4.2.2. Versuchsaufbau für Fermentationsmessungen

Da das elektrische Signal während der Fermentation vor allem in komplexen Medien nur schwierig zu interpretieren ist, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der eine direkte Referenzmessung mit dem Streulichtsignal zulässt. Das Streulicht diente als Indikator für die Biomasse und damit für die bei der Fermentation wachsende Zelldichte. Für den Versuchsaufbau wurde ein Schütteltablet der Kühner GmbH (Birsfelden, Schweiz) verwendet.

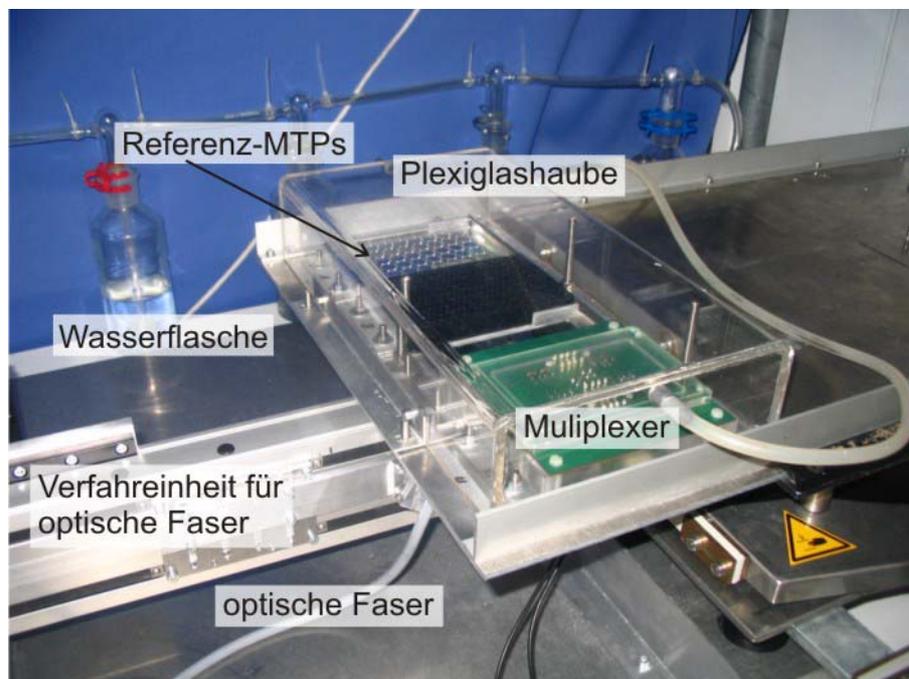


Abbildung 4.2.4. Versuchsaufbau der galvanisch entkoppelten Sensoren zur Messung während der Fermentation mikrobieller Zellkulturen

Auf diesem Tablett konnten überhängend vom Schüttelantrieb drei MTPs positioniert werden. Durch den Überhang konnte sowohl der Multiplexer für die Impedanzmessung von unten

kontaktiert werden, als auch Platz für die optische Faser geschaffen werden, mit der das Streulichtsignal aus einer Referenz-MTP aufgenommen wurde. Alle für die Versuche verwendeten MTPs wurden mit einer Plexiglashaube abgedeckt, die kontinuierlich mit feuchter Luft begast wurde. Durch den Einsatz von 5 Waschflaschen mit Wasser gefüllt, durch die ein stetiger Luftstrom geführt wurde, konnte im Bereich der MTPs eine relative Luftfeuchte von über 95% erzielt werden. Die hohe Luftfeuchte verhinderte ein schnelles Austrocknen der Wannen während der Fermentation. Der gesamte Aufbau befand sich in einem Thermokonstantraum bei einer Temperatur von 37°C. Die MTPs konnten zusammen mit dem Multiplexer mit bis zu 1500 U/min orbital geschüttelt werden.

### 4.2.3. Fehlerkorrektur der Messwerte

Bei der Messung der ge-Sensoren mittels einfacher Zweipunktmessung (siehe Abbildung 4.2.1) verfälschten Zuleitungen und Kontaktwiderstände das Messergebnis nachhaltig. Um dennoch verwertbare Ergebnisse zu erhalten, mussten die zuleitungsbedingten Messfehler durch Referenzmessungen eliminiert werden. Hierzu wurde das Modell eines einfachen Zweitors verwendet. Der elektrische Einfluss des kompletten Messaufbaus inklusive aller Kabel auf das Messsignal kann modellhaft durch ein Zweitor zwischen dem Messgerät und dem zu messenden Objekt beschrieben werden.

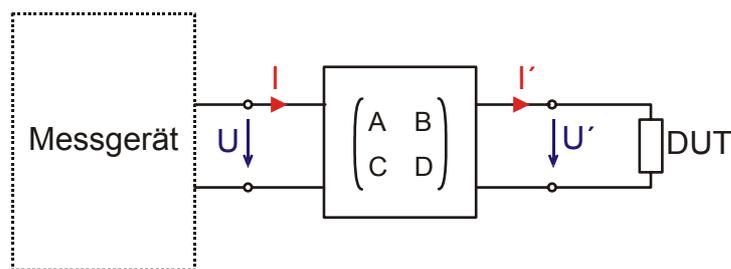


Abbildung 4.2.5. Prinzipskizze des Zweitormodells zur Fehlerkorrektur der aufgenommenen Messwerte

Hierzu wurde der Ansatz aus Abbildung 4.2.5 gewählt. Hierbei wurde das Netzwerk aus Kabeln und Multiplexer zwischen dem Messgerät und dem zu messenden Objekt (DUT = Device under test) als einfaches lineares Zweitor mit den komplexen Parametern A, B, C und D beschrieben. Die vom Messgerät gemessene Impedanz wurde durch die Größen U und I bestimmt, die tatsächliche Impedanz des DUT jedoch durch die Größen U' und I'. Die Größen hängen wie folgt voneinander ab:

$$Z_{\text{mess}} = \frac{U}{I} \quad \text{und} \quad Z_{\text{DUT}} = \frac{U'}{I'} \quad (27)$$

Alle Größen in Formel (32) sind komplex. Der Zusammenhang zwischen den Größen U, I und U', I' konnte mit Hilfe des Zweitors wie folgt beschrieben werden:

$$\begin{pmatrix} U \\ I \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} U' \\ I' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A \cdot U' + B \cdot I' \\ C \cdot U' + D \cdot I' \end{pmatrix} \quad (28)$$

Aus den Gleichungen (27) und (28) folgte der Zusammenhang der gemessenen  $Z_{\text{mess}}$  und der tatsächlichen Impedanz  $Z_{\text{DUT}}$ .

$$Z_{\text{mess}} = \frac{U}{I} = \frac{A \cdot U' + B \cdot I'}{C \cdot U' + D \cdot I'} = \frac{A \cdot \frac{U'}{I'} + B}{C \cdot \frac{U'}{I'} + D} = \frac{A \cdot Z_{\text{DUT}} + B}{C \cdot Z_{\text{DUT}} + D} \quad (29)$$

Aufgelöst nach der tatsächlichen Impedanz des Messobjektes ergab sich folgende Formel:

$$Z_{\text{DUT}} = \frac{B - D \cdot Z_{\text{DUT}}}{C \cdot Z_{\text{DUT}} - A} \quad (30)$$

Mit einer Division durch den komplexen Korrekturfaktor A ließ sich Formel (30) auf eine Gleichung mit nur drei Unbekannten reduzieren:

$$Z_{\text{DUT}} = \frac{a - b \cdot Z_{\text{DUT}}}{c \cdot Z_{\text{DUT}} - 1} \quad \text{mit } a = \frac{B}{A} \wedge b = \frac{D}{A} \wedge c = \frac{C}{A} \quad (31)$$

Mit Hilfe der Formel (31) war es nun möglich die tatsächliche Impedanz  $Z_{\text{DUT}}$  des Messobjektes mit Hilfe der drei komplexen Korrekturparameter und der gemessenen Impedanz  $Z_{\text{mess}}$  zu bestimmen. Um die Formel bei den durchgeführten Messungen einsetzen zu können, mussten die systembedingten Korrekturfaktoren a, b und c zunächst bestimmt werden. Hierzu wurden drei Referenzmessungen mit unterschiedlichen, bekannten Impedanzen durchgeführt. Das so aufgestellte Gleichungssystem von drei Gleichungen (jede Referenzmessung entsprach einer Gleichung) mit drei Unbekannten (a, b, c) konnte dann mittels einfacher Determinatenrechnung gelöst werden.

Zur Referenzmessung wurden Platinen gefertigt, auf denen jeweils eine Parallelschaltung zweier SMD-Bauteile gelötet wurde. Die Parallelschaltungen bestanden aus jeweils einem Widerstand und einer Kapazität. Folgende Kombinationen wurden zur Referenzmessung verwendet:

*Tabelle 4.2.1. Verwendete Größen bei der Simulation der Schaltung aus Abbildung 2.4.2*

<b>Referenz 1</b>	$C_{\text{ref1}}$	15 pF
	$R_{\text{ref1}}$	10 k $\Omega$
<b>Referenz 2</b>	$C_{\text{ref2}}$	18 pF
	$R_{\text{ref2}}$	1 k $\Omega$
<b>Referenz 3</b>	$C_{\text{ref3}}$	12 pF
	$R_{\text{ref3}}$	3,3 k $\Omega$

Die komplexen Korrekturfaktoren a, b und c wurden als Real- und Imaginärteile in ASCII-Dateien abgelegt. Das in LabVIEW geschriebene Messprogramm konnte diese Daten online während der Messung abrufen und die Messdaten noch während der Messung korrigieren. Für die spätere Auswertung wurden sowohl die original als auch die korrigierten Messwerte abgespeichert.

### **4.3. Versuchsdurchführung**

Im Folgenden werden die Versuche beschrieben, die mit den ge-Sensoren durchgeführt wurden. Dabei handelt es sich um Messungen in einfachen Testlösungen mit deren Hilfe die geS charakterisiert wurden. Als Testlösungen wurden Kaliumchloridlösungen mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten untersucht. Hierzu wurde die Konzentration der Lösungen so eingestellt, dass sich die Leitfähigkeiten in einem Bereich von 3 – 20 mS/cm befanden. Dieser Leitfähigkeitsbereich deckt die Leitfähigkeiten gängiger Zellmedien ab. Lediglich stark salzbasierte Minimalmedien liegen mit ihrer Leitfähigkeit über diesem Bereich.

#### **4.3.1. Versuche mit definierten Kaliumchloridlösungen**

Die Versuche mit Kaliumchloridlösungen wurden bei einer Raumtemperatur von zirka 24°C durchgeführt. Zunächst wurde eine KCl-Lösung mit einer spezifischen Leitfähigkeit von 3 mS/cm in vier verschiedene Wannen gefüllt. Diese wurden mittels eines Klebebandes verschlossen um Ausdunstungseffekte und ein damit verbundenes Aufkonzentrieren des Salzes zu verhindern. Nach der Befüllung der Wannen wurde die Messung direkt gestartet. Bei jeder Wanne wurden 11 Messpunkte in einem logarithmischen Abstand zwischen 100 kHz und 10 MHz gemessen. In einem Zeitintervall von 2 Minuten wurden die Messungen kontinuierlich wiederholt. Die Messungen nach zirka einer Stunde wurden zur Charakterisierung und zum Vergleich der unterschiedlichen Sensordesigns verwendet.

#### **4.3.2. Fermentationsmessungen**

Während der Versuche zur Überwachung aerober Fermentationsprozesse wurde der Aufbau aus Kapitel 4.2.2 verwendet. Es wurden Messungen an verschiedenen biologischen Systemen durchgeführt. Untersucht wurden unter anderem Escherichia Coli Bakterien in TB-Medium (Terrific Broth). Hierbei handelte es sich um ein komplexes Medium mit Salzbestandteilen und Hefeextrakten (siehe Anhang). Bei den E.Coli Kulturen handelte es sich um gentechnisch unveränderte Wildtypen. Die Schüttelfrequenz bei diesen Untersuchungen wurde auf nur 700 U/min eingestellt, um eine leichte Sauerstofflimitierung der Zellen zu gewährleisten. Unterschiede in der Höhe der Limitierung konnten durch Variationen der Füllmenge einer einzelnen Wanne eingestellt werden. Es wurden Füllvolumina von 100µl bis 200 µl eingestellt und vermessen. Um eine Querkontamination der Wannen untereinander zu verhindern, wurde die MTP mit einer gasdurchlässigen Membran versiegelt.

#### 4.4. Messungen mit galvanisch entkoppelten Sensoren

In den folgenden Unterkapiteln werden alle Messergebnisse der galvanisch entkoppelten Sensoren vorgestellt, beschrieben und analysiert, bevor sie diskutiert werden.

##### 4.4.1. Messungen in KCl-Lösungen zur Verifikation der Theorie

Um zunächst die Auswirkungen der Korrekturfaktoren (Formel (31), Kapitel 4.2.3) auf die Messdaten zu dokumentieren, werden in den folgenden Abbildungen die Frequenzverläufe verschiedener Messungen vor und nach der Korrektur verglichen.

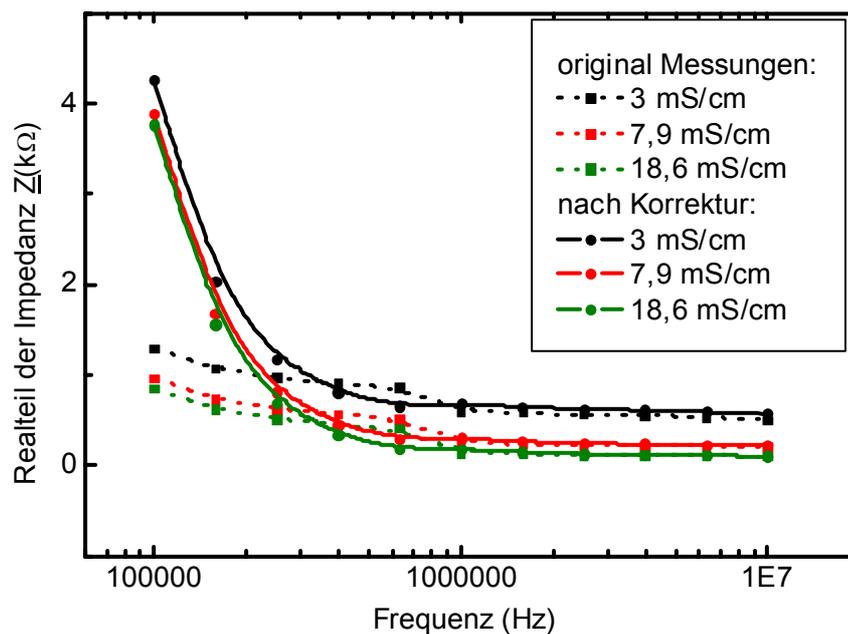


Abbildung 4.4.1. Vergleich der tatsächlich gemessenen Realteile mit den korrigierten Werten durch Verwendung des Zweitormodells (siehe Kapitel 4.2.3) eines geS-VI

Die Graphen in Abbildung 4.1.1 zeigen den deutlich unterschiedlichen Frequenzverlauf der original Messwerte im Vergleich zu den nach Formel (31) korrigierten Werten für den Realteil der gemessenen Impedanz. Besonders deutlich zeigte sich der Einfluss der Korrektur im niedrigen Frequenzbereich. Hier lagen die Abweichungen der Werte bei bis zu 400%. Auffällig ist auch die Stufe im Frequenzgang der originalen Messwerte bei Frequenzen von knapp unter 1 MHz. Dieser Messfehler konnte ebenfalls durch die Korrektur fast vollständig kompensiert werden.

Die Änderungen bei den Werten der Imaginärteile waren weniger deutlich. Sowohl die Unterschiede bei verschiedenen Leitfähigkeiten der Testlösungen als auch zwischen den original gemessenen und den korrigierten Werten waren nur sehr gering. Um dennoch die Unterschiede kenntlich machen zu können, sind die Imaginärteile in der folgenden Abbildung im logarithmischen Maßstab aufgetragen.

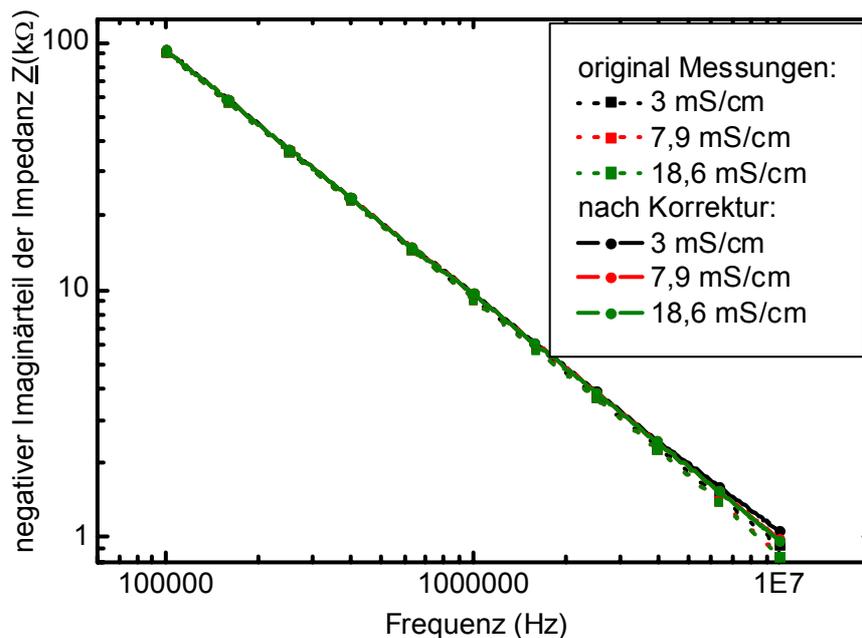


Abbildung 4.4.2. Vergleich der tatsächlich gemessenen Imaginärteile mit den korrigierten Werten durch Verwendung des Zweitormodells (siehe Kapitel 4.2.3) eines geS-VI

Die Graphen in Abbildung 4.4.2 zeigen ein fast ideal kapazitives Verhalten des gemessenen Imaginärteils. Unterschiede bedingt durch verschiedene Leitfähigkeiten der KCl-Lösungen oder durch die Korrektur sind nur bei hohen Frequenzen um 10 MHz erkennbar.

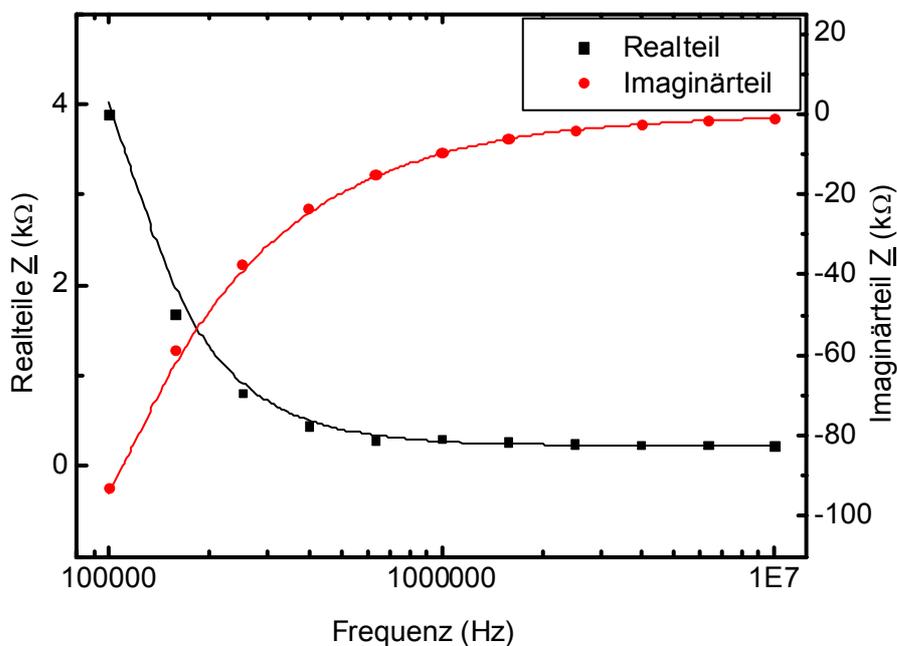


Abbildung 4.4.3. Gefittete Messungen eines geS-VI in KCl-Lösung mit 8 mS/cm spezifischer Leitfähigkeit mit dem ESB aus Abbildung 4.1.1

Diese korrigierten Messungen wurden mit dem ESB aus Abbildung 4.1.1 gefittet. Die Graphen aus Abbildung 4.4.3 zeigen, dass sich das gemessene Frequenzverhalten der hergestellten ge-Sensoren sehr gut mit dem ESB aus Abbildung 4.1.1 beschreiben ließ. Die Punkte im Graphen repräsentieren die korrigierten Messwerte, während die durchgezogenen Linien der jeweiligen Fitfunktion entsprechen.

#### **4.4.2. Auswertung der Messungen und Vergleich mit der Theorie**

Der Vergleich der originalen Messwerte mit denen durch das Zweitormodell (Kapitel 4.2.3) korrigierten Werten (Abbildung 4.4.1 und Abbildung 4.4.2) zeigte eindeutig die Notwendigkeit der Referenzmessungen. Auch wenn das Messgerät eine solche Korrektur nicht vorsah, sind die Einflüsse parasitärer Kapazitäten durch die Kabelführung und den restlichen Versuchsaufbau so dominant, dass eine Auswertung der Messwerte nicht möglich gewesen wäre. Eine Beschreibung der Messwerte mittels des postulierten Ersatzschaltbildes aus Abbildung 4.1.1 war daher nur nach in Kapitel 4.2.3 beschriebener Korrektur möglich.

Trotz der großen Abweichungen der Messung, vor allem im niedrigen Frequenzbereich bei unter 1 MHz, konnte mit der vorgestellten Korrektur die Messung derart verbessert werden, dass eine perfekte Beschreibung des Sensorverhaltens mittels des vorgestellten Ersatzschaltbildes aus Abbildung 4.1.1 gewährleistet wurde. Die hervorragende Beschreibung des Sensorverhaltens über einen großen Frequenzbereich von 2 Dekaden (100 kHz bis 10 MHz) zeigt der Graph aus Abbildung 4.4.3.

#### **4.4.3. Messungen zur Charakterisierung der Sensoreigenschaften**

Im Folgenden wurden diese Fits an allen Sensordesigns durchgeführt und ausgewertet. Zur Auswertung wurden in verschiedenen KCl-Lösungen in einem Bereich von 3 – 19 mS/cm Messungen an vier verschiedenen Sensoren des gleichen Typs durchgeführt. Wegen der prozessbedingten Schwankungen der Polyimidschichtdicke (Kapitel 3.1) wurden nur Sensoren verglichen, die auf dem gleichen Wafer prozessiert wurden und damit eine weitestgehend identische Polyimidschicht aufwiesen. Ausgewertet wurden die Größen  $C_1$  und  $R_1$ , die die Eigenschaften der Polyimidschicht beschreiben.

Das Balkendiagramm aus Abbildung 4.4.4 zeigt die mit Hilfe des ESB aus Abbildung 4.1.1 berechneten Werte für die Kapazität  $C_1$  der Polyimidschicht der einzelnen Sensordesigns. Hierbei ist die Balkenhöhe der gemittelte Wert aller Messungen. Die schwarzen Fehlerbalken beschreiben die Schwankungen von Sensor zu Sensor, während die roten Fehlerbalken den durchschnittlichen Fehler bei Anwendung der Fitfunktion zeigen.

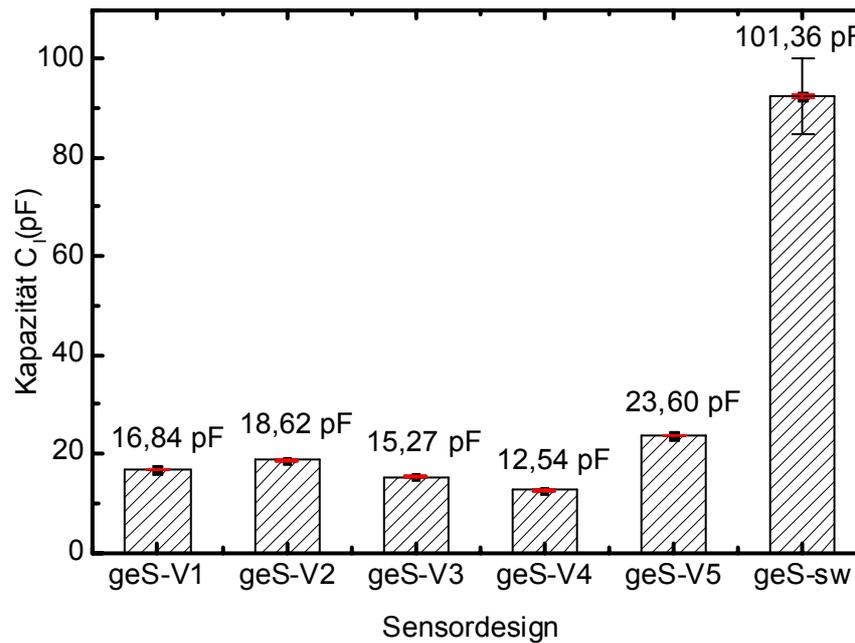


Abbildung 4.4.4. Ermittelte Kapazität  $C_1$  der verschiedenen Sensordesigns

Bei dem Vergleich verschiedener Sensoren einer Polyimidfolie zeigten sich nur geringe Schwankungen der Werte sowohl bei der Berechnung (rote Fehlerbalken) als auch im Vergleich der unterschiedlichen Wannen (schwarze Fehlerbalken). Bei den seitenwandintegrierten Sensoren zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Sensoren.

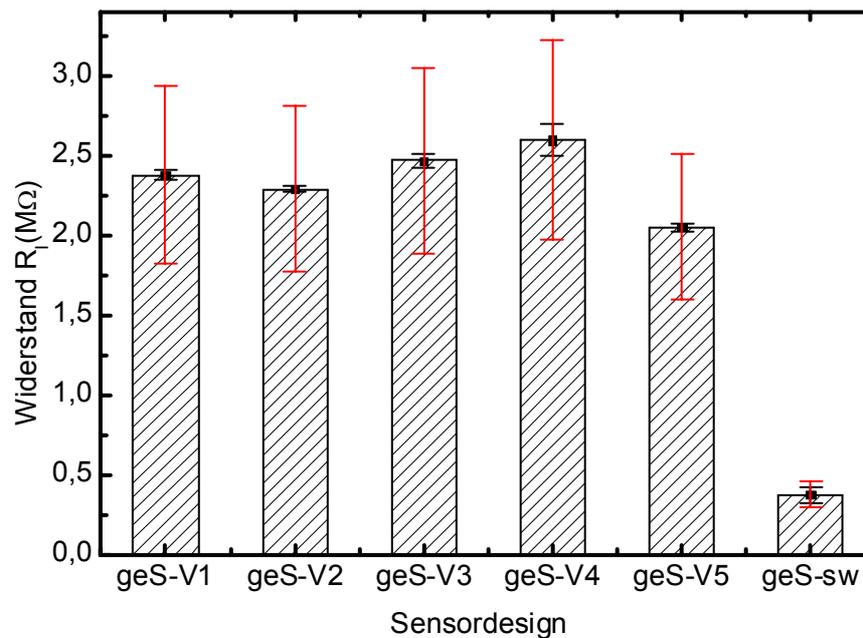


Abbildung 4.4.5. Ermittelter Widerstand  $R_1$  der verschiedenen Sensordesigns

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Widerstandswerte der Polyimidschichten in Abbildung 4.4.5 zeigen sich große Fehler in der Genauigkeit der Fitfunktion (rote Fehlerbalken). Insgesamt belaufen sich die Widerstandswerte nur auf wenige Megaohm oder sogar nur auf zirka  $370 \text{ k}\Omega$  für die geS-sw.

Um die elektrischen Eigenschaften der Testlösungen zu ermitteln, wurde ebenfalls das ESB aus Abbildung 4.1.1 verwendet. Der reziproke resultierende Widerstand  $R_{\text{Ele}}$  wurde als Funktion der Lösungsleitfähigkeit aufgetragen.

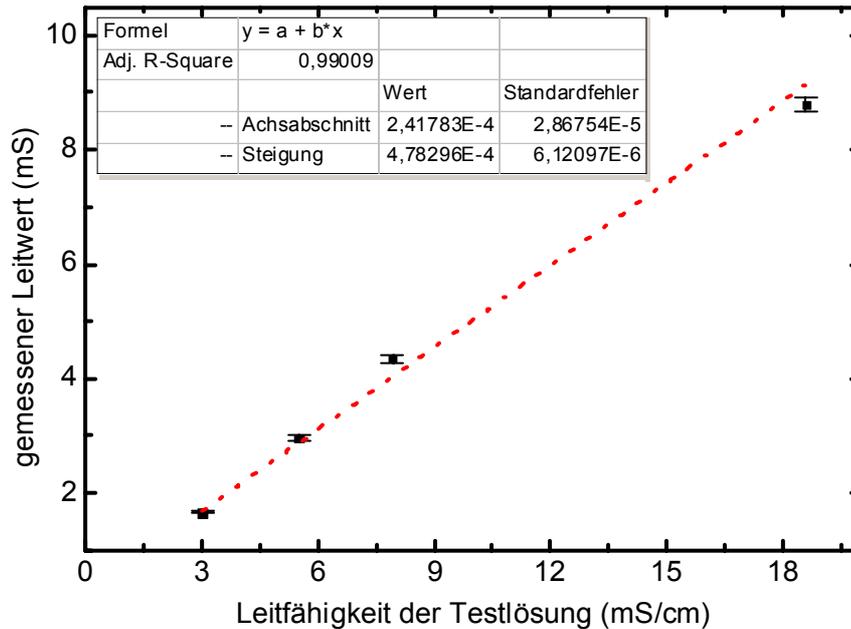


Abbildung 4.4.6. Auswertung des reziproken Widerstandes  $R_{\text{Ele}}$  als Funktion der Leitfähigkeiten der KCl-Lösungen am Beispiel eines geS-V1

Wie in Abbildung 4.4.6 deutlich zu erkennen, verhielt sich der reziproke Widerstandswert von  $R_{\text{Ele}}$  stark linear, bezogen auf die Leitfähigkeit der Testlösung.

Anders verhielt es sich bei der Bestimmung der Lösungskapazität  $C_{\text{Ele}}$ . Die über das ESB aus Abbildung 4.1.1 aus den Messungen ermittelten Kapazitäten unterlagen großen Schwankungen und waren daher nicht reproduzierbar.

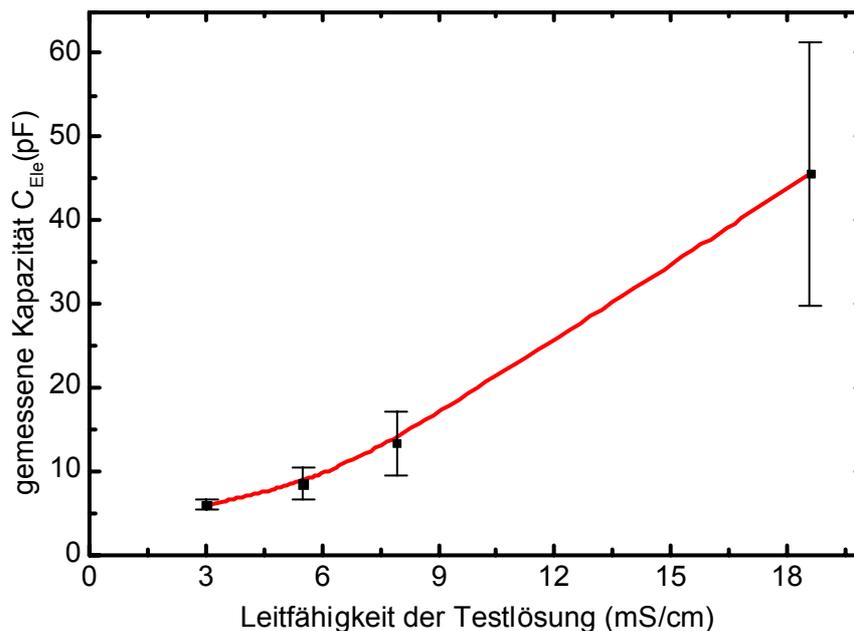


Abbildung 4.4.7. Durch das ESB bestimmte Kapazität  $C_{Ele}$  eines geS-V1 als Funktion unterschiedlicher Leitfähigkeiten

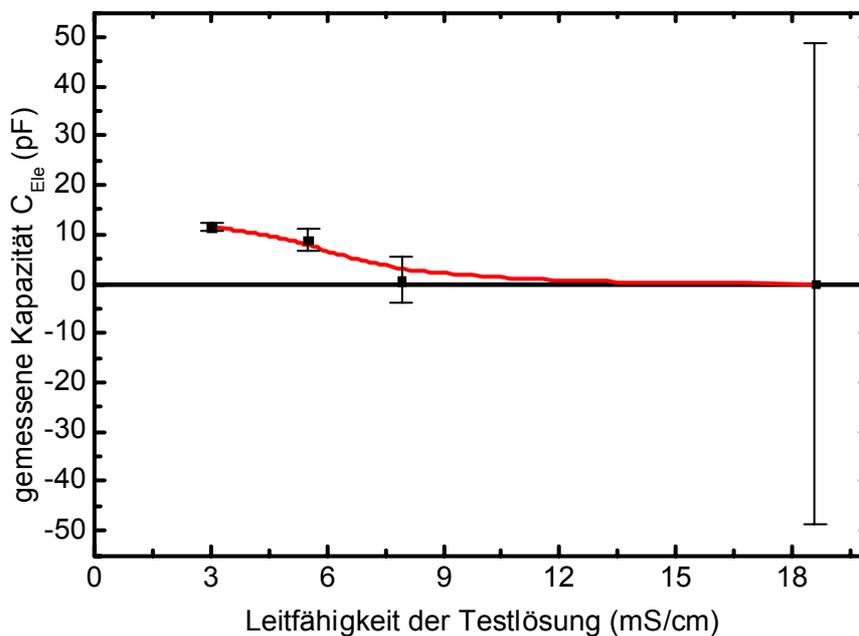


Abbildung 4.4.8. Durch das ESB bestimmte Kapazität  $C_{Ele}$  eines geS-sw als Funktion unterschiedlicher Leitfähigkeiten

Die Graphen aus Abbildung 4.4.7 und Abbildung 4.4.8 zeigen beispielhaft für einen geS-V1 und einen geS-sw das Verhalten der ermittelten Lösungskapazitäten. Während die Fehler durch den Fit des ESB im niedrigen Leitfähigkeitsbereich noch sehr gering ausfielen, wurden die Abweichungen und Ungenauigkeiten mit zunehmender Leitfähigkeit der Testlösung immer dominanter. Im Falle des geS-V1 steigt die Kapazität bei stärker leitenden Lösungen an,

während die bei einem geS-sw ermittelte Lösungskapazität mit steigender Leitfähigkeit kleiner wird. Schon bei zirka 7 mS/cm sind die Fehler größer als der absolut ermittelte Wert der Kapazität (Abbildung 4.4.8).

#### 4.4.4. Auswertung der Sensoreigenschaften

Die Auswertung der Größen  $R_I$  und  $C_I$  diente der Beschreibung der Sensoren selbst. Diese Größen des ESB (Abbildung 4.1.1) beschreiben lediglich die elektrischen, bzw. dielektrischen Eigenschaften der Isolationsschicht. Im Falle der bodenintegrierten Sensoren war dies die zirka 5  $\mu\text{m}$  dicke Polyimidfolie. Bei den seitenwandintegrierten Sensoren wurde eine zirka 2,5  $\mu\text{m}$  dünne Parylenschicht zur Isolation der Elektroden verwendet (Kapitel 3.3). Die Auswertung der Kapazität  $C_I$  (Abbildung 4.4.4) zeigte eine gute Übereinstimmung mit den zuvor analytisch abgeschätzten Werten aus Tabelle 4.1.1. Die leichten Abweichungen der Werte aus der Tabelle gegenüber den bei den Messungen ermittelten Werten ließen sich mit dem nur sehr unpräzisen Modell eines Plattenkondensators erklären, das zur Abschätzung der Kapazitäten in Tabelle 4.1.1 verwendet wurde. Aber auch prozessbedingte Schwankungen der Dicke der Polyimidfolie waren verantwortlich für die abweichenden Kapazitätswerte. Durch den nur schwer reproduzierbaren Aufschleuderprozess zur Herstellung der Polyimidfolie kam es zu Polyimiddicken zwischen 4 - 5,5  $\mu\text{m}$  von Wafer zu Wafer. Die Schwankungen der Kapazitäten auf Folien, die auf einem Wafer hergestellt wurden, waren jedoch nur sehr gering (Abbildung 4.4.4). Die Unterschiede der messbaren Kapazität  $C_I$  bei den seitenwandintegrierten Sensoren waren wesentlich höher. Obwohl auch diese Messungen an vier Elektrodenpaaren in einer MTP vorgenommen wurden, waren Schwankungen von fast  $\pm 10\%$  messbar. Der Grund dieser Wertestreuung lag im Abscheideprozess der Parylenschicht. Durch die sehr komplexe Struktur der MTP kam es innerhalb der Vakuumkammer der Parylenabscheideanlage zu Abschattungen und Inhomogenitäten bei der Dicke der abgeschiedenen Schicht.

Die Auswertung des Widerstandes  $R_I$  zeigt, dass die ohmschen Verluste innerhalb der polymeren Isolationsschichten nicht zu vernachlässigen waren (Abbildung 4.4.5). In Wertebereichen von nur 2 bis 2,5  $\text{M}\Omega$  für die Polyimidböden und sogar nur 370  $\text{k}\Omega$  für die Parylenbeschichtung waren die Widerstandswerte zu gering, um im Modell (Abbildung 4.1.1) vernachlässigt werden zu können. Die Großen Fehler beim Kurvenfit (rote Fehlerbalken in Abbildung 4.4.5) wiesen auf bestehende Ungenauigkeiten des Modells hin. Um mögliche Auswirkungen dieser Ungenauigkeiten von  $R_I$  auf die Messung der Lösungen zu bestimmen, wurde das Sensorsignal mit den in Abbildung 4.4.4 und Abbildung 4.4.5 ermittelten Werten für  $C_I$  und  $R_I$  simuliert. In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis der Simulation eines geS-sw gezeigt. Folgende Werte wurden für die Simulation verwendet:  $C_I = 101 \text{ pF}$ ,  $R_I = 370 \text{ k}\Omega$ ,  $C_{\text{Ele}} = 5 \text{ pF}$  und  $R_{\text{Ele}} = 200 \text{ }\Omega$ .

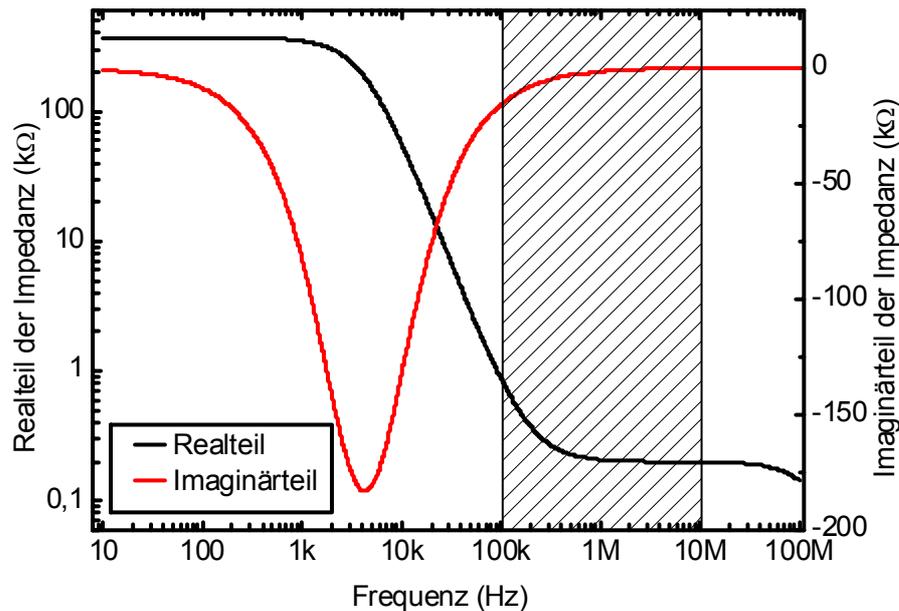


Abbildung 4.4.9. Spice-Simulation eines geS-sw über einen erweiterten Frequenzbereich mit schraffiertem in dieser Arbeit verwendetem Frequenzbereich

Das in Abbildung 4.4.9 simulierte Frequenzverhalten eines geS-sw weist das typische Relaxationsverhalten eines RC-Gliedes auf. Bei niedrigen Frequenzen ist der Widerstand  $R_I$  dominant und bestimmt die Gesamtimpedanz. Zu höheren Frequenzen hin fällt der Realteil auf den Wert des Widerstandes  $R_{Ele}$  ab. Der Imaginärteil zeigt währenddessen ein stark ausgeprägtes lokales Minimum. Am Ende dieser Relaxation ist der Widerstand  $R_I$  durch die nun dominierende Kapazität  $C_I$  quasi kurzgeschlossen. Da der Messbereich (schraffierter Bereich) am Ende dieser Relaxationsstufe lag, konnte der Wert von  $R_I$  nur sehr ungenau bestimmt werden (Abbildung 4.4.5). Es zeigte sich dennoch ein nicht zu vernachlässigender Einfluss des Widerstandes  $R_I$  bis zu Frequenzen von 1 MHz (Abbildung 4.4.9). Erst ab diesen Frequenzen kann von einer durch  $R_I$  unbeeinflussten Messung gesprochen werden. Um eine möglichst genaue von  $R_I$  unbeeinflusste Messung auch bei 100 kHz noch gewährleisten zu können, müsste die charakteristische Frequenz der Isolationsschicht  $f_C$  (siehe Formel (24)) noch deutlich niedriger liegen. Alle auf Polyimid oder Parylen basierten Isolationsschichten wiesen eine charakteristische Frequenz  $f_C$  von 4 bis 5 kHz auf. Trotz dieser niedrigen Frequenz waren noch Auswirkungen auf die Gesamtimpedanz bis hin zu 1 MHz erkennbar.

Die Auswertungen der Lösungsimpedanzen zeigten einen idealen linearen Zusammenhang des gemessenen Leitwerts mit der Lösungsleitfähigkeit (Abbildung 4.4.6). Dieses Verhältnis konnte für einen Leitfähigkeitsbereich von 3 bis 20 mS/cm nachgewiesen werden. Der dabei ermittelte Widerstandswert  $R_{Ele}$  entsprach jeweils dem gemessenen Realteil der Impedanz bei hohen Frequenzen von zirka 10 MHz. Dies war zu erwarten, da bei diesen Frequenzen der gemessene Realteil so gut wie keine Anteile des Isolationsschichtwiderstandes  $R_I$  mehr aufwies (Abbildung 4.4.9). Bei der Berechnung der Lösungskapazitäten  $C_{Ele}$  mit Hilfe des Ersatzschaltbildes kam es zu großen Streuungen der Werte. Die Herausforderung bei der Bestimmung lag darin, dass die Kapazität  $C_{Ele}$  nicht nur in Reihe mit der

Isolationsschichtkapazität  $C_I$  zu bestimmen war, sondern auch dass sie durch die hohen Leitfähigkeiten der Lösungen extrem verlustbehaftet war. Zwei Kriterien konnten daher eine kapazitive Auswertung verbessern.  $C_I$  musste im Verhältnis zu der zu messenden Kapazität  $C_{Ele}$  sehr groß sein, da bei einer Reihenschaltung zweier Kapazitäten immer die kleinere von beiden dominant ist. Des Weiteren war eine niedrigere Leitfähigkeit der Lösung von Vorteil. Beides kann in den Graphen von Abbildung 4.4.7 und Abbildung 4.4.8 gesehen werden. Während bei niedrigen Leitfähigkeiten der KCl-Lösungen von zirka 3 mS/cm noch auswertbare Kapazitäten im Bereich einiger Pikofarad ermittelt werden konnten, so wurden die Fehler mit zunehmender Leitfähigkeit größer. Bei den Sensoren mit 5  $\mu\text{m}$  dickem Polyimid als Isolationsschicht und damit Kopplungskapazitäten von nur zirka 20 pF (Abbildung 4.4.4) stiegen die ermittelten Lösungskapazitäten mit steigendem Leitwert der Lösung an (Abbildung 4.4.7). Bei Sensoren mit höherer Kopplungskapazität wie den seitenwandintegrierten Sensoren zeigte sich eine besser messbare Kapazität  $C_{Ele}$  (Abbildung 4.4.8). Doch auch diese wurde bei hohen Leitfähigkeiten durch steigende Ungenauigkeiten unauswertbar.

#### 4.4.5. Messung der zeitlichen Einlaufphase

Die Messungen an trockenen Sensoren zeigten eine starke Veränderung der Messwerte in den ersten Minuten der Messung. Sowohl Real- als auch Imaginärteil der Messung veränderten sich noch bis zu einer Stunde nach Befüllen der Wannen. Exemplarisch wurde dieses Verhalten an einem geS-V3 untersucht.

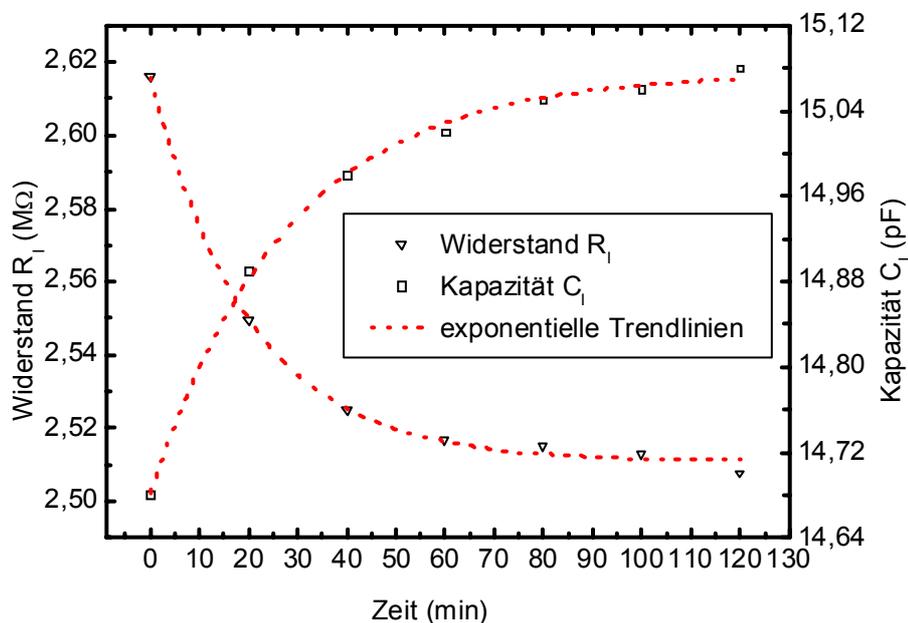


Abbildung 4.4.10. Ermittelte Werte von  $C_I$  und  $R_I$  bis zu zwei Stunden nach Befüllung einer trockenen Wanne eines geS-V3 mit einer KCl-Testlösung (3 mS/cm)

Um die Veränderung der Sensoren in dieser Phase besser beschreiben zu können, wurden für eine der Wannen die Werte  $C_I$  und  $R_I$ , die die Eigenschaften der Polyimidfolie beschreiben, mit Hilfe des ESB aus Abbildung 4.1.1 ermittelt. Die Messung aus Abbildung 4.4.10

zeigt die exponentiellen Verläufe der Größen  $C_I$  und  $R_I$ . Beide Werte ändern sich nach Befüllung der Wanne nachhaltig.

### 4.4.6. Auswertung der zeitlichen Einlaufphase

Eine weitere Eigenschaft der ge-Sensoren war eine Drift der Messwerte am Anfang einer Messung. Wurden die trockenen Wannen der MTP befüllt und damit die trockenen Sensoren befeuchtet, so diffundierten Bestandteile der wässrigen Lösung in die Polymere ein (Polyimid und Parylen). Diese veränderten dadurch ihre dielektrischen Eigenschaften (Abbildung 4.4.10). Wie alle Polymere nehmen auch Parylen und Polyimid Flüssigkeiten bzw. Wasser auf. Auch wenn die Aufnahme verglichen mit anderen Polymerarten gering ist, kam es durch die Aufnahme der stark polaren Wassermoleküle zu einem Anstieg der Kapazität  $C_I$ . Die ionischen Anteile in der Lösung ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ) führten zu einer Reduzierung des Isolationswiderstandes  $R_I$  (Abbildung 4.4.10). Erst nach frühestens 60 min konnte von einer Sättigung und damit einem stationären Zustand gesprochen werden. Eine exakte Auswertung der Lösungsimpedanz ( $C_{Ele}$ ,  $R_{Ele}$ ) war aber nur bei konstanten dielektrischen Eigenschaften der Isolationsschicht ( $C_I$ ,  $R_I$ ) möglich. Um also mit den Sensoren arbeiten zu können, musste eine Einwirkzeit der Testlösung von mindestens 60 min abgewartet werden. Wurde nur die Flüssigkeit gewechselt, ohne die polymeren Isolationsschichten auszutrocknen, so entfiel die Wartezeit, da die Isolationsschichten bereits gesättigt waren.

### 4.4.7. Fermentationsmessungen

In den folgenden Graphen sind die Messergebnisse der geS während der Fermentationsversuche dargestellt. Es werden Ergebnisse verschiedener E.Coli Fermentationen vorgestellt. Aufgrund des in Kapitel 4.4.5 und 4.4.6 beschriebenen Einlaufverhaltens der Sensoren wurden die Messungen der ersten 60 Minuten nicht für die Beobachtung der Fermentationen verwendet. Die Messungen nach 1 Stunde wurden als Startwerte genommen und die Veränderung als Messgröße während der Fermentation verwendet.

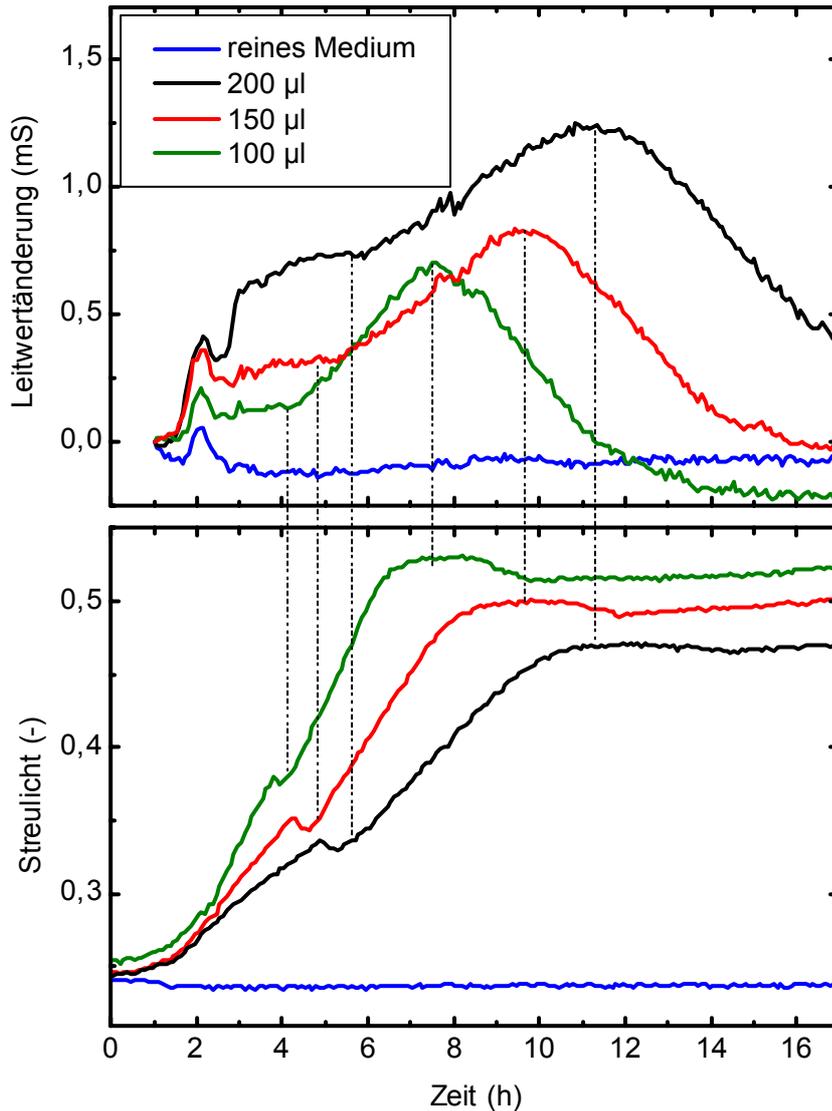


Abbildung 4.4.11. Mit einem geS-VI gemessene Leitwertänderung einer E.Coli-Fermentation in TB-Medium im Vergleich mit dem parallel gemessenen Streulichtsignal

Die Graphen aus Abbildung 4.4.11 zeigen die gemessene Änderung des Leitwertes über die Fermentationszeit. Verglichen wurde diese Änderung mit dem parallel gemessenen Streulichtsignal. In beiden Messungen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Geschwindigkeit der jeweiligen Fermentationsprozesse. Je geringer das Füllvolumen der Wanne war, desto schneller verlief die Fermentation. Das Streulichtsignal zeigte eine typische Wachstumskurve mit einem charakteristischen Knick zwischen 3 bis 6 Stunden und einem erreichten Sättigungswert am Ende der Fermentation. Der gemessene Leitwert begann zum Zeitpunkt des im Streulicht sichtbaren Knickes stark zu steigen. Sobald das Streulicht einen konstanten Wert erreichte, fiel das Signal des Leitwertes wieder. Während das Streulichtsignal auf einem konstanten Wert verblieb, sank der Leitwert noch über Stunden (Abbildung 4.4.11). Die unterschiedlichen Wachstumsphasen während der Fermentation zeigten in beiden Signalen sowohl dem Streulicht als auch dem Leitwertsignal charakteristische Übergänge (siehe gestrichelte Linien).

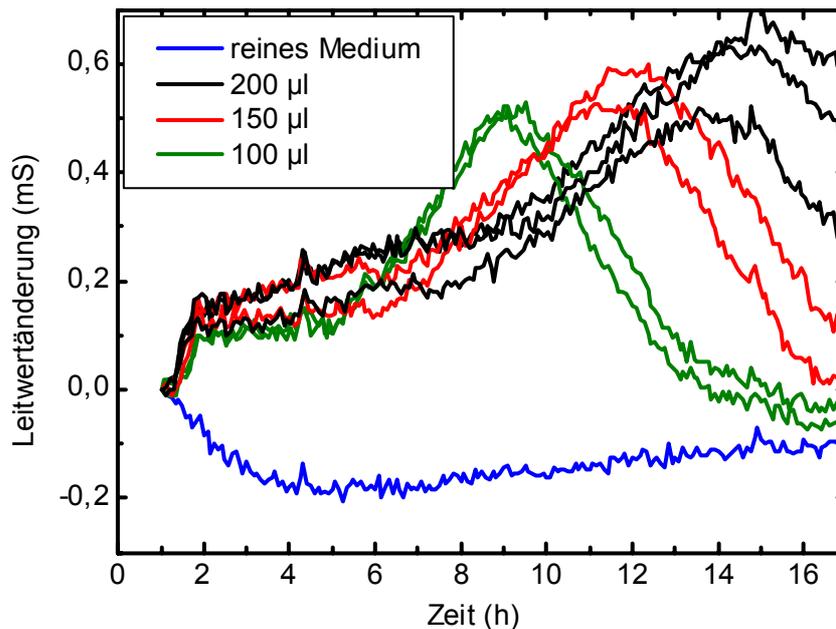


Abbildung 4.4.12. Mit einem geS-V3 gemessene Leitwertänderung einer *E.Coli*-Fermentation in TB-Medium im Vergleich mit dem parallel gemessenen Streulichtsignal

Abbildung 4.4.12 zeigt die Messungen einer identisch angesetzten Fermentation wie in Abbildung 4.4.11 dargestellt in 8 Wannen parallel. Auch hier zeigten sich wieder die charakteristischen Eckpunkte der Kurven. Durch die geringeren Störungen in den Signalen während der ersten Stunden der Fermentation fielen die Unterschiede in den Absolutwerten bei dieser Messung nicht so drastisch aus, wie dies bei der Fermentation aus Abbildung 4.4.11 der Fall war. Auch hier war allerdings zu erkennen, dass die absolute Änderung des Mediums mit der Füllmenge tendenziell stieg.

#### 4.4.8. Auswertung der Fermentationsmessungen

Die in den Graphen aus Abbildung 4.4.11 und Abbildung 4.4.12 dargestellten Messsignale zeigten eine deutlich messbare Veränderung der Zelllösung. Eine kapazitive Auswertung bei einzelnen Frequenzen oder gar des gesamten Frequenzbereiches war aus zuvor beschriebenen Gründen nicht reproduzierbar. Der in den Fermentationen gemessene Leitwert war in erster Linie eine Eigenschaft der Zelllösung selber und daher kein direkter Indikator für die Zell- oder Biomasse. Dennoch zeigten sich sehr charakteristische Verläufe, die in weiteren Messungen bestätigt werden konnten. Um die Messungen besser miteinander vergleichen zu können, wurde das Referenzsignal der Wanne mit reinem Medium von den Messsignalen abgezogen. Diese durch das Referenzsignal bereinigten Messungen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

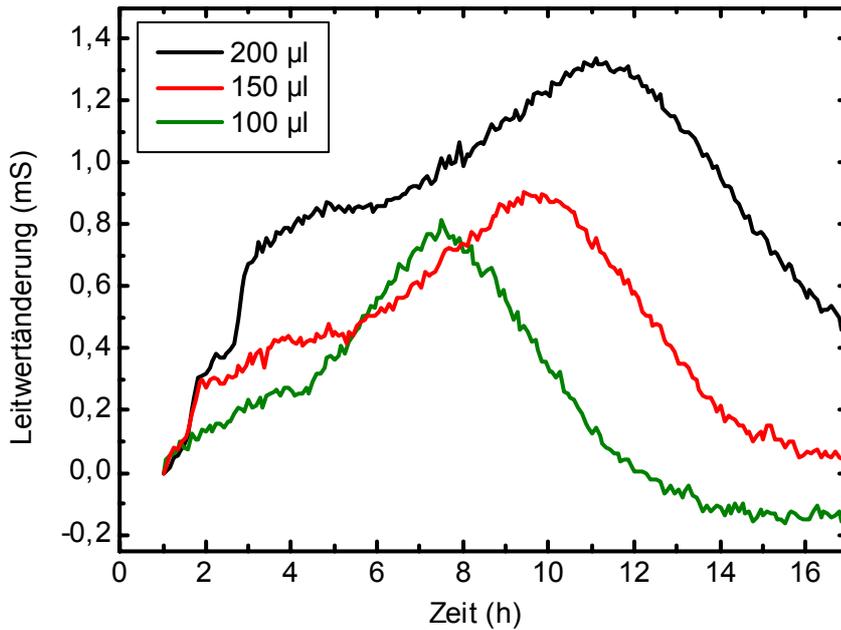


Abbildung 4.4.13. Messsignale des geS-VI bei der Fermentation aus Abbildung 4.4.11 abzüglich der Messwerte an reinem Medium

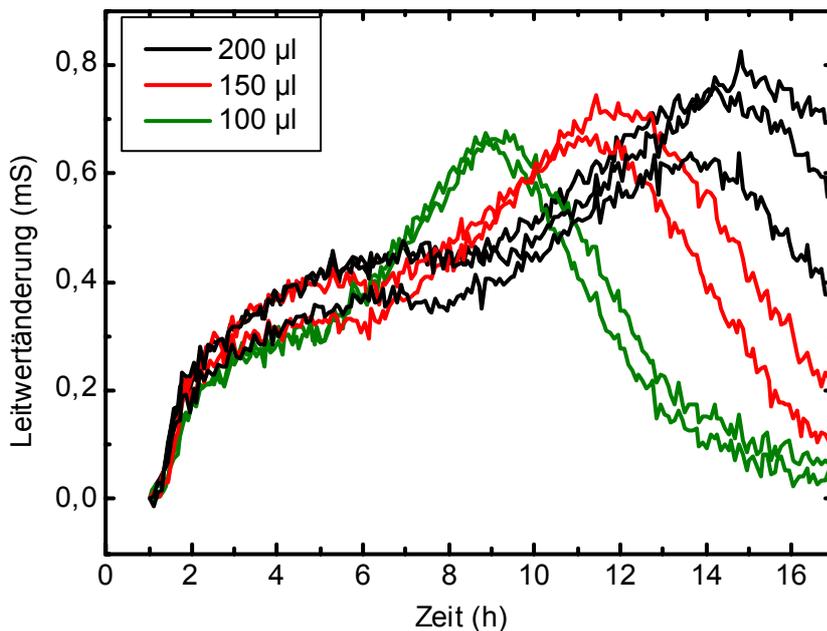


Abbildung 4.4.14. Messsignale des geS-V3 bei der Fermentation aus Abbildung 4.4.12 abzüglich der Messwerte an reinem Medium

In der ersten Wachstumsphase der Bakterien bis zu dem in den Streulichtmessungen sichtbaren Knick, verstoffwechselten die E.Coli Kulturen das Glycerin des komplexen Mediums (siehe Anhang). In dieser ersten Phase der Fermentation war eine leichte degressive Änderung des Leitwertes messbar. Oft wurde diese Änderung auch noch von Drifts des Sensors überdeckt. Diese Drift konnte unterschiedlich stark ausfallen und führte in Folge zu verschiedenen

messbaren Absolutwerten (Abbildung 4.4.13). Die zweite Wachstumsphase jedoch schlug sich deutlich in einer Änderung des Leitwertes nieder. In dieser Phase der Fermentation änderten die Bakterien ihren Stoffwechsel und begannen die komplexen Medienbestandteile zu metabolisieren. Die Veränderung des Mediums wurde als deutlicher Anstieg des Leitwertes erkennbar. Dieser starke Anstieg hielt an, bis die Bakterien ihr Wachstum einstellten und die stationäre Phase erreichten. Ab diesem Zeitpunkt blieb die Biomasse konstant. Dies konnte gut an dem Signal des Streulichts abgelesen werden. Das während dieser dritten Phase stattfindende Sinken des Leitwertes deutete auf eine weitere Umstellung des Stoffwechsels hin. Das Signal zeigte, dass die Bakterien, obwohl sie das Wachstum einstellten, keineswegs inaktiv waren. Der Stoffwechsel in der stationären Wachstumsphase änderte die Leitfähigkeit des Mediums sogar nachhaltiger als in den beiden Phasen zuvor. Diese Aktivität konnte mit dem Streulichtsignal nicht erfasst werden (siehe Abbildung 4.4.11 bis Abbildung 4.4.14).

## 4.5. Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten galvanisch entkoppelten Sensoren konnten nachweislich durch die eingeführte Theorie (Kapitel 2.3) und die gezeigten Modelle (Kapitel 4.1) beschrieben werden. Mit Hilfe der Modelle konnten über einen weiten Frequenzbereich von 100 kHz bis 10 MHz das Sensorverhalten und die Messwerte exakt vorhergesagt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es mittels einfachster Sensoraufbauten, bestehend aus einer Polyimid-schicht und einer Goldschicht, möglich ist, die Veränderung des Medienleitwertes während einer Fermentation in einer Mikrotiterplatte zu verfolgen (Abbildung 4.4.11 bis Abbildung 4.4.14). Eine Bestimmung der Leitfähigkeit der Lösung bei Frequenzen von unter 10 MHz war jedoch stark durch die Isolationsschichtänderungen gestört. Die Größenordnung dieser Änderung und die damit verbundene Änderung des Messwertes erschwerte eine zuverlässige und reproduzierbare Auswertung über einen größeren Frequenzbereich. Die Messung der Leitfähigkeit des Mediums bei 10 MHz konnte dennoch zusätzliche Informationen über den Metabolismus der Zellkulturen liefern, die bei Streulichtmessungen nicht erkennbar waren. Auch wenn eine genaue Interpretation dieser Leitwärtsänderungen in komplexen Medien sehr schwierig war, lieferten die Messungen zusätzliche und neue Informationen über den Fermentationsverlauf. Um genau zu verstehen, um welche metabolischen Prozesse es sich handelt, sind weiterführende Messungen notwendig. Dennoch zeigten die Versuche, dass eine Beobachtung der Leitfähigkeit eine genaue Bestimmung der Fermentationszeit ermöglicht. Würde eine Fermentation zu früh abgebrochen werden, könnte die Produktion des gewünschten Zielmoleküls noch nicht ihr Maximum erreicht haben. Die starke Veränderung des Leitwertes in der späten Phase der Fermentation zeigt jedoch, wie schnell sich der Metabolismus umstellen kann. Dies kann bei manchen Prozessen dazu führen, dass das gewünschte Produkt wieder abgebaut wird. Bei der Suche dieses unter Umständen schmalen Prozessfensters zwischen noch nicht abgeschlossener Produktion und wieder Reduzierung der Zielmoleküle kann die Messung des Leitwertes einen einfachen und präzisen Indikator für den Fermentationsverlauf darstellen.

## 5. Vierpunktsensoren

### 5.1. FEM-Simulationen der Bodenelektroden

Um ein tieferes Verständnis der verschiedenen Sensordesigns, die für die Vierpunktsensoren entwickelt wurden, zu gewährleisten, wurden Finite-Elemente-Methode-Simulationen (FEM) mit dem Programm Multiphysics der Firma Comsol durchgeführt. Mit Hilfe der FEM-Modelle konnten erste Abschätzungen bezüglich der Zellkonstanten vorgenommen werden. Des Weiteren wurden die einzelnen Designs bezüglich ihres Verhaltens bei starkem Schütteln untersucht. Die komplexen Geometrieabhängigkeiten ließen keine sinnvolle analytische Auswertung zu.

#### 5.1.1. Funktionsweise der Finite-Elemente-Methode

Die prinzipielle Vorgehensweise von FEM-Programmen lässt sich in drei Teilschritte gliedern; den sogenannten Preprozessor, den Solutionprozessor und den Postprozessor.

Im ersten Schritt, dem Preprozessor, wird das Modell bezüglich geometrischer Abmessungen und Materialparametern bestimmt und erstellt. Die Randbedingungen des Modells werden ebenfalls festgelegt. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Preprozessors ist das Vermaschen des Modells. Durch die Vermaschung werden Raumpunkte des Modells und deren Verknüpfung beschrieben, die mit Hilfe entsprechender Differenzialgleichungen gelöst werden. Das Vermaschen ist einer der kritischsten Simulationsschritte. Wird eine zu grobe Vermaschung gewählt, steigen die damit verbundenen Berechnungsfehler und die Ungenauigkeit der Simulation. Bei einer zu feinen Vermaschung hingegen kommt es schnell zu nicht mehr tolerierbaren Rechenzeiten. Dies ist mitunter eine Schwierigkeit bei der Simulation mikrotechnologischer Strukturen. Die oft enormen Aspektverhältnisse führen dabei meist zwangsläufig zu einem hohen Vermaschungsgrad mit vielen Elementen.

Der Solutionprozessor im zweiten Schritt der Simulation stellt das durch den Preprozessor vorgegebene Gleichungssystem auf. Jedes durch das Vermaschen erzeugte Element wird mathematisch bezüglich seiner Knoten beschrieben. Das Gleichungssystem wird, wenn möglich, vereinfacht und dem Gleichungslöser (Solver) übergeben.

Im dritten und letzten Schritt werden die Simulationsergebnisse aufbereitet und dargestellt. Die Darstellung übernimmt der Postprozessor.

#### 5.1.2. Simulation der Zellkonstanten

Die Zellkonstante beschreibt den geometrischen Zusammenhang zwischen der reinen Messgröße und den lösungsspezifischen Werten. An einem einfachen Widerstand kann dies beispielhaft erklärt werden: Die von außen zunächst messbare Größe ist der Widerstandswert in der Einheit  $\Omega$ . Das Material weist einen spezifischen Widerstandswert in der Einheit  $\Omega\text{cm}$  auf. Beide Größen sind über einen Geometriefaktor miteinander verknüpft. Je nach Definition kann dieser die Einheit  $\text{cm}$  oder  $\text{cm}^{-1}$  aufweisen. Bei Elektrochemischen Zellen wird dieser Faktor Zellkonstante genannt. Diese Zellkonstante bei einer Vierelektrodenanordnung analy-

tisch zu bestimmen, ist äußerst anspruchsvoll und verlangt komplexe und umständliche Modelle. In diesem Falle bieten sich numerische Simulationsverfahren wie die zuvor beschriebene Finite-Elemente-Methode (FEM) an. Im ersten Schritt der Simulation wird das zu lösende Problem bzw. Modell mit Hilfe von Symmetrien oder Annahmen vereinfacht. Da bis auf zwei Elektrodengeometrien keine Rotationssymmetrie vorliegt, konnte bei drei der hergestellten Elektroden designs nur eine einfache Spiegelachse als Symmetrieebene verwendet werden (siehe Abbildung 5.1.1).

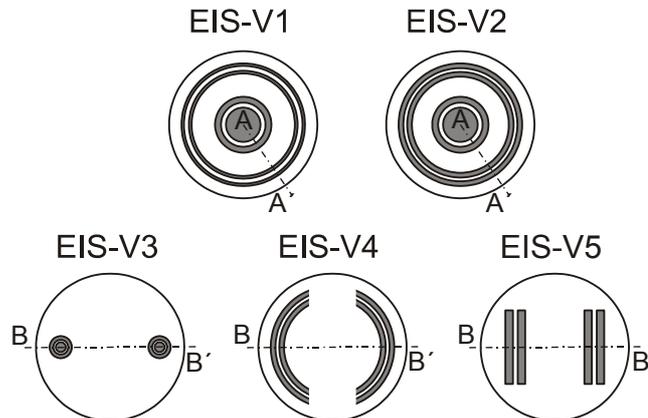


Abbildung 5.1.1. Darstellung der fünf hergestellten Elektroden designs mit den vorhandenen Symmetrieachsen. A-A' zeigt die Rotationssymmetrie, B-B' beschreibt eine einfache Spiegelsymmetrie.

Aufgrund der Spiegelsymmetrie konnten die Modelle zur Simulation der Designs EIS-V3, EIS-V4 und EIS-V5 nur in ihrem Volumen verringert werden. Eine Vereinfachung des Modells in eine zweidimensionale Darstellung war nicht möglich. Die Rotationssymmetrie der Designs EIS-V1 und EIS-V2 würden ein zweidimensionales Modell entlang des Schnittes A-A' erlauben. Um die Vergleichbarkeit der Modelle untereinander jedoch so wenig wie möglich zu beeinflussen, wurde für jedes Design ein dreidimensionales Halbraummodell erstellt.

Bei der Simulation der Elektroden in der MTP sollte das Verhalten des elektrischen Feldes und der Stromdichte innerhalb der flüssigen Testlösung simuliert werden. Für die Bestimmung der Zellkonstanten wurden die durch den galvanischen Kontakt entstehenden Nichtlinearitäten vernachlässigt. Aufgrund der hohen Frequenzen, bei denen die Messungen durchgeführt wurden (100 kHz bis 10 MHz), hatten die durch Diffusion bestimmten Nichtlinearitäten des Elektroden-Elektrolyt-Überganges einen nur noch sehr geringen Einfluss auf das Elektroden signal. Das Problem reduzierte sich daher auf den Feldlinienverlauf innerhalb der flüssigen Testlösung. Da die Höhe der Elektroden von weniger als 3  $\mu\text{m}$  (siehe Kapitel 3.2), bezogen auf die Füllhöhe der MTP von zirka 5 bis 6 mm, vernachlässigbar klein ist, wurde diese ebenfalls vernachlässigt. Die Elektroden ließen sich daher als einfache Randflächen darstellen, die mit speziellen Randbedingungen (hohe Leitfähigkeit, elektrisches Potenzial etc.) definiert wurden. Gleiches galt für die nichtleitenden Polystyrolwände der MTP und den Rest der Polyimidfolie zwischen den Elektroden. Diese Randbereiche wurden in den Randbedingungen als Isolatoren definiert. Die Symmetrieebene wurde ebenfalls als Isolator definiert, um den Feldlinienverlauf nicht zu beeinflussen. Das Modell beschrieb daher

nur die flüssige Testlösung, während die MTP und die Elektroden nur geometrische und materialbedingte Randbedingungen erzeugen.

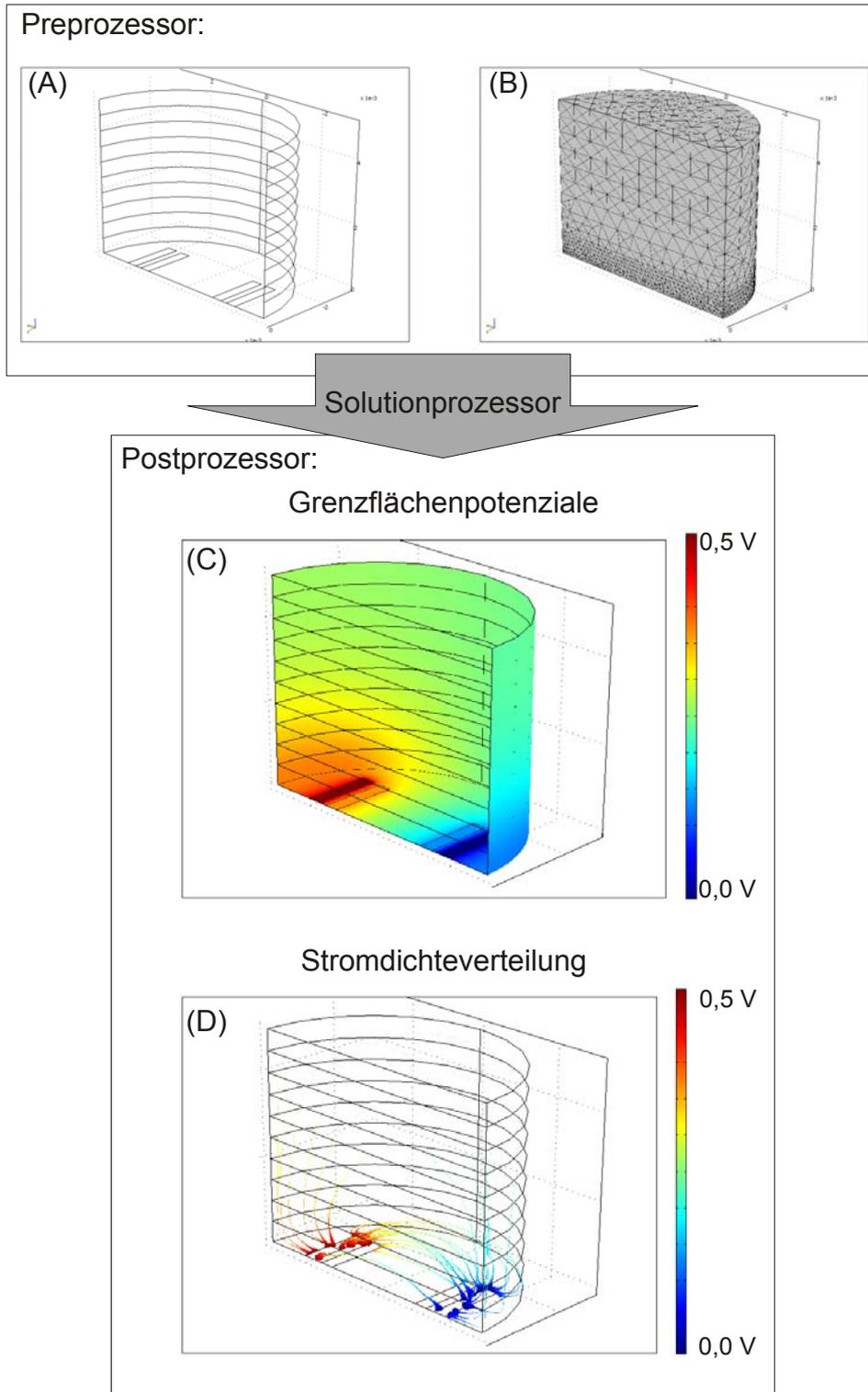


Abbildung 5.1.2. Aufbau und Ablauf der Sensorsimulation anhand des Beispiels von Elektrodendesign EIS-V5

Wie in Abbildung 5.1.2 zu erkennen ist, wurde das Modell aus verschiedenen Schichten aufgebaut. Insgesamt 10 Halbkreise mit Dicken von jeweils 0,5 mm repräsentieren die flüssi-

ge Testlösung. Die Elektroden wurden als Flächenelemente in den Boden des untersten Halbkreises eingebunden (Abbildung 5.1.2.A). Der schichtweise Aufbau des Modells ermöglichte eine spezifische Vermaschung für die Simulation. Da der größte Teil des elektrischen Feldes und damit auch der Stromdichte in der Nähe der Elektroden zu erwarten ist, konnte für die elektrodenferneren Elemente eine gröbere Vermaschung gewählt werden als in Elektrodennähe (Abbildung 5.1.2.B). Dies ermöglichte bei gleicher Elementzahl eine höhere Auflösung im empfindlichen elektrodennahen Bereich und damit eine verbesserte Genauigkeit des Ergebnisses. Als weitere Randbedingungen wurden neben den Materialparametern der Randflächen noch die Potenziale an den äußeren Elektroden und die elektrischen Parameter der Flüssigkeit festgelegt. Für die durchgeführten Simulationen wurde das Potenzial einer der äußeren Elektroden auf 0 V definiert, während die andere mit einer Wechselspannung von 0,5 V Amplitude und einer Frequenz von 1 MHz beaufschlagt wurde. Die mittleren Elektroden wurden als leitende Fläche mit unbestimmtem Potenzial definiert (floating potential). Die spezifische Leitfähigkeit der Flüssigkeit wurde mit  $\sigma = 6 \text{ mS/cm}$  und die relative Permittivität mit  $\epsilon_r = 80$  festgelegt.

Nachdem ein entsprechend ausgewählter Lösungsalgorithmus (Solutionprozessor) die Ergebnisse berechnet hat, konnten diese im Postprozessor in Form der Grenzflächenpotenziale (Abbildung 5.1.2.C) und der Stromdichteverteilung (Abbildung 5.1.2.D) dargestellt werden. Die farbcodierten Grenzflächenpotenziale zeigen anschaulich die Spannungsverteilung am Boden, den Elektroden und den Wänden der MTP. Die durch sogenannte Streamlines dargestellte Stromdichte zeigt deutlich den durch die mittleren Elektroden beeinflussten Stromverlauf in der Flüssigkeit (Abbildung 5.1.2.D). Die ansonsten elliptisch verlaufenden Stromdichtelinien werden in Bodennähe durch die leitenden Elektroden abgelenkt. Deutlich ist auch die starke Abnahme der Stromdichte, je weiter sie von den Elektroden und dem Boden entfernt sind. Dargestellt wird dies durch die Dicke der gezeigten Streamlines.

Um aus den gewonnenen Simulationsdaten die für die Elektrodenanordnung spezifische Zellkonstante  $k$  zu bestimmen, musste zunächst die resultierende Impedanz oder Admittanz des Modells berechnet werden. Mit Hilfe des Flächenintegrals über die Stromdichte  $J$  bei einer der äußeren Elektroden kann direkt der Strom durch die stromführende Elektrode berechnet werden. Dieser Strom wird durch die simulierte Spannungsdifferenz ( $V_{E2}-V_{E3}$ ) der beiden mittleren Elektroden dividiert und mit der vorgegebenen spezifischen Leitfähigkeit  $\sigma$  der Lösung verrechnet (siehe Formel (32)). Da nur Halbraummodelle in den Simulationen verwendet wurden, musste das Ergebnis noch verdoppelt werden, um die tatsächliche Zellkonstante zu erhalten.

$$k = \frac{\iint J \partial F_{E1}}{V_{E2} - V_{E3}} \cdot \frac{1}{\sigma} \cdot 2 \quad (32)$$

Auf diese Weise wurde für alle in Abbildung 5.1.1 dargestellten Elektrodendesigns die Zellkonstante  $k$  simuliert. Die Ergebnisse der Simulationen sind in Tabelle 5.1.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1.1. Auflistung der simulierten Zellkonstanten der einzelnen Elektrodendesigns

Elektrodendesign	Zellkonstante k (cm)
EIS-V1 	0,7233
EIS-V2 	0,4914
EIS-V3 	0,1592
EIS-V4 	0,3444
EIS-V5 	0,2336

Der Vergleich der simulierten Zellkonstanten zeigt vergleichsweise hohe Werte für die rotationssymmetrischen Designs EIS-V1 und EIS-V2. Den mit Abstand niedrigsten Zellfaktor weist das Design EIS-V3 auf.

### 5.1.3. Simuliertes Schüttelverhalten

Wie in den Kapiteln zuvor bereits erwähnt ist das Schütteln der MTP während der Kultivierung aerober Mikroorganismen oder Zellkulturen von entscheidender Bedeutung (Hermann 2003; Zimmermann 2006). Um eine elektrische Impedanzmessung bei diesen extremen Schüttelbedingungen von zirka 1000 U/min während der Fermentation gewährleisten zu können, muss die Funktionalität der Sensoren in Abhängigkeit der Schüttelfrequenzen untersucht werden. Für die Simulationen werden die bereits vorgestellten Modelle verwendet (siehe Kapitel 5.1.2). Um die Simulation zu vereinfachen, wird der Einfluss des Schüttelns auf die Lösung oder Flüssigkeit in der MTP genauer betrachtet und vereinfacht in das Modell übernommen. Durch das starke Schütteln der Platte bildet sich eine sichelförmige Oberfläche der Flüssigkeit aus. Diese Sichelform rotiert in der Wanne der MTP mit der eingestellten Schüttelfrequenz  $n_0$ . Abbildung 5.1.3 zeigt das Flüssigkeitsverhalten in der MTP bei steigender Schüttelfrequenz  $n_0$  im Querschnitt. Sobald eine kritische Frequenz erreicht ist und die Oberflächenspannung der Flüssigkeit durch die Schüttelenergie überwunden wird, beginnt sich die Oberfläche zu verformen und bildet die typische Sichelform aus. Dabei steigt die Schwapphöhe  $h_L$  und damit auch die Größe der Flüssigkeitsoberfläche, die für den Sauerstofftransfer notwendig ist. Das auf diese Weise vergrößerte Oberflächen-Volumenverhältnis verbessert die Sauerstofftransferate (OTR) und ermöglicht das gewünschte nichtlimitierte Wachstum der Mikroorganismen. Auf der anderen Seite sinkt mit zunehmender Schüttelfrequenz die effektive Füllhöhe  $h_E$  in der MTP. Diese kann soweit absinken, dass der von den

Sensoren genutzte Flüssigkeitsbereich am Boden der MTP beeinflusst wird (Abbildung 5.1.3).

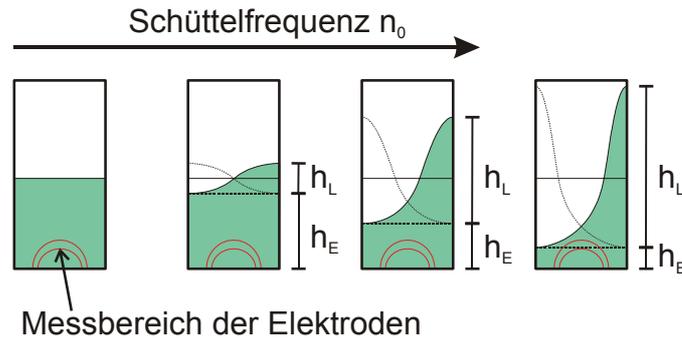


Abbildung 5.1.3. Ausbildung der Flüssigkeitssichel bei starkem Schütteln der MTP

In den Simulationen kann der Effekt des Schüttelns daher mit einer einfachen Reduktion der Füllhöhe berücksichtigt werden. In den jeweiligen Modellen der Simulationen wurden hierzu die Materialparameter der einzelnen Schichten angepasst. Die Modelle bestehen jeweils aus 10 Schichten, die alle eine eigene Subdomäne im Programm darstellen (Abbildung 5.1.2 A). Diese Subdomänen können unabhängig voneinander mit Materialparametern versehen werden. Während zur Simulation der Zellfaktoren alle Schichten die Parameter der flüssigen Lösung hatten ( $\sigma = 6 \text{ mS/cm}$ ,  $\varepsilon = 80$ ), wurden die Materialparameter der Schichten zur Simulation des Schüttelns von oben nach unten verändert. Um einen niedrigeren Füllstand zu simulieren wurden die Parameter der oberen Schichten denen von Luft angepasst ( $\sigma = 0 \text{ mS/cm}$ ,  $\varepsilon = 1$ ).

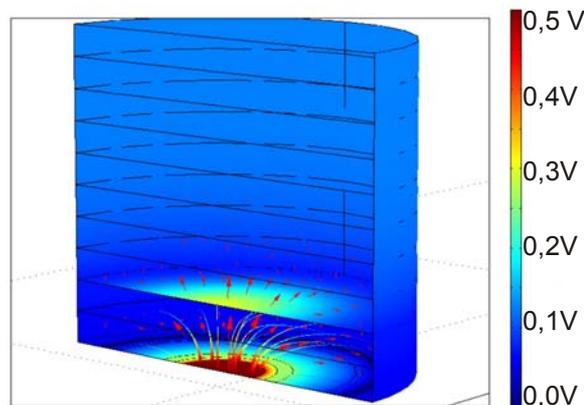


Abbildung 5.1.4. Simuliertes Schüttelverhalten durch Reduktion der effektiven Füllhöhe bei Design EIS-VI Elektroden. Farbige Flächen zeigen die Potenzialverteilung, die Pfeile stellen den elektrischen Feldverlauf dar, und die Streamlines repräsentieren die Stromdichteverteilung.

In der in Abbildung 5.1.4 gezeigten Simulation wurden die acht oberen Schichten mit Materialeigenschaften von Luft und die beiden unteren Schichten mit den bereits oben erwähnten Eigenschaften definiert. Die roten Pfeile zeigen den Feldlinienverlauf des elektrischen Feldes. Das elektrische Feld ist nahezu unbeeinflusst von dem Materialsprung an der Grenzfläche. Die Streamlines hingegen, die sowohl durch ihre Dicke als auch durch die Farbe die Stärke der Stromdichte angeben, sind deutlich in dem unteren Bereich des Modells gestaut. Die

Stromdichtepfade sind durch die Grenzschicht beschränkt und können die Flüssigkeit nicht verlassen.

Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Designs EIS-V1 und V2 und den Designs EIS-V4 und V5 wurde auf eine Simulation aller einzelnen Elektrodendesigns verzichtet. Als repräsentative Designs unterschiedlicher Arten wurden EIS-V1, V3 und V5 simuliert und ausgewertet. Die prozentuale Veränderung der auf die oben beschriebene Weise simulierten Admittanzwerte wurde ermittelt und bezüglich der effektiven Füllhöhe aufgetragen.

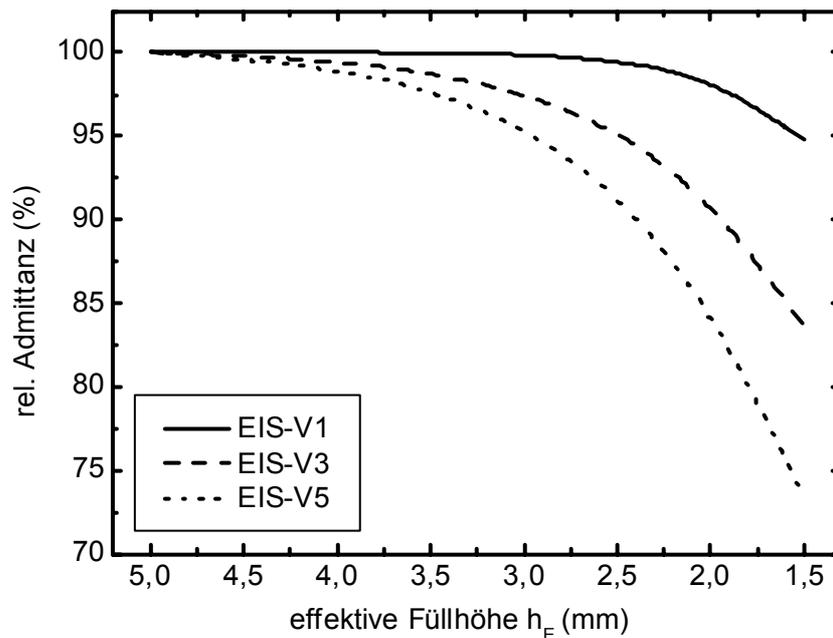


Abbildung 5.1.5. Simulation der Veränderung der Admittanz bei stetiger Reduktion der effektiven Füllhöhe  $h_E$  der MTP

Abbildung 5.1.5 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Simulationen. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den unterschiedlichen Elektrodendesigns zu erkennen. Die herkömmliche Anordnung der Elektroden in Design EIS-V5 reagiert schon bei geringen Veränderungen der effektiven Höhe mit einem Abfall im simulierten Admittanzsignal. Design EIS-V3 zeigt noch bei niedrigeren Füllhöhen ein nahezu unverändertes Signal. Am wenigsten Beeinflussung durch die reduzierte Füllhöhe erfährt das Design EIS-V1. Sogar eine Halbierung der effektiven Füllhöhe  $h_E$  auf 2,5 mm hat nahezu keinen Effekt auf die simulierte Admittanz.

Dass das Design mit dem geringsten maximalen Elektrodenabstand die besten Eigenschaften zeigen würde, war zu erwarten. Aufgrund des vergleichsweise kleinen Elektrodenabstandes des EIS-V1 Designs, zeigt es bei der Simulation die geringste Beeinflussung durch die Reduzierung der effektiven Füllhöhe. Trotz des großen Elektrodenabstandes des EIS-V3 Designs zeigte dieses ein deutlich besseres Verhalten als das EIS-V5 Design. Eine Interpretation dieses Verhaltens soll erst nach der Verifikation durch entsprechende Testmessungen vorgenommen werden (siehe Kapitel 5.4.4 und 5.4.5).

## 5.2. Versuchsaufbauten

Die Versuchsaufbauten zur Messung mit den Vierpunktsensoren unterschieden sich zu den Aufbauten aus Kapitel 1.1 vor allem in den elektronischen Komponenten. Im Gegensatz zu den galvanisch entkoppelten Sensoren (geS) mussten bei diesen Messungen vier Elektroden angesteuert werden. Für den Aufbau des Multiplexers bedeutete dies eine Verdopplung der zu schaltenden Kanäle und damit eine deutliche Erhöhung der Komplexität der Schaltung.

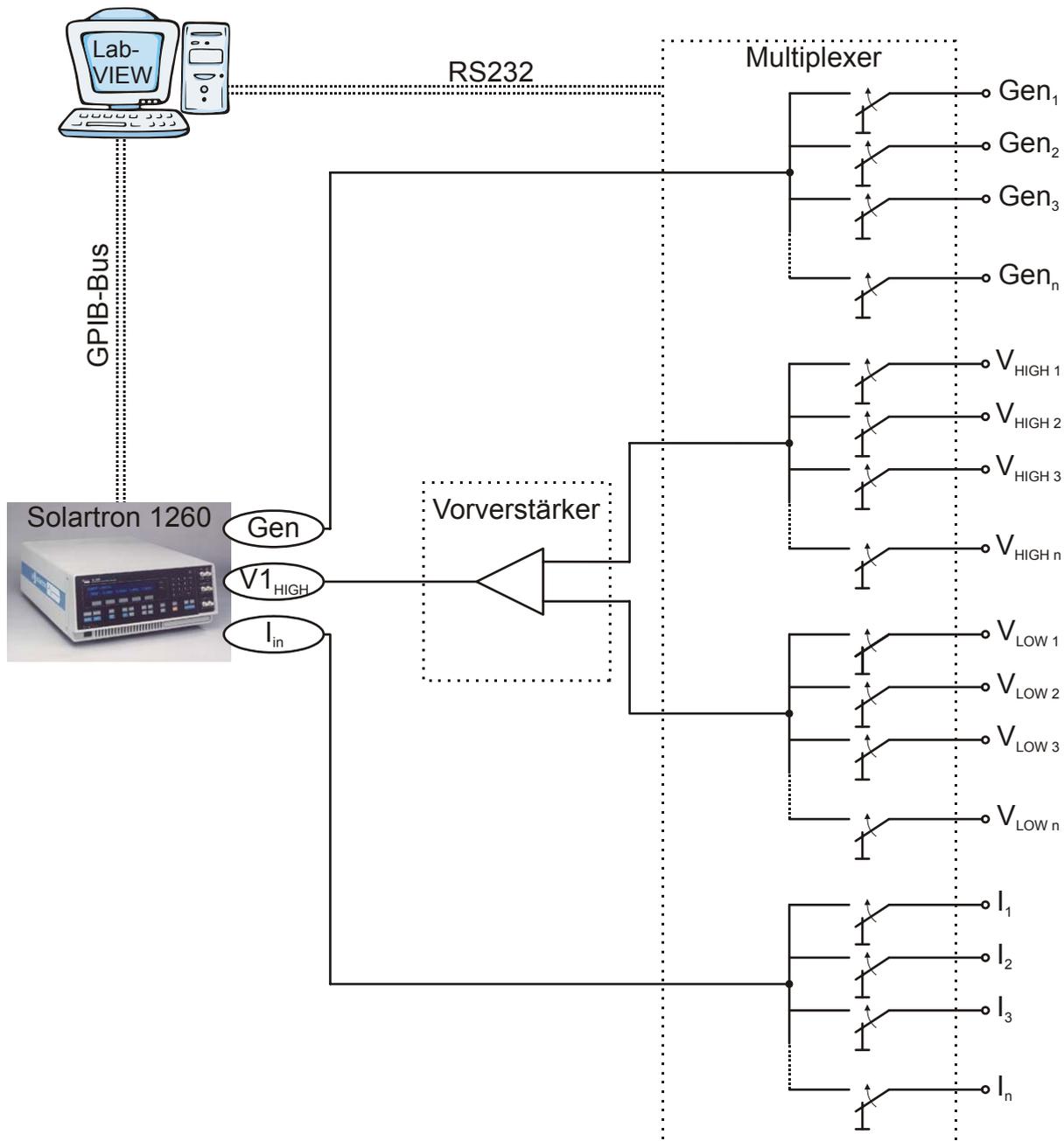


Abbildung 5.2.1. Prinzipskizze des Versuchsaufbaus für die Sensoren zur Vierpunktmessung

Entscheidender war jedoch der Einsatz einer Vorverstärkerschaltung zur Spannungsmessung. Um die Messfehler zu minimieren, war es notwendig die Spannungsmessung an den entsprechenden Elektroden durch einen Vorverstärker zu realisieren. Die ausführliche Theorie dazu ist in Kapitel 1.1 beschrieben. Die Grafik in Abbildung 5.2.1 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Versuchsanordnung. Der gesamte Aufbau wurde durch einen Computer gesteuert. Die Programme zur Steuerung und Kommunikation der Geräte wurden in LabVIEW 8.2 geschrieben. Als Messgerät diente wie bei den Messungen an den geS der Impedance- oder Gain-Phase-Analyser 1260 der Firma Solartron. Über die serielle Schnittstelle RS232 konnte der Multiplexer auf die für die Messung notwendigen Kanäle geschaltet werden. Die Kommunikation mit dem Impedanzmessgerät Solartron 1260 wurde über einen GPIB-IEEE488 Bus realisiert. Über diesen konnten alle Einstellungen am Gerät vorgenommen und die Messungen getriggert und ausgelesen werden. Der Generatorausgang (Gen) des Solartron 1260 liefert das Anregungssignal für die Messung. Dieser wurde über den Multiplexer direkt an die entsprechende Elektrode weitergegeben. Die Elektrode für den Messstrom wurde ebenfalls direkt über den Multiplexer und ein zirka 50 cm langes Koaxialkabel an das Impedanzmessgerät angeschlossen. Um den Einfluss parasitärer Kapazitäten bei der Spannungsmessung zu reduzieren, wurde eine Vorverstärkerschaltung direkt hinter dem Multiplexer angeschlossen. Dieser wandelte die Differenzspannung zwischen den Kanälen  $V_{\text{HIGH}}$  und  $V_{\text{LOW}}$  in ein einfaches Spannungssignal um, das dann über ein Koaxialkabel an das Impedanzmessgerät übergeben werden konnte. Auf eine Vorverstärkung des Stromsignals (I) wurde in diesem Versuchsaufbau verzichtet. Da der Strom-Spannungs-Wandler des Solartron 1260 das Messsignal auf ein „virtuelles Massepotenzial“ legt, sind die Kabelkapazitäten bei der Messung des Stromsignals vernachlässigbar.

In den folgenden Unterkapiteln werden die praktischen Aufbauten und Funktionen des verwendeten Multiplexers und des Vorverstärkers vorgestellt und erläutert.

### 5.2.1. Multiplexereinheit

Der Aufbau des für diese Versuche verwendeten Multiplexers war mit dem des in Kapitel 4.2.1 beschriebenen identisch. Es wurden die gleichen Relais verwendet, um die Kanäle zu schalten. Auch hier war der Aufbau so gewählt, dass alle Elektroden, die nicht für die Messung benötigt wurden, auf Bezugspotenzial „Masse“ lagen. Zur Ansteuerung der Relais wurde die gleiche Transistorverstärkerschaltung wie zuvor verwendet (siehe Kapitel 4.2.1 Abbildung 4.2.3). Die Relais waren so verschaltet, dass immer zwei jeweils für eine Vierpunktmessung angesteuert wurden, wobei ein Relais die Kanäle mit den höheren Spannungen (Gen,  $V_{\text{HIGH}}$ ) und das andere die Kanäle mit den niedrigeren Spannungen ( $V_{\text{LOW}}$ , I) schaltete.

### 5.2.2. Vorverstärker

Bei dem Versuchsaufbau zur Messung der Vierpunktsensoren war der Vorverstärker eine der wichtigsten Komponenten. Seine Aufgabe war es, den Spannungsabfall zwischen den beiden Spannungselektroden möglichst „stromlos“ bzw. sehr hochohmig ohne den Einfluss großer parasitärer Kabelkapazitäten zu messen und an das Messgerät weiter zu geben (Zagar 2007).

Die Anforderungen für den Vorverstärker waren hoch. Aufgrund der hohen Messfrequenzen konnten keine herkömmlichen Instrumentenverstärker verwendet werden. Diese weisen zwar extrem hochohmige Eingangswiderstände auf, die für eine nahezu stromlose Messung geeignet wären, sind aber nur bis Frequenzen von wenigen Kilohertz verwendbar. Es musste ein Verstärker verwendet werden, der neben hohen Eingangswiderständen auch sehr niedrige Eingangskapazitäten aufweist, aber dennoch schnell genug ist, die Signale im Frequenzbereich bis zu 10 MHz zu verarbeiten. Um eine möglichst fehlerfreie Messung bei diesen Frequenzen zu gewährleisten, musste vor allem auf eine hohe Ansprechgeschwindigkeit der Verstärkerschaltung geachtet werden. Eine „slew rate“ von mehr als  $1 \text{ kV}/\mu\text{s}$  war notwendig, um mögliche Phasenfehler zwischen der verstärkten Spannung und dem Strom vernachlässigbar klein zu halten. Hinzu kam die durch die Kabel und das Messgerät bedingte hohe kapazitive Last am Ausgang des Vorverstärkers. Die Schaltung musste Kapazitäten bis hin zu 90 pF (35 pF Geräteimpedanz, zirka 50 pF Kabel) am Ausgang treiben können.

Aufgrund der vielfältigen Anforderungen des Verstärkers wurde der CAT-5 Video Receiver AD8130 der Firma Analog Devices verwendet. Diese hoch integrierte Verstärkerschaltung zeichnet sich neben zwei differentiellen Spannungsmesseingängen und einer hohen „slew rate“ von  $1,1 \text{ kV}/\mu\text{s}$  bei einer Versorgungsspannung von  $\pm 12 \text{ V}$ , auch durch die Fähigkeit aus, hohe kapazitive Lasten treiben zu können. Die differentiellen Eingangsimpedanzen des ICs sind  $1 \text{ M}\Omega$  und weniger als 3 pF. Die CMRR (Common Mode Rejection Ratio) ist mit 94 dB bei 100 kHz und immer noch 70 dB bei 10 MHz ausreichend hoch. Die realisierte Schaltung ist in Abbildung 5.2.2 dargestellt.

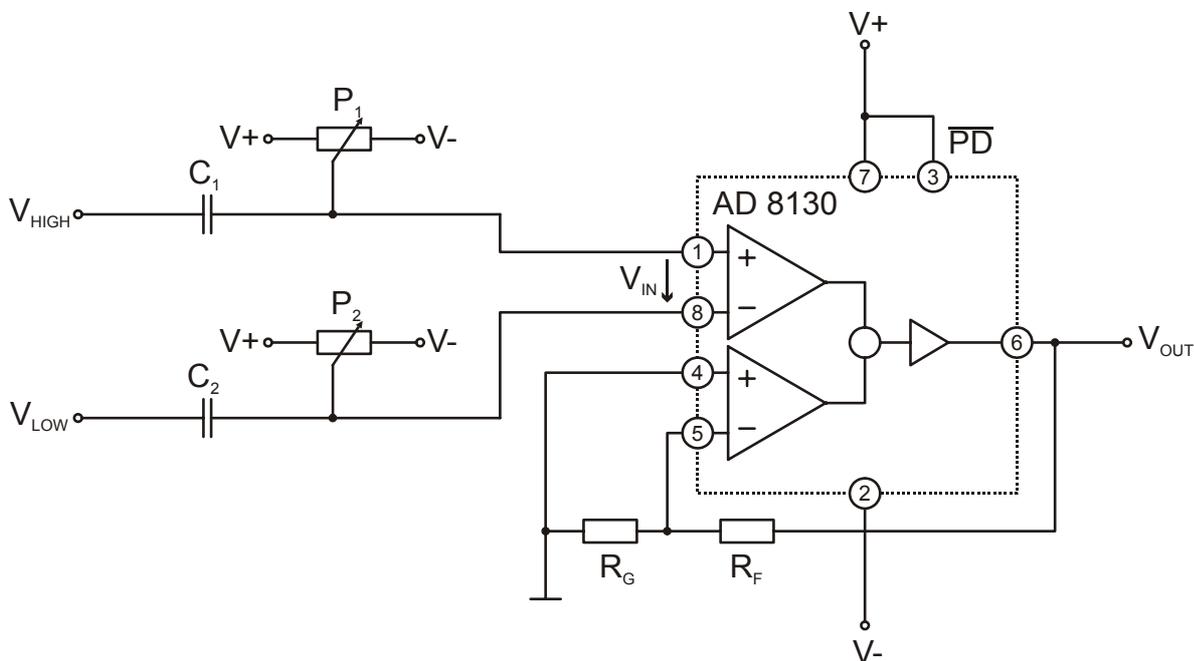


Abbildung 5.2.2. Schaltbild der Vorverstärkerschaltung

Um zu verhindern, dass die Elektroden in der MTP durch mögliche Gleichströme an den Eingängen des ICs während der Messung in Lösung gehen, mussten die Elektroden und der AD8130 durch Kapazitäten ( $C_1$ ,  $C_2$ ) DC-entkoppelt werden. Da der AD8130 jedoch Eingangsströme bis zu  $\pm 2 \mu\text{A}$  benötigt, um seine Funktionalität aufrecht erhalten zu können, war

eine einfache Entkopplung nur über Kapazitäten nicht möglich. Um den benötigten Strom zu gewährleisten, wurden zwei Potenziometer mit einem Widerstand von 2 M $\Omega$  in der Schaltung integriert. Der hohe Widerstandswert verhinderte eine starke Reduktion der Eingangsimpedanzen der Schaltung, während durch die Stellung der Potenziometer eine Gleichspannungsverschiebung des Ausganges kompensiert werden konnte. Über die Widerstände  $R_F$  und  $R_G$  in Abbildung 5.2.2 ließ sich der Verstärkungsfaktor der Schaltung einstellen. Die Formel hierzu lautet:

$$V_{\text{OUT}} = V_{\text{IN}} \cdot \left( 1 + \frac{R_F}{R_G} \right) \quad (33)$$

Bei dem in dieser Arbeit aufgebauten Vorverstärker wurde ein Verstärkungsfaktor von 1 gewählt. Für diesen „unity gain“ Fall wurden beide Widerstände  $R_F$  und  $R_G$  durch Kurzschlüsse ersetzt. Die Spannungsversorgung wurde für  $\pm 12$  V mittels eines DC-DC-Wandlers von 12 V auf  $\pm 12$  V eingestellt, um bestmögliche Eigenschaften des ICs zu gewährleisten. Die Spannungsversorgung wurde weiterhin durch jeweils zwei Kondensstoren (100 nF, 10  $\mu$ F) an beiden Anschlüssen stabilisiert. Die komplette Schaltung des Vorverstärkers inklusive des DC-DC-Wandlers wurde mit SMB-Printsteckern bzw. –buchsen direkt an den Multiplexer angeschlossen. Dadurch konnten weitere parasitäre Kapazitäten durch zusätzliche Kabel verhindert werden.

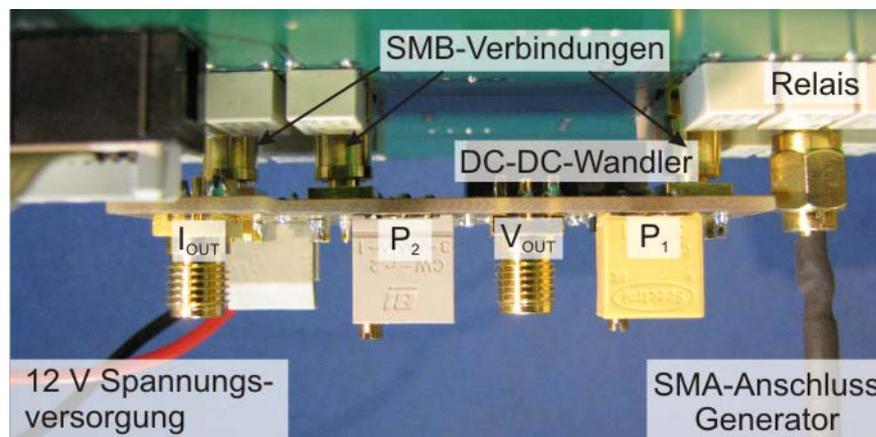


Abbildung 5.2.3. Foto des aufgebauten Vorverstärkers mit

In Abbildung 5.2.3 ist ein Foto gezeigt, auf dem man den angeschlossenen Vorverstärker erkennen kann. Die kleine Vorverstärkerplatine mit den in Abbildung 5.2.2 aufgeführten Bauteilen und dem DC-DC-Wandler wurde mittels dreier SMB-Verbindungen unter dem Multiplexer montiert. Hierbei dienten zwei der Verbindungen der Kontaktierung der Spannungselektroden mit dem Vorverstärker, während die dritte SMB-Verbindung den Messstrom  $I$  führte. Dieser wurde nicht durch den Vorverstärker verändert, sondern nur an eine SMA-Buchse (Abbildung 5.2.3  $I_{\text{OUT}}$ ) weitergeleitet. Die verstärkte Differenzspannung  $V_{\text{OUT}}$  wurde ebenfalls über eine SMA-Buchse dem Messgerät Solartron 1260 zur Verfügung gestellt. Der Anschluss des Generatorausganges des Solartron 1260 erfolgte direkt mittels SMA-

Verbindung an dem Multiplexer selbst. Der Vorverstärker wurde über zwei einfache Kabel durch ein Netzteil mit 12 V Gleichspannung versorgt.

Mit Hilfe der vorgestellten Schaltung war es möglich, die Messgenauigkeit des untersuchten Frequenzbereichs drastisch zu erhöhen. Vor allem die parasitären Kapazitäten, die eine Messung bei Frequenzen von über 100 kHz stark beeinflussen können, konnten enorm verringert werden. Die differentiellen Spannungseingänge des Solartron 1260 weisen eine Eingangsimpedanz von 1 M $\Omega$  und 35 pF auf. Bei einer Verwendung eines Koaxialkabels sinken die Impedanzen weiter. Die so entstehenden Kapazitäten resultieren in einer sehr geringen Eingangsimpedanz für die Spannungsmessung von deutlich unter 2 k $\Omega$ . Die Verwendung der Vorverstärkerschaltung garantierte genauere und reproduzierbare Messergebnisse in den durchgeführten Untersuchungen.

### **5.2.3. Aufbau für CV-Messung und Elektrodenimpedanz**

Für die Messung der Zyklovoltamogramme (CV) wurde der Potentiostat/Galvanostat 283 von EG&G Instruments eingesetzt. Um die CV-Charakteristiken der Platin- bzw. Iridiumoxidelektroden zu bestimmen wurden fertige MTPs mit bodenintegrierten Sensoren verwendet. Die AgAgCl-Referenzelektrode wurde von oben in die Lösung in der Wanne der MTP eingetaucht. Ein dünner gebogener Platindraht wurde ebenfalls von oben in die Wanne eingetaucht und diente als stromführende Gegenelektrode. Zur Kontaktierung der jeweiligen Arbeitselektrode wurde der in Kapitel 5.2.1 vorgestellte Multiplexer verwendet. Der für die Impedanzmessung der Lösung notwendige Vorverstärker war aufgrund der geringen Messgeschwindigkeit und damit verbundenen niedrigen Frequenzen nicht notwendig.

### **5.3. Versuchsdurchführung**

In den folgenden Unterkapiteln werden die Versuchsbedingungen, unter denen die Tests durchgeführt wurden, und die verwendeten Medien genauer beschrieben.

#### **5.3.1. CV-Messung**

Die Messungen der CV-Kurven wurden in PBS (Phosphate buffered saline) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Phosphat-gepufferte Salzlösung mit den Hauptbestandteilen NaCl und KCl. Als Puffer in der Lösung dienen Dinatrium- und Kaliumdihydrogenphosphat. Alle Versuche wurden bei einer Raumtemperatur von 24°C durchgeführt. Um die in dieser Arbeit relevanten Stellen der CV-Kurven erfassen zu können, wurde die Spannung zwischen -0,8 V und +1,2 V bzw. -1,0 V und +1,0 V zyklisch variiert. Die dabei verwendete Geschwindigkeit war 100 mV/s. Die Ergebnisse der Messungen wurden mit CV-Kurven von reinem Platin und reinem Gold in PBS-Lösung verglichen (siehe Kapitel 5.4.1).

#### **5.3.2. Elektrodenimpedanz**

Durch die Verwendung von Iridiumoxid als Elektrodenmaterial war die Messung der Elektrodenimpedanz von besonderem Interesse. Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, sind die elektrochemischen Eigenschaften und damit auch die Elektrodenimpedanzen stark von der Vorkonditionierung des Materials abhängig. Um dieses Verhalten der Elektroden zu untersuchen, wurden Impedanzmessungen mit in Kapitel 5.2.3 beschriebenen Messaufbau durchgeführt. Es wurde wieder PBS als Testlösung verwendet. Die Impedanz wurde in einem Frequenzbereich von 1 Hz bis 100 kHz gemessen. Um Einflüsse möglicher Kabelinduktivitäten bei der Impedanzmessung zu vermeiden, wurde die maximale Messfrequenz von 100 kHz bei diesen Versuchen gewählt. Es wurden Messungen an Iridiumoxidelektroden durchgeführt und mit Messungen an identischen Elektroden aus Platin verglichen.

#### **5.3.3. Versuche mit definierten Kaliumchloridlösungen**

Um die verschiedenen Elektrodendesigns bezüglich ihres elektrischen Verhaltens genauer charakterisieren zu können, wurden Messungen mit vordefinierten Kaliumchloridlösungen (KCl) durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Salzlösungen weist eine KCl-Lösung einen stark linearen Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit der Lösung und KCl-Konzentration auf (Oehme 1991). Die KCl-Konzentrationen der Lösungen wurden so gewählt, dass die resultierenden Leitfähigkeitswerte im Bereich der spezifischen Leitfähigkeiten typischer Zellmedien lagen. Alle Elektrodendesigns wurden mehrfach in Lösungen mit folgenden Leitfähigkeitswerten gemessen: 3 mS/cm, 7,9 mS/cm und 18,6 mS/cm. Alle Versuche wurden in einem klimatisierten Raum bei konstant 24°C durchgeführt. Für die Messungen zur Charakterisierung des Schüttelverhaltens wurden die entsprechenden Elektrodendesigns mit Hilfe des in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Schüttlers mit verschiedenen Drehzahlen orbital geschüttelt und die Messungen mit den Ergebnissen der Simulation aus Kapitel 5.1.3 verglichen. Die hierbei verwendete KCl-Lösung hatte eine Leitfähigkeit von 5,8 mS/cm. Für diese Schüttelversuche wurden jeweils 200 µl der KCL-Lösung in die zu testenden Wannern gefüllt.

Bei den Messungen zur Charakterisierung des Frequenzverlaufes der einzelnen Elektrodendesigns wurde darauf verzichtet, die MTP zu schütteln, um den reinen Einfluss der Elektrodengeometrie auf das Messsignal bestimmen zu können. Die Füllvolumina in jeder Wanne betragen bei diesen Versuchen 250  $\mu\text{l}$ .

#### **5.3.4. Messungen an definierten Zellkulturen**

Um das in der Theorie beschriebene Relaxationsverhalten der unterschiedlichen Zellkulturen mit den hergestellten Sensoren zu untersuchen, wurden zunächst Vorkulturen in einfachen Schüttelkolben angesetzt. Nachdem diese zirka 12 Stunden im Medium bei 37°C wachsen konnten, wurde die Biomasse durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Durch Abzentrifugieren der Biomasse und Verdünnungen mit dem verwendeten Medium konnten unterschiedliche Zellkonzentrationen eingestellt werden. Als Zelllösung wurden *Hansenula Polymorpha* (Hefe) in einem YNB-Medium und *Escherichia Coli* (Bakterien) in TB-Medium verwendet. Bei den Hefen *Hansenula Polymorpha* und den *E.Coli*-Stämmen handelte es sich um nicht gentechnisch veränderte Wildtypen. Das für die Hefe verwendete YNB-Medium gehörte zu dem Typen der Minimalmedien. Das TB-Medium für die *E.Coli* Bakterien hingegen war ein komplexes Medium (siehe Anhang).

#### **5.3.5. Fermentationsmessungen**

An den bereits zuvor erwähnten Kulturen *Hansenula Polymorpha* und *Escherichia Coli* in unterschiedlichen Medien wurden Impedanzmessungen während der Fermentation durchgeführt. Beide Kulturen wurden sowohl in Minimalmedien als auch in komplexen Medien fermentiert und gemessen. Die genauen Kulturbezeichnungen und Medienzusammensetzungen sind in diesem Kapitel für die einzelnen Versuche beschrieben.

## 5.4. Messungen mit Vierpunktsensoren

### 5.4.1. CV-Messungen

Um die Messungen an den fertigen Elektroden der Sensorfolien interpretieren zu können, wurden ebenfalls Messungen an reinem Gold und reinem Platin durchgeführt. Diese Messungen dienen als Referenz und wurden mit einem separaten Messaufbau an Schichten auf einfachen Glasobjektträgern durchgeführt.

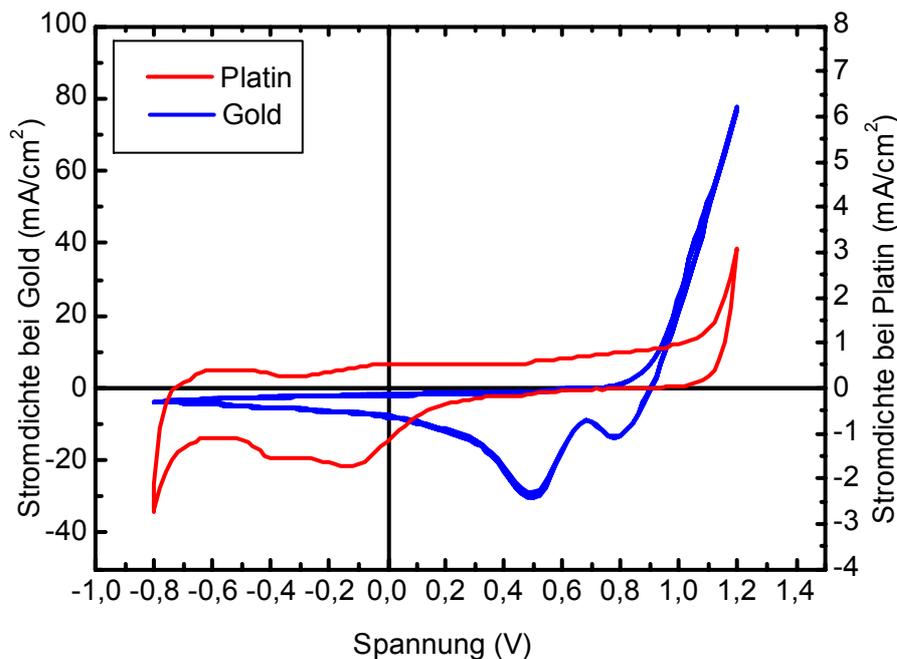


Abbildung 5.4.1. CV Kurven reiner Gold- und Platinschichten in PBS-Lösung in einem Messbereich von  $-0,8\text{ V}$  bis  $+1,2\text{ V}$  und einer Messgeschwindigkeit von  $100\text{ mV/s}$

Abbildung 5.4.1 zeigt die Ergebnisse der CV-Messungen von reinem Gold und reinem Platin in einer PBS-Lösung. Während Platin im CV-Diagramm einen sehr flachen Verlauf aufweist und bereits bei  $-0,8\text{ V}$  wie auch bei  $+1,2\text{ V}$  gegenüber einer AgAgCl-Referenzelektrode deutliche Elektrolysereaktionen zeigte, so war der Stromfluss an einer vergleichbaren Elektrode aus Gold wesentlich höher. Auch blieb eine erkennbare Elektrolyse von Wasserstoff bei  $-0,8\text{ V}$  aus. Stattdessen setzte die Elektrolyse von Sauerstoff schon bei Spannungen von  $+1,0\text{ V}$  ein. In der Folge kam es zu einem starken Anstieg der CV-Kurve in dem Bereich zwischen  $1,0\text{ V}$  bis  $1,2\text{ V}$ . Sehr charakteristisch war auch die Stromüberhöhung bei  $0,5\text{ V}$  von bis zu  $-30\text{ mA/cm}^2$ .

Um eine möglichst optimale Abdeckung des Goldes zu gewährleisten, wurde ein Negativlack zur Strukturierung der Goldgalvanik für die Elektroden verwendet (siehe Kapitel 3.2). Um den Effekt dieses Prozesses zu untersuchen, wurden CV-Kurven von Sensoren aufgenommen, die mit der neuen Negativlacktechnik hergestellt wurden, und mit Messungen verglichen, die an Sensoren durchgeführt wurden, deren Galvanikschicht mit einem Positiv-

lack strukturiert wurde. Diese wiesen an den Rändern der Elektroden große freistehende Flächen exponierten Goldes auf (siehe Anhang).

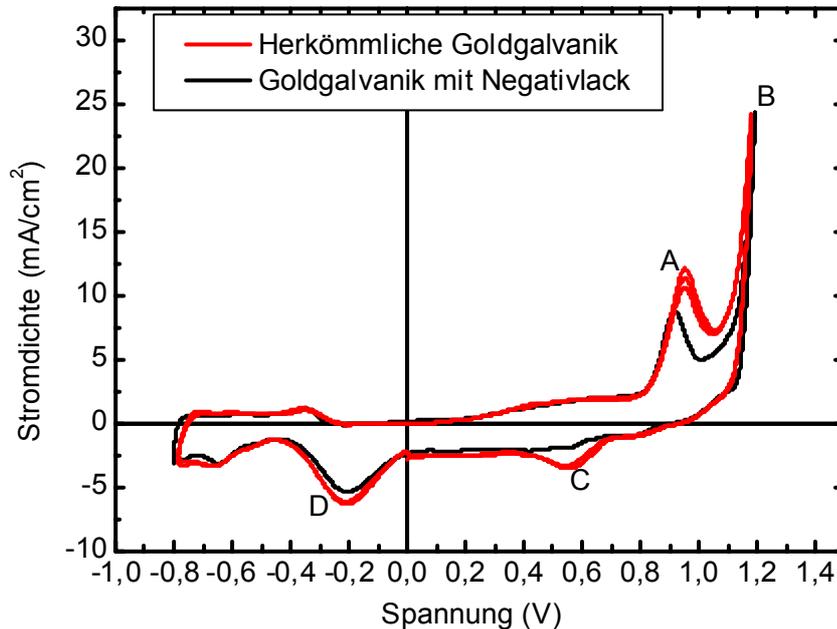


Abbildung 5.4.2. Vergleich zweier Elektroden verschiedener EIS-V5-Sensoren mit unterschiedlichen Galvanikprozessen zur Elektrodenstrukturierung

Die für die Messung verwendeten Elektroden waren jeweils eine Außenelektrode eines EIS-V5-Sensors mit einer Fläche von  $0,9 \text{ mm}^2$  (siehe Abbildung 3.2.3). Beide Kurven in Abbildung 5.4.2 zeigen einen etwas höhere Stromdichtewerte und einen nach unten verschobenen Verlauf im Vergleich zu der Messung an reinem Platin (Abbildung 5.4.1). Neben dem sehr starken Elektrolyseanstieg bei  $1,2 \text{ V}$  (Abbildung 5.4.2 B) war auch eine deutliche Überhöhung des Stromes zwischen  $0,8 \text{ V}$  und  $1,0 \text{ V}$  zu erkennen (Abbildung 5.4.2 A). Weitere Stromspitzen zeigten sich bei der Messung an der Elektrode, die mit einer Positivlackstrukturierung hergestellt wurde, bei Spannungen von  $0,55 \text{ V}$  (C) und  $-0,25 \text{ V}$  (D). Bei der Messung an der Elektrode, die mit einer Negativlackstrukturierung hergestellt wurde, fiel die Stromüberhöhung bei zirka  $0,9 \text{ V}$  (A) deutlich geringer aus. Der Stromanstieg bei  $0,55 \text{ V}$  (C) blieb sogar völlig aus. Nur bei  $-0,25 \text{ V}$  (D) ist das gleiche Stromverhalten erkennbar.

Die Messungen an den mit Iridiumoxid beschichteten Elektroden wurden über einen größeren Zeitraum durchgeführt, um die Elektroden vorzukonditionieren (Kapitel 2.2.2). Die folgende Abbildung zeigt die Veränderung der CV-Kurven während der Messung der Iridiumoxid-Elektroden. Die darauf folgenden Ergebnisse der Impedanzmessungen wurden mit vergleichbaren Platinelektroden verglichen und sind in Kapitel 5.4.2 aufgeführt.

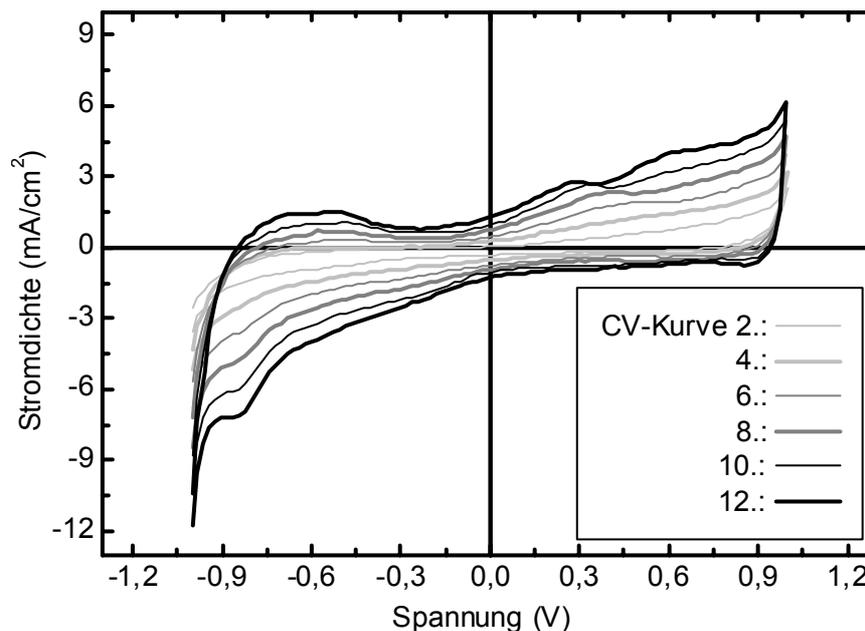


Abbildung 5.4.3. Bei der Aktivierung einer Iridiumoxidelektrode aufgenommene CV-Kurven

Die CV-Kurven aus Abbildung 5.4.3 zeigen, wie sich die umschlossene Fläche der Kurven von Messung zu Messung ausdehnte. Während die CV-Kurven an „frischen“ Iridiumoxidelektroden einen sehr schmalen und flachen Verlauf auswiesen, nahmen die Stromdichten mit der Zeit deutlich zu. Für die durchgeführten Vorkonditionierungen wurden insgesamt 15 Zyklen einer CV-Messung durchlaufen. Das Verhalten der Elektroden bei einer Vorkonditionierung mit Spannungszyklen von -1,2 V bis +1,2 V war vergleichbar. Jedoch wurde das Iridiumoxid nach diesen Aktivierungen mechanisch so instabil, dass es geringsten Belastungen, wie leichtem Schütteln von der Platinschicht abfiel. Das mit den in Abbildung 5.4.3 gezeigten CV-Messungen (-1,0 V bis +1,0 V) vorkonditionierte Iridiumoxid war jedoch stabil und hielt auch stärkeren mechanischen Einflüssen stand. Ein Ausspülen mit Di-Wasser der Wannens mit derart veränderten Iridiumoxidelektroden war kein Problem und beschädigte die Elektroden nicht.

#### 5.4.2. Messungen der Elektrodenimpedanz

Vor allem in Hinblick auf die mit Iridiumoxid beschichteten Elektroden waren die Messungen der Elektrodenimpedanz von Bedeutung. Es wurden Messungen an verschiedenen vorkonditionierten Iridiumoxidelektroden durchgeführt und mit entsprechenden Platinelektroden verglichen. In der folgenden Abbildung sind die Beträge der jeweils gemessenen Impedanz über der Messfrequenz aufgetragen. Für die vorgestellten Messungen wurden die Mittelelektroden eines EIS-V2 Sensors mit einer Fläche von zirka 0,79 mm<sup>2</sup> verwendet.

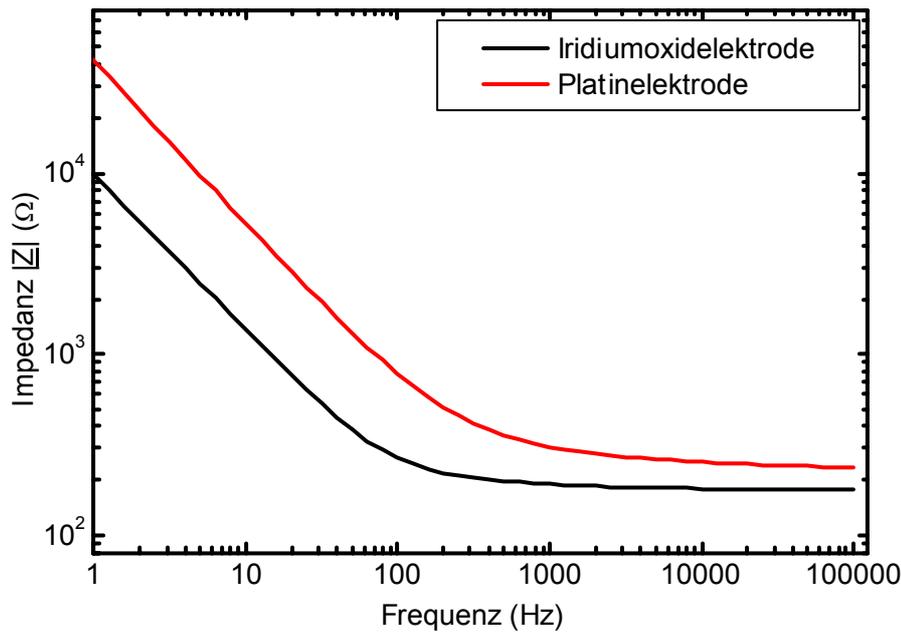


Abbildung 5.4.4. Gemessene Elektrodenimpedanzen einer Iridiumoxidelektrode im Vergleich mit einer identischen Platinelektrode

Die Betragsverläufe der gemessenen Impedanzen weisen trotz identischer Elektrodengröße große Unterschiede auf (Abbildung 5.4.4). Die untersuchte Iridiumoxidelektrode zeigte eine deutlich geringere Elektrodenimpedanz als eine vergleichbare Elektrode aus reinem Platin.

Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass bei den Messungen eine große Abhängigkeit von der Elektrodenfläche zu bemerken war. Bei kleineren Elektroden wie im Falle der EIS-V3-Sensoren musste die Vorkonditionierung bei niedrigeren Spannungen durchgeführt werden. Schon bei einem Spannungsbereich von -1 V bis +1 V wurden die Iridiumoxidschichten zerstört. Es wurden daher CV-Messungen in einem Spannungsbereich von -0,8 V bis +0,8 V durchgeführt. Nach einigen Zyklen in diesem Spannungsbereich konnte dieser für weitere Zyklen auf -0,9 V bis +0,95 V erweitert werden. Das Ergebnis war vergleichbar mit den in Abbildung 5.4.4 gezeigten Graphen. Die hier vorgestellten vorkonditionierten Elektroden (EIS-V2) wiesen noch nach über einer Woche Trockenlagerung eine sehr niedrige Elektrodenimpedanz auf, die unverändert geringer und damit besser war als die der Platinvergleichselektroden.

### 5.4.3. Auswertung der CV- und Impedanzmessungen

Bei den CV-Messungen an reinen Gold- und Platinproben zeigten sich sehr charakteristische, materialabhängige Verläufe der Stromdichten. Auffällig waren dabei vor allem die maximal erreichten Stromdichtewerte. Während Gold hohe Stromdichten von -30 bis +80 mA/cm<sup>2</sup> aufwies, zeigte Platin einen deutlich flacheren Verlauf. Die Maximalwerte bei den Messungen von Platin waren zirka um den Faktor 10 kleiner als bei Gold (Abbildung 5.4.1). Vor allem die deutlich früher einsetzende Elektrolyse im positiven Spannungsbereich charak-

terisierte die Goldprobe. Auch sehr auffällig war das stark ausgeprägte negative Maximum der Goldmesskurve bei einer rückläufigen Spannung von zirka +0,5 V. Die charakteristischen Verläufe der CV-Kurven wurden in dieser Arbeit lediglich verwendet, um die Qualität der Platinschicht auf dem Gold zu bestimmen. Hierfür wurden die individuellen Peaks der Messungen verwendet. Auf eine genaue chemische Interpretation der einzelnen Peaks und eine Untersuchung der zugrundeliegenden chemischen Reaktionen wurde verzichtet.

Da sich das Gold durch wesentlich höhere Stromdichten auszeichnete, konnte sein Einfluss bei den Messungen an fertigen Elektroden gut nachgewiesen werden. Der Vergleich von Sensoren, die mit einer herkömmlichen Positivlackprozessierung hergestellt wurden, und denen, die mit einem Negativlack gefertigt wurden, zeigte die unterschiedlich starken Einflüsse der unter dem Platin liegenden Goldschicht (siehe Kapitel 3.2). Dadurch dass bei der Herstellung der Elektroden mit einem Positivlack für die Goldgalvanik überhängende Goldkanten entstanden, die nicht vollständig mit Platin bedeckt werden konnten (siehe Abbildung 9.3.1), waren große Flächen des Goldes dem flüssigen Elektrolyten direkt ausgesetzt. In den CV-Diagrammen machte sich dies im Kurvenverlauf bemerkbar. Bei der CV-Messung der fertigen Elektroden kam es im Spannungsbereich von 1 V zu einer lokalen Überhöhung des Stromdichtesignals (Abbildung 5.4.2 A). Des Weiteren war der Elektrolysepeak bei einer Spannung von 1,2 V deutlich stärker ausgeprägt, als es bei reinem Platin zu erwarten gewesen wäre. Beides lässt sich mit der bei Gold wesentlich früher einsetzenden Elektrolyse erklären. Die Elektrolyse von reinem Gold war bereits bei +1 V stark ausgeprägt. Genau bei dieser Spannung kam es bei den fertigen Elektroden zu einer deutlichen Spannungsüberhöhung, bevor sich bei +1,2 V die Elektrolyseeffekte von Platin und Gold überlagerten. Deutlich weniger ausgeprägt war dieses Verhalten bei den Sensoren, die mit einer Negativlacktechnik für die Goldgalvanik hergestellt wurden (Abbildung 5.4.2). Besonders hervorstechend war der Unterschied bei zirka +0,5 V in der rückläufigen Messkurve (Abbildung 5.4.2 C). Hier war bei Elektroden mit nicht vollständig geschlossenen Platinschichten (Positivlackprozessierung) ein für Gold typisches negatives Maximum erkennbar. Dieses konnte durch die Verwendung eines Negativlackes für die Goldgalvanik vollständig eliminiert werden. Das im negativen Spannungsbereich auftretende negative Maximum war eine Eigenschaft des Platins selbst (Abbildung 5.4.2 D) und beschrieb die Reduktion von Sauerstoff (Whalen 2006). Eine Goldschicht wies in diesem Bereich keine ausgeprägten Peaks auf (Abbildung 5.4.1).

Die Messungen an den mit Iridiumoxid beschichteten Elektroden zeigten das für dieses Material typische Verhalten. Mit zunehmender Anzahl der Messzyklen weiteten sich die CV-Kurven und umschlossen eine immer größere Fläche im CV-Diagramm (Abbildung 5.4.3). Nach der Vorkonditionierung mit nur 15 CV-Zyklen sank die Elektrodenimpedanz nachhaltig und war deutlich niedriger als die der Platinelektroden gleicher Größe. Die Vorkonditionierung reiner Iridiumoxidschichten und deren Optimierung wurde in früheren Arbeiten bereits eingehend untersucht (Slavcheva 2004; Slavcheva 2005; Slavcheva 2006b; Slavcheva 2006a). Das für diese Arbeit verwendete Iridiumoxid war optimiert auf die Anwendung in medizinischen Implantaten zur Nervenstimulation (Wessling 2006a). Die Vorkonditionierung in dieser Arbeit konnte allerdings nur in einem eingeschränkten Spannungsbereich vorgenommen werden. Während in bisherigen Versuchen an großen Elektroden mit zirka 1 cm<sup>2</sup> Fläche

Spannungen in einem Bereich von  $-1,4\text{ V}$  bis  $+1,4\text{ V}$  verwendet wurden, führte dies bei den getesteten Sensorelektroden zur Zerstörung der Iridiumoxidschichten. Jedoch reichte auch dieser eingeschränkte Spannungsbereich aus, die Elektrodeneigenschaften nachhaltig zu verbessern. Wie aus den Graphen in Abbildung 5.4.4 ersichtlich, ergab die durchgeführte Vorkonditionierung der Iridiumoxidelektroden in dem in dieser Arbeit untersuchten Frequenzbereich von über  $10\text{ kHz}$  nur eine leicht geringere Impedanz bezogen auf die reinen Platinelektroden. Deutlicher waren die Unterschiede im niedrigen Frequenzbereich von unter  $1\text{ kHz}$  (siehe Abbildung 5.4.4).

#### 5.4.4. Messungen des Schüttelverhaltens verschiedener Sensoren

Im Folgenden werden die Messergebnisse der Kaliumchloridlösungen gezeigt und beschrieben. Für die Messungen wurden immer vier verschiedenen Sensorelektroden vermessen.

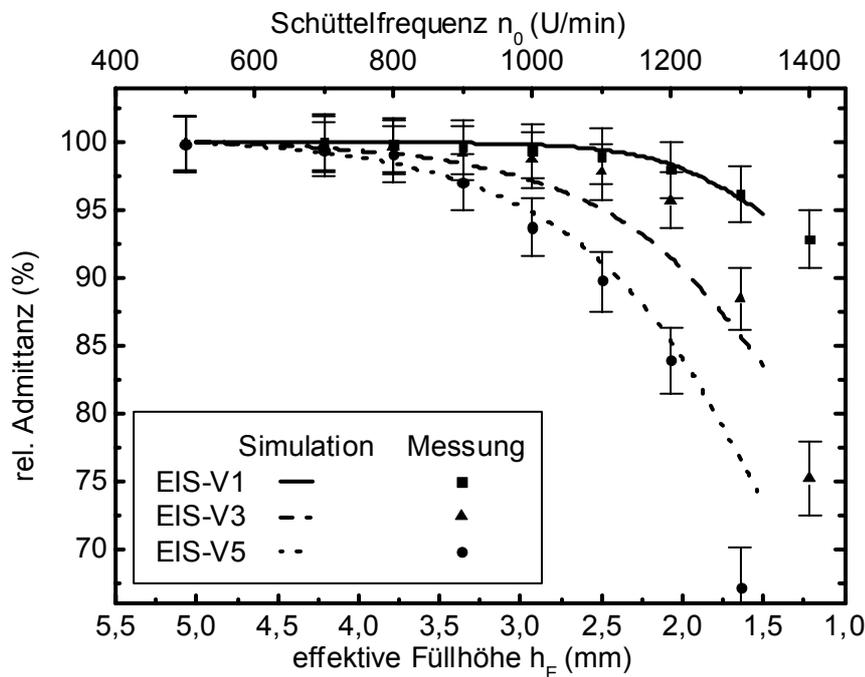


Abbildung 5.4.5. Gemessene Abweichung der Admittanz bei Erhöhung der Schütteldrehzahl im Vergleich mit den Simulationen aus Kapitel 5.1.3

Für die Überprüfung der zuvor durchgeführten Simulationen der geschüttelten MTPs mit verschiedenen Elektrodendesigns wurden Messungen mit den Sensoren EIS-V1, EIS-V3 und EIS-V5 durchgeführt. Der gemessene Leitwert bei  $10\text{ kHz}$  wurde hierbei als Admittanz der Lösung gemessen und über der Schüttelfrequenz aufgetragen.

Die Messungen aus Abbildung 5.4.5 zeigen eine gute Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten Simulationen (Abbildung 5.1.5). Die Linien beschreiben hierbei die Ergebnisse der Simulation als Funktion der effektiven Füllhöhe  $h_E$ , während die Messpunkte mit ihren Standardabweichungen als Funktion der eingestellten Schüttelfrequenz aufgetragen wurden. Sowohl in der Simulation als auch in den Messungen zeigten die Elektroden der EIS-V5 Sensoren den stärksten Einfluss der Schüttelfrequenz bzw. der Reduzierung der Füllhöhe auf das

Admittanzsignal. Die beste Signalstabilität auch bei hohen Schüttelfrequenzen lieferten die EIS-V1 Sensoren.

### 5.4.5. Auswertung des sensorspezifischen Schüttelverhaltens

Die Messungen mit reiner Kaliumchloridlösung wurden zur Charakterisierung der einzelnen Elektrodendesigns verwendet. Da es sich bei den zu untersuchenden Zellen um aerobe Zellkulturen handelte, diese also Sauerstoff für ihr Wachstum benötigten, mussten entsprechend hohe Schütteldrehzahlen während der Messung möglich sein. Hierzu wurden in Kapitel 5.1.3 bereits Vorüberlegungen und Simulationen vorgestellt. Die mit KCl-Lösung durchgeführten Schüttelversuche bestätigten die Ergebnisse der Simulationen (Abbildung 5.4.5). Die Unterschiede der Schüttelempfindlichkeiten der verschiedenen Elektrodendesigns lassen sich am besten über den effektiven Abstand der Elektroden zueinander erklären. Bei der Betrachtung der von den Elektroden erzeugten elektrischen Felder hängt die Höhe des Feldes, das sich in der Lösung ausbreitet, direkt von der Entfernung der Elektroden untereinander ab. Je größer der Abstand der Elektroden desto weiter reicht das Feld und damit der Messbereich in die Lösung hinein. Bei einer Reduzierung der Füllstandshöhe durch die Ausbildung einer sichelförmigen Oberfläche während des Schüttelvorgangs wurden daher zuerst die Sensoren beeinflusst, deren Elektroden am weitesten voneinander entfernt lagen. Dies galt für die Designs EIS-V4 und V5. Im Verhältnis zu diesen Designs waren die Abstände der kreissymmetrischen Elektroden EIS-V1 und V2 deutlich geringer (siehe Abbildung 3.2.3). Eine Ausnahme bei diesen Überlegungen bildet das Elektrodendesign EIS-V3. Trotz des relativ großen Elektrodenabstandes war das Schüttelverhalten besser als bei dem getesteten Design EIS-V4. Dies wiederum lag an den stark unterschiedlichen Elektrodenformen. Das elektrische Feld, das sich bei EIS-V4 Elektroden ausgebildet hat, war näherungsweise mit der Form eines liegenden Halbzylinders zu vergleichen. Die punktförmigen Elektroden des EIS-V3 Designs hingegen bildeten ein nahezu halbkugelförmiges Feld aus. Die Höhe beider Felder in der Lösung war vergleichbar. Jedoch war bei einer Reduzierung der effektiven Füllhöhe durch das Schütteln der prozentuale Anteil des Gesamtfeldes, der beeinflusst wurde, bei einem halbzylindrischen Feld größer als bei dem Feld der EIS-V3 Sensoren.

Die Übereinstimmungen der Messungen mit den Simulationen zeigten, dass die für die Simulationen getroffenen Annahmen und Vereinfachungen zulässig waren (siehe Kapitel 5.1). Erwartungsgemäß zeigten die rotationssymmetrischen Elektrodendesigns (EIS-V1 und V2) die stabilsten Messwerte auch bei hohen Schütteldrehzahlen. Bis hin zu deutlich über 1000 U/min waren die messbaren Abweichungen der Admittanz unter 1%. Diese Schüttelfrequenzen waren ausreichend, um für die meisten Fermentationsprozesse einen unlimitierten Sauerstofftransfer zu gewährleisten.

#### **5.4.6. Messungen des Frequenzverhaltens in Kaliumchloridlösungen**

Die ungeschüttelten Messungen der komplexen Admittanz sind als Funktion der Frequenz mit dem arithmetischen Mittel aller Messungen, den Standardabweichungen und der entsprechenden Trendlinie dargestellt.

Der gemessene Realteil der EIS-V1 Elektroden (Abbildung 5.4.6) stieg bei allen KCl-Lösungen mit zunehmender Frequenz leicht an. Je höher die Leitfähigkeit der Testlösung war, desto später kam es zu einem lokalen Maximum, bevor die Messwerte zu höheren Frequenzen wieder abnahmen.

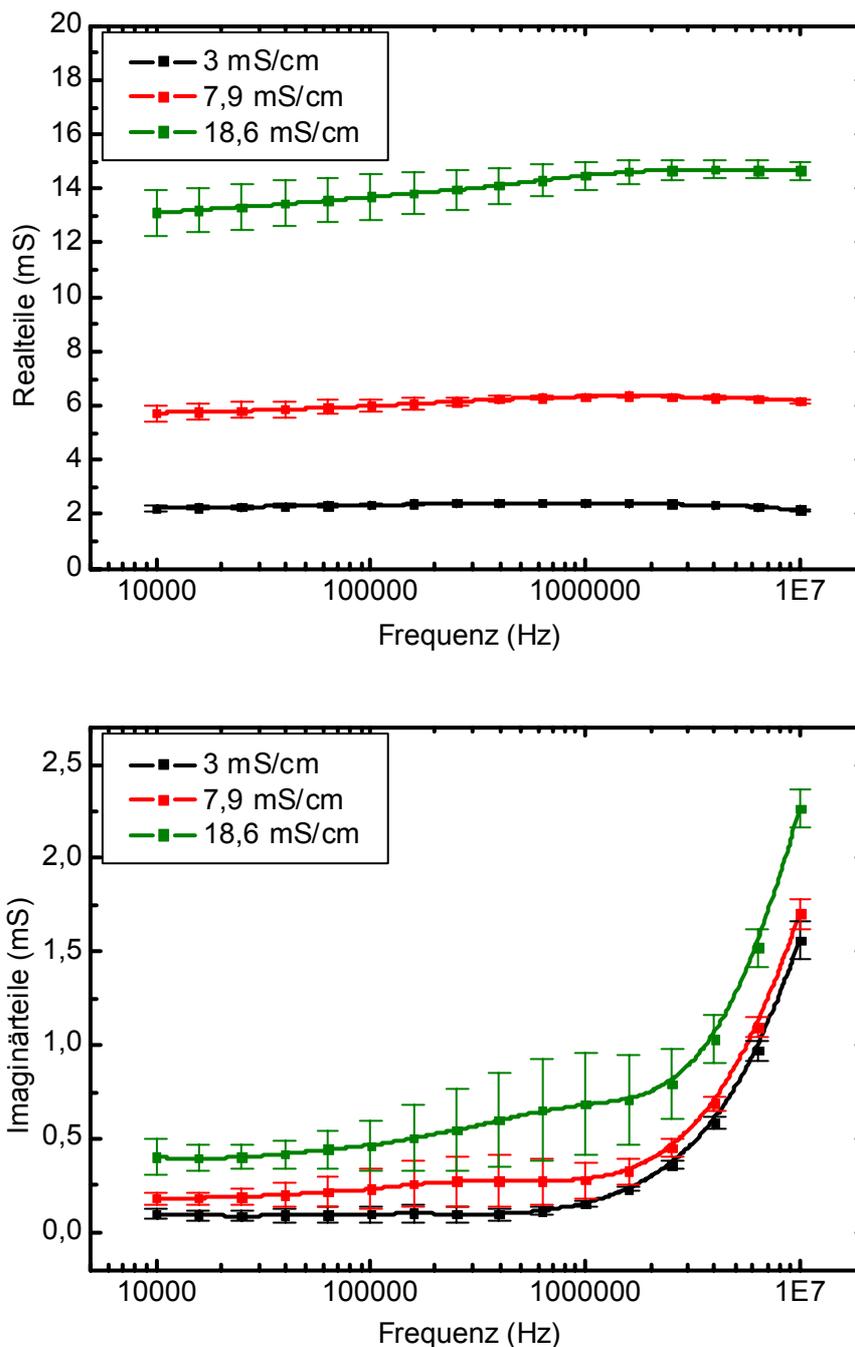


Abbildung 5.4.6. Gemessene Admittanz verschiedener KCl-Lösungen mit EIS-V1 Elektroden als Funktion der Messfrequenz

Die mit den EIS-V1-Elektroden gemessenen Imaginärteile der Admittanz (Abbildung 5.4.6) zeigten bei niedrigen Leitfähigkeiten der Testlösung (3mS/cm) einen exponentiellen Verlauf bei gewählter halblogarithmischer Darstellung. Mit Zunahme der Leitfähigkeit bildete sich eine Überhöhung der Kurve im Frequenzbereich von 300 kHz bis zirka 2 MHz aus. Insgesamt wurden die Werte der gemessenen Imaginärteile bei Lösungen mit höheren Leitfähigkeiten größer.

Die Realteile der gemessenen Admittanz bei Verwendung der EIS-V2-Elektroden zeigten über den gesamten Frequenzbereich einen nahezu konstanten Wert (Abbildung 5.4.7). Erst bei sehr hohen Frequenzen von fast 10 MHz kam es bei niedrigen Leitfähigkeiten (3 mS/cm) zu einem leichten Absinken der Messwerte.

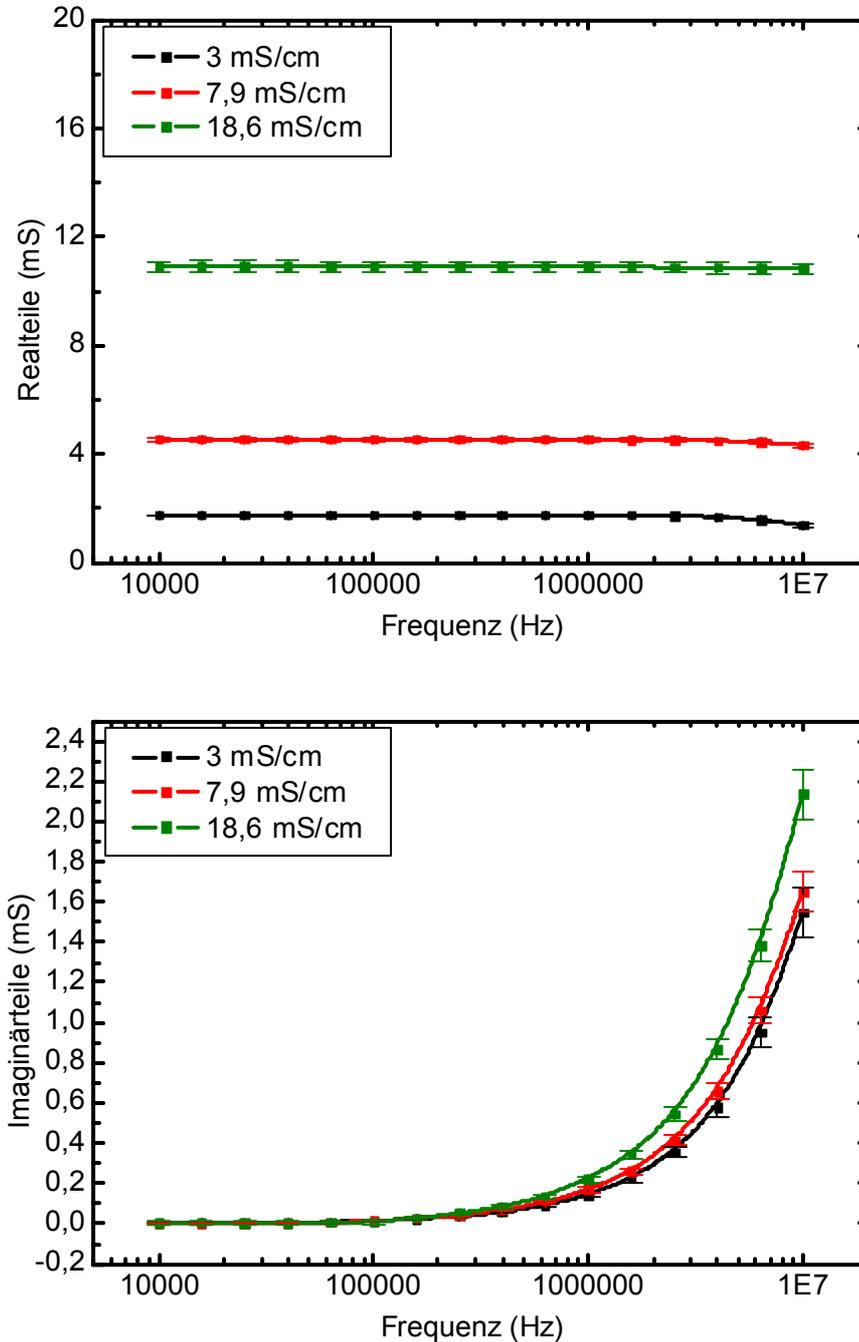


Abbildung 5.4.7. Gemessene Admittanz verschiedener KCl-Lösungen mit EIS-V2 Elektroden als Funktion der Messfrequenz

Alle mit den EIS-V2-Elektroden gemessenen Imaginärteile zeigten einen rein exponentiellen Verlauf (Abbildung 5.4.7). Die absoluten Messwerte stiegen mit Zunahme der Leitfähigkeit.

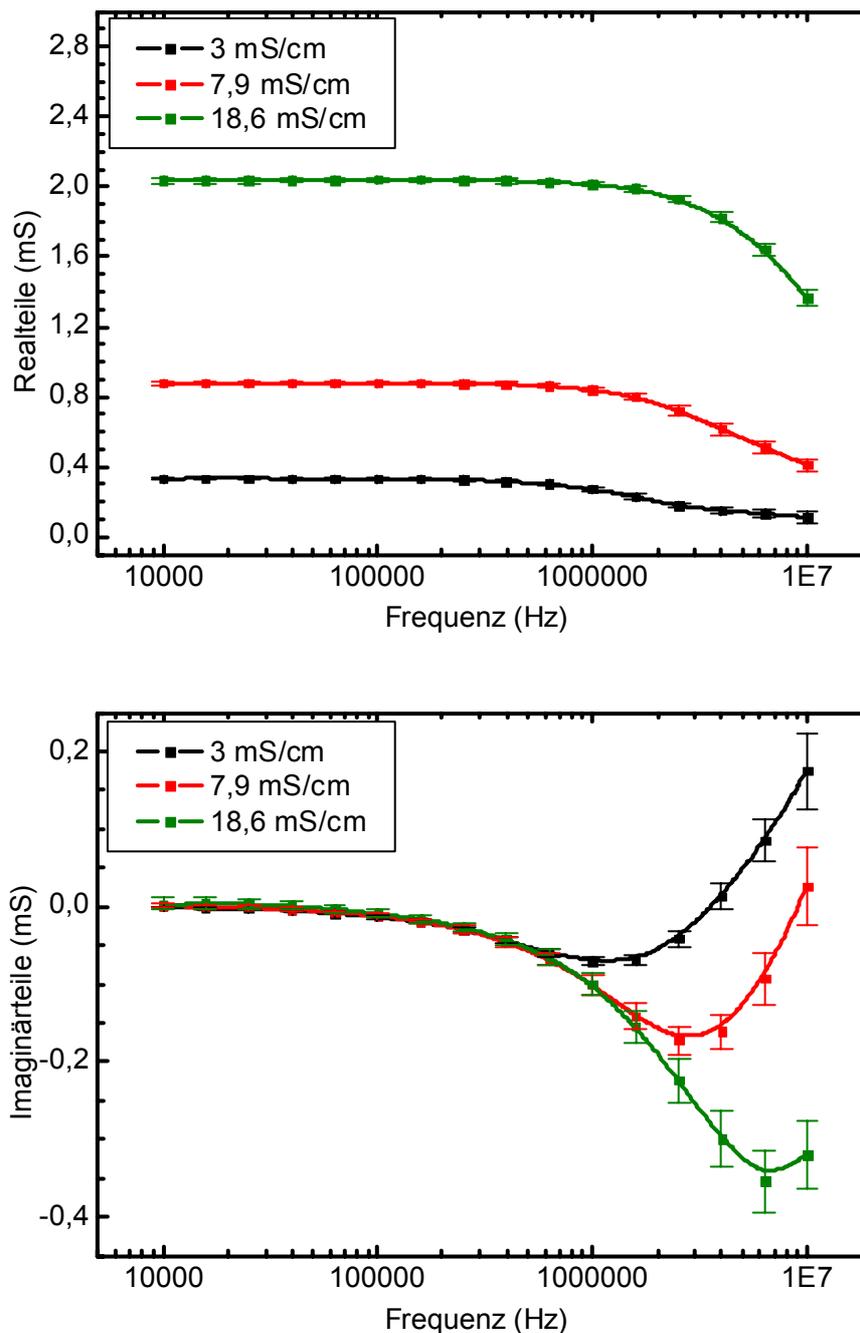


Abbildung 5.4.8. Gemessene Admittanz verschiedener KCl-Lösungen mit EIS-V3 Elektroden als Funktion der Messfrequenz

Die Realteilmessungen mit den EIS-V3-Elektroden zeigten einen deutlichen Rückgang des Signals bei hohen Frequenzen (Abbildung 5.4.8). Bis zu fast 1 MHz blieben bei allen Testlösungen die Werte nahezu konstant, während bei Frequenzen darüber die Signale stark einbrachen. Die Messkurve der Messungen bei 3 mS/cm zeigte einen stufenförmigen Verlauf. Mit steigender Leitfähigkeit der Lösung verschob sich die Stufe im Frequenzverlauf zu größeren Frequenzen hin und gewann an Höhe. Bei den Leitfähigkeiten 7,9 mS/cm und 18,6 mS/cm war jeweils nur der obere Anfang der Stufe zu erkennen.

Die Imaginärteile der gemessenen Admittanzen zeigten ein stark induktives Verhalten der EIS-V3-Elektroden (Abbildung 5.4.8). Je höher die Leitfähigkeit der Testlösung war, desto stärker bildete sich ein negatives Maximum im Frequenzspektrum aus. Dieser charakteristische negative Peak wurde mit zunehmender Leitfähigkeit nicht nur größer, sondern wanderte auch im Spektrum zu höheren Frequenzen.

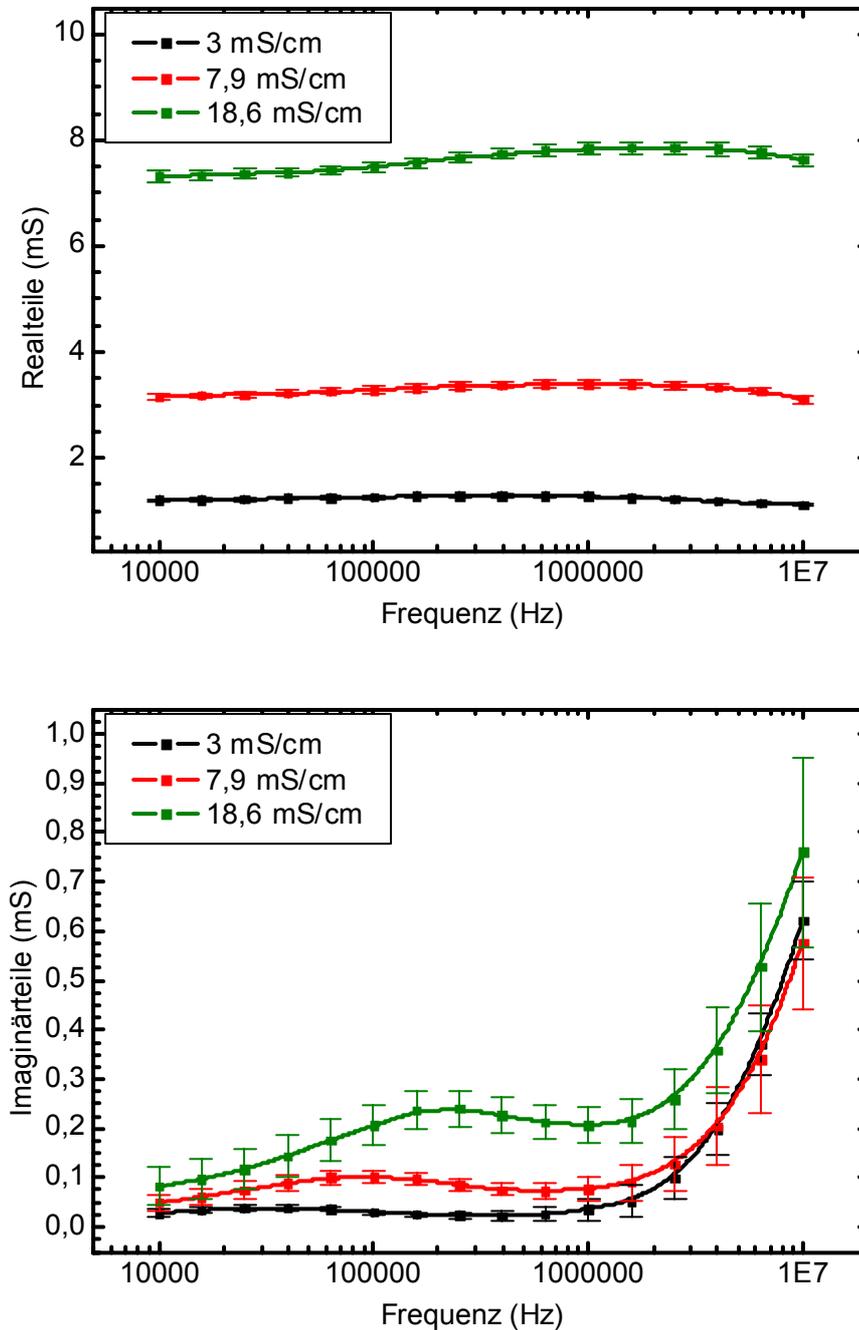


Abbildung 5.4.9. Gemessene Admittanz verschiedener KCl-Lösungen mit EIS-V4 Elektroden als Funktion der Messfrequenz

Das Frequenzverhalten der EIS-V4 und der EIS-V5 Elektroden in Abbildung 5.4.9 und Abbildung 5.4.10 war vergleichbar mit dem Verhalten der EIS-V1 Sensoren.

Der Realteil stieg bei beiden Elektrodentypen ebenfalls zu höheren Frequenzen hin leicht an und sank hinterher wieder ab. Je höher die Leitfähigkeit der gemessenen Lösung, desto stärker wurde dieser Effekt sichtbar. Der gemessene Imaginärteil zeigte die gleiche Überhöhung wie bei der Messung mit EIS-V1 (Abbildung 5.4.6). Der Effekt war nur deutlicher und zeigte sich bei niedrigeren Frequenzen.

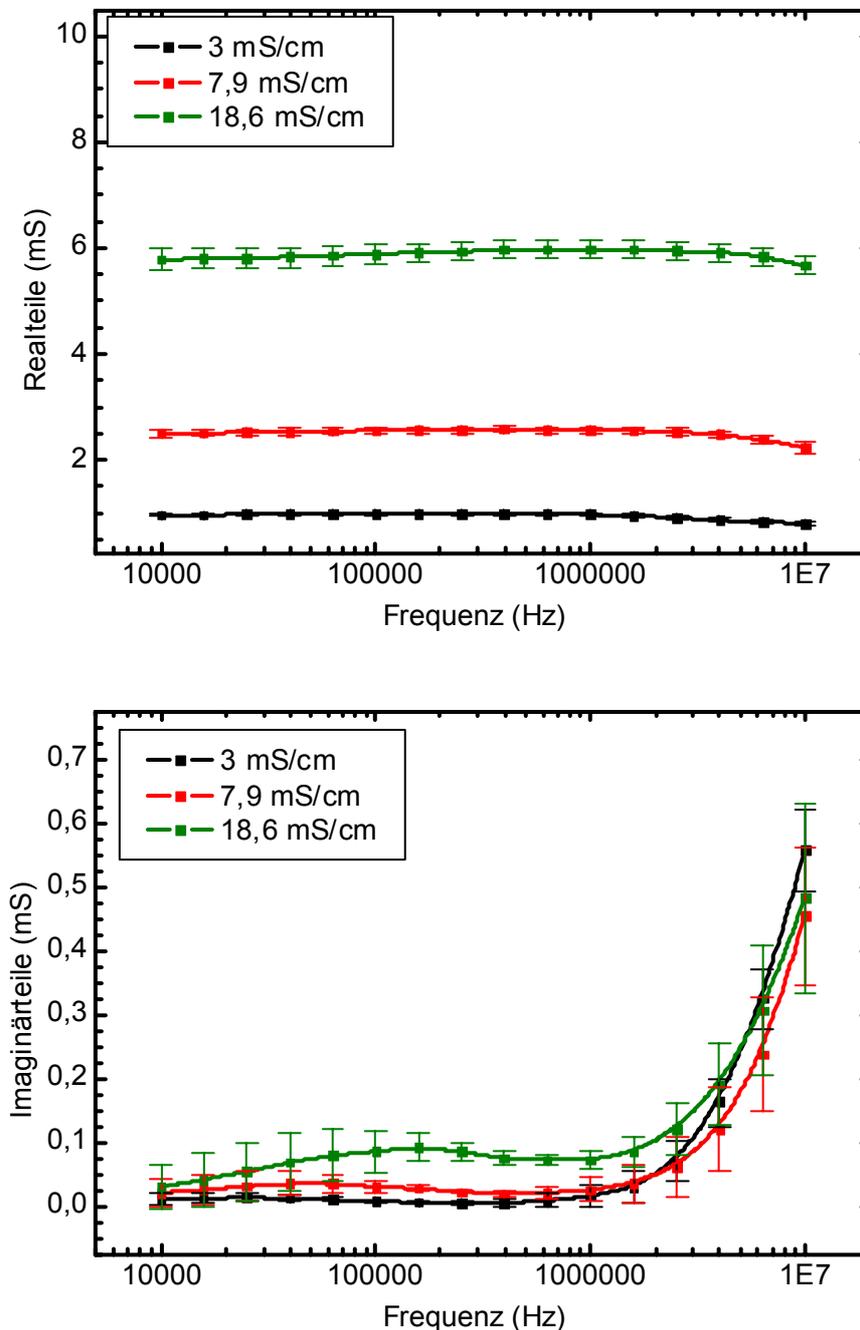


Abbildung 5.4.10. Gemessene Admittanz verschiedener KCl-Lösungen mit EIS-V5 Elektroden als Funktion der Messfrequenz

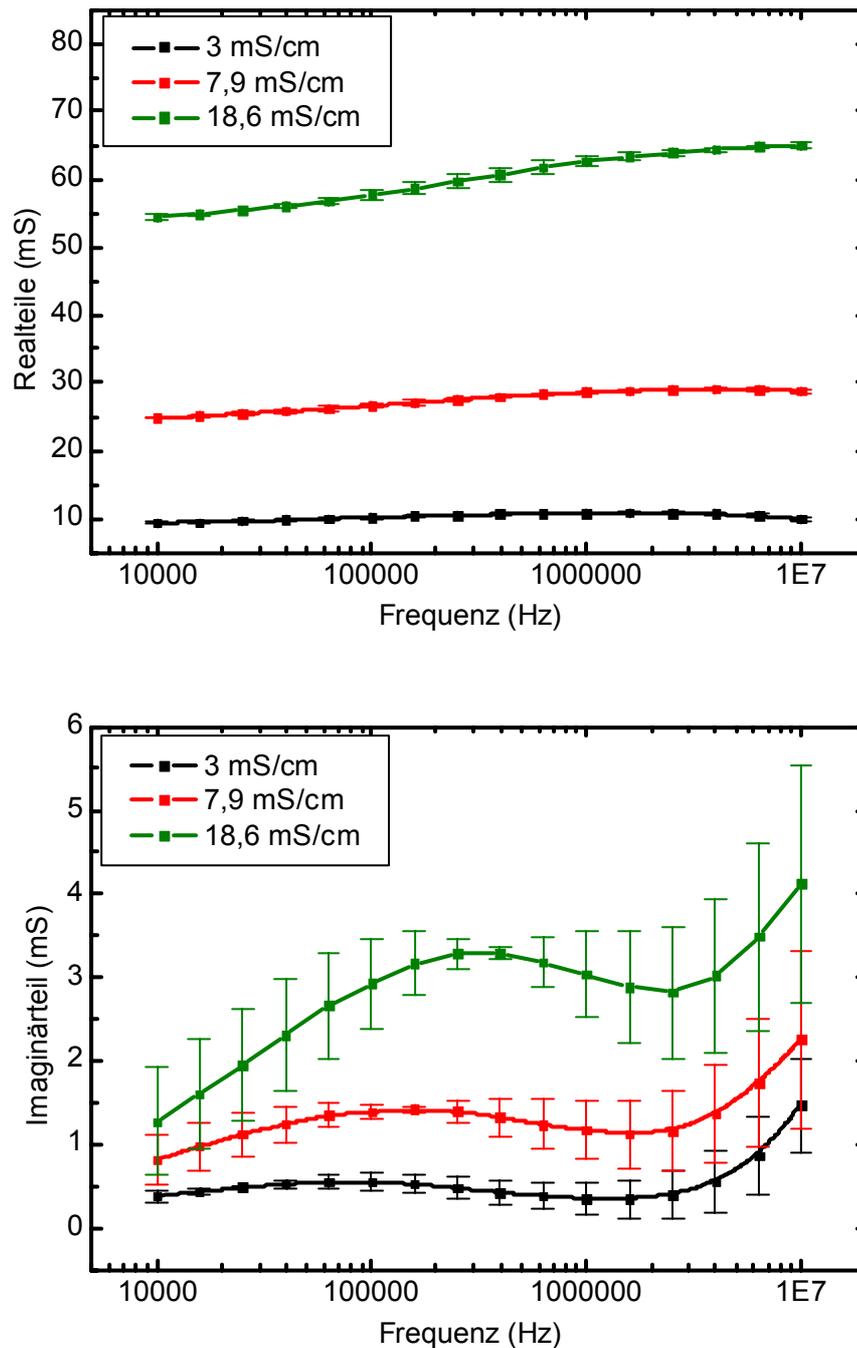


Abbildung 5.4.11. Gemessene Admittanz verschiedener KCl-Lösungen mit EIS-sw Elektroden als Funktion der Messfrequenz

Die seitenwandintegrierten Sensoren zeigten das gleiche wie zuvor beschriebene Verhalten. Jedoch deutlich ausgeprägter als bei den Sensoren EIS-V1, V4 und V5 waren der Anstieg des Realteils zu hohen Frequenzen hin und die starke Überhöhung des Imaginärteils (Abbildung 5.4.11). Des Weiteren wiesen die Messwerte der EIS-sw deutlich höhere Schwankungen auf, wie an den Fehlerbalken des Graphen in Abbildung 5.4.11 erkennbar.

Um aus den gemessenen Daten einen Zellfaktor  $k$  der einzelnen Elektrodendesigns bestimmen zu können, wurde die lineare Abhängigkeit des gemessenen Leitwertes bei 10 kHz von der jeweiligen Leitfähigkeit der KCl-Lösung bestimmt. Zur Auswertung wurde die niedrigste Messfrequenz gewählt, da bei niedrigen Frequenzen der Einfluss des teils sehr unterschiedlichen Imaginärteils am geringsten war.

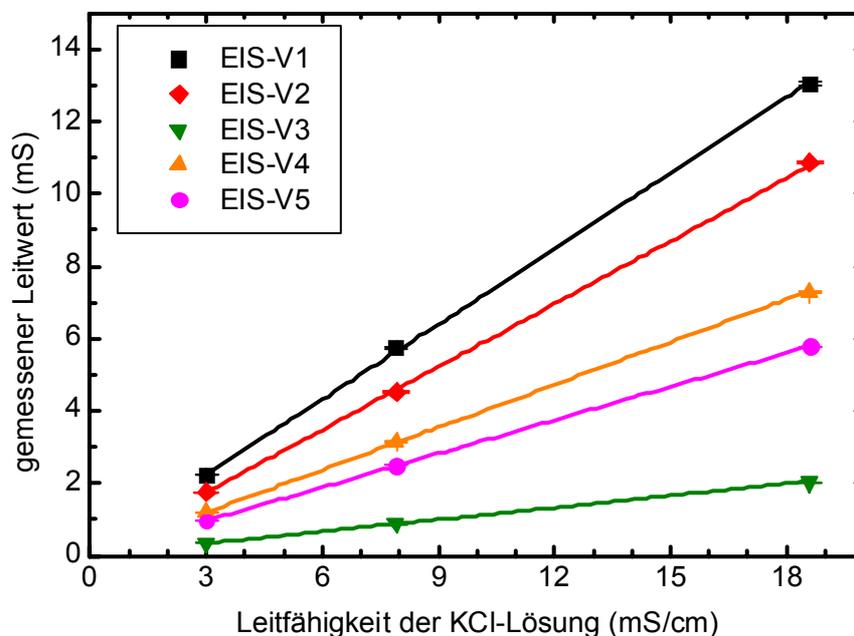


Abbildung 5.4.12. Gegenüberstellung der gemessenen Leitwerte mit den verschiedenen Elektrodendesigns in unterschiedlichen KCl-Lösungen

Trägt man diese gemessenen Leitwerte als Funktion der Lösungsleitfähigkeit auf, ergeben sich Geraden mit Steigungen, die dem Zellfaktor bzw. der Zellkonstanten des jeweiligen Designs entsprechen. Die auf diese Weise ermittelten Zellkonstanten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und den simulierten Werten aus Kapitel 5.1.2 gegenübergestellt.

Tabelle 5.4.1. Ermittelte Zellkonstanten der einzelnen Elektrodendesigns im Vergleich mit den simulierten Werten aus Kapitel 5.1.2

Elektrodendesign	Zellkonstante $k$ [cm]		Abweichung [%]
	gemessen	simuliert	
EIS-V1	0,69	0,7233	+4,8
EIS-V2	0,57	0,4914	-13,8
EIS-V3	0,11	0,1592	+44,7
EIS-V4	0,39	0,3444	-11,7
EIS-V5	0,31	0,2336	-24,46

### 5.4.7. Auswertung der Kaliumchloridmessungen

In weiteren Messungen wurden KCl-Lösungen mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten mit allen Elektrodendesigns bezüglich ihrer Admittanz gemessen. Hierbei stellten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Elektrodendesigns heraus. Es zeigten sich bei den untersuchten Designs die in Kapitel 2.4 beschriebenen Fehlermechanismen. Die Elektrodendesigns EIS-V1 (Abbildung 5.4.6), V4 (Abbildung 5.4.9), V5 (Abbildung 5.4.10) und EIS-sw (Abbildung 5.4.11) zeigten eine deutliche Überhöhung des gemessenen Imaginärteils bei Frequenzen zwischen 100 kHz und 1 MHz. Dieses Verhalten konnte durch den starken Einfluss großer paralleler Parasitärkapazitäten erklärt werden (siehe Abbildung 2.4.7). Auch die dabei auftretenden stufenförmigen Anstiege der Realteile der Admittanz stimmten mit den analytischen Fehlersimulationen aus Kapitel 2.4 überein. Am deutlichsten zeigten die Seitenwandeletroden dieses Verhalten (Abbildung 5.4.11). Die im Vergleich zu den anderen Messungen hohen Streuungen der Messwerte bei diesen Elektrodendesigns konnten mit dem Aufbau der Sensoren begründet werden. Während die bodenintegrierten Sensoren nah beieinander auf dem Wafer prozessiert wurden und damit sehr identische Schichtqualitäten aufwiesen, waren die Sensorfolien für die EIS-sw-Elektroden über den ganzen Wafer verteilt. Unterschiedliche Schichtqualitäten waren hierbei die Folge. Des Weiteren kam der wesentlich komplexere Einbau in die verwendeten MTPs hinzu (siehe Kapitel 3.4.2). Dieser führte zu einer größeren Streuung der endgültigen Elektrodeneigenschaften. Neben den in der Theorie vorhergesagten Fehlermechanismen der Imaginärteilüberhöhung konnten auch die vorausgesagten virtuellen Induktivitäten nachgewiesen werden. Das Verhalten der gemessenen EIS-V3 Sensoren zeigte genau dieses Phänomen (Abbildung 5.4.8). Wie in den Simulationen aus Abbildung 2.4.4 und Abbildung 2.4.5 bildeten sich starke negative Maxima im gemessenen Imaginärteil aus. Dieses eigentlich induktive Verhalten war ein Charakteristikum der Elektrodenform und Geometrie. Einflüsse der Zuleitungen durch entsprechende Kabelinduktivitäten auf das Messsignal konnten ausgeschlossen werden, da alle Versuche mit demselben Messaufbau durchgeführt wurden. Nur die Sensoren mit EIS-V3 Elektroden zeigten ein induktives Verhalten. Wie auch in den Simulationen waren die ausgeprägten negativen Maxima mit einem Abfall der Werte des Realteils der Admittanz verbunden (Abbildung 5.4.8). Bei den Simulationen in Kapitel 2.4 wurde gezeigt, dass dieses induktive Verhalten vor allem in den hohen Elektrodenimpedanzen im Verhältnis zur Lösungsimpedanz begründet ist. Genau dieses Verhältnis ist bei den EIS-V3 Elektroden gegeben. Durch die vergleichsweise kleinen Elektroden dieses Sensordesigns ergaben sich hohe Übergangsimpedanzen in die Lösung. Das Resultat war ein stark induktives Verhalten der Vierpunktmessanordnung (Abbildung 5.4.8). Lediglich das Design EIS-V2 zeigte ein fast ideales Verhalten. Die geometrischen wie materialspezifischen Eigenschaften der Elektroden waren in diesem Fall so, dass sich nur geringe Messfehler deutlich machten. Die unterschiedlichen Verläufe der Imaginärteile bei verschiedenen KCl-Lösungen waren ein deutlicher Indikator für eine Querempfindlichkeit des gemessenen Imaginärteils gegenüber der Leitfähigkeit der Lösung. Mit zunehmender Leitfähigkeit der KCl-Lösung stiegen auch der Imaginärteil der Admittanz und damit die gemessene Kapazität.

Bei der Auswertung der gemessenen Zellfaktoren in Abbildung 5.4.12 zeigte sich eine gute lineare Abhängigkeit des gemessenen Leitwertes und der Leitfähigkeit der KCl-Lösung. Dies bedeutete eine gleichbleibende Zellkonstante über den gesamten Leitfähigkeitsbereich von 3 mS/cm bis hin zu 19 mS/cm. Die in Tabelle 5.4.1 aufgelisteten Abweichungen der Messungen von den Werten der Simulationen aus Kapitel 5.1.2 sind teilweise sehr groß. Auch wenn die simulierten Zellkonstanten die gleichen Tendenzen aufwiesen wie die gemessenen, kam es doch zu Abweichungen von über 40%. Dies lag in erster Linie an der vereinfachten Einbindung der Elektroden als einfache Äquipotenzialflächen in der Simulation, ohne die Übergangsimpedanzen der galvanischen Kontakte zu berücksichtigen. Diese hatten aber, wie aus den Überlegungen aus Kapitel 2.4 deutlich wurde, trotz der verwendeten Vierpunktmessungen einen Einfluss auf das messbare Signal. Dieser äußerte sich in einer Verschiebung des messbaren Leitwertes und damit auch in einer Abweichung des Zellfaktors bezüglich der idealisierten Messung.

### 5.4.8. Messungen der Lösungskapazitäten mit Vierpunktsensoren

Eine andere in dieser Arbeit wichtige Größe war die Lösungskapazität. Diese wurde unmittelbar aus dem Imaginärteil der gemessenen Admittanz ermittelt. Die Kapazitäten, die sich aus den Messungen in der KCl-Lösung mit 8 mS/cm Leitfähigkeit ergaben, wurden für jedes Sensordesign berechnet und einander gegenübergestellt.

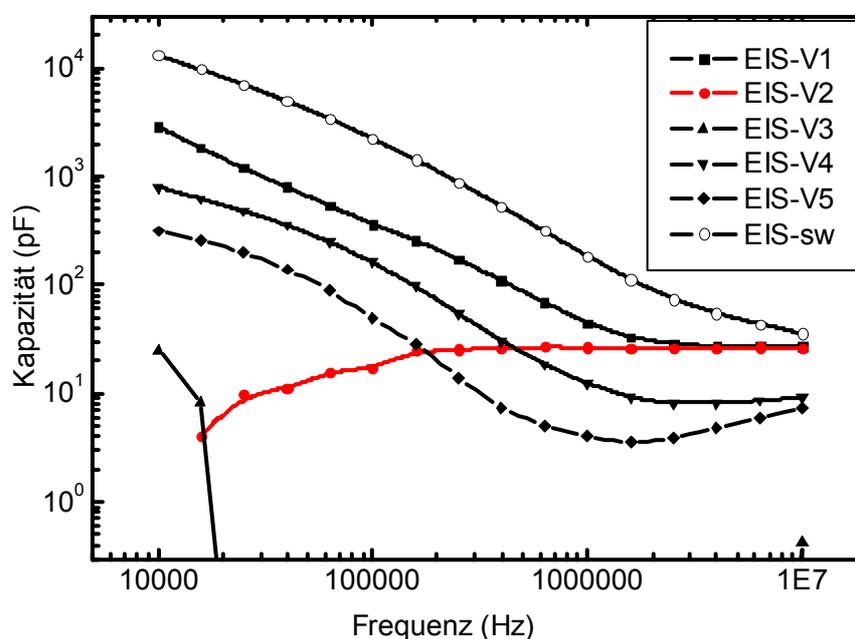


Abbildung 5.4.13. Berechnete Kapazitäten aus den Messungen in den KCl-Lösungen mit einer Leitfähigkeit von 8 mS/cm

Die Gegenüberstellung der Lösungskapazitäten, gemessen mit den verschiedenen Sensordesigns (Abbildung 5.4.13), zeigte die starken Auswirkungen der unterschiedlichen Imaginärteilverläufe (Abbildung 5.4.6 bis Abbildung 5.4.10) auf die messbare Kapazität. Die

Designs EIS-V1, -V4, -V5 und -sw zeigten einen starken Anstieg der Kapazität zu niedrigen Frequenzen hin. Das Elektrodendesign von EIS-V3 ließ keine kapazitive Auswertung der Messsignale zu, da der gemessene negative Imaginärteil negative Kapazitäten bzw. Induktivitäten zur Folge hätte. Das Design EIS-V2 hingegen wies einen sehr konstanten Kapazitätswert über den Frequenzbereich von 200 kHz bis 10 MHz auf (siehe rote Linie in Abbildung 5.4.13). Auch bei KCl-Lösungen mit anderen Leitwerten war ein konstanter Wert der Kapazität in diesem Frequenzbereich erkennbar.

Der bei den meisten Designs erkennbare Anstieg der Kapazität bei niedrigen Frequenzen wurde bereits von Davey und Kell beschrieben (Davey 1998a; Davey 1998b), die das Phänomen mit der Elektrodenpolarisation erklärten und ein mathematisches Modell entwickelten, mit dessen Hilfe sie die Messungen korrigieren konnten (Kapitel 2.4). Die von Davey und Kell verwendete Elektrodenkonfiguration war vergleichbar mit dem in dieser Arbeit getesteten EIS-V5 Design. Jedoch waren Abstand, Länge und Breite der Elektroden unterschiedlich. Die „Biomass Monitor Probes“ von Aber Instruments bestanden aus einem Edelstahl Zylinder, an dessen Ende ein Probenkopf aus Polyetheretherketon (PEEK) mit integrierten Platinelektroden montiert war. Die Verwendung von PEEK ermöglichte eine Autoklavierung des Gesamtsystems.

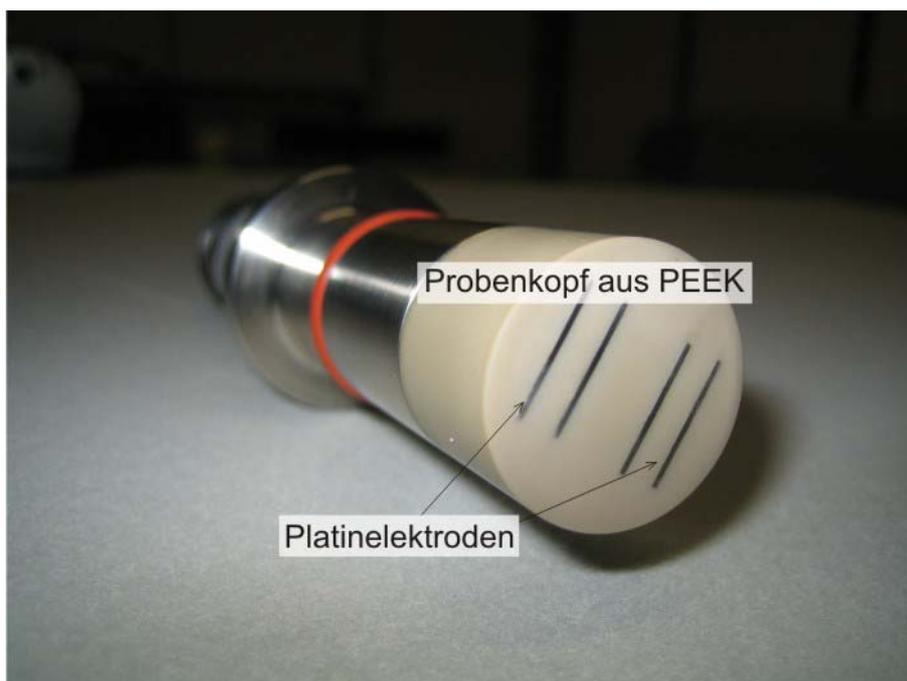


Abbildung 5.4.14. Foto eines Probenkopfes eines von Davey und Kell verwendeten Biomass Monitor Systems

Abbildung 5.4.14 zeigt ein Foto des beschriebenen Probenkopfes. Die Versuche, die ermittelten Kapazitäten mit Hilfe des „Power Laws“ zu fitten, zeigten, dass die meisten Designs nicht dem Modell von Davey und Kell entsprachen. Lediglich die Messwerte des EIS-V4 Designs konnten in dem von Davey und Kell untersuchten Frequenzbereich mit der dem Modell des „Power Laws“ zugrunde liegenden Gleichung beschrieben werden. In der folgenden Abbildung 5.4.15 ist die Fitfunktion des „Power Laws“ als durchgezogene Linie dargestellt.

Die Messwerte sind als Rechtecke in dem Graphen erkennbar. Das Phänomen der Elektrodenspolarisation, von Davey und Kell bereits beschrieben, wurde von diesen in einem Frequenzbereich von 200 kHz bis 10 MHz untersucht (Davey 1998a; Davey 1998b). Messpunkte in diesem Frequenzbereich sind als ausgefüllte Rechtecke dargestellt. Der für diese Arbeit verwendete Messbereich reichte jedoch über vier Dekaden bis hinunter zu 10 kHz. Messpunkte, die einen von Davey und Kell bislang unberücksichtigten Frequenzbereich beschreiben, sind als leere Rechtecke dargestellt.

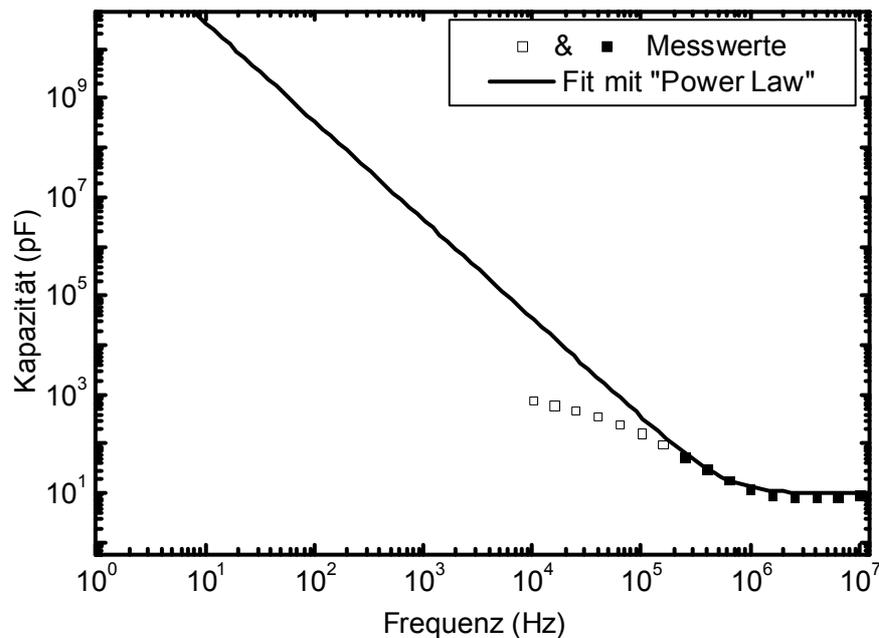


Abbildung 5.4.15. Gefittete Werte der gemessenen Kapazität mit EIS-V4 mit Hilfe des von Davey und Kell postulierten „Power Laws“

In Abbildung 5.4.15 ist deutlich zu erkennen, dass die Fitkurve des „Power Laws“ die Messwerte in dem von Davey und Kell beschriebenen Frequenzbereich sehr gut nachbildet. Bei Messungen unterhalb von 200 kHz waren die Abweichungen der Messwerte von dem Verlauf der Fitfunktion jedoch deutlich erkennbar.

### 5.4.9. Auswertung der gemessenen Lösungskapazitäten

Die Untersuchungen der rein kapazitiven Messsignale bestätigten zunächst nur die Beobachtungen, die schon bei den gemessenen Imaginärteilen gemacht werden konnten. Die Elektrodendesigns mit einer stark ausgeprägten Überhöhung im Imaginärteil zeigten einen exponentiellen Anstieg der Kapazität zu niedrigen Frequenzen hin (siehe Abbildung 5.4.13). Dies galt für die Elektrodendesigns EIS-V1, -V4, -V5 und -sw. Da die EIS-V3 Sensoren durch die negativen Imaginärteile keine kapazitive Auswertung zuließen, konnten keine Werte ermittelt werden. Besonders stach jedoch die Messung mit den EIS-V2 Sensoren heraus. Die mit diesen Sensoren ermittelten Kapazitäten waren über einen weiten Frequenzbereich

hin konstant. Das Sensordesign bot damit ein nahezu ideales Kapazitätsmessverhalten in dem zu untersuchenden Frequenzbereich von 200 kHz bis 10 MHz.

Die bei den meisten Elektroden sichtbaren kapazitiven Anstiege zu niedrigen Frequenzen hin wurden bereits von Davey und Kell in der Literatur beschrieben. Das von ihnen eingeführte Modell der Elektrodenpolarisation wurde mit Hilfe des „Power Law“ mathematisch beschrieben. Die Vorstellung hinter diesem Modell ist eine Aufladung der galvanischen Kontakte, die die Messung beeinflussen kann. Die aus diesen Überlegungen resultierende Gleichung (21) wurde verwendet, um die Messwerte zu korrigieren.

In Abbildung 5.4.15 wurde dieses „Power Law“ dazu verwendet die mit einem EIS-V4 Sensor ermittelten Kapazitätswerte zu fitten. Es war deutlich zu erkennen, dass für den von Davey und Kell untersuchten Frequenzbereich von 200 kHz bis 10 MHz das von ihnen eingeführte Modell eine gute Näherung der Messwerte darstellte (Abbildung 5.4.15). Umso eindeutiger waren jedoch die Abweichungen unterhalb der von Davey und Kell untersuchten Frequenzen. Das stark unterschiedliche Verhalten der Kapazitätswerte der einzelnen Elektroden designs untereinander zeigte die eindeutige Geometrieabhängigkeit des Effektes der Elektrodenpolarisation. Die von Davey und Kell eingeführte Näherungsgleichung (21) der Elektrodenpolarisation war auf die anderen untersuchten Elektroden designs nicht anwendbar. Schon die unterschiedlichen Steigungen der in Abbildung 5.4.13 aufgetragenen Kapazitätswerte machte deutlich, dass der Zusammenhang von Kapazität und Frequenz keinesfalls immer dem von Davey und Kell postulierten Verhältnis  $C \sim f^2$  entsprechen muss. Das eingeführte „Power Law“ kann daher nur eine Beschreibung der von Davey und Kell untersuchten Messsonde sein, und stellt kein allgemein gültiges Gesetz der Vierpunktmessung dar.

Somit ließ sich zusammenfassend für alle Untersuchungen an den getesteten KCl-Lösungen festhalten, dass die Elektrodengeometrie bei der Vierpunktmessung vor allem für die kapazitive Auswertung der Messsignale eine zentrale Rolle spielt. Neben dem eigentlichen Zellfaktor  $k$  der Elektrodengeometrie wird mit der Wahl der Elektrodenform und der Lage der Elektroden zueinander festgelegt, inwieweit Phänomene der Elektrodenpolarisation oder virtueller Induktivitäten das Messsignal beeinflussen. Die Form der EIS-V2 Sensoren zeigte in dem zu untersuchenden Frequenzbereich von 200 kHz bis 10 MHz über einen weiten Leitfähigkeitsbereich (3 mS/cm bis 19 mS/cm) eine nahezu frequenzunabhängige Kapazität. Der ähnliche Aufbau der Elektroden im Vergleich zu den EIS-V1 Elektroden gewährleistete ebenfalls hervorragende Schütteleigenschaften während der Fermentationen.

#### **5.4.10. Ergebnisse der Messungen an definierten Zellkulturen**

Bei den Messungen in konzentrierten Zelllösungen sollte vor allem die Frequenzabhängigkeit der gemessenen Admittanz untersucht werden. Die folgende Abbildung zeigt die Frequenzverläufe der Kapazitäten und der Leitwerte. Gemessen wurden hierzu zwei verschiedene Hefekonzentrationen von 11 g/l und 19 g/l.

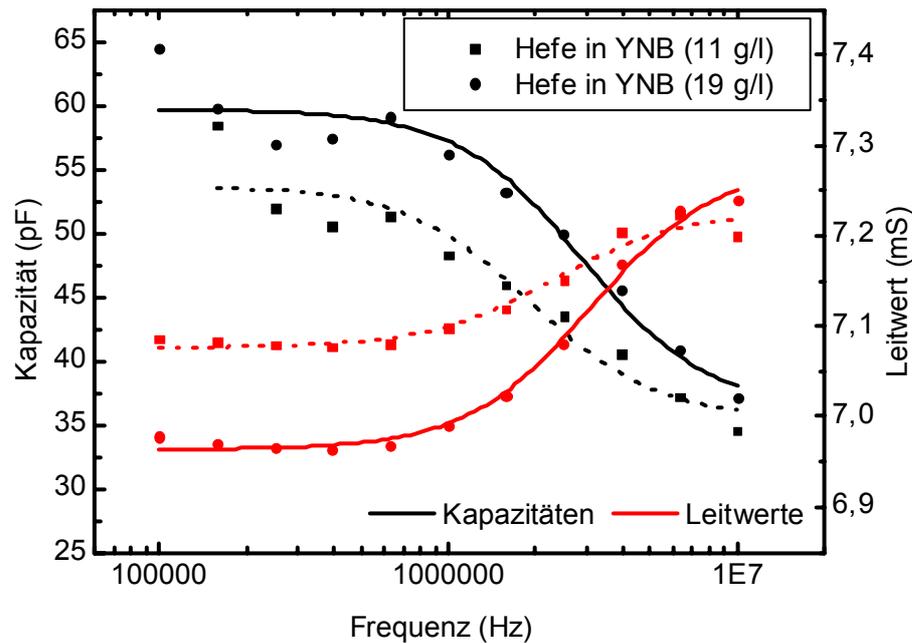


Abbildung 5.4.16. Gemessenes Frequenzverhalten von Hefelösungen im Vergleich zu reinen KCl-Lösungen mit einem EIS-V2

Die in Abbildung 5.4.16 gezeigten Graphen zeigen den stufenförmigen Verlauf der Kapazität und des gemessenen Leitwertes. Während die Messung in reiner KCl-Lösung mit einer EIS-V2 Sensor eine nahezu konstante Kapazität über den gesamten Frequenzbereich aufwies (Abbildung 5.4.13), stiegen die Kapazitäten für die Zelllösungen zu niedrigen Frequenzen hin an. Anders zeigte sich das Verhalten der Leitwerte. Diese stiegen zu höheren Frequenzen hin an. Die Höhe beider Stufen, sowohl der des Leitwertes als auch der der Kapazität, wuchs mit zunehmender Biomasse. Die in Abbildung 5.4.16 dargestellten Messpunkte wurden mit Gleichungen der einfachen Debye-Relaxation gefittet (Gleichungen (6) und (7)). Alle Kurven zeigten eine perfekte Übereinstimmung mit den jeweiligen Messpunkten. Als charakteristische Frequenz für die  $\beta$ -Dispersion wurden zirka 2,9 MHz ermittelt. Die Messungen der Kapazität bei unter 200 kHz Messfrequenz zeigten deutliche Abweichungen zu den Fitfunktionen. Diese Kapazitätswerte waren alle erhöht und entsprachen nicht mehr der erwarteten Kurvenform der  $\beta$ -Dispersion.

Das Frequenzverhalten der gemessenen E.Coli Kulturen wurde ebenfalls untersucht. Als Kulturmedium diente das komplexe TB-Medium. Um eine Auflösung der Frequenzeigenschaften zu gewährleisten, mussten hochkonzentrierte Zellkonzentrationen eingestellt werden. Gemessen wurden daher TB-Lösungen mit 49 g/l und 90 g/l lebender E.Coli-Kulturen. Auch bei diesen Messungen wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Gleichungen einer einfachen Debye-Relaxation gefittet (Gleichungen (6) und (7)). Die Messergebnisse und Fits sind in Abbildung 5.4.17 dargestellt.

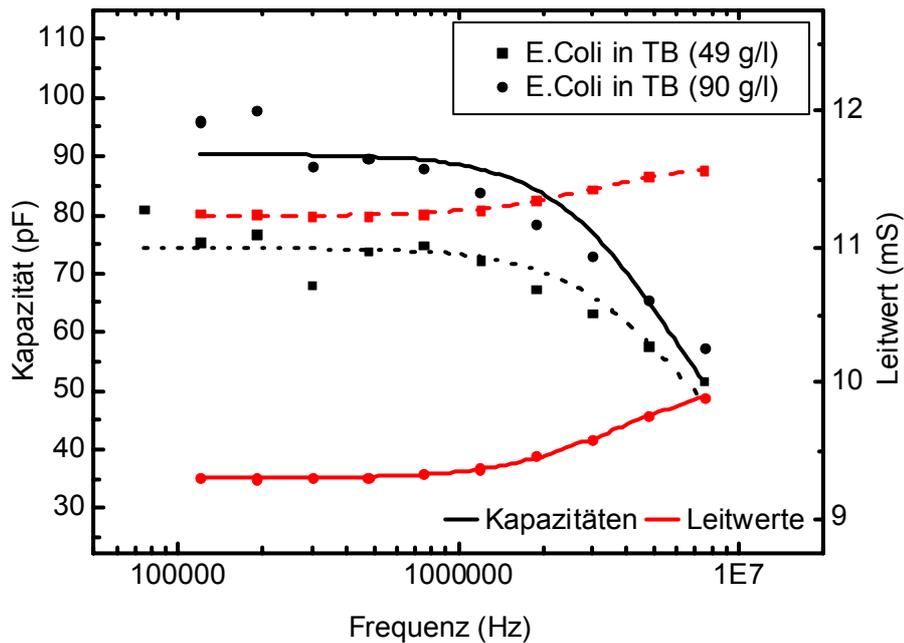


Abbildung 5.4.17. Gemessenes Frequenzverhalten von *E.Coli* in komplexem TB-Medium im Vergleich zu reinen KCl-Lösungen mit einem EIS-V2

Man kann auch hier wie in Abbildung 5.4.16 die charakteristischen Verläufe von Kapazität und Leitfähigkeit erkennen. Im Gegensatz zu den Messungen an Hefezellen zeigten die Kapazitätswerte bei diesen Messungen keine extreme Überhöhung im niedrigen Frequenzbereich. Bei dem Versuch die Kapazitätswerte mit der Funktion der normalen Debye-Relaxation zu fitten, zeigten sich jedoch große Abweichungen vor allem im Bereich der  $\beta$ -Dispersion selbst. Die Messpunkte durchlaufen eine wesentlich flachere Kurve, als die Funktion der Debye-Relaxation dies beschreiben kann. Auch das Verhalten der gemessenen Leitwerte wich von den Messungen an den Hefezellen ab. Während die Leitwerte bei verschiedenen Hefekonzentrationen in YNB-Medium bei höheren Frequenzen einen nahezu identischen Wert aufwiesen (Abbildung 5.4.16), so unterschieden sich die gemessenen Leitwerte der *E.Coli*-Konzentrationen auch im hohen Frequenzbereich deutlich voneinander (Abbildung 5.4.17). Die angedeutete Stufe des Leitwertes im Frequenzspektrum war wie bei den Hefen höher, je größer die Zellkonzentration eingestellt wurde.

Um die Unterschiede der verschiedenen mathematischen Beschreibungen vergleichen zu können, wurden die gemessenen Kapazitätswerte der *E.Coli*-Kulturen auch mit dem erweiterten Modell verglichen (Gleichung (13)). Anhand der Messungen in der Zelllösung mit einer Biomasse von 90 g/l *E.Coli* sind die Unterschiede der verschiedenen Fittings dargestellt.

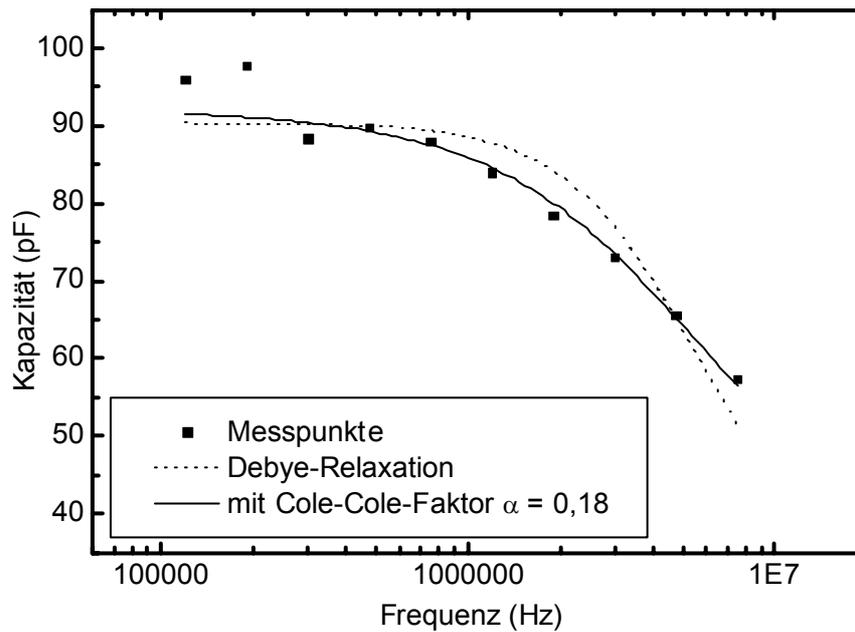


Abbildung 5.4.18. Fitting der gemessenen Kapazitätswerte einer *E. Coli* Zelllösung mit 90 g/l Biomasse mit Hilfe der einfachen Debye-Relaxation im Vergleich mit der erweiterten Beschreibung durch Einführung des Cole-Cole-Faktors

Bei genauerer Betrachtung des kapazitiven Frequenzverhaltens der vermessenen *E. Coli* Kultur ist die Ungenauigkeit der Beschreibung durch eine einfache Debye-Relaxation offensichtlich (Abbildung 5.4.18). Wie bereits erwähnt, ließ die Formel der Debye-Relaxation (Gleichung (6)) keine Beschreibung des flachen Verlaufs der Messwerte zu. Die durch den Cole-Cole-Faktor erweiterte Formel hingegen lieferte eine sehr gute Beschreibung des gemessenen kapazitiven Frequenzverlaufs. Es wird aus den Messungen wie aus der Fitfunktion deutlich, dass der verwendete Frequenzbereich für die Messungen der vollständigen  $\beta$ -Dispersion nicht ausreichend war. Als charakteristische Frequenz der  $\beta$ -Dispersion wurden zirka 5,7 MHz ermittelt.

#### 5.4.11. Auswertung der Frequenzspektren

Die Messungen in konzentrierten Zelllösungen bestätigten die in Kapitel 2.1.1 beschriebene Theorie. Die frequenzabhängigen Kurvenverläufe der Kapazität und des Leitwertes bei den Messungen in Hefekulturen zeigten ein nahezu perfektes Debye-Verhalten (Abbildung 5.4.16). Die gute Beschreibung der Messkurve mit Hilfe der einfachen Debye-Relaxation lag an der Form der Hefezellen. Diese bildeten eine Kugelform aus und wiesen nur sehr geringe Größenvarianzen auf. Je größer die Zellkonzentration gewählt wurde, desto höher war die messbare Dispersionsstufe. Wie aus der Literatur bekannt, wurde die Dispersion bei Hefen bis zu einer Frequenz von 10 MHz fast vollständig durchlaufen.

Anders präsentierten sich die Messungen an konzentrierten E.Coli-Lösungen. Bei den Messungen an E.Coli zeigte sich ein deutlich flacherer Verlauf der Dispersionsstufe als bei den untersuchten Hefezellen. Eine Beschreibung des kapazitiven Frequenzverhaltens mittels der einfachen Debye-Relaxation war daher nicht möglich (Abbildung 5.4.17). Durch die in der Theorie beschriebene Erweiterung der Relaxationsgleichung mit dem Cole-Cole-Faktor  $\alpha$  konnte der frequenzabhängige Kurvenverlauf dargestellt werden (Abbildung 5.4.18). Auch hier bestätigten die Messungen wieder die Theorie. Durch die stabähnliche Form der kleineren E.Coli Zellen kam es zu einer größeren Streuung der in der Lösung vorhandenen effektiven Zellradien. Diese Streuung führte zu einer leichten „Verschmierung“ der  $\beta$ -Dispersionsstufe und damit zu einem längeren und flacheren Verlauf im Frequenzspektrum. Genau dieses Verhalten konnte mit der in der Theorie eingeführten Gleichung (14) beschrieben werden.

Zu beiden vorgestellten Messungen an konzentrierten Zelllösungen aus Abbildung 5.4.16 und Abbildung 5.4.17 muss angemerkt werden, dass die untersuchten Zellkonzentrationen nur durch ein Aufzentrifugieren der zuvor fermentierten Zelllösung erreicht wurden. Während einer Fermentation im Batch-Ansatz, also ohne Regelung des pH-Wertes oder Zudosierung weiterer Nährlösung, sind solche Zellkonzentrationen nicht zu erreichen. Je nach Zellkultur und Medium können bei den in dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen Zellkonzentrationen von maximal 10 g/l bei Hefe und 15 g/l für E.Coli erreicht werden. Aufgrund der geringen Zellkonzentrationen bei den durchgeführten Fermentationen war eine Auflösung des Frequenzspektrums meist zu verrauscht und nicht aussagekräftig.

#### **5.4.12. Fermentationsmessungen**

Zur Beobachtung erster einfacher Fermentationsprozesse wurden wieder die Real- und Imaginärteile der Admittanz in einem Frequenzbereich von 100 kHz bis 10 MHz aufgenommen. Messungen von Hefen im YNB-Minimalmedium zeigten eine saubere Wachstumskurve. Als Beispiel für eine solche Messung ist in der folgenden Abbildung 5.4.19 eine Messung mit einem EIS-V1 Sensor bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min und einem Füllvolumen von 200  $\mu$ l gezeigt. Als Referenzsignal diente eine Wanne mit reinem Medium.

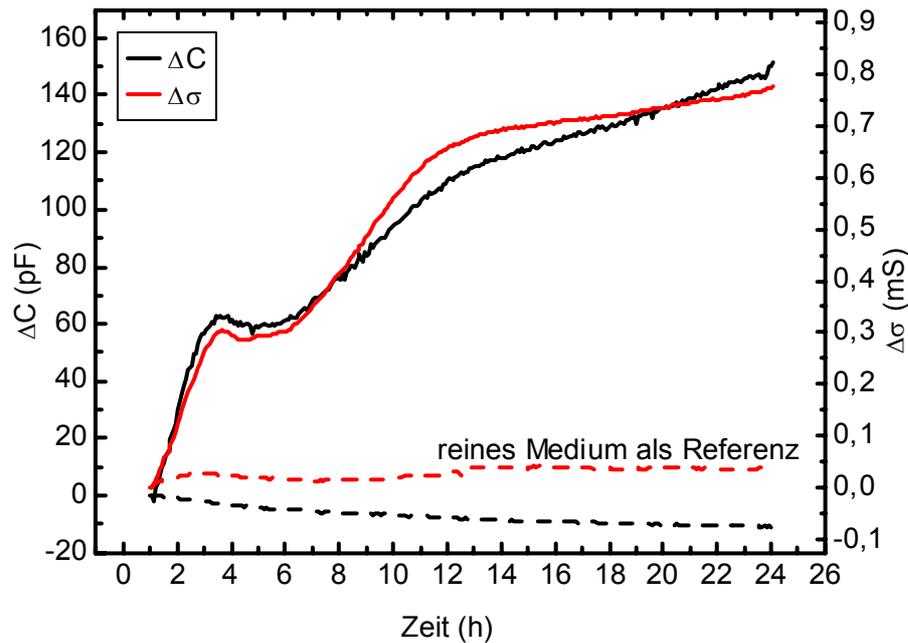


Abbildung 5.4.19. Messdaten einer Hefefermentation in YNB-Medium mit einem EIS-VI Sensor

Die in Abbildung 5.4.19 gezeigten Kurven beschreiben die Änderung der Kapazitätsdifferenz  $\Delta C$  und der Leitwertdifferenz  $\Delta \sigma$ . Zur Berechnung der Differenzwerte wurde die Kapazität bei 10 MHz ermittelt, von der gemessenen Kapazität bei 400 kHz abgezogen und der Leitwert bei 100 kHz von dem bei 10 MHz abgezogen. Es wurden also die Höhen der in Abbildung 5.4.16 dargestellten Stufen ermittelt und als Messgröße während der Fermentation verwendet. Deutlich zu erkennen war der Anstieg beider Werte in der Wanne mit Hefezellen, während die Messwerte in reinem Medium nahezu konstant blieben. Der Verlauf der kapazitiven Differenz wies auch nach 14 Stunden noch einen deutlichen Anstieg auf. Beide Indikatoren für die Biomasse, sowohl Kapazitätsdifferenz wie auch die Leitwertdifferenz, zeigten ein absolut identisches Verhalten. Während die Differenz der Kapazität weiter deutlich anstieg, erhöhte sich die Leitwertdifferenz nach 13 Stunden nicht mehr nennenswert.

Fermentationen von *Hansenula Polymorpha* wurden auch in komplexen Medien durchgeführt. Exemplarisch wird im folgenden Abschnitt eine Messung von Hefezellen in YPG-Medium gezeigt. Für diese Versuche wurden neben dem Medium als Referenz drei Wannen mit Zelllösung gefüllt. Die Startkonzentration der Zellen war in allen Fällen identisch, lediglich die Füllmenge variierte. Es wurden Volumina von 100  $\mu\text{l}$ , 150  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  eingestellt und vermessen. Auch für diese Versuche wurde eine Schüttelfrequenz von 700 U/min eingestellt.

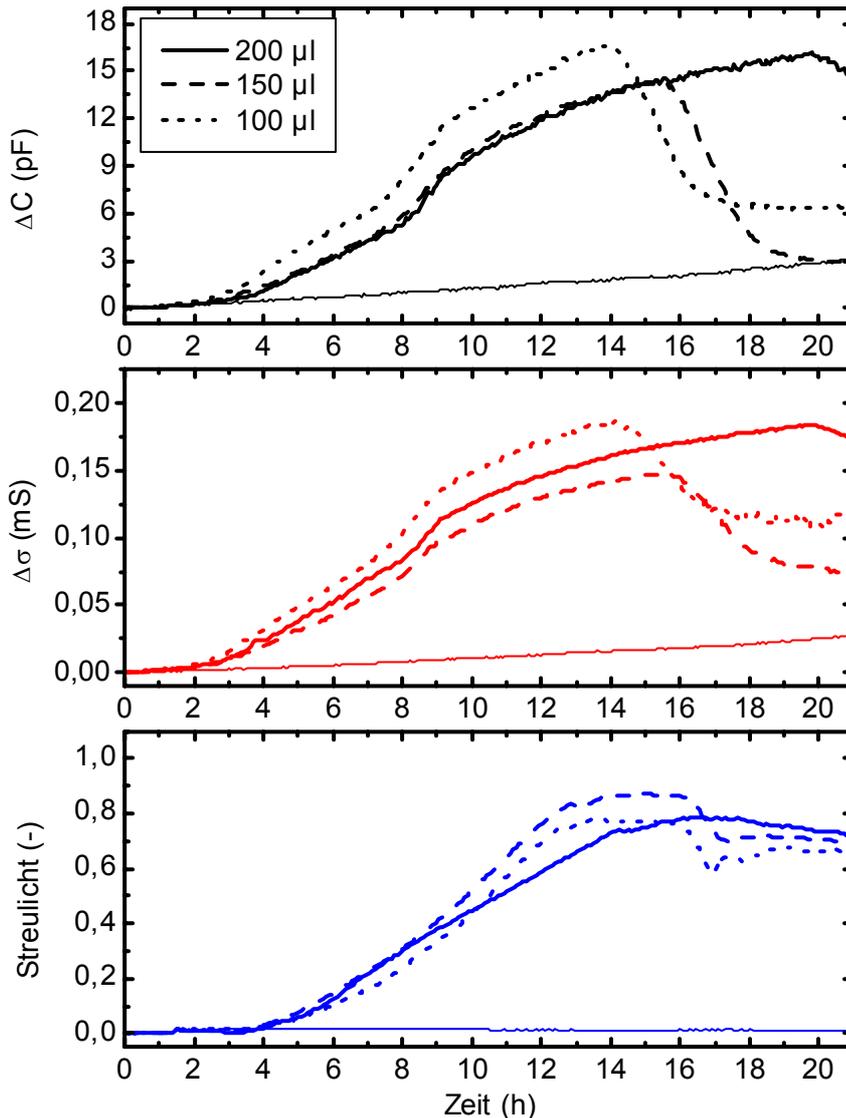


Abbildung 5.4.20. Messdaten einer Hefefermentation in komplexem YPG-Medium mit einem EIS-V2 Sensor und dem Streulichtsignal als Referenz mit unterschiedlichen Füllvolumina der Wannen

Die dargestellten Messergebnisse in Abbildung 5.4.20 zeigen den Zusammenhang der elektrischen Messgrößen mit dem Signal der Streulichtmessung. Im Gegensatz zu den Messungen von Hefe in dem Minimalmedium YNB (Abbildung 5.4.19) wurden bei dieser Messung deutlich niedrigere Werte für die Kapazitäts- und Leitwertdifferenz während der Fermentation ermittelt. Während die Messungen in YNB mit dem EIS-V1 Sensor Kapazitätsdifferenzen von bis über 100 pF ergaben wurden in YPG mit dem EIS-V2 Sensor nur Maximalwerte von 16 pF gemessen. Ein weiterer deutlicher Unterschied wurde durch die Rückgänge der Messsignale markiert. Sowohl die gemessene Leitwertdifferenz als auch die Differenz der Kapazität fielen bei einem Füllvolumen von 100 μl schon nach 14 Stunden wieder deutlich ab. Dieses Abfallen der Signale war bei einem Füllvolumen von 150 μl erst nach zirka 16 Stunden und bei 200 μl Füllvolumen sogar erst nach 20 Stunden erkennbar. Ein entsprechendes Einknicken der Messwerte war auch in den Streulichtsignalen sichtbar, aber

deutlich geringer ausgeprägt. Insgesamt ließ sich in allen Messungen erkennen, dass die Fermentationen bei geringerem Füllvolumen schneller ablaufen.

Manche Messungen ließen keine Interpretation der Signale bezogen auf Biomasse oder Stoffwechsel zu. Eine solche Messung ist in Abbildung 5.4.21 dargestellt.

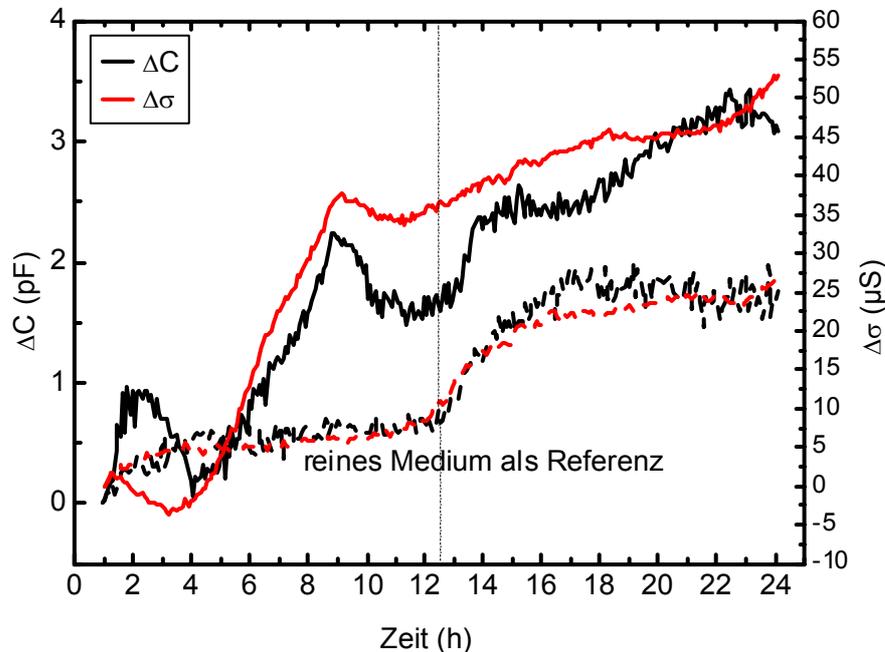


Abbildung 5.4.21. Messdaten einer Hefefermentation in komplexem YPD-Medium mit einem EIS-VI Sensor

Die Messungen aus Abbildung 5.4.21 zeigten nur einen minimalen Anstieg in den Signalen der Kapazitäts- und Leitwertsdifferenz. Auch wenn ein leichtes Wachstum zwischen 4 und 8 Stunden Fermentationszeit zu erkennen war, so waren die Messsignale von  $\Delta C = 2$  pF und Leitwertsdifferenz  $\Delta\sigma = 40$   $\mu\text{S}$  sehr gering und gingen fast im Rauschen der Messung unter. Besonders auffällig bei dieser Messung war der deutliche Anstieg des Referenzsignals des reinen YPD-Mediums. Nach zirka 12,5 Stunden Fermentationszeit stiegen die Signale im reinen Medium spontan an und näherten sich einem höheren Sättigungswert. Auch die zunächst wieder leicht abgefallenen Signale der Zelllösung stiegen ab diesem Zeitpunkt wieder an.

Wie bereits zuvor beschrieben wurden auch Fermentationsversuche mit *Escherichia Coli* in komplexem TB-Medium durchgeführt. In den folgenden Abschnitten werden Messungen in dieser Kulturlösung gezeigt und beschrieben. Die Fermentationen wurden alle bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 700 U/min durchgeführt. Es wurden auch hier unterschiedliche Füllvolumina der Wannen miteinander verglichen. Als Referenzsignal diente wieder die Streulichtmessung.

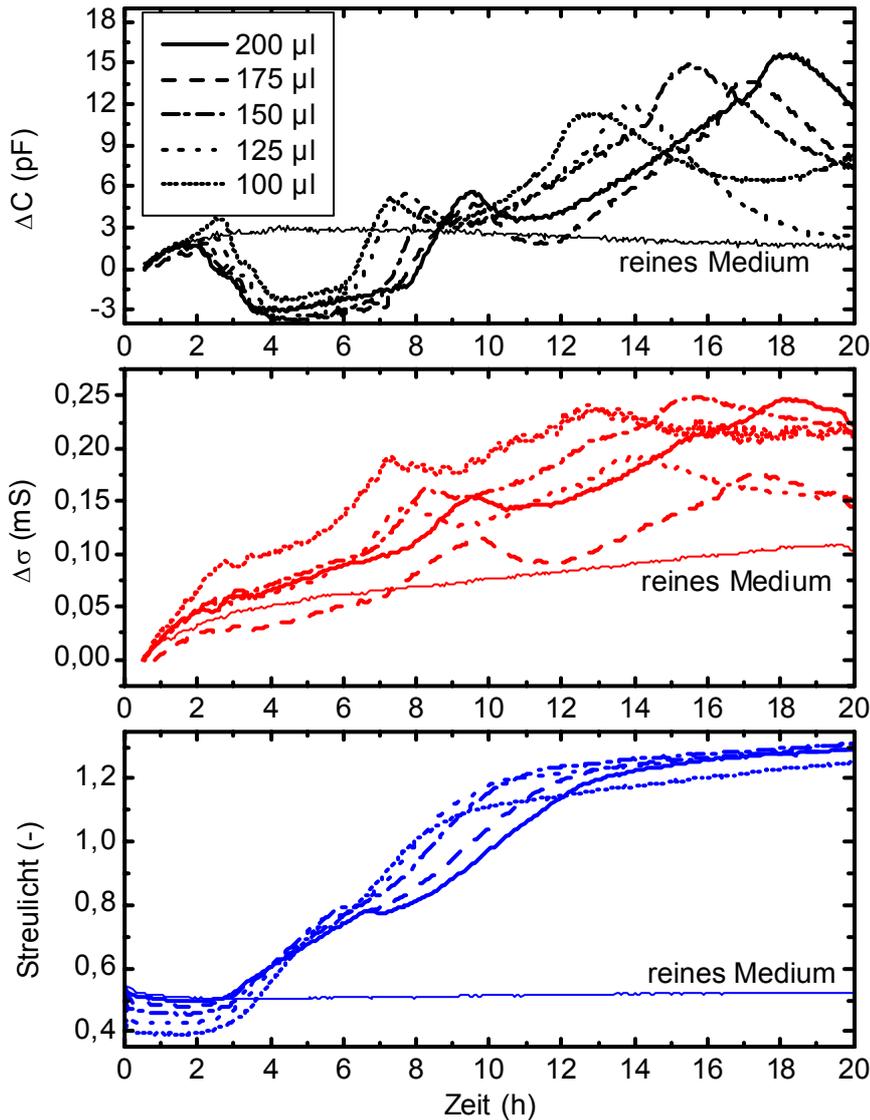


Abbildung 5.4.22. Messdaten einer Fermentation von *E. Coli* in komplexem TB-Medium mit einem *EIS-V2* Sensor

Abbildung 5.4.22 zeigt die gemessenen Verläufe der Kapazitätsdifferenz, der Leitwertsdifferenz und des Streulichtes. Während die Signale der Streulichtmessung die typischen Wachstumsverläufe anzeigten, wiesen die elektrischen Signale deutlich andere Verlaufsformen auf. Nach zirka zwei Stunden Fermentationszeit war bereits ein leichter Anstieg in den Kurven des Streulichtes erkennbar. Die Signale der Leitwertsdifferenz unterschieden sich nur gering von dem Referenzsignal aus der Wanne, die mit reinem Medium gefüllt war. Die Kapazitätsdifferenz hingegen sank sogar in den ersten vier Stunden um über 3 pF um dann wieder zirka 2 Stunden lang leicht zu steigen. Bei sechs Stunden Fermentationszeit knickte das Streulichtsignal kurz ein, um danach wieder schnell anzusteigen. Genau zu diesem Zeitpunkt begannen auch die Differenzwerte des Leitwertes und der Kapazität stark zu steigen. Nach dreizehn Stunden haben alle Streulichtsignale ihren quasistationären Endwert erreicht. Auch wenn sich ab diesem Zeitpunkt die Werte des Streulichtsignals noch leicht erhöhten, kam es zu keinen nachhaltigen Veränderungen mehr im Signalverlauf. Anders in den Signalen

der elektrischen Messgrößen. Nachdem beide Differenzwerte im Zeitbereich von 7 bis 10 Stunde der Fermentationszeit lokale Maxima aufwiesen und bis zu 12 Stunden wieder einen leichten Rückgang verzeichneten, bildeten sich nach dieser Zeit erneute Maxima aus. Das zeitliche Erscheinen dieser charakteristischen Punkte der Messkurve folgte dem eingestellten Füllvolumen der Wannen. Je weniger Flüssigkeit in einer Wanne war, desto früher wurden die einzelnen Phasen des Messsignals durchlaufen.

### 5.4.13. Auswertung der Fermentationsmessungen

Dennoch zeigten die untersuchten Sensoren sehr gute Eigenschaften bei der Online-Messung während einer Fermentation. Die gemessenen Werte der Kapazitäts- und Leitwertdifferenzen bei einer Fermentation in YNB-Medium zeigten das erwartete Zellwachstum (Abbildung 5.4.19). Besonders auffällig an den Messungen waren jedoch die extrem hohen Kapazitätsdifferenzen und der weitere deutliche Anstieg dieser Werte, nachdem die Leitwertdifferenzen nur noch geringe Veränderungen aufwiesen. Während der Fermentation wurden Kapazitätsdifferenzen von mehr als 140 pF gemessen. Verglichen mit den Werten aus Abbildung 5.4.16 würden diese hohen Kapazitätswerte auf extreme Zellkonzentrationen schließen lassen. Der Grund für diese hohen Messwerte ist in Abbildung 5.4.13 zu erkennen. In den Untersuchungen der gemessenen Kapazitätswerte zeigte sich, dass EIS-V1 Sensoren einen Effekt aufweisen, der mit der von Davey und Kell beschriebenen Elektrodenpolarisation zu vergleichen ist. Bei niedrigen Frequenzen unter 1 MHz kommt es zu einer zusätzlichen Erhöhung des Kapazitätssignals. Diese Überhöhung überlagert sich mit der gemessenen  $\beta$ -Dispersion der Zellen und hängt stark von der Leitfähigkeit des Mediums ab. Dies führte zu deutlich höheren Differenzwerten der Kapazität, als sie die einfache  $\beta$ -Dispersion hätte hervorrufen können. Dies erklärt auch den weiteren Anstieg der Kapazitätsdifferenz am Ende der Fermentation. Hier führte eine weitere Veränderung der Lösungsleitfähigkeit zu einem anhaltenden Anstieg des Signals. Die Verwendung beider Biomasseindikatoren, die Kapazitätsdifferenz und die Leitwertdifferenz, gaben jedoch einen sehr präzisen Verlauf der Biomasseentwicklung wieder. Neben den Messungen in künstlichen Minimalmedien wie YNB wurden auch komplexe Hefemedien untersucht. Bei diesen Medien sind neben Salzen und chemischen Puffern auch Hefeextrakte vorhanden. Wie bereits von Schwan et al. gezeigt, können auch biologische Makromoleküle wie Aminosäuren und Proteine eine  $\beta$ -Dispersion aufweisen (siehe Tabelle 2.1.1). Daher war bei den Messungen während einer Fermentation speziell in komplexen Medien mit Querempfindlichkeiten auf eben diese Moleküle zu rechnen. Die in Abbildung 5.4.20 gezeigten Messkurven während einer Hefefermentation in komplexem YPG-Medium korrespondierten dennoch sehr gut mit dem gemessenen Referenzsignal des Streulichts (siehe Abbildung 5.4.20). Durch die Verwendung eines EIS-V2 Sensors zeigten sich keine überhöhten Kapazitätsdifferenzen aufgrund von Elektrodenpolarisationseffekten. Vergleich man die während der Fermentation erreichten Kapazitäts- und Leitwertdifferenzen mit den Werten aus den Messungen an den aufzentrifugierten Zelllösungen (Abbildung 5.4.16), so ergaben sich maximale Biomassen von zirka 10 g/l. Ebenfalls gut zu erkennen war die zeitliche Verzögerung der einzelnen Wachstumsphasen. Je geringer das

Füllvolumen eingestellt wurde, desto schneller verlief die Fermentation. Dies lag an den unterschiedlichen Sauerstofflimitierungen während der Versuche. Je geringer das Füllvolumen, desto höher war das Oberflächen-Volumenverhältnis. Dieses erhöhte Oberflächenvolumenverhältnis führte zu einem besseren Sauerstofftransfer in die Zelloösung hinein. Die Schütteldrehzahl von 700 U/min reichte demnach nicht aus, die Zellen bei einem Füllvolumen von 200  $\mu\text{l}$  ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Durch die einfache Veränderung des Füllvolumens konnten daher unterschiedliche Sauerstofflimitierungen eingestellt werden. Weniger deutlich war dieser Effekt im Referenzsignal des Streulichts zu sehen. Der starke Abfall der elektrischen Signale am Ende der Fermentation (Abbildung 5.4.20) ließ Raum für Spekulationen. Ein Abfallen der Signale musste nicht unbedingt ein Indikator für ein rasches Zellsterben sein. Morphologische Veränderungen können ebenfalls zu einer Signalveränderung führen. Wenn die Zellen sich nicht weiter vermehren und durch die Veränderung des Mediums zu schrumpfen beginnen, verschiebt sich die charakteristische Frequenz der  $\beta$ -Dispersion zu höheren Frequenzen hin. Bleiben die beiden Messfrequenzen jedoch gleich, kann dies zur Folge haben, dass die Kapazität der höheren Frequenz auf der sich verschiebenden Dispersionsstufe nach oben wandert. Das bedeutet eine Verringerung der Kapazitätsdifferenz und damit ein Abfallen des Messsignals.

Ganz anders präsentierten sich die Ergebnisse, die in Abbildung 5.4.21 gezeigt sind. Obwohl durch die Verwendung eines EIS-V1 Sensors mit hohen Kapazitätsdifferenzen hätte gerechnet werden müssen, änderten sich sowohl die Differenz der Kapazität als auch die der Leitwerte während der Fermentation kaum. Fehlermechanismen kommen viele in Frage. Interessant war jedoch die nach 12,5 Stunden plötzlich auftretende Veränderung des Mediums. Hierbei handelte es sich um ein eindeutiges Indiz für eine Kontamination der Nährlösung durch einen Fremdorganismus. Die Anwesenheit fremder Zellen im verwendet Medium konnte später durch Mikroskopuntersuchungen bestätigt werden. Die durchgeführten Messungen boten somit auch eine Überwachung des eingesetzten Mediums und ermöglichten eine Erkennung von Kontaminationen während des Prozesses.

Auch bei den Fermentationen von E.Coli in TB-Medium in Abbildung 5.4.22 war die Schütteldrehzahl von 700 U/min nicht ausreichend, die Bakterien mit dem benötigten Sauerstoff zu versorgen. Der Grad der Limitierung wurde wie bei den anderen Fermentationen durch das Füllvolumen eingestellt. Je geringer der Füllstand in der Wanne war, desto günstiger stellte sich das Oberflächen-Volumen-Verhältnis ein, das den diffusiven Sauerstoffeintrag bestimmte. Daher verliefen alle Fermentationen mit geringerem Füllvolumen schneller ab, als andere mit mehr Zelloösung in der Wanne. Die Referenzsignale des Streulichts wiesen die aus anderen Arbeiten bekannten Kurven auf. Die charakteristischen Knicke in der Wachstumskurve zwischen 6 und 8 Stunden Fermentationszeit markierten den Zeitpunkt, in dem die Bakterien ihren Stoffwechsel umstellten und von Glycerin auf komplexe Proteine als Kohlestoffquelle wechselten. Dies geschieht immer in starker Abhängigkeit der Sauerstofflimitierung. Bei einer unlimitierten Sauerstoffversorgung entfällt der charakteristische Knick fast vollständig. Je größer die Limitierung desto später stellen die Bakterien ihren Stoffwechsel um und der Knick erscheint zu späteren Zeiten der Fermentation. Die dargestellten Messungen aus Abbildung 5.4.22 bestätigten das beschriebene Verhalten der E.Coli

Bakterien. Die gezeigten Messkurven der elektrischen Größen bei den Fermentationen zeigten einen völlig andersartigen Verlauf (siehe Abbildung 5.4.22). Während die Leitwertdifferenz zwar einen nicht mit dem Streulichtsignal übereinstimmenden ansteigenden Verlauf aufwies, fiel das Signal der Kapazitätsdifferenz sogar in den ersten vier Stunden. Die während der Fermentation ständig steigenden und fallenden Differenzwerte zeigten keine eindeutige Korrelation zu der im Streulicht gemessenen Biomasse. Der Grund hierfür kann in Abbildung 5.4.17 und Abbildung 5.4.18 abgelesen werden. Die höchste während der Messung verwendete Frequenz war 10 MHz. Wie im Frequenzverhalten der E.Coli Kulturen zu erkennen, war das Ende der Dispersionsstufe bei dieser Frequenz noch nicht erreicht. Dies bedeutet, dass sich die Frequenz von 10 MHz in der Mitte der Dispersionsstufe befand. Wählt man nun eine niedrige Frequenz, die sich auf dem oberen Plateau der Dispersionsstufe befindet und vergleicht die dort gemessene Kapazität mit einer Kapazität in der Mitte der Dispersionsstufe, so wird das Messsignal stark durch weitere Faktoren beeinflusst. Damit hat die Leitfähigkeit der Zelloberfläche einen Einfluss auf die charakteristische Frequenz der Dispersionsstufe (siehe Abbildung 5.4.23).

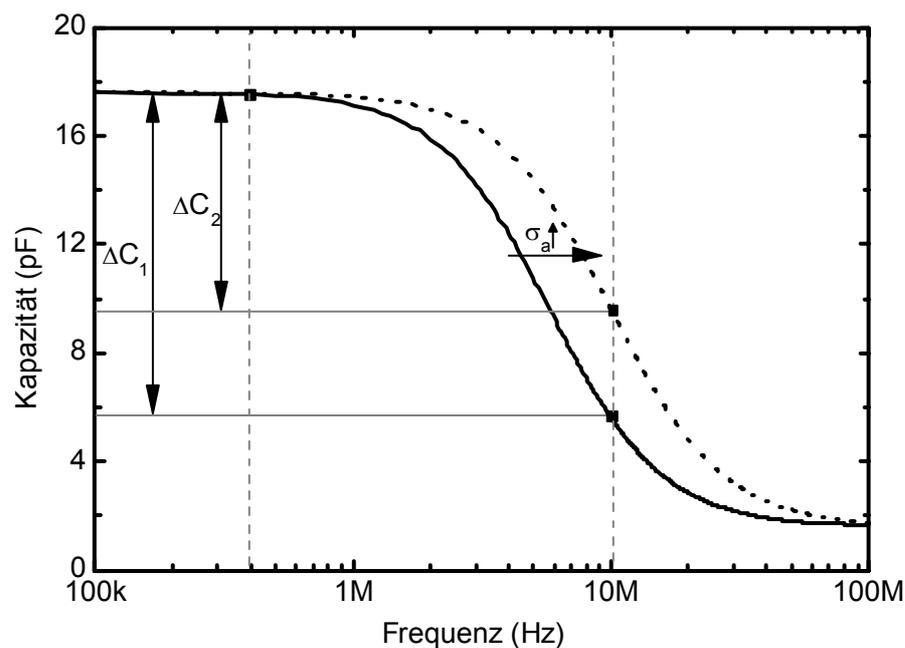


Abbildung 5.4.23. Einfluss der Leitfähigkeit  $\sigma_a$  auf das Kapazitätssignal bei zu gering gewählter Referenzfrequenz

Die Gleichungen (11) und (12) beschreiben den Zusammenhang der Frequenz  $f_c$  und der Lösungsleitfähigkeit  $\sigma_a$ . Steigt die Leitfähigkeit der Lösung durch den Stoffwechsel der Zellen während der Fermentation an, so verschiebt sich die Stufe der  $\beta$ -Dispersion in Richtung höherer Frequenzen. Ist in diesem Falle die höhere der beiden Messfrequenzen so gewählt, dass sie sich im Bereich der Dispersionsstufe befindet, erhöht sich die bei dieser Frequenz gemessene Kapazität. Bei einer nur geringen Änderung der Biomasse kann dies dazu führen, dass das kapazitive Differenzsignal sinkt, obwohl die Biomasse konstant bleibt oder gar leicht

ansteigt. In der Skizze der Abbildung 5.4.23 ist eine typische Dispersionsstufe gezeigt. Die gemessene Kapazitätsdifferenz zwischen 400 kHz und 10 MHz ( $\Delta C_1$ ) verringert sich deutlich bei einer Verschiebung der Dispersionsstufe aufgrund steigender Lösungsleitfähigkeit  $\sigma_a$  ( $\Delta C_2$ ). Neben diesem Effekt können auch morphologische Veränderungen der Zellen das Signal beeinflussen, da aus der Theorie bekannt ist, dass vor allem die Zellgröße die charakteristische Frequenz  $f_c$  und damit die Position der  $\beta$ -Dispersion verändert.

Um eine korrekte Messung der Biomasse zu garantieren, müssen die Frequenzen so gewählt werden, dass sie die Kapazitäten sowohl am höchsten Punkt der Dispersionsstufe messen als auch ein von Zellen unbeeinflusstes Grundsignal liefern. Der durch die stabähnliche Form der E.Coli Bakterien gestreckte Verlauf der  $\beta$ -Dispersion erschwert diese Voraussetzungen zusätzlich. Um ein von den Zellen unbeeinflusstes Kapazitätssignal zu erhalten, das sich am Ende der Dispersionsstufe einstellt müssten Frequenzen von 25 MHz und mehr erreicht werden. Diese Frequenzen waren jedoch mit dem in dieser Arbeit verwendeten Messsystem nicht zu realisieren.

## 5.5. Diskussion

Die im vorangegangenen Kapitel 5.4 vorgestellten und ausgewerteten Messungen bestätigten ohne Ausnahme die zuvor beschriebene Theorie in Kapitel 2. Mit Hilfe von FEM-Simulationen und entsprechenden Vergleichsmessungen konnte die sinnvolle Verwendung einiger Elektrodendesigns auch für aerobe Zellkulturen nachgewiesen werden. Die Sensoren mit rotationssymmetrischen Elektroden (EIS-V1 und V2) zeigten hierbei die besten Eigenschaften. Damit war für bestimmte Designs nachgewiesen, dass ihr Einsatz in Mikrotiterplatten auch bei hohen Schüttelfrequenzen und damit verbundenen hohen Sauerstofftransferraten möglich ist.

Mit Hilfe der Messungen der Elektrodenimpedanzen (Kapitel 5.4.2) und der Zyklovoltammogramme (CV) (Kapitel 5.4.1) konnten die hergestellten Elektroden bezüglich ihrer Materialeigenschaften untersucht werden. Eine nachweislich gute Abdeckung des Goldes durch das verwendete Platin konnte mit den in der Arbeit verwendeten Prozessschritten erzielt werden (Kapitel 3.2). Hierdurch konnte einerseits gewährleistet werden, dass es sich bei den Impedanzmessungen tatsächlich um Platinelektroden in der Lösung handelte, andererseits war die vollständige Bedeckung des Goldes für die Aktivierung der getesteten Iridiumoxidelektroden notwendig. Für die nachhaltige Aktivierung der Iridiumoxidschichten wurden Spannungen benötigt, die das Gold aufgelöst hätten (Abbildung 5.4.3). Eine durch die Aktivierung hervorgerufene Degeneration der Goldschicht hätte zum Abfallen der Elektroden vom Polyimidträger geführt. Somit war eine kontrollierte Aktivierung der Iridiumoxidelektroden möglich. Eine deutliche Verbesserung der Messung durch den Einsatz aktivierter Iridiumoxidelektroden im Bereich der  $\beta$ -Dispersion konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Neben den materialspezifischen Eigenschaften der Elektroden stellte sich vor allem die gewählte Geometrie der Elektrodendesigns als entscheidender Einflussfaktor auf die Messergebnisse heraus. Die in Kapitel 2.4 beschriebenen Fehlermechanismen konnten anhand der Messungen an verschiedenen Elektrodendesigns nachvollzogen werden. Als zwei Grundtypen auftretender Messfehler zeigten sich eine Überhöhung des Imaginärteils der Admittanz im Bereich von 1 MHz und die Messung virtueller Induktivitäten. Beide Phänomene lassen sich über das einfache elektrische Ersatzschaltbild aus Abbildung 2.4.2 erklären. Während die Auswirkungen der Fehler in erster Linie den Imaginärteil der Admittanz betrafen, waren die gemessenen Realteile verhältnismäßig stabil. Bei sehr speziellen Elektrodendesigns wie dem EIS-V3 zeigten sich jedoch auch im Realteil große Abweichungen des Messsignals über der Frequenz (Abbildung 5.4.8). Die Auswirkungen dieser Messfehler auf die messbare Lösungskapazität wurden ebenfalls für die unterschiedlichen Elektrodengeometrien untersucht (Abbildung 5.4.13). Hierbei zeigten sich sehr deutlich die Einflüsse der zuvor beschriebenen Messfehler auf das Kapazitätssignal. Wie schon die Auswertung der Real- und Imaginärteile vermuten ließ, hatten die EIS-V2 Sensoren in dem für die Messungen relevanten Frequenzbereich die besten Eigenschaften und lieferten nahezu konstante und frequenzunabhängige Kapazitätswerte. Es war dennoch eine Abhängigkeit der Kapazität von der Leitfähigkeit der Lösung erkennbar. Dieser Fehler war jedoch akzeptabel, da die während einer Fermentation stattfindenden Leitfähigkeitsänderungen so gering waren, dass die dadurch hervorgerufenen

Kapazitätsänderungen vernachlässigbar waren. Außerdem diente die Kapazitätsdifferenz von 400 kHz und 10 MHz als Biomasseindikator, wodurch eine Erhöhung der Kapazität insgesamt durch eine Veränderung der Leitfähigkeit kompensiert werden konnte.

Der von Davey und Kell beschriebene Fehlermechanismus der Elektrodenpolarisation stellte sich ebenfalls als geometrieabhängig heraus. Während jedes Elektrodendesign unterschiedliche Kapazitätsverläufe aufwies, konnte nur die Kapazität des getesteten EIS-V4 mit der von Davey und Kell postulierten Formel (21) der Elektrodenpolarisation annähernd gefittet werden. Es zeigte sich, dass das vorgestellte „Power Law“ zur Beschreibung der Elektrodenpolarisation nur in dem engen von Davey und Kell untersuchten Frequenzbereich galt (200 kHz bis 10 MHz). Unterhalb dieser Frequenzen wich die gemessene Kapazität stark von dem Modell ab (Abbildung 5.4.14). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Modell der Elektrodenpolarisation und das daraus von Davey und Kell abgeleitete „Power Law“ kein allgemeingültiges Gesetz darstellt. Die Form dieser Formel und vor allem die Frequenzabhängigkeit hängen stark von der untersuchten Elektrodengeometrie ab. Es ist daher vielmehr eine zufällige mathematische Formel um einen Messfehler einer ganz bestimmten Elektrodenkonfiguration in einem eingeschränkten Frequenzbereich im Nachhinein zu korrigieren. Die tatsächlich zugrundeliegenden Fehlermechanismen konnten zum ersten Mal in dieser Arbeit beschrieben werden und lassen sich nur durch die in Kapitel 2.4 vorgestellten Modelle erklären. Daher gilt es in Zukunft die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten zu verwenden, um einen geeigneten Algorithmus zu entwickeln, mit dem eine Messfehlerkorrektur möglichst elektrodengeometrieunabhängig während der Messung vorgenommen werden kann.

Die an den konzentrierten Zelllösungen und während der Fermentation durchgeführten Messungen zeigten die Anwendbarkeit der hergestellten Sensoren für die Beobachtung und Charakterisierung mikrobiologischer Organismen. Vor allem die Messungen an Hefekulturen zeigten das Potenzial der Sensoren. Neben dem Streulicht boten die elektrischen Signale ebenfalls eine gute Messung der Biomasse. Anders als beim Streulicht haben allerdings nur lebende Zellen mit intakter Zellmembran einen Einfluss auf die Signale. Aufgrund der in den untersuchten Batch-Fermentationen nur geringen Biomassen waren Messungen in komplexen Medien nicht immer eindeutig zu interpretieren. Da auch Makromoleküle eine  $\beta$ -Dispersion aufweisen, konnte eine diesbezügliche Querempfindlichkeit nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wurden gut reproduzierbare Ergebnisse zum Beispiel in YPG-Medium aufgezeichnet. Besonders gut eigneten sich die untersuchten Sensoren auch für die Überwachung des verwendeten Mediums. Kontaminationen durch Fremdorganismen konnten durch die Messung erkannt werden (Abbildung 5.4.21).

Deutlich schwieriger erwiesen sich die Messungen an bakteriellen Lösungen. Durch die geringe Größe und die nicht sphäroidische Form der E.Coli Zellen verhält sich die  $\beta$ -Dispersion anders als die bei Hefen. Die durch die hohe Zellradienvarianz gestreckte Dispersionsstufe war nur sehr schwer zu messen. Extrem hohe Zellkonzentrationen mussten eingestellt werden, um auswertbare Messsignale zu erhalten (Abbildung 5.4.17 und Abbildung 5.4.18). Des Weiteren reichte der in dieser Arbeit verwendete Frequenzbereich

nicht aus, die vollständige Dispersionsstufe der Bakterien abzubilden. Die daraus resultierenden Querempfindlichkeiten verhinderten eine eindeutige Biomassemessung der untersuchten Bakterien. Nur die Verwendung höherer Messfrequenzen würde eine solche Messung erlauben. Dennoch geben die elektrischen Messsignale Aufschluss und zusätzliche Informationen über den Metabolismus der bakteriellen Kulturen. Wie schon bei den galvanisch entkoppelten Sensoren sind deutlich messbare Veränderungen der elektrischen Signale fest zu stellen, während das parallel gemessene Streulichtsignal bereits keine Veränderungen mehr aufweist. Die zusätzliche elektrische Online-Sensorik, die in dieser Arbeit untersucht wurde, könnte daher eine zu frühe Beendigung durchgeführter Fermentationsversuche verhindern. Vor allem im Hinblick auf die Produktion biologischer Zielmoleküle ist ein Indikator für metabolische Prozesse von besonderer Bedeutung. Denn nur durch die Berücksichtigung des tatsächlich ablaufenden Metabolismus kann eine optimale Fermentationszeit ermittelt werden. Dies kann eine rein optische Messung des Streulichtsignals nicht liefern.



---

## 6. Zusammenfassung

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung, Herstellung und Untersuchung spezieller Sensoren zur Messung elektrischer Eigenschaften mikrobieller Zelllösungen während der Fermentation in Mikroreaktorenarrays. Hierzu wurden zwei verschiedene Verfahren getestet: galvanisch entkoppelte Sensoren (geS) und Vierelektrodenanordnungen.

Die Herstellung der Sensoren wurde mittels mikrosystemtechnischer Verfahren auf flexiblen Polyimidfolien durchgeführt. Dieser Aufbau ermöglichte eine Implementierung der Sensoren als Boden einer herkömmlichen Mikrotiterplatte oder aber eine durch Falten der Trägerfolie mögliche Seitenwandintegration. Bei der Herstellung der geS konnte vollständig auf bereits vorhandene Standardprozesse zurückgegriffen werden. Für den Aufbau der komplexeren Vierelektrodensensoren mussten neue Lackprozesse für die verwendete Goldgalvanik entwickelt werden.

Zur Charakterisierung aller hergestellten Sensoren wurden Messungen an KCl-Lösungen mit Leitfähigkeiten in einem Bereich von 3 mS/cm bis 19 mS/cm vorgenommen. Des Weiteren wurden Tests an Zelllösungen während der Fermentation durchgeführt. Diese Messungen wurden mit zuvor gezeigten Modellen verglichen und interpretiert.

So konnte anhand von einfachen elektrischen Ersatzschaltbildern das Verhalten der geS beschrieben und erklärt werden. Fünf unterschiedliche Elektrodenformen wurden hergestellt und untersucht. Die Form der Elektroden hatte dabei lediglich einen Einfluss auf die Kopplungskapazität in die Lösung. Diese Sensoren eigneten sich vor allem für eine extrem kostengünstige Messung der Änderung der Lösungsleitfähigkeit während der Fermentation in Mikrotiterplatten. Der Einfluss der verwendeten Isolationsmaterialien Polyimid und Parylen auf die Qualität der Messergebnisse konnte ausgearbeitet werden. Es zeigten sich weiterhin starke Einflüsse der in die Polymere hineindiffundierten Lösungsbestandteile auf die Messung. Diese Eigenschaften der verwendeten Polymere erschwerten eine kapazitive Auswertung der Zelllösungen. Die Änderung der Leitfähigkeit hingegen konnte bei hohen Frequenzen von 10 MHz mit einer Genauigkeit von nur wenigen  $\mu\text{S}/\text{cm}$  bestimmt werden und erwies sich als hervorragender Indikator für die unterschiedlichen Phasen der untersuchten E.Coli-Fermentationen.

Noch bessere Eigenschaften zeigten die hergestellten Vierelektrodenanordnungen. Es wurden auch hier 5 verschiedene Elektrodendesigns entwickelt, hergestellt und getestet. Diese Sensoren wurden ebenfalls mit Hilfe analytischer aber auch numerischer Simulationen beschrieben. Durch numerische FEM-Simulationen konnte das Verhalten einzelner Sensordesigns für den Fall einer stark geschüttelten MTP untersucht werden. Dieses Schütteln war für einen ausreichenden Sauerstoffeintrag in die Lösung für die Zellen notwendig. Geometrieabhängige Schütteleigenschaften der Sensoren wurden ermittelt und mit Hilfe von Messungen in KCl-Lösungen verifiziert. Hierbei zeigten die rotationssymmetrischen Elektrodenformen die besten Eigenschaften. Darüber hinaus wurde das Frequenzverhalten der einzelnen Sensoren genauer untersucht. Es konnten zwei dominierende geometrieabhängige Fehlermechanismen identifiziert und charakterisiert werden. Dabei handelte es sich auf der

einen Seite um „virtuelle Induktivitäten“ und auf der anderen um eine Kapazitätserhöhung zu niedrigen Messfrequenzen hin. Es konnte gezeigt werden, dass starke induktive Signale allein aufgrund der Elektrodengeometrie bei den Vierpunktmessungen auftreten können. Diese Induktivitäten hatten ihren Ursprung nachweislich nicht in den verwendeten Koaxialkabeln, sondern entstanden durch ein ungünstiges Verhältnis von Elektrodenimpedanzen und Elektrodengeometrie. Eine kapazitive Auswertung dieser Sensoren war daher nicht möglich. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die aus der Literatur bekannte Elektrodenpolarisation, von Davey und Kell bereits 1998 beschrieben, ihren Ursprung ebenfalls in den Elektrodengeometrien hat. Eine hergestellte Elektrodenform (EIS-V4) zeigte ein Verhalten, das mit dem von Davey und Kell postulierten Modell beschrieben werden konnte. Andere Elektroden designs hingegen wiesen einen völlig anderen kapazitiven Frequenzverlauf auf und gehorchten nicht dem in der Arbeit von Davey und Kell entwickelten „Power Law“.

Neben den geometrischen Eigenschaften wurden auch die Materialeigenschaften der Elektroden genauer untersucht. Hierzu wurden Elektroden aus reinem Platin mit Elektroden aus Iridiumoxid verglichen. Durch eine einfache Vorkonditionierung der Elektroden verringerten sich die Elektrodenimpedanzen deutlich gegenüber vergleichbarer Platinelektroden. Der in dem untersuchten Frequenzbereich von 100 kHz bis 10 MHz erzielte Effekt durch die Verwendung der vorkonditionierten Iridiumoxidschichten war jedoch nicht ausreichend, um den Mehraufwand bei der Herstellung der Elektroden zu rechtfertigen.

Anhand von Messungen in konzentrierten Hefelösungen und während laufender Fermentationen konnte die Anwendbarkeit der Sensoren zur Online-Überwachung mikrobieller Prozesse nachgewiesen werden. Die für die Tests verwendete Kultur war die Hefe *Hansenula Polymorpha*. Bereits bei den niedrigen Zelldichten von unter 15 g/l, die sich während der durchgeführten Batch-Fermentationen einstellten, waren die Wachstumsverläufe der Kulturen gut messbar. Schwieriger gestalteten sich Messungen in bakteriellen Lösungen. Es wurden Versuche mit *Escherichia Coli* in komplexem TB-Medium durchgeführt. Da der in dieser Arbeit verwendete Frequenzbereich nicht die vollständige  $\beta$ -Dispersionsstufe der Bakterien auflösen konnte, war das kapazitive Messsignal kein eindeutiger Indikator für die lebende Biomasse. Stoffwechselbedingte Leitfähigkeitsveränderungen des Mediums und morphologische Änderungen der Zellen hatten ebenfalls große Einflüsse auf die gemessenen elektrischen Eigenschaften. Durch eine Verbesserung der elektronischen Messwerterfassung und der Verwendung eines anderen Messgerätes ließen sich auch höhere Frequenzen messen und damit auch die bakteriellen Lösungen genauer untersuchen.

Es konnte mit den Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Integration von Impedanzmeselektroden in eine herkömmliche Mikrotiterplatte möglich ist. Die durch die Messung der elektrischen Impedanz gewonnenen Informationen eignen sich hervorragend, zur Beobachtung und Charakterisierung aerober Fermentationsprozesse bereits im Mikroli-  
termaßstab.

---

## 7. Ausblick

Mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen konnte eine Anwendbarkeit miniaturisierter Elektroden zur Messung von Zelllösungsimpedanzen für die Online-Überwachung mikrobieller Fermentationsprozesse nachgewiesen werden.

Durch die Verwendung anderer Isolationsmaterialien wie  $\text{SiO}_2$  oder  $\text{Si}_3\text{N}_4$  könnten die vorgestellten galvanisch entkoppelten Sensoren wesentlich bessere Eigenschaften und damit reproduzierbarere Ergebnisse aufweisen. Durch die elektrisch stabileren Eigenschaften dieser Isolationsschichten wäre auch eine Impedanzspektroskopie denkbar. Der Aufbau dieser Sensoren wird dadurch aber wieder komplexer, da diese Materialien nicht gleichzeitig als Trägersubstrat für die Elektroden dienen können.

Die erarbeiteten Fehlermechanismen der Vierelektrodensensoren konnten anhand neuer Modelle zwar erklärt und qualitativ nachgestellt werden, ermöglichen derzeit aber noch keine zuverlässige Korrektur der Messwerte. Ziel muss es daher in Zukunft sein, tiefer gehende Modelle zu entwickeln, aus denen Designvorschriften abzuleiten sind, die eine auf die gewünschten Messungen hin optimierte Elektrodengeometrie vorgeben. Eine Frequenzbereichserweiterung auf zirka 30 MHz würde auch die reproduzierbare Messung kleiner Zellen wie Bakterien ermöglichen. Hierzu müsste jedoch neben einem optimierten Frontend, bestehend aus Multiplexer und Vorverstärker, auch ein anderes Messgerät verwendet werden.

Doch auch die in dieser Arbeit vorgestellten seitenwandintegrierten Sensoren bieten interessante Applikationsmöglichkeiten. In ersten kleineren Vorarbeiten wurden die seitenwandintegrierten Sensoren in Mikroreaktorsystemen integriert, die über optische Messverfahren durch den transparenten Boden und durch eine angeschlossene Mikrofluidik eine pH-Wertregelung der Zelllösung ermöglichten. Durch den platzsparenden Aufbau an den Seitenwänden, war es problemlos möglich, die optischen und mikrofluidischen Systemkomponenten im noch freien Boden zu platzieren. Bislang wurden mittels der Sensoren nur Leitwertsänderungen gemessen. Eine Optimierung der Elektrodendesigns könnte aber auch die Messung kapazitiver Werte und damit lebender Biomasse ermöglichen.

Die genauere Untersuchung der hergestellten Iridimoxidelektroden zeigte vor allem in niedrigen Frequenzbereichen interessante Elektrodeneigenschaften. Die aktivierten Iridiumoxidelektroden wiesen nicht nur eine deutlich niedrigere Elektrodenimpedanz bei Frequenzen von unter 10 kHz auf, sondern erzeugten auch deutlich weniger harmonische Oberwellen bei der Messung. Dies wiederum könnte eine Auswertung der von den lebenden Zellen im Frequenzbereich der  $\alpha$ -Dispersion erzeugten Oberwellen ermöglichen. Dieser spezielle Einsatz von Iridiumoxidelektroden sollte Schwerpunkt noch folgender Arbeiten werden.



## 8. Referenzen

- Arlt, G. 1989, *Werkstoffe der Elektrotechnik* Druckerei Mainz GmbH, Aachen.
- Asami, K. 2002a, "Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy", *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 305, no. 1-3.
- Asami, K. 2002b, "Characterization of heterogeneous systems by dielectric spectroscopy", *Progress in Polymer Science*, vol. 27, no. 8.
- Asami, K. 2005, "Simulation of dielectric relaxation in periodic binary systems of complex geometry", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 292, no. 1, pp. 228-235.
- Asami, K. 2006, "Dielectric dispersion in biological cells of complex geometry simulated by the three-dimensional finite difference method", *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 39, no. 3, pp. 492-499.
- Asami, K., Gheorghiu, E., & Yonezawa, T. 1999, "Real-time monitoring of yeast cell division by dielectric spectroscopy", *Biophysical Journal*, vol. 76, no. 6.
- Asami, K. & Sekine, K. 2007, "Dielectric modelling of cell division for budding and fission yeast", *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 40, no. 4, pp. 1128-1133.
- Asami, K. & Zhao, K. S. 1994, "Dielectric Measurement of A Single Submillimeter Size Microcapsule", *Colloid and Polymer Science*, vol. 272, no. 1, pp. 64-71.
- Bolton, M. P., Ward, L. C., Khan, A., Campbell, I., Nightingale, P., Dewit, O., & Elia, M. 1998, "Sources of error in bioimpedance spectroscopy", *Physiological Measurement*, vol. 19, no. 2, pp. 235-245.
- Cruse, K. & Huber, R. 1957, *Hochfrequenztitration* Verlag Chemie, Weinheim.
- Davey, C. L. & Kell, D. B. 1998a, "The influence of electrode polarisation on dielectric spectra, with special reference to capacitive biomass measurements - I. Quantifying the effects on electrode polarisation of factors likely to occur during fermentations", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 46, no. 1, pp. 91-103.
- Davey, C. L. & Kell, D. B. 1998b, "The influence of electrode polarisation on dielectric spectra, with special reference to capacitive biomass measurements: (II) Reduction in the contribution of electrode polarisation to dielectric spectra using a two-frequency method", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 46, no. 1, pp. 105-114.
- Escorihuela, M. J., De Rosnay, P., Kerr, Y. H., & Calvet, J. C. 2007, "Influence of bound-water relaxation frequency on soil moisture measurements", *Ieee Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, vol. 45, no. 12, pp. 4067-4076.
- Falbe, J. & Regnitz, M. 1990, *Römpp Chemie Lexikon*, Bd. I und Bd. II edn, Georg Thieme Verlag, New York.
- Fritz, T. 2002, *Charakterisierung galvanisch abgeschiedener Nickel- und Nickelwolframschichten für mikrotechnische Anwendungen*.

- Gómez, R., Bashir, R., Sarikaya, A., Ladisch, M. R., Sturgis, J., Robinson, J. P., Geng, T., Bhunia, A. K., Apple, H. L., & Wereley, S. 2001, "Microfluidic Biochip for Impedance Spectroscopy of Biological Species", *Biomedical Microdevices*, vol. 3, no. 3.
- Grimnes, S. & Martinsen, O. G. 2007, "Sources of error in tetrapolar impedance measurements on biomaterials and other ionic conductors", *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 40, no. 1, pp. 9-14.
- Hauttmann, S. & Muller, J. 2001, "In-situ biomass characterisation by impedance spectroscopy using a full-bridge circuit", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 24, no. 3.
- Hermann, R., Lehmann, M., & Buchs, J. 2003, "Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 81, no. 2.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. 1952, "A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve", *Journal of Physiology-London*, vol. 117, no. 4, pp. 500-544.
- Hofmann, M. C., Kensy, F., Buchs, J., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2005, "Transponder-based sensor for monitoring electrical properties of biological cell solutions", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 100, no. 2.
- Ilic, B., Czaplewski, D., Neuzil, P., Stanczyk, T., Blough, J., & Maclay, G. J. 2000, "Preparation and characterization of platinum black electrodes", *Journal of Materials Science*, vol. 35, no. 14, pp. 3447-3457.
- Kensy, F., John, G. T., Hofmann, B., & Buchs, J. 2005, "Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 28, no. 2, pp. 75-81.
- Kim, S. H., Moon, H. S., Woo, S. G., & Ahn, J. 2008, "Study on the Properties of Interlayer Low Dielectric Polyimide during Cl-Baed Plasma Etching of Aluminum", *Japanese Journal of Applied Physics*.
- Lindemann, C., Marose, S., Nielsen, H. O., & Scheper, T. 1998, "2-dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 51, no. 1-3, pp. 273-277.
- Marose, S., Lindemann, C., Ulber, R., & Scheper, T. 1999, "Optical sensor systems for bioprocess monitoring", *Trends in Biotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 30-34.
- Morgan, H., Sun, T., Holmes, D., Gawad, S., & Green, N. G. 2007, "Single cell dielectric spectroscopy", *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 40, no. 1, pp. 61-70.
- Noble, P. A. 1999, "Hypothetical model for monitoring microbial growth by using capacitance measurements - a minireview", *Journal of Microbiological Methods*, vol. 37, no. 1.
- Oehme, F. 1991, *Chemische Sensoren* Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig.

## Referenzen

---

- Pauly, H. 1963, "Über die elektrische Kapazität der Zellmembran und die Leitfähigkeit des Zytoplasmas von Ehrlich-Aszitestumorzellen", *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 1, no. 3, pp. 143-153.
- Ragheb, T. & Geddes, L. A. 1990, "Electrical-Properties of Metallic Electrodes", *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 28, no. 2, pp. 182-186.
- Samorski, M., Muller-Newen, G., & Buchs, J. 2005, "Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: A novel measurement technique for shaken microtiter plates", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 92, no. 1, pp. 61-68.
- Schwan, H. P. 1983, "Electrical-Properties of Blood and Its Constituents - Alternating-Current Spectroscopy", *Blut*, vol. 46, no. 4, pp. 185-197.
- Schwan, H. P. 1988, "Dielectric-Spectroscopy and Electro-Rotation of Biological Cells", *Ferroelectrics*, vol. 86, pp. 205-223.
- Schwan, H. P. "Electrical Properties of Tissues and Cell Suspensions: Mechanisms and Models", p. A70-A71.
- Schwan, H. P. 1999, "The practical success of impedance techniques from an historical perspective", *Electrical Bioimpedance Methods: Applications to Medicine and Biotechnology*, vol. 873, pp. 1-12.
- Schwan, H. P. 2000, "Dielectric spectroscopy of biological materials and field interactions: the connection with Gerhard Schwarz", *Biophysical Chemistry*, vol. 85, no. 2-3, pp. 273-278.
- Schwan, H. P. & Ferris, C. D. 1968, "4-Electrode Null Techniques for Impedance Measurement with High Resolution", *Review of Scientific Instruments*, vol. 39, no. 4, p. 481-&.
- Schwan, H. P. & Foster, K. R. 1980, "Rf-Field Interactions with Biological-Systems - Electrical-Properties and Biophysical Mechanisms", *Proceedings of the Ieee*, vol. 68, no. 1, pp. 104-113.
- Schwan, H. P. & Onaral, B. 1985, "Linear and Nonlinear Properties of Platinum-Electrode Polarization .3. Equivalence of Frequency-Domain and Time-Domain Behavior", *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 23, no. 1, pp. 28-32.
- Schwan, H. P., Schwarz, G., Maczuk, J., & Pauly, H. 1962, "On Low-Frequency Dielectric Dispersion of Colloidal Particles in Electrolyte Solution", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 66, no. 12, p. 2626-&.
- Slavcheva, E., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2005, "Electrodeposition and properties of NiW films for MEMS application", *Electrochimica Acta*, vol. 50, no. 28, pp. 5573-5580.
- Slavcheva, E., Schnakenberg, U., & Mokwa, W. 2006b, "Deposition of sputtered iridium oxide - Influence of oxygen flow in the reactor on the film properties", *Applied Surface Science*, vol. 253, no. 4, pp. 1964-1969.

- Slavcheva, E., Schnakenberg, U., & Mokwa, W. 2006a, "Deposition of sputtered iridium oxide - Influence of oxygen flow in the reactor on the film properties", *Applied Surface Science*, vol. 253, no. 4, pp. 1964-1969.
- Slavcheva, E., Vitushinsky, R., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2004, "Sputtered iridium oxide films as charge injection material for functional electrostimulation", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 151, no. 7, p. E226-E237.
- Spiller, E., Frommichen, T., Zimmermann, A., Sippel, A. E., & Urban, G. A. 2003, "Development of an electronic microtiterplate for high throughput screening (HTS)", *Sensors*, vol. 2.
- Spiridonov, V. I. 1982, "A Relaxation Model for the Dielectric-Properties of Water in Heterogeneous Mixtures", *Measurement Techniques Ussr*, vol. 25, no. 5, pp. 448-451.
- Sun, T., Gawad, S., Bernabini, C., Green, N. G., & Morgan, H. 2007a, "Broadband single cell impedance spectroscopy using maximum length sequences: theoretical analysis and practical considerations", *Measurement Science & Technology*, vol. 18, no. 9, pp. 2859-2868.
- Sun, T., Gawad, S., Green, N. G., & Morgan, H. 2007b, "Dielectric spectroscopy of single cells: time domain analysis using Maxwell's mixture equation", *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 40, no. 1, pp. 1-8.
- Toyama, S., Someya, M., Takei, O., Ohtake, T., Usami, R., Horikoshi, K., & Ikariyama, Y. 2001, "Fabrication and characterization of gold-platinum black electrode", *Chemistry Letters* no. 2, pp. 160-161.
- Wehnert, G., Anders, K. D., Bittner, C., Kammeyer, R., Hubner, U., Nielsen, J., & Scheper, T. 1990, "Combined Fluorescence Scattered-Light Detector and Its Use in Process Monitoring in Biotechnology", *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 62, no. 3, pp. 211-212.
- Wessling, B., Besmehn, A., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2007, "Reactively sputtered iridium oxide - Influence of plasma excitation and substrate temperature on morphology, composition, and electrochemical characteristics", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 154, no. 5, p. F83-F89.
- Wessling, B., Lusebrink, D., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2008a, "Sputtered ir films evaluated for electrochemical performance - II. Simulations", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 155, no. 5, p. F66-F74.
- Wessling, B., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2006a, "RF-sputtering of iridium oxide to be used as stimulation material in functional medical implants", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, no. 6, p. S142-S148.
- Wessling, B., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2006b, "RF-sputtering of iridium oxide to be used as stimulation material in functional medical implants", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, no. 6, p. S142-S148.
- Wessling, B., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2008b, "Sputtered ir films evaluated for electrochemical performance - I. Experimental results", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 155, no. 5, p. F61-F65.

- Whalen, J. J., Young, J., Weiland, J. D., & Searson, P. C. 2006, "Electrochemical characterization of charge injection at electrodeposited platinum electrodes in phosphate buffered saline", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 153, no. 12, p. C834-C839.
- Yazawa, Y., Takagi, N., Yoshida, H., Komai, S., Satsuma, A., Tanaka, T., Yoshida, S., & Hattori, T. 2002a, "The support effect on propane combustion over platinum catalyst: control of the oxidation-resistance of platinum by the acid strength of support materials", *Applied Catalysis A-General*, vol. 233, no. 1-2, pp. 103-112.
- Yazawa, Y., Yoshida, H., & Hattori, T. 2002b, "The support effect on platinum catalyst under oxidizing atmosphere: improvement in the oxidation-resistance of platinum by the electrophilic property of support materials", *Applied Catalysis A-General*, vol. 237, no. 1-2, pp. 139-148.
- Yazawa, Y., Yoshida, H., Komai, S., & Hattori, T. 2002c, "The additive effect on propane combustion over platinum catalyst: control of the oxidation-resistance of platinum by the electronegativity of additives", *Applied Catalysis A-General*, vol. 233, no. 1-2, pp. 113-124.
- Zagar, T. & Krizaj, D. 2007, "An instrumentation amplifier as a front-end for a four-electrode bioimpedance measurement", *Physiological Measurement*, vol. 28, no. 8, p. N57-N65.
- Zen, J. M. & Patonay, G. 1991, "Near-Infrared Fluorescence Probe for Ph Determination", *Analytical Chemistry*, vol. 63, no. 24, pp. 2934-2938.
- Zimmermann, H. F., Anderlei, T., Buchs, J., & Binder, M. 2006, "Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 72, no. 6, pp. 1157-1160.

## 9. Anhang

### 9.1. Definitionen von Impedanz und Admittanz

Da in dieser Arbeit die elektrischen Eigenschaften der untersuchten Lösungen in unterschiedlichen Formen dargestellt und ausgewertet wurden, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die Zusammenhänge der einzelnen Größen vermittelt werden.

Die Impedanz  $\underline{Z}$  ist der komplexe Widerstand eines linearen passiven Zweipols bei Wechselspannungen und Wechselströmen. Sie ist definiert als Quotient der Spannung  $u(t)$  durch den Strom  $i(t)$ . Die Admittanz  $\underline{Y}$  ist der Kehrwert der Impedanz  $\underline{Z}$ . Eine Darstellung der komplexen Größen ist über deren Betrag ( $|\underline{Z}|$  bzw.  $|\underline{Y}|$ ) mit zugehörigem Phasenwinkel ( $\varphi$  bzw.  $\delta$ ) oder über Real- ( $R$  bzw.  $G$ ) und Imaginärteile ( $X$  bzw.  $B$ ) möglich.

	Impedanz	Admittanz
Polarkoordinaten	$\underline{Z} =  \underline{Z}  \cdot e^{j\varphi}$	$\underline{Y} =  \underline{Y}  \cdot e^{j\delta}$
Kartesische Koordinaten	$\underline{Z} = R + jX$	$\underline{Y} = G + jB$
Beträge	$ \underline{Z}  = \sqrt{R^2 + X^2}$	$ \underline{Y}  = \sqrt{G^2 + B^2}$

In der folgenden Abbildung sind die Zusammenhänge anhand der Impedanz graphisch veranschaulicht:

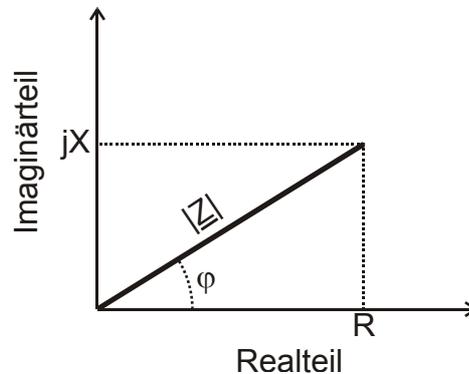
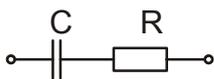


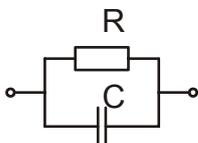
Abbildung 9.1.1. Graphische Darstellung der komplexen Impedanz

Es gelten weiterhin folgende Zusammenhänge:



$$\underline{Z} = R + \frac{1}{j\omega C}$$

$$\underline{Y} = \frac{j\omega C}{1 + j\omega CR}$$



$$\underline{Z} = \frac{R}{1 + j\omega CR}$$

$$\underline{Y} = \frac{1}{R} + j\omega C$$

## 9.2. Debye Relaxation

Die Debye-Relaxation beschreibt das Verhalten vieler Dipole in einem Gesamtsystem. Wenn die Dipole aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen Trägheit schnellen elektrischen Anregungen nur zögerlich folgen, spricht man von einer Relaxation. Die Debye-Relaxation geht vereinfachend davon aus, dass alle Dipole sich gleich und unabhängig voneinander verhalten. Das der Debye-Relaxation zugrunde liegende Ersatzschaltbild sieht wie folgt aus (Arlt 1989):

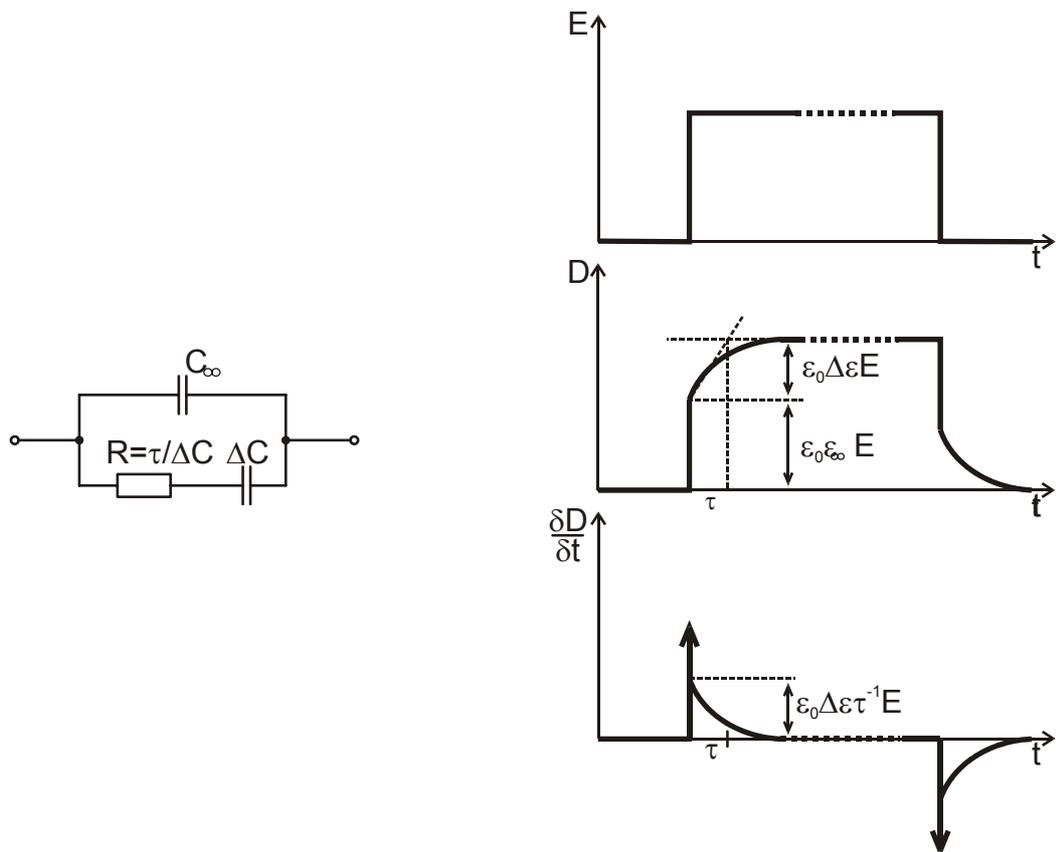


Abbildung 9.2.1. Ersatzschaltbild einer Debye-Relaxation mit einer typischen Sprungantwort im Zeitbereich auf ein äußeres elektrisches Feld

Hierbei beschreibt  $C_\infty$  die Kapazität bzw. die Polarisierbarkeit, die keinem Relaxationsvorgang unterliegt und schnell genug äußeren Feldern folgen kann. Die Kapazität  $\Delta C$  quantifiziert den zusätzlichen Anteil der Polarisierbarkeit, der zeitverzögert nach einem Anlegen äußerer Felder hinzu kommt. Diese Zeitverzögerung wird im ESB in Abbildung 9.2.1 durch den Widerstand  $R$  repräsentiert.

Setzt man  $C_\infty = \epsilon_0 \epsilon_\infty A/d$ ,  $\Delta C = \epsilon_0 \Delta \epsilon A/d$ , wobei  $A$  die Querschnittsfläche des untersuchten Materials und  $d$  die Dicke des Materials beschreiben, so folgt als Sprungantwort der elektrischen Verschiebungsdichte  $D$  und des elektrischen Verschiebestromes  $\delta D/\delta t$  mit  $D = Q/A$  auf ein spontan angelegtes elektrisches Feld  $E$  das in Abbildung 9.2.1 gezeigte Verhalten.

Betrachtet man nun elektrische Wechselfelder, werden komplexe Größen verwendet.

Aus den komplexen Wechselfeldern für  $E^*$  und  $D^*$  ergibt sich leicht die komplexe relative Dielektrizitätszahl  $\epsilon_r^*$ .

$$E^* = \hat{E}^* \cdot \exp(j\omega t) \quad \wedge \quad D^* = \hat{D}^* \cdot \exp(j\omega t)$$

$$\Rightarrow \frac{\hat{D}^*}{\epsilon_0 \hat{E}^*} = \epsilon_r^* = \epsilon_r' + j\epsilon_r''$$

Das Frequenzverhalten der relativen Dielektrizitätszahl  $\epsilon_r^*$  ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

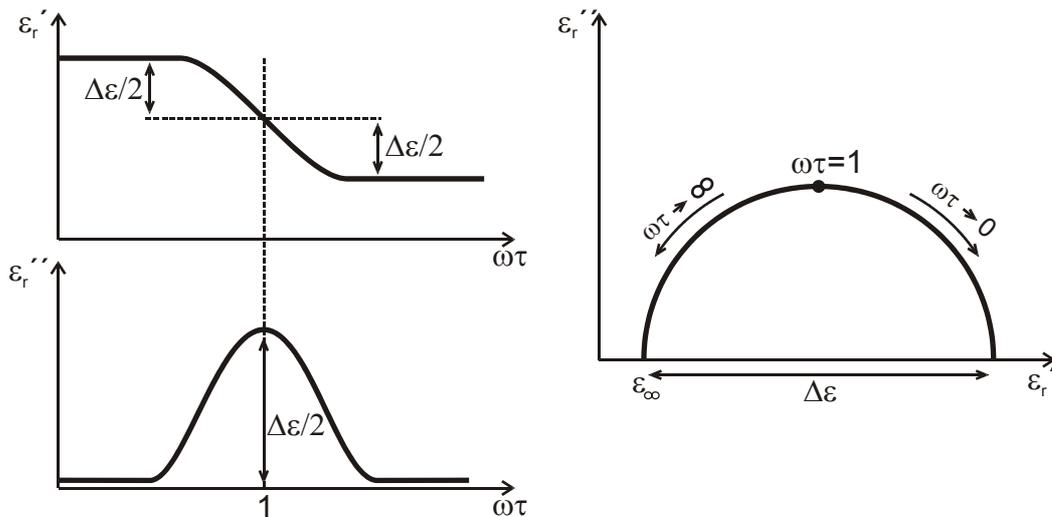


Abbildung 9.2.2

Während die reale relative Permittivität zu hohen Frequenzen hin abnimmt und eine charakteristische Stufenform beschreibt, bildet der Imaginärteil der Permittivität genau in der Mitte dieser Stufe ein Maximum aus (Abbildung 9.2.2 links). Betrachtet man die Ortskurve der komplexen Permittivität, also den Imaginärteil als Funktion des Realteils, so wird ein perfekter Halbkreis durch die Debye-Relaxation beschrieben (Abbildung 9.2.2 rechts).

---

### 9.3. Bemerkungen zur Sensorherstellung

Um die in Kapitel 3.2 beschriebenen Effekte eines Positivlacks bei der galvanischen Herstellung der Goldschicht zu verdeutlichen, sind hier noch einmal Rasterelektronenmikroskopaufnahmen vorgestellt, die die überhängenden Goldkanten zeigen, die mit dem gesputterten Platin nicht vollständig abgedeckt werden konnten.

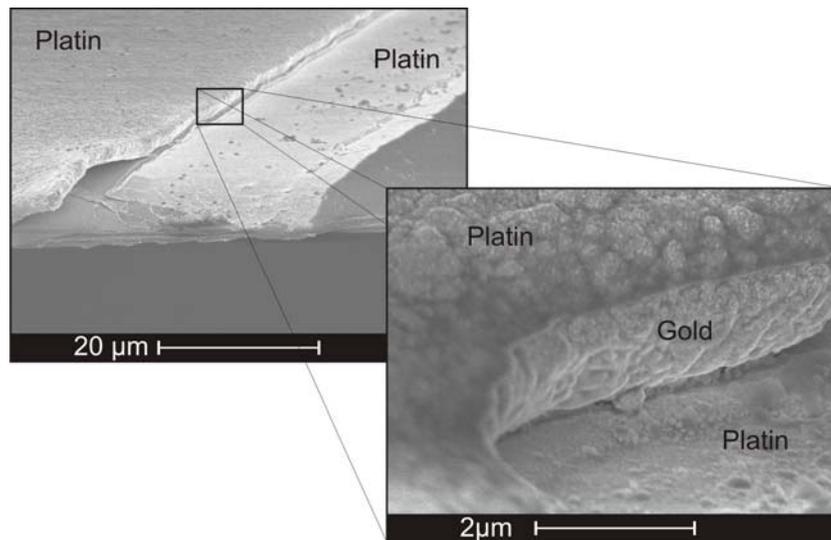


Abbildung 9.3.1. Rasterelektronenmikroskopaufnahme der Kante einer Elektrode mit überhängenden Goldkanten

An dieser Stelle sei auch die Wahl einer Titanschicht als Haftvermittler der Platingbase hervorgehoben. Als die bevorzugte Schicht zur Herstellung stabiler Gold-Polymer-Verbindungen wird meist eine dünne Schicht aus Chrom verwendet. Bei der Galvanik zeigt sich jedoch, dass die Verwendung von Chrom als Haftvermittler gravierende Nachteile aufweist. Die reinen Haftungseigenschaften einer Chrom-Gold-Platingbase sind hervorragend. Auch eine darauf folgende Galvanisierung bereitet keine Schwierigkeiten. Wird jedoch nach der Lackentfernung die Platingbase geätzt, erweist sich das Chrom als schlechte Wahl. Zur Entfernung der Chromhaftvermittlerschicht stehen zwei verschiedene Ätzlösungen zur Verfügung. Sie unterscheiden sich in erster Linie durch die Art ihres reaktiven Bestandteiles. Die eine Lösung ist säurebasiert (Perchlorsäure ( $\text{HClO}_4$ ) und Ammoniumcernitrat ( $(\text{NH}_4)_2(\text{Ce}(\text{NO}_3)_6)$ )) während die zweite auf einer Lauge basiert (10 g KOH + 10 g Kaliumferricyanid + 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Bei einer Strukturierung der Chromschicht mittels Perchlorsäure und Ammoniumcernitrat kommt es zu starken Verunreinigungen der Goldoberfläche. Nebenprodukte des Ätzprozesses lagern sich als kleine Partikel auf dem Wafer ab. Eine weitere Verarbeitung dieser verunreinigten Wafer ist nicht sinnvoll. Bei der Verwendung von KOH mit Kaliumferricyanid wirkt die Chrom-Gold-Kombination als Katalysator des Ätzprozesses und es kommt zu enorm hohen Unterätzraten. An den unteren Kanten wird nicht nur die Chromschicht geätzt, auch das Gold wird an diesen Stellen von der Lösung angegriffen (Verweis auf SEM-Bild). Die so deutlich reduzierte Chromschicht unter dem Gold führt zu einer

Verringerung der Haftungseigenschaften. Besonders gravierend wirkt sich dies bei schmalen Strukturen aus. Hier kann die Unterätzung so stark ausgeprägt sein, dass die komplette Chromschicht unter dem Gold entfernt wird und die Goldstrukturen vom Wafer abfallen. Eine nur 30 nm hohe Unterätzung (Dicke der Chromschicht) wäre für die vollständige Bedeckung der Goldschicht durch eine 200 nm dicke Platinschicht theoretisch kein Problem. Durch den Ätzangriff auf das Gold an der Unterkante vergrößert sich jedoch der Spalt, so dass es wieder zu großen abgeschatteten Randbereichen kommt, die nicht durch den Platin-Sputterprozess erreicht werden können.

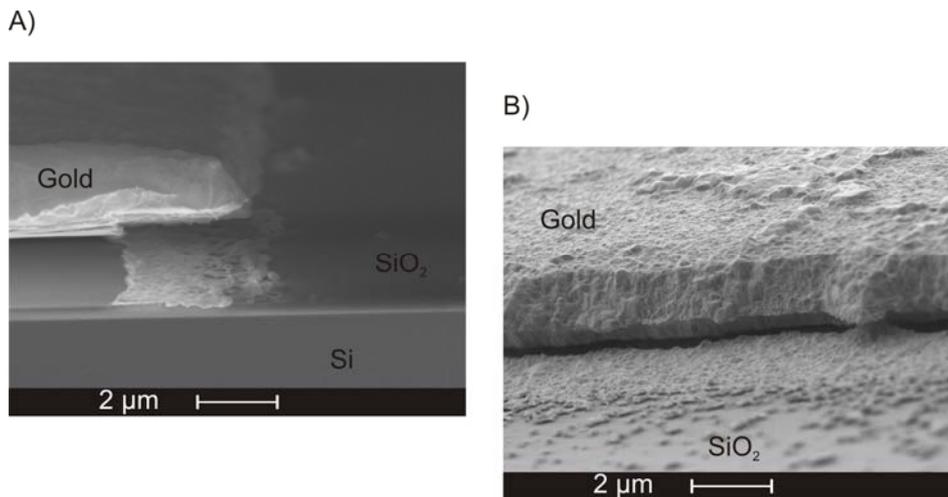


Abbildung 9.3.2. Rasterelektronenmikroskopaufnahmen einer strukturierten Goldgalvanik auf einer  $\text{SiO}_2$ -Schicht mit einer KOH-Kaliumferricyanid-Lösung

In Abbildung 9.3.2 A) ist eine deutliche Unterätzung von mehr als  $2\ \mu\text{m}$  zu erkennen. An der Bruchkante ist die Chromschicht sauber von der  $\text{SiO}_2$ -Schicht abgerissen. An den Stellen der Unterätzung sind Überreste des Ätzprozesses zu sehen. In Abbildung 9.3.2 B) ist eine Seitenansicht einer Goldstruktur gezeigt. Deutlich zu erkennen ist der dunkle Spalt der Unterätzung an der unteren Kante der Goldschicht. Ebenfalls zu sehen sind die bei der Ätzung entstandenen Nebenprodukte, die sich um das Gold herum auf dem  $\text{SiO}_2$  angelagert haben. Bei einem Ätzprozess, bei dem der Ätzstopp über Sichtkontrolle bestimmt wird, können die Unterätzungen so gravierend werden, dass die Haftung des Goldes gefährdet ist.

Als allgemeine Konsequenz lässt sich zusammenfassen, dass eine Haftvermittlerschicht für Gold aus Chrom vor allem für einen Lift-Off-Prozess geeignet ist. So können die hervorragenden Haftungseigenschaften von Chrom genutzt werden, ohne die Schichten durch ein späteres nasschemisches Ätzen zu beschädigen. Da bei galvanischen Goldschichten in der Regel immer eine Strukturierung durch nasschemische Ätzschritte am Ende erfolgt, sollte eine Titanschicht als Haftvermittler bevorzugt werden. Ein selektives Ätzen der Titanschicht mittels stark verdünnter Flußsäure (HF) ist ein einfach zu kontrollierender Ätzvorgang, bei dem sich keine ungewollten Randeffekte zeigen.

---

## 9.4. Verwendete Nährlösungen für die Versuche mit lebenden Zellen

### Hefemedien:

YNB	(Yeast Nitrogen Base)	
<b>Vitamine</b>		
	Biotin	2 µg/l
	Kalziumpantothenat	400 µg/l
	Folsäure	2 µ/l
	Inositol	2000 µg/l
	Niacin	400 µg/l
	p-Aminobenzoessäure	200µg/l
	Pyridoxinhydrochlorid	400 µg/l
	Riboflavin	200 µg/l
	Thiaminhydrochlorid	400 µg/l
<b>Bestandteile zur Unterstützung von Spurenelementen</b>		
	Borsäure	500 µg/l
	Kupfersulfat	40 µg/l
	Kaliumiodid	100 µg/l
	Eisenchlorid	200 µg/l
	Magnesiumsulfat	400 µg/l
	Natriummolybdat	200 µg/l
	Zinksulfat	400 µg/l
<b>Salze</b>		
	Monokaliumphosphat	1,0 g/l
	Magnesiumsulfat	0,5 g/l
	Natriumchlorid	0,1 g/l
	Calciumchlorid	0,1 g/l
<b>Resultierender pH-Wert</b>		4,3 – 4,7 bei 25°C

<b>YPD und YPG</b> (Yeast extract Peptone Dextrose / Glucose)	
<b>Substanz</b>	
Glucose (D) / Glycerin (G)	20 / 10 g/l
Trypton / Pepton	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
<b>Resultierender pH-Wert</b>	7,5 – 8,0 bei 25°C

**Medium für Escherichia Coli:**

<b>TB</b> (Terrific Broth)	
<b>Substanz</b>	
Glycerin (G)	5 g/l
Trypton	12 g/l
Hefeextrakt	24 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31 g/l
<b>Resultierender pH-Wert</b>	7,5 – 8,0 bei 25°C

---

## 9.5. Lebenslauf

Mirko Hofmann

29.12.1976	Geboren in Lima Peru
1983 – 1984	Grundschule Dormagen
1984 – 1987	Grundschule Odenthal
1987 – 1996	Freiherr vom Stein Gymnasium Leverkusen
1996 – 1997	Ersatzdienst: Behindertenbetreuung am Flughafen Köln/Bonn
1997 – 2003	Diplom Studium der Elektrotechnik an der RWTH-Aachen
1997	Grundpraktikum bei der Bayer AG in Leverkusen
1999 – 2001	Studentische Hilfskraft am Institut für Kunststoffverarbeitung der RWTH-Aachen (IKV)
2001 – 2002	Studentische Hilfskraft am Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik 1 (IWE-1)
2002	Fachpraktikum am „Samsung Advanced Institute of Technology“ (SAIT) in Suwon, Südkorea
2003 – 2008	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik 1, Prof. rer. nat. W. Mokwa
2005	Gründung der Firma <i>m2p-labs</i> GmbH
seit 2008	Technischer Projektleiter bei der Robert Bosch GmbH in Reutlingen