

# Optische Sonde zum Nachweis von Mikrosphären

Dr. Peter Klauth, Forschungszentrum Jülich

Dipl. Ing. Andreas Joschko, **iNano** *Institut für angewandte Nano- und Optische Technologien der Hochschule Niederrhein*

## Vorwort

Mit der vorgestellten Arbeit soll ein Einblick in das Innere einer mit Sand gefüllten Laborsäule ermöglicht werden, in der sich mikroskopisch kleine Teilchen mit dem Wasserfluss bewegen. Mit Hilfe dieser Laborsäule soll eine natürliche Umgebung der Agrarökosysteme simuliert werden.

Durch die gefüllte Laborsäule werden kolloidale Partikel (0,2-2  $\mu\text{m}$ ), transportiert. Diese Partikel besitzen ähnliche Eigenschaften wie Lebewesen, die in der Natur zu finden sind, zum Beispiel wie Bakterien. Mit solchen Versuchen sollen Transportvorgänge der Stoffe im Boden untersucht, und die Entwicklung von numerischen Simulationen durch Parameterfindung ermöglicht werden.

Bei den Partikeln, die bei den Versuchen verwendet werden, handelt es sich um Mikrosphären (MS), die mit einem optisch aktiven Fluoreszenzfarbstoff markiert sind und einen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  haben. Bei der Anregung der MS im UV- Bereich von 375 nm wird eine Emission im roten Spektrum von 613nm erzeugt.

Diese optische Aktivität der MS, die sich durch Fluoreszenz äußert, soll ausgenutzt werden, um deren Konzentration und örtliche Position in den untersuchten Säulen zu bestimmen. Die Fluoreszenzlebensdauer der ausgewählten MS ist um Größenordnungen höher ( $10^{-3}$  s gegenüber  $10^{-6}$  s) als vergleichbare natürliche Fluoreszenzen, was eine zeitliche Diskriminierung des MS-Signals gegenüber der natürlichen Umweltfluoreszenz ermöglicht.

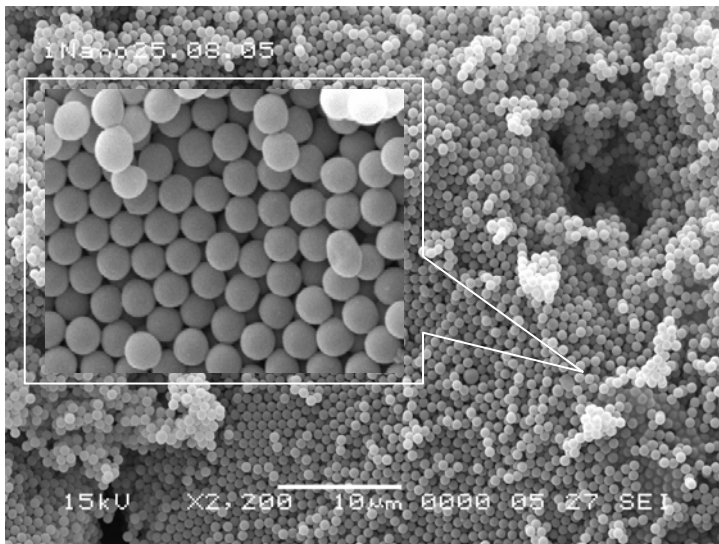
Um die MS quantitativ nachweisen zu können, wurde eine Lichtwellenleitersonde entwickelt. Diese Sonde leitet gepulstes Licht in die mit Sand gefüllte Säule ein, wodurch die vorhandenen MS angeregt werden. Die dabei entstehende Fluoreszenz der MS wird von einem Fotodetektor, der in die Lichtleitersonde eingebaut ist, aufgenommen. Bei dem durchgeführten Versuch handelt es sich um eine zeitaufgelöste Messung, bei welcher die abfallende Flanke der Emission gegenüber der Zeit betrachtet wird.

## Mikrosphären

In dem Begriff Mikrosphären verbergen sich zwei Worte. Das Wort „Mikro“ stammt ursprünglich aus der griechischen Sprache und bedeutet klein oder gering. Bei dem zweiten Wort „Sphäre“ handelt es sich ebenfalls um ein griechisches Wort, das für eine Kugel steht.

Die Mikrosphären sind kleine Partikel mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ , die aus Polymethylmetacrylat (PMMA, Plexiglas) bestehen und in die der Farbstoff Euttaphen integriert ist. Die Oberfläche der MS kann entsprechend den Anforderungen des Experimentes modifiziert werden. Dabei kann es z.B. zu erhöhter Wasserlöslichkeit (Hydrophilie) durch Modifikation von Carboxylgruppen (-COOH) kommen, im folgenden PMMS EU/COOH genannt. Variationen in der Hydrophilie sind in der belebten Natur sehr häufig und ein Charakterisationsmerkmal der „echten“ Bodenpartikel, wie z.B. der Bakterien.

Die Mikrosphären sind in Zusammenarbeit mit der Firma Microparticles GmbH (Berlin) und der FH Steinfurt/Münster entwickelt worden. In Abbildung 1, die mit einem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen wurden, sind die Mikrosphären zu erkennen. Das große Bild ist in einer Vergrößerung von 2200 x aufgenommen worden und der kleinere Ausschnitt mit der Vergrößerung von 5500x.



**Abbildung 1:** REM-Aufnahme von Mikrosphären

Bei dem Farbstoff handelt es sich um einen so genannten Seltene-Erden-Chelat-Komplex. Diese Farbstoffe enthalten als Zentralatom ein Lanthanid-Ion, welches von Liganden komplexiert wird, und charakterisieren sich durch eine große Stokes'sche Verschiebung, was bedeutet, dass zwischen der Anregung und Emission eine große spektrale Differenz vorhanden ist. In diesem Fall ist die Differenz zwischen der Anregung (375 nm) und der Emission (613 nm) mit 236 nm sehr groß. Die Anregung und Emission sowie die chemische Struktur sind in der Abbildung 2 zu finden.

Lumineszenzspektren  
 (1-thenyl-,4,4,4-trifluor-1,3-butane-,1,3-dionato)(1,10-phenanthrolinato) Eu (+III)

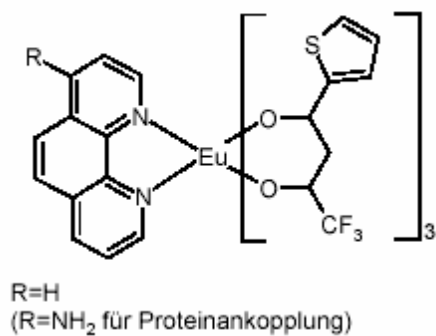
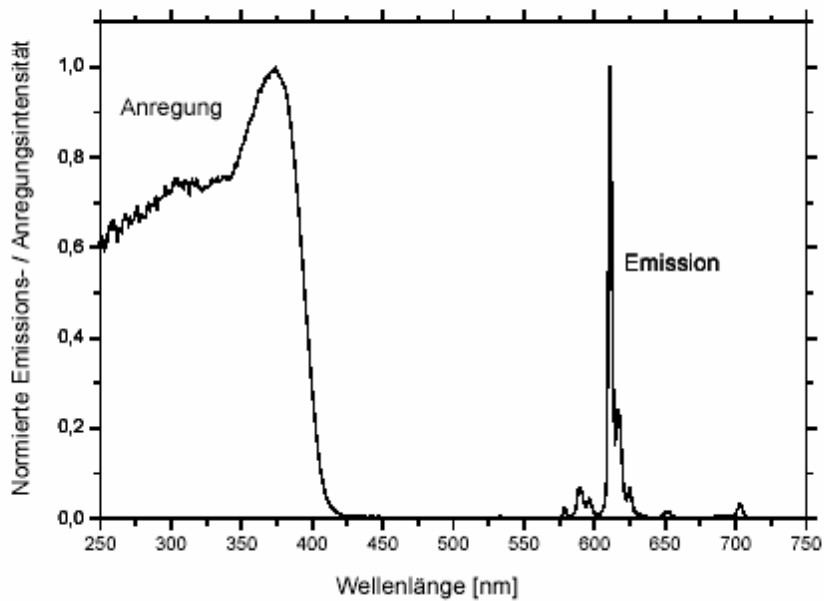


Abbildung 2: Oben: Anregungs- und Emissionsspektrum des verwendeten Seltene-Erden-Chelat-Komplexes, Unten: Chemische Struktur

Bei den konventionellen Farbstoffen, die heute sehr oft verwendet werden, handelt es sich um rein organische Farbstoffe. Organische Farbstoffe zeigen im Gegensatz zu den Seltene-Erden-Chelat-Komplexen immer Überlappungen zwischen ihrem Anregungs- und Emissionsspektrum. Die spektrale Differenzierung zwischen Anregungs- und Emissionslicht ist dort schwieriger und muss durch steilflankige Filter erreicht werden. Zum Vergleich hierzu zeigt Abbildung 3 einen organischen Farbstoff (DAPI), der ebenfalls mit UV-Licht angeregt wird und im blauen Spektralbereich fluoresziert (Quelle: . www.probes.com).

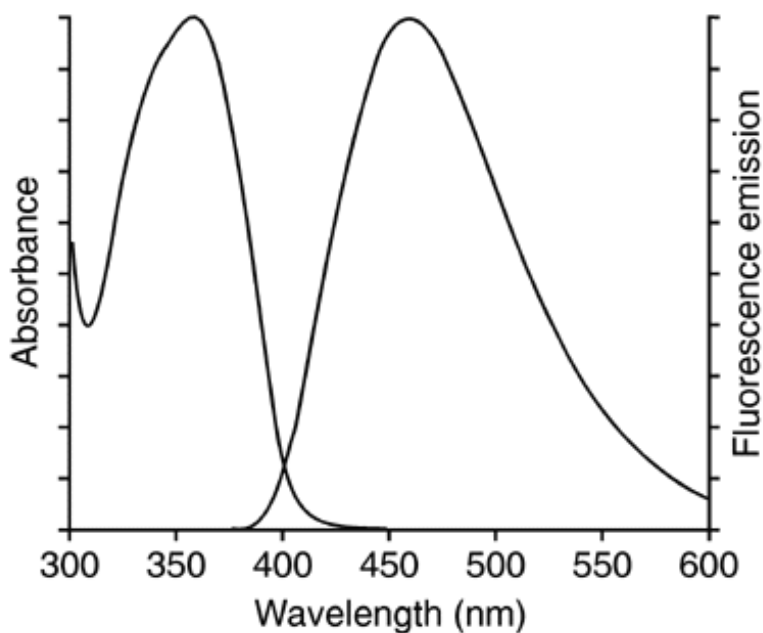


Abbildung 3.: Anregungs- und Emissionsspektrum von DAPI

## Fluoreszenz

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen physikalischen Effekt, der einen Emissionsvorgang beschreibt. Die Emission tritt solange auf, wie die fluoreszierenden Moleküle durch Lichtabsorption angeregt werden.

Bei der Absorption eines Lichtquants wird seine Energie auf Elektronen des Moleküls übertragen, was zu einem Übergang vom Singulettgrundzustand zu einem höher angeregten Singulettzustand führt. Wird durch die Übertragung der Energie ein Molekül in einem höheren energetischen Zustand als  $S_1$  angeregt, so relaxiert es innerhalb von etwa  $10^{-14}$  Sekunden ohne Emission zum  $S_1$ -Zustand. Durch die Wechselwirkung wird die Energie der Moleküle, die auf den Zustand  $S_1$  herabfallen, an die umgebenden Moleküle übergeben. Die umgebenden Moleküle sind nicht im Stande die freigesetzte Energiedifferenz, die durch den Wechsel in dem Grundzustand entsteht, aufzunehmen. Somit kann das Molekül seinen Grundzustand erreichen, indem es die Energiedifferenz in Form von Licht emittiert. Die Fluoreszenz wird durch die Lebensdauer des angeregten Zustandes definiert ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  s).

Die bei der Fluoreszenz freigesetzte Energie ist wegen des strahlungslosen Zerfalls kleiner als die bei der Anregung aufgenommene Energie. Dies bedeutet, dass die Frequenz des emittierten Lichts kleiner ist als die des eingestrahlt Lichts. In der Physik wird der Effekt meistens nach dem ersten Beobachter benannt, der dies erforscht und beschrieben hat. Sie heißt Stokes'sche Verschiebung. In der Tat handelt es sich nicht um einen Stokes'sche Verschiebung im klassischen Sinne, weil bei den Seltene-Erden-Chelatkomplexen ein Energietransfer zwischen den Liganden (Chelate) und dem Zentralatom (Seltene-Erden)

stattfindet. Diese Tatsache wird im Folgenden nicht weiter erwähnt, da sie für die Anwendung keine Bedeutung hat.

## Messprinzip

Durch die Eigenschaft der Seltene-Erden-Chelat-Komplexe, welche als Farbstoffe bei den verwendeten Mikrosphären benutzt werden, musste eine Messmethode entwickelt werden, die eine zeitliche Diskriminierung des langlebigen Fluoreszenzsignals ermöglicht. Nach Anregung beginnt der Farbstoff zu fluoreszieren und beendet diese Aktivität erst Millisekunden nach Abschalten des Anregungssignals. Die Fluoreszenzen von organischen Farbstoffen beenden ihre Fluoreszenzaktivität nach spätestens einigen Mikrosekunden.

Ab dem Zeitpunkt der Abschaltung, bzw. nach dem Zeitfenster der organischen Farbstoffe, wird das abklingende Fluoreszenzlicht gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt mit der Zeit exponentiell ab (Diagramm 1).

Das kumulierte Fluoreszenzsignal (die Fläche unter der abfallenden Flanke) korreliert mit der Konzentration des Farbstoffs, bzw. der Mikrosphären.

Aufgetragen im Diagramm 1 ist die Spannung, welche durch einen Transimpedanzverstärker aus dem Stromsignal des Photodetektors umgewandelt wurde. Bei sehr kleinern Lichtemissionen wurde der erzeugte Strom jedoch durch den Dunkelstrom überdeckt.

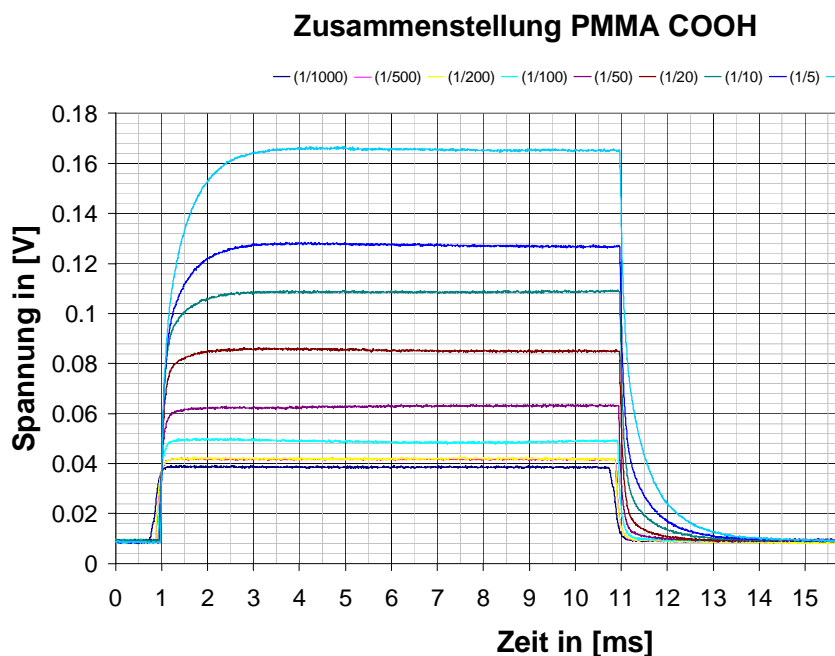


Diagramm 1: Abhängigkeit der Spannung der Photodiode von der Menge an Mikrosphären, dargestellt als Verdünnungen einer Stammlösung ( $10^{11}$  / mL). Die Abschaltung erfolgt bei 11 ms, danach wird die fallende Flanke vermessen.

Für die Anregung werden UV-LED's benutzt, welche mit einem 10 ms dauernden Rechtecksignal (Diagramm 1) bei einer Frequenz von 50 Hz angesteuert werden. Nach der Zeit, in der die UV-LED's ausgeschaltet sind, wird die Fluoreszenz mit einem Photodetektor gemessen (Diagramm 1). Jede Kurve stellt ein Messsignal bei einer gegebenen Konzentration der Proben dar.

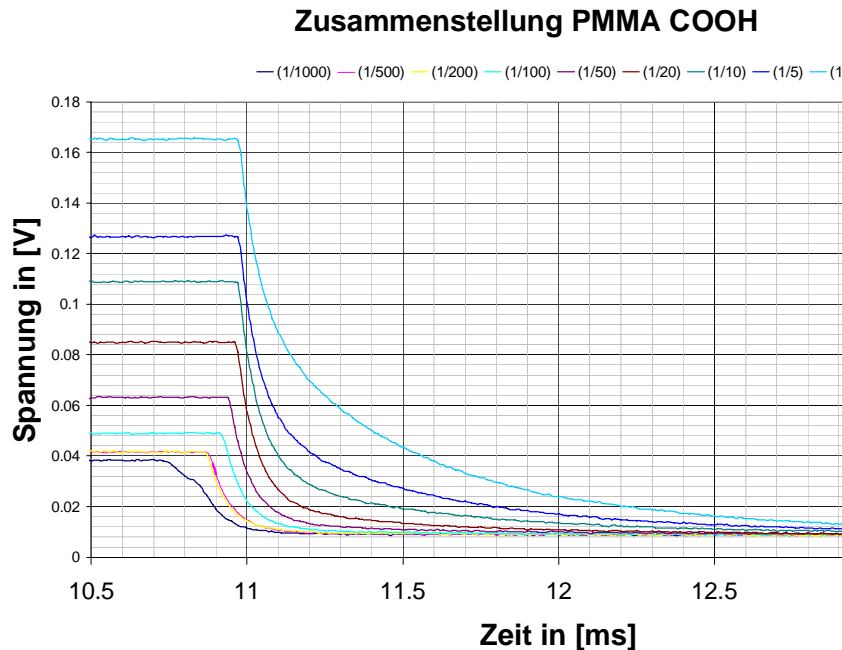


Diagramm 2 : Ausschnittsvergrößerung aus Diagramm 1 der fallenden Flanken.

In Diagramm 2 sind die abfallenden Flanken dargestellt. Die Amplitude ist von der Konzentration abhängig.

Um die gemessenen Konzentrationen bestimmen zu können, wird die Fläche der abfallenden Flanke berechnet. Das Messsignal der Sonde wird mit einer Messkarte (DAQPad 6052) aufgenommen und weiter an einen Computer übertragen. Die weitere Berechnung der Integralflächen erfolgt mit Hilfe eines Programms, welches in LabVIEW implementiert ist. Anhand der berechneten Integralfläche kann somit die Konzentration bestimmt werden.

### Lichtwellenleitersonde

Bei dem derzeitigen Stand der Sondenentwicklung ist die Hauptkomponente der Sonde ein Glasrohr, welches einen inneren Durchmesser von 11 mm, eine Wandstärke von 1 mm und eine Länge von 130 mm hat. Das Glasrohr besteht aus Quarzglas HOQ 310 der Firma HERAEUS, welches über eine hohe optische Durchlässigkeit für UV- Licht verfügt.

Die Komponente, welche für die Detektierung des Fluoreszenzlichtes verwendet wird, ist der Photodetektor OPT101.

Für die Anregung werden Leuchtdioden im UV- Bereich mit einer Wellenlänge von 375nm verwendet. Um das UV- Licht, welches mit den LED's erzeugt wird, an das Glasrohr anzukoppeln, werden ca. 5 cm lange PMMA- Lichtwellenleiter verwendet. Bei der Länge der Lichtwellenleiter spielt die Dämpfung im UV- Bereich eine sehr geringe Rolle.

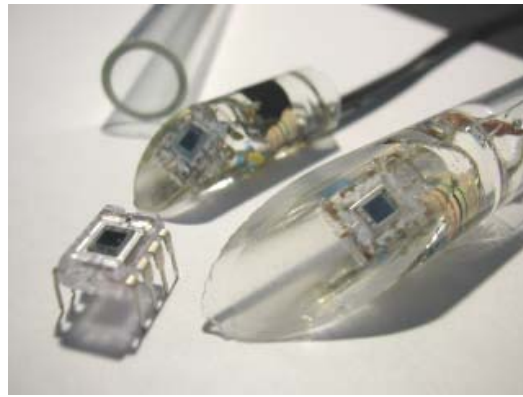


Abbildung 5 : Bestandteile und komplette Sonde

In der Abbildung 5 werden die verwendeten Komponenten gezeigt. Oben ein Quarzglasrohr und darunter ein vergossener Photodetektor. Links im Bild ist ein nicht verschalteter OPT101 und rechts unten eine fertige Lichtwellleitersonde zu sehen.

### **Aufbau der Messanordnung**

Um naturnahe Umweltbedingungen im Labor zu simulieren, wurde eine Laborsäule mit Quarzsand gefüllt (TECO-SIL<sup>TM</sup>).

Die Laborsäule wurde über Schläuche mit geringen Innendurchmessern (zur Vermeidung von Entmischungen aufgrund von Dispersivitäten) mit der Pumpe und einem nachgeschalteten Fluoreszenz-Diodenarray-Detektor verbunden. Dieser Detektor diente als Referenz für die Durchbruchkurven der Mikrosphären. Sein Signal war aufgrund der räumlichen Trennung zeitlich verzögert gegenüber dem Sondensignal. Die Sonde befand sich in der Mitte der Laborsäule. Die dabei aufgenommenen Daten aus der Sonde wurden mittels eines Computers aufgenommen. Die Versuchsanordnung ist schematisch in Abbildung 6. dargestellt.

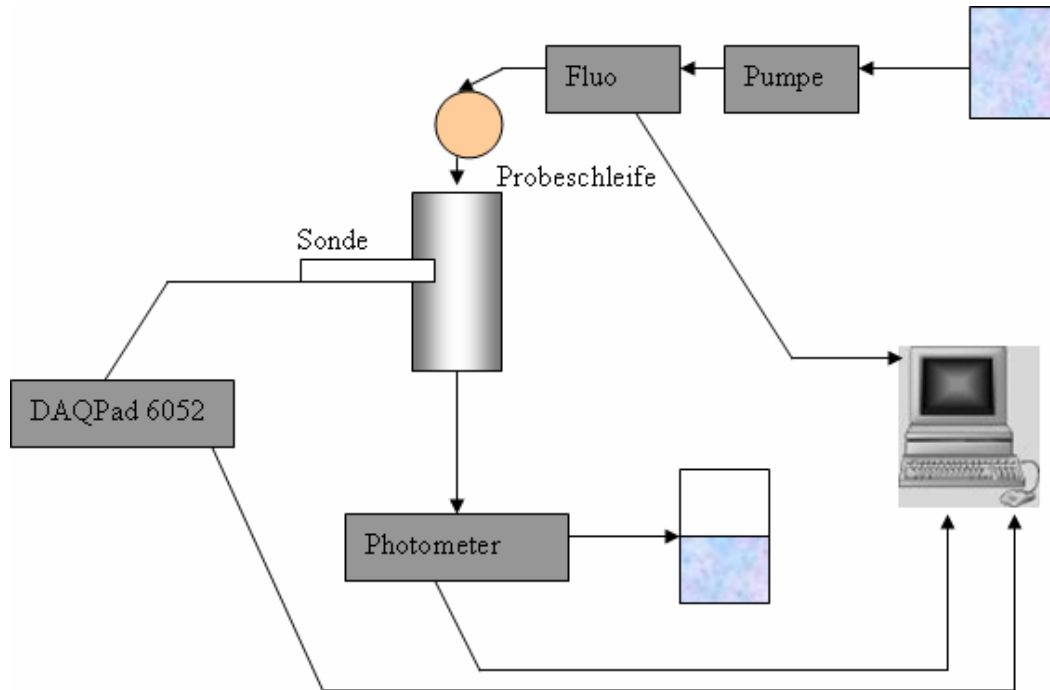


Abbildung 6. Versuchsanordnung der Laborsäule mit allen Peripheriegeräten.

### Durchführung der Säulenversuche

Die gesättigte Säule wurde über 2 Stunden mit einem Puffermedium equilibriert. Die eingestellte Flussgeschwindigkeit betrug 3ml/min. Dies diente der Entfernung von Luftblasen und der endgültigen Setzung der Sandpackung. Anschließend, nachdem der Equilibationsvorgang abgeschlossen war, wurde über die Probeschleife 1 ml einer Suspension der Mikrosphären ( $4 \cdot 10^9$ ) aufgegeben. Nach einer definierten Zeit, die von der Flussgeschwindigkeit abhängig ist, wurde die Durchbruchkurve der MS in der Säule von der Sonde und später von dem nachgeschalteten Fluoreszenz-Diodenarray-Detektor aufgenommen. In den beiden Diagrammen 3 und 4 sind die jeweiligen Durchbruchkurven dargestellt. Die Signale sind zeitlich gleich skaliert.

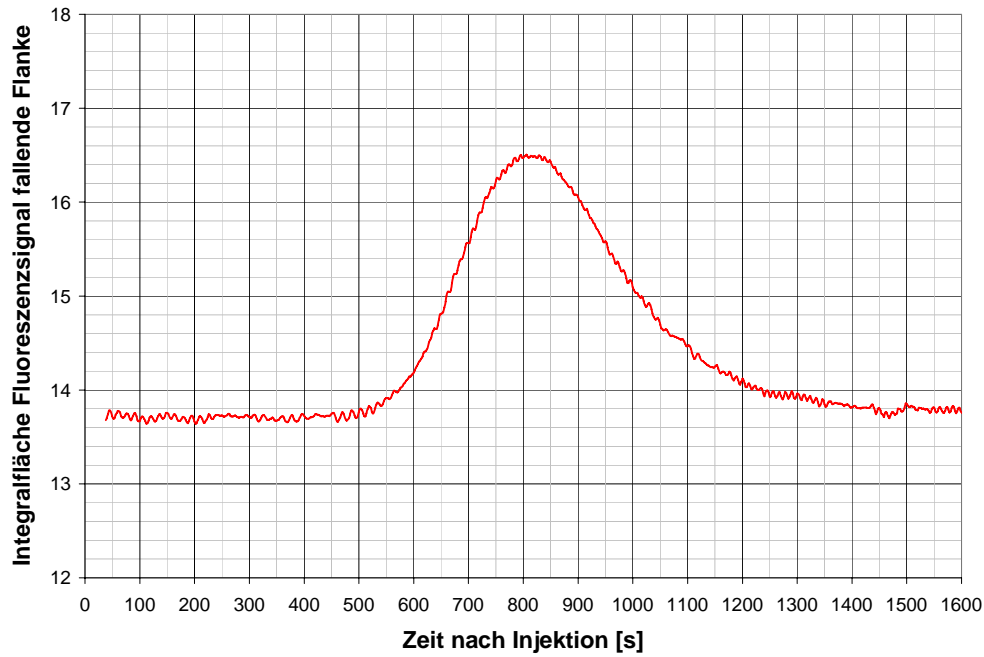


Diagramm 3 : Durchbruchkurve der MS innerhalb der Laborsäule, gemessen mittels Lichtleitersonde.

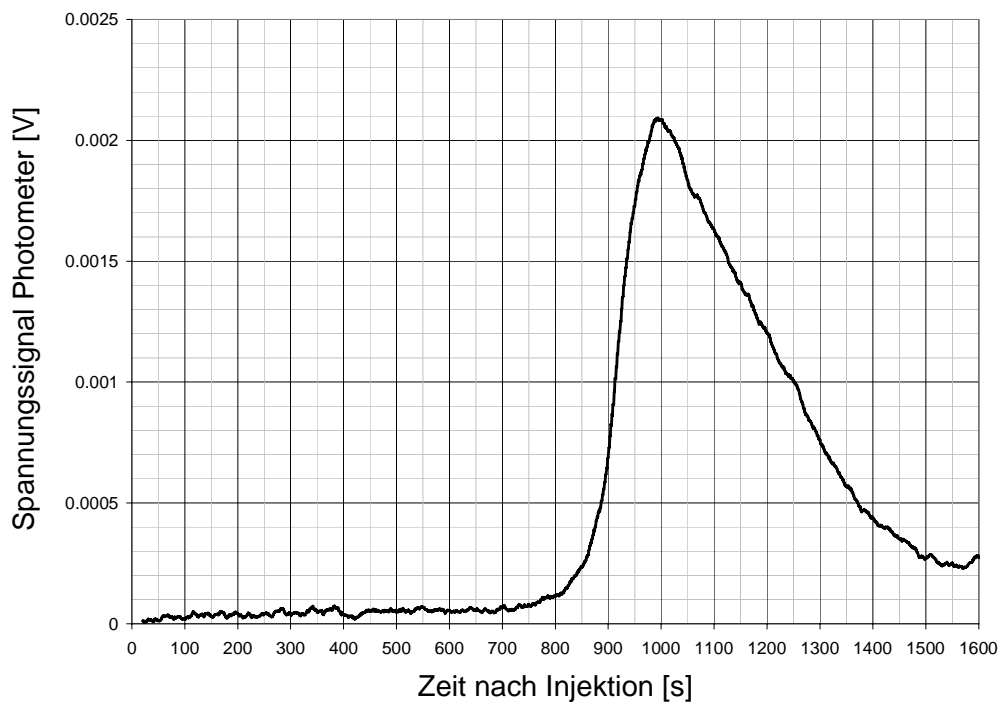


Diagramm 4 : Durchbruchkurve Fluoreszenz-Diodenarray-Detektor nach Passage der Säule.

Nach Abschluss des Versuches wurde die Säule in zwölf je 1 cm hohe Schichten zerlegt, indem der Inhalt der Säule vorsichtig in Plastischälchen überführt wurde. Zur Vorbereitung der Schälchen für die Mikroskopie wurden die 12 Schich-

ten in 50ml Puffer suspendiert. Danach wurde ein Aliquot aus der Suspension entnommen und auf einen Polycarbonatmembranfilter der Firma Millipore (GPIB) aufgebracht und die Flüssigkeit entzogen. Durch die sehr kleine Porengröße des Filters von 0,2  $\mu\text{m}$  bleiben die Mikrosphären zurück. Um die Anzahl der Mikrosphären zu ermitteln, wurden 20 Aufnahmen der Filteroberfläche mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die so erstellten Bilder von der Filteroberfläche wurden mittels Bildverarbeitungssoftware (ZEISS KS 400 3.0) ausgewertet und die durchschnittliche Anzahl der Mikrosphären pro Schicht ermittelt.