



Dissertation
**Optoelektronische Meßsysteme
hoher örtlicher Auflösung
für phototrophe Organismen**

erstellt von
Dipl.-Ing. Björn Grunwald
am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie

eingereicht im
Fachbereich I (Physik/Elektrotechnik) der Universität Bremen

1. Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Dieter Silber
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Benecke
Betreuer und 3. Gutachter: Dr.-Ing. Gerhard Holst

März 2003
Termin des Promotionskolloquiums: 12. Mai 2003

Fortschritt-Berichte VDI

Reihe 8

Meß-, Steuerungs-
und Regelungstechnik

Dipl.-Ing. Björn Grunwald,
Bremen

Nr. 1007

**Optoelektronische
Meßsysteme hoher
örtlicher Auflösung
für phototrophe
Organismen**

VDI Verlag

Grunwald, Björn

Optoelektronische Meßsysteme hoher örtlicher Auflösung für phototrophe Organismen

Fortschr.-Ber. VDI Reihe 8 Nr. 1007. Düsseldorf: VDI Verlag 2003.

110 Seiten, 57 Bilder, 5 Tabellen.

ISBN 3-18-500708-5, ISSN 0178-9546,

€ 37,00/VDI-Mitgliederpreis € 33,30.

Für die Dokumentation: SPR – Surface plasmon resonance – Brechungsindex – Faseroptik – Chlorophyll-Fluoreszenz – Imaging – Ortsauflösung

Die Charakterisierung der Lebensbedingungen phototropher Mikroorganismen in der marinen Mikrobiologie erfordert Meßsysteme, die in der Lage sind, Gradienten chemischer Stoffe und die Zellaktivität in der Größenordnung einiger Mikrometer zu messen. Für diese Anwendung sind zwei unterschiedliche optoelektronische Sensorsysteme entwickelt worden, die den Brechungsindex in der Umgebung von Mikroorganismen mittels Oberflächenplasmonenresonanz (engl.: surface plasmon resonance, kurz: SPR) bzw. deren photosynthetische Aktivität über Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen bestimmen können.

Für die Messung des Brechungsindex ist ein faseroptischer Sensor und ein Konzept für ein kameragestütztes System entwickelt worden. Die Chlorophyll-Fluoreszenz wird mittels eines Kameraaufbaus zweidimensional aufgelöst. Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung der Meßsysteme bis hin zur erfolgreichen Anwendung.

Die Reihen der FORTSCHRITT-BERICHTS VDI:

- | | |
|--|---|
| 1 Konstruktionstechnik/Maschinenelemente | 13 Fördertechnik/Logistik |
| 2 Fertigungstechnik | 14 Landtechnik/Lebensmitteltechnik |
| 3 Verfahrenstechnik | 15 Umwelttechnik |
| 4 Bauingenieurwesen | 16 Technik und Wirtschaft |
| 5 Grund- und Werkstoffe/Kunststoffe | 17 Biotechnik/Medizintechnik |
| 6 Energietechnik | 18 Mechanik/Bruchmechanik |
| 7 Strömungstechnik | 19 Wärmetechnik/Kältetechnik |
| 8 Meß-, Steuerungs- und Regelungstechnik | 20 Rechnerunterstützte Verfahren
(CAD, CAM, CAE, CAP, CAQ, CIM, ...) |
| 9 Elektronik/Mikro- und Nanotechnik | 21 Elektrotechnik |
| 10 Informatik/Kommunikation | 22 Mensch-Maschine-Systeme |
| 11 Schwingungstechnik | |
| 12 Verkehrstechnik/Fahrzeugtechnik | |

Dissertation Universität Bremen

© VDI Verlag GmbH · Düsseldorf 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe (Fotokopie, Mikrokopie), der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, im Internet und das der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISSN 0178-9546

ISBN 3-18-500708-5

Danksagung

Diese Arbeit ist innerhalb von $3\frac{1}{4}$ Jahren in der Arbeitsgruppe „Mikrosensoren“ am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie erstellt worden. Obwohl bzw. gerade weil ich als Ingenieur fachfremd in diesem Institut war, hat mir die Entwicklung der Meßsysteme und vor allem deren Anwendung bei Fragestellungen, die ich zunächst nicht einmal aussprechen konnte, sehr viel Spaß gemacht. Allerdings wäre diese Arbeit ohne die Unterstützung vieler Leute so nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen beigetragen haben.

Besonders möchte ich meinem Betreuer Gerhard Holst danken, der mich von meiner eigenen Arbeit immer wieder überzeugt hat und mir in vielen Diskussionen zahlreiche Impulse in die richtige Richtung gegeben hat. Er war gerade in der Anfangszeit die Schnittstelle zwischen der mikrobiologischen Anwendung und meinem Verständnis. Desweiteren war er geradezu ein Fundus an praktischen Lösungen für eben die „Kleinigkeiten“, die einen manchmal an einem Problem verzweifeln lassen. Mein Dank gilt auch Michael Kühl, der mich durch seine Begeisterung für technische Lösungen immer wieder motivieren konnte und mir bei meinen Besuchen in Helsingør und auf der Forschungsstation Heron Island einen anschaulichen Einblick in mikrobiologische Fragestellungen geben konnte, aus dem viele Ideen entsprungen sind.

Danken möchte ich auch Volker Meyer, Paul Färber und Harald Osmers aus der Elektrowerkstatt für ihre Unterstützung bei technischen Fragen sowie Georg Herz und Alfred Kutsche aus der Feinmechanik. Die beiden waren zwar oft bei meinen speziellen Wünschen der Verzweiflung nahe, lieferten aber dennoch immer mit einem Lächeln echte Qualitätsarbeit. Nicht zuletzt gilt mein Dank auch Uli Franke und Luboš Polerecký, die mit mir das Büro geteilt haben und genauso wie der gesamte Korridor der Mikrosensorgruppe maßgeblich zur tollen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. In der heißen Schlußphase danke ich besonders meiner Schwester Käthe für das Lektorat, bei dem sie sichtlich Spaß hatte, und die vielen aufmunternden Worte. Zu guter letzt möchte ich noch Bo Barker Jørgensen danken, der es mir ermöglicht hat, in diesem schönen Institut zu promovieren.

Für meine Eltern.

„Fröhliche Wissenschaft‘: das bedeutet die Saturnalien eines Geistes, der einem furchtbaren langen Drucke geduldig widerstanden hat – geduldig, streng, kalt, ohne sich zu unterwerfen, aber ohne Hoffnung –, und der jetzt mit einem Male von der Hoffnung angefallen wird, von der Hoffnung auf Gesundheit, von der Trunkenheit der Genesung.“

Friedrich Nietzsche

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
	Literaturverzeichnis	6
I	Brechungsindexmeßsysteme auf Grundlage von Oberflächen-Plasmonenresonanz	7
2	Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR)	8
2.1	Reflexion an dünnen Schichten	8
2.2	Brechungsindexabhängigkeit von SPR	13
3	SPR Meßsysteme	18
3.1	Prismabasierende SPR	19
3.2	Faseroptische SPR	20
3.3	Bildgebende SPR	23
4	Faseroptischer Brechungsindexsensor	25
4.1	Modellierung	25
4.1.1	Lichtausbreitung in beschichteten Glasfasern	25
4.1.2	Simulationsergebnisse	28
4.2	Herstellung	32
4.2.1	Anspitzen („Tapern“) der Faser	32
4.2.2	Maskierung	34
4.2.3	Beschichtung	35
4.3	Kalibrierung von SPR-Sensoren	37
4.3.1	Bestimmung des Reflexionsminimums	37
4.3.2	Nichtlineare Regression der Hauptkomponenten	39
4.3.3	Praktische Kalibrierung	44
4.4	Charakterisierung der Sensoren	47
4.4.1	Meßaufbau	47

4.4.2	Empfindlichkeit	48
4.4.3	Ortsauflösung	55
4.4.4	Mechanische Stabilität	57
4.5	Anwendung	59
5	Konzept eines bildgebenden SPR Systems	63
5.1	Struktur des Meßsystems	63
5.2	Ausblick	65
6	Zusammenfassung	67
	Literaturverzeichnis	70
II Pulsweitenmoduliertes Kamerasystem zur Messung von Chlorophyll-Fluoreszenz		73
7	Chlorophyll-Fluoreszenz	74
7.1	Biologische Bedeutung	74
7.2	Fluoreszenzmessung mit gepulstem Licht	76
7.3	Gegenwärtiger Entwicklungsstand von Chlorophyll-Fluoreszenzmeßsystemen	79
8	Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz	81
8.1	Aufbau	81
8.2	Zeitsteuerung	83
8.3	Bildaufnahme	86
8.4	Anwendung	88
9	Zusammenfassung	94
	Literaturverzeichnis	96
III Zusammenfassung		98
	Publikationen	101

Kurzfassung

Die Charakterisierung der Lebensbedingungen phototropher Mikroorganismen in der marinen Mikrobiologie erfordert Meßsysteme, die in der Lage sind, Gradienten chemischer Stoffe und die Zellaktivität in der Größenordnung einiger Mikrometer zu messen. Für diese Anwendung sind zwei unterschiedliche optoelektronische Sensorsysteme entwickelt worden, die den Brechungsindex in der Umgebung von Mikroorganismen mittels Oberflächenplasmonenresonanz (engl.: surface plasmon resonance, kurz: SPR) bzw. deren photosynthetische Aktivität über Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen bestimmen können.

Die Messung des Brechungsindex geschieht durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen auf einem angespitzten, goldbeschichteten Glasfaserende mit Weißlicht. Das reflektierte Licht wird über einen Faserkoppler mit einem Spektrometer gemessen. Das Reflexionsspektrum weist ein charakteristisches Minimum auf, das sich mit steigendem Brechungsindex zu größeren Wellenlängen hin verschiebt. Die Kalibrierung erfolgt entweder über die Bestimmung der Wellenlänge minimaler Reflektivität oder über nichtlineare Regression der Hauptkomponenten (engl.: non-linear principal component regression, kurz: NPCR). Zur Maximierung der Ortsauflösung beschränkt eine Maskierung auf dem Faserende die Anregung von SPR auf eine Länge einiger $100\ \mu\text{m}$. Der Sensor ist in der Lage den Brechungsindex mit einer Auflösung von 10^{-4} RIU bei einer Ortsauflösung von weniger als $1\ \text{mm}$ zu messen. Desweiteren wird ein Konzept eines kameragestützten SPR-Systems präsentiert, mit dem die theoretische Grenze der Ortsauflösung von $5\ \mu\text{m}$ bei potentiell besserer Brechungsindexauflösung erzielt werden kann.

Die photosynthetische Aktivität von Mikroorganismen wird mit Hilfe eines Kamerasystems zur Messung der Chlorophyll-Fluoreszenzausbeute bestimmt. Die Fluoreszenzausbeute von Chlorophyll hängt von der photosynthetischen Aktivität des Organismus ab und gibt Aufschluß über z.B. die Quantenausbeute des Photosystems und seine Elektronenflußrate. Die Messung beruht auf der Anregung von Fluoreszenz mit dem Licht blauer LEDs und der Detektion des emittierten Lichts durch einen optischen Langpaßfilter mit einer modulierten CCD-Kamera. Die zeitliche Steuerung zur Synchronisierung von Lichtquelle und Kamera erfolgt durch eine Zeiteinheit. Das vorgestellte System ist in der Lage selbst bei einem dunkeladaptierten Organismus das lichtschwache Signal der minimalen Fluoreszenzausbeute F_0 bei einer Ortsauflösung von $20\ \mu\text{m}$ pro Pixel zu messen. Außerdem ist es durch seinen modularen Aufbau möglich, das System an die gewünschte Ortsauflösung bis hinunter auf Zellebene anzupassen.

Beide Meßsysteme sind mit Erfolg bei der Charakterisierung von symbiotischen Kolonien mariner Mikroorganismen angewendet worden und konnten bisher nicht durchführbare Meßaufgaben lösen.

Abstract

In marine microbiology the characterisation of the environment of phototrophic microorganisms and their activity shows high gradients of chemical and physical properties in the order of micrometers. Therefore high spatial resolution sensor systems are required that are capable to detect these properties. Two different optoelectronic sensor systems for refractive index and chlorophyll fluorescence have been developed that match these specifications.

The sensing technique used for refractive index measurements is based on the excitation of surface plasma waves at the tip of a tapered and gold-coated optical fibre with white light. The reflected light is measured by a spectrometer and analyzed on a computer. A characteristic minimum in the reflection spectrum shifts to higher wavelengths when the surrounding refractive index increases. For calibration either the wavelength of minimum reflection or as with non-linear principal component regression (NPCR) the shape of the spectrum is related to refractive index. The spatial resolution of the sensor is enhanced by masking the fibre tip so that the sensing length is in the order of a few hundred micrometers. The presented sensor can measure the refractive index with a resolution of 10^{-4} RIU at a spatial resolution below 1 mm. Furthermore a concept for a camera-based SPR system is presented that is capable to achieve the theoretical spatial resolution limit of $5 \mu\text{m}$ at a potentially better refractive index resolution.

The photosynthetic activity of microorganisms can be determined by chlorophyll fluorescence yield measurements. From the yield many physiological parameters can be calculated such as quantum efficiency of the photosystem of the organism or its electron transport rate. The fluorescence is excited by the light of blue LEDs and is detected through an optical long-pass filter with a modulated CCD-camera. Synchronisation between the light source and camera is carried out by a timing controller. The presented system is able to detect even the low-intensity fluorescence signal of dark-adapted microorganisms F_0 at a spatial resolution of $20 \mu\text{m}$. Because of the modular set-up the system can be arranged to achieve the desired spatial resolution down to the level of single cells.

Both systems have been applied to the characterisation of symbiotic microbial marine colonies and delivered results that could not be measured before.

Kapitel 1

Einleitung

Ein Schwerpunkt in der marinen Mikrobiologie ist die Erforschung von Stoffkreisläufen mikrobieller Lebensgemeinschaften in einer aquatischen Umgebung. Die Kolonien von Mikroorganismen bilden oft Symbiosen, in denen die Reaktionsprodukte einzelner Artengruppen den Lebensraum für andere schaffen. Da die einzelnen Arten in einer solchen Symbiose nicht untereinander um ihre primäre Energiequelle konkurrieren, entstehen komplexe Kreisläufe der jeweiligen Stoffwechselprodukte. Viele der Mikroorganismen sind phototroph, d.h. ihre primäre Energiequelle ist das Sonnenlicht, mit dessen Hilfe sie Photosynthese betreiben können. Kolonien von phototrophen Organismen können eine Produktivität erreichen, die mit der eines Regenwaldes vergleichbar ist, der allgemein als produktivstes Ökosystem bezeichnet wird [1].

Ein typischer Lebensraum solcher Kolonien sind unter anderem Mikrobenmatten, aber beispielsweise auch Korallen und andere Lebewesen, die symbiotische Kolonien bilden. Diese Matten sind Produkte der in ihr leben-

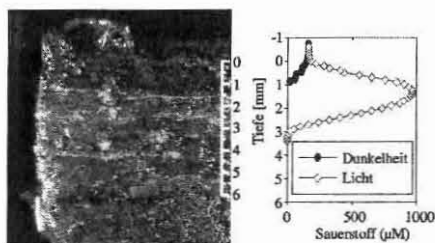


Abbildung 1.1: Mikrobenmatte eines Salzsees (La Salada di Chiprana, Spanien) mit einem Sauerstoffprofil. Die deutlich erkennbaren einzelnen Schichten bestehen aus unterschiedlichen Mikrobenarten.



Abbildung 1.2: Koralle der Art *Galaxea fascicularis*, an der mit einer Kalziumelektrode die Rate der Kalziumfixierung gemessen wird.

den Organismen und bilden zusammenhängende, geschichtete, mit organischer Materie angereicherte Systeme auf Gewässerböden. Eine Probe einer solchen Matte zeigt Abbildung 1.1. Neben der Matte sind zwei mit einem Sauerstoffmikrosensor gemessene Profile bei Dunkelheit und bei Beleuchtung abgebildet. In nur drei Millimetern Tiefe kann selbst bei Beleuchtung, bei der naturgemäß die Produktivität von phototrophen Mikroorganismen groß ist, kein Sauerstoff mehr gemessen werden. Dieser wird von Organismen verbraucht, deren Stoffwechsel auf Sauerstoffatmung angewiesen ist. Das Photo der Matte zeigt deutlich eine vertikale Schichtung. Jede dieser Schichten beherbergt eine Mikrobenart, die an bestimmte Umweltbedingungen angepaßt ist. Die Dicke der einzelnen Schichten beträgt nur wenige $100\ \mu\text{m}$. Damit sind Mikrobenmatten das kleinste Ökosystem der Erde. In der Regel bilden Kieselalgen die oberste Schicht einer solchen Matte gefolgt von Cyanobakterien, farblosen und roten Schwefelbakterien sowie sulfatreduzierenden Bakterien. Da die unterschiedlichen Arten sich auch an unterschiedliche Lebensbedingungen angepaßt haben, findet man in den Schichten starke Konzentrationsunterschiede verschiedener Stoffe, wie z.B. Sauerstoff oder Schwefelwasserstoff. Cyanobakterien benötigen Licht und Sauerstoff, wohingegen farblose Schwefelbakterien Sauerstoff und Schwefelwasserstoff ohne Licht zur Energiegewinnung verwenden. Rote Schwefelbakterien wiederum brauchen keinen Sauerstoff sondern Licht und Schwefelwasserstoff. Als maßgeblicher Mechanismus für den Stofftransport innerhalb der Matte herrscht die Diffusion vor, die im Vergleich zum aktiven Transport durch Wasserströmung (Advektion) oder grabende Lebewesen (Bioturbation) extrem langsam verläuft. Dadurch treten auf wenigen Millimetern Tiefe starke Konzentrationsunterschiede von chemischen Parametern wie z.B. Sauerstoff auf. Um die Umweltbedingungen



Abbildung 1.3: Faseroptischer Sensor zur Bestimmung der räumlichen Photonflußrate in einer Sedimentprobe. Die Kugel am Ende der Glasfaser hat einen Durchmesser von $100\ \mu\text{m}$.

der Mikroorganismen in diesen heterogenen Lebensräumen charakterisieren zu können, müssen Sensoren eine Ortsauflösung haben, die kleiner ist als der zu messende Gradient. Ein allgemein verständlicher Einblick in den Aufbau und die gegenseitige Abhängigkeit der Mikroorganismen in Mikrobenmatten ist auch bei Karsten und Kühl zu finden [2]. Einen Überblick über das Zusammenspiel von Mikroorganismen beim Aufbau von Korallenriffen bieten Scholz und Krumbein [3].

Die Lebensbedingungen, denen Mikroorganismen ausgesetzt sind, könnten, was verfügbares Licht, Temperatur, Salzgehalt, pH-Wert und chemische Zusammensetzung anbelangt, kaum extremer sein. Sie reichen von der Kälte der Polargebiete über tropische Hitze, hypersaline, saure oder alkalische Gewässer hin zu heißen Schwefelquellen. Diese Lebensräume haben den Vorteil, daß die Organismen wenig Konkurrenz fürchten müssen. Zur Charakterisierung dieser Lebensräume und ihren Einfluß auf die in ihm lebenden Organismen werden Mikrosensoren für zahlreiche physiologisch wichtige Stoffe, wie z.B. Sauerstoff, Schwefelwasserstoff, Kohlendioxid, Karbonat, Kalzium, Nitrat und Methan, aber auch für andere Parameter wie Temperatur, pH-Wert, räumliche Photonflußrate und spektrale Zusammensetzung des verfügbaren Lichts, eingesetzt. Es kommen dabei klassische Clark-Mikroelektroden sowie faseroptische Sensoren und LIX-Elektroden (liquid ion exchange) zum Einsatz. Es werden auch Kamerasysteme angewendet, mit denen zweidimensionale Verteilungen von beispielsweise Sauerstoff mit einem Fluoreszenzfarbstoff gemessen werden können [4]. Einen Überblick der existierenden Meßsysteme und die Vielfalt der meßbaren Parameter ist in Holst et al. [5] und Kühl et al. [6] zu finden. Die örtliche Auflösung dieser Sensoren liegt in der Größenordnung von 1 bis $100\ \mu\text{m}$. Ein faseroptischer Sensor für die Photonflußrate ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Dieser Sensor ist bei Profilmes-

sungen in der Nähe phototropher Organismen mit dem Ergebnis eingesetzt worden, daß die Lichtintensität und das Spektrum in einer Mikrobenmatte örtlich stark variiert [7, 8]. Die Folge dieser heterogenen Lichtverteilung ist die Schaffung einer Mikroumwelt, die spezialisierten Organismen Lebensraum schafft, in denen andere Arten beispielsweise aufgrund von Mangel an energiereichem, blauem Licht nicht überleben können. Mit den gemessenen Daten ist es allerdings ohne die Kenntnis des lokalen Brechungsindex nicht möglich, ein Modell zu entwerfen, das die Ursache der Lichtverteilung erklärt und mit dessen Hilfe die Ausbreitung eines Lichtstrahls in der Probe berechnet werden kann. Dies ist die Motivation, zwei Mikrosensorsysteme zu entwickeln, die entweder als Fasersensor für Punktmessungen des Brechungsindex eingesetzt werden können oder als Kamerasystem zweidimensionale Brechungsindexverteilungen visualisieren.

Neben der Charakterisierung der Umgebung ist natürlich auch die Produktivität der Mikroorganismen selbst von größtem Interesse. Einen Einblick in die Verarbeitung von Licht durch chlorophyllhaltige Organismen bieten Fluoreszenzmessungen. In den Zellen wird durch Licht eine photochemische Reaktionskette ausgelöst, die auch Fluoreszenzeigenschaften des Chlorophylls beeinflusst. Chlorophyll ist ein lichtverwertendes Molekül zur Erzeugung freier Elektronen und funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie eine Solarzelle. Die freien Elektronen werden im Photosystem jedoch für die Produktion von organischen Kohlenstoffverbindungen, wie z.B. Zucker, benötigt und versorgen so den Organismus mit Energie. Über eine spezielle Abfolge von Lichtpulsen mit unterschiedlich starkem Anregungslicht, liefern Fluoreszenzaufnahmen Informationen über die Leistungsfähigkeit des Photosystems. Wie bereits erwähnt sind marine Mikroorganismen extrem produktiv, weshalb eine Identifizierung der Zentren dieser Produktivität von entscheidender Bedeutung für das Verständnis dieser Ökosysteme ist. Bislang können Punktmessungen mit kommerziell verfügbaren Chlorophyll-Fluoreszenzmeßsystemen durchgeführt werden. Zweidimensionale Verteilungen einiger Parameter können bereits mit Kamerasystemen aufgenommen werden. Jedoch sind einige existierende Systeme nicht empfindlich genug, sehr schwache Fluoreszenz messen zu können und sind wenig flexibel im Aufbau. Im Rahmen dieser Arbeit wird deshalb ein Kamerasystem vorgestellt, das mit Hilfe von Standardoptiken (Objektive, Mikroskope) und einer hohen Empfindlichkeit den Anforderungen zur Messung an phototrophen, marinen Mikroorganismen gerecht wird.

Der erste Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der Brechungsindexmessung nach dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz. Dieses Meßprinzip beruht auf der Anregung von Ladungsträgerwellen auf einer dünnen Metall-

oberfläche durch Licht. Das an einer solchen Oberfläche reflektierte Licht weist in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels und der Wellenlänge ein charakteristisches Minimum auf, das sich mit steigendem Brechungsindex zu größeren Winkeln bzw. Wellenlängen verschiebt. Zunächst wird in Kapitel 2 der theoretische Unterbau des Meßprinzips beschrieben, gefolgt von einer Übersicht existierender Systeme in Kapitel 3. Die Simulation, Herstellung und Anwendung des faseroptischen Sensors wird in Kapitel 4 ausführlich beschrieben. Das Konzept eines bildgebenden Brechungsindexsystems in Kapitel 5 und eine Zusammenfassung bilden den Abschluß des ersten Teils. In Teil II wird ein Kamerasystem zur Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz vorgestellt. Hiermit ist es möglich, Informationen über die Aktivität, Effektivität und Geschwindigkeit des energieliefernden Photosystems eines Mikroorganismus zu messen. Durch blaues Licht wird Fluoreszenz im wichtigsten Molekül der Photosynthese angeregt und von einer Kamera aufgenommen. Die Fluoreszenzausbeute, also das Verhältnis zwischen emittierter und absorbierter Lichtenergie, unter verschiedenen Lichtbedingungen gibt Aufschluß über den momentanen Zustand des Photosystems. Die Bedeutung der Chlorophyll-Fluoreszenz in der Biologie und das Meßverfahren wird in Kapitel 7 erläutert. Der Aufbau des Systems und Messungen an Korallen bilden das Kapitel 8 gefolgt von einer Zusammenfassung, die den Abschluß dieser Arbeit bildet.

Literaturverzeichnis

- [1] B. B. Jørgensen, Y. Cohen, Photosynthesis and structure of benthic microbial mats: microelectrode and SEM studies of four cyanobacterial communities, *Limnology and Oceanography* 28 (1983) 1075–1093.
- [2] U. Karsten, M. Kühl, Die Mikrobenmatte – das kleinste Ökosystem der Welt, *Biologie in unserer Zeit* 26 (1) (1996) 16–26.
- [3] J. Scholz, W. E. Krumbein, Entwicklung tropischer Korallenriffe, *Biologie in unserer Zeit* 24 (2) (1994) 96–102.
- [4] G. Holst, B. Grunwald, Luminescence lifetime imaging with transparent oxygen optodes, *Sensors and Actuators B* 74 (1-3) (2001) 78–90.
- [5] G. Holst, I. Klimant, M. Kühl, O. Kohls, Optical microsensors and microprobes, in: M. Varney (Hrsg.), *Ocean Science and Technology Vol. 1, Chemical sensors in Oceanography*, Gordon and Breach, Amsterdam, 2000, S. 143–188.
- [6] M. Kühl, N. P. Revsbech, Biogeochemical microsensors for boundary layer studies, in: B. P. Boudreau, B. B. Jørgensen (Hrsg.), *The benthic boundary layer transport process and biogeochemistry*, Oxford University Press, London, 2002, S. 180–210.
- [7] M. Kühl, C. Lassen, N. P. Revsbech, A simple light meter for measurements of PAR (400 to 700nm) with fiber-optic microprobes: Application for P vs E_0 (PAR) measurements in a microbial mat, *Aquatic Microbial Ecology* 13 (1997) 197–207.
- [8] R. Thar, M. Kühl, G. Holst, Fiber-optic fluorometer for microscale mapping of photosynthetic pigments in microbial communities, *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6) (1994) 2823–2828.

Teil I

Brechungsindexmeßsysteme auf Grundlage von Oberflächen- Plasmonenresonanz

Kapitel 2

Oberflächenplasmonen- Resonanz (SPR)

Plasmonen sind Ladungsträgerwellen, die sich in Metallen ausbreiten können. Man kann zwischen Volumen- und Oberflächeneffekten unterscheiden. Volumeneffekte von Plasmonen sind inerte Prozesse, die lediglich durch die Eigenschaften des Materials, in denen sie angeregt wurden, bestimmt sind. Im Gegensatz dazu treten die Oberflächeneffekte in Wechselwirkung mit dem sie umgebenden Medium, so daß sich diese als Signalwandler für Sensoren verwenden lassen. Für den Fall, daß der Wellenvektor der Oberflächenplasmonen (engl.: surface plasmons; kurz: SP) mit dem des einfallenden Lichtes übereinstimmt, spricht man von Oberflächen-Plasmonenresonanz bzw. surface plasmon resonance (kurz: SPR).

2.1 Reflexion an dünnen Schichten

In diesem Abschnitt soll ein Berechnungsverfahren hergeleitet werden, das es erlaubt, die Reflexion eines Lichtstrahls von beliebigen Dünnschichtsystemen in Abhängigkeit von Wellenlänge und Einstrahlwinkel zu berechnen. Von dünnen Schichten ist immer dann die Rede, wenn die Dicke der Schicht weniger als einige Wellenlängen beträgt. Im vorliegenden Fall betragen die Schichtdicken maximal ein Viertel des betrachteten Wellenlängenbereichs. Zunächst wird von der Lichtausbreitung in einem homogenen Medium ausgegangen und eine Lösung der Maxwell'schen Gleichungen berechnet. Anschließend wird das System nach und nach um Grenzschichten zu einem Medium anderen Brechungsindex erweitert. Die Herleitung orientiert sich

an einer existierenden Herleitung [1] und beinhaltet Modifikationen, die von praktischer Bedeutung für einen Simulationsalgorithmus für die Reflexionsberechnung ist.

Das betrachtete Schichtsystem besteht aus homogenen und stationären Materialien ($\frac{\partial \epsilon, \mu}{\partial x, y, z, t} = 0$), in denen keine Raumladungen existieren ($\rho = 0$) und die für den optischen Wellenlängenbereich näherungsweise nicht magnetisch sind ($\mu \approx \mu_0$). Mit diesen Bedingungen können die Maxwell'schen Gleichungen in der vereinfachten Form

$$\text{rot } \vec{H} = \sigma \vec{E} + \epsilon_r \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (2.1)$$

$$\text{rot } \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \quad (2.2)$$

$$\text{div } \vec{H} = 0 \quad (2.3)$$

$$\text{div } \vec{E} = 0 \quad (2.4)$$

geschrieben werden. Nach \vec{E} bzw. \vec{H} aufgelöst ergibt sich

$$\Delta \cdot \vec{E} = \sigma \mu_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \epsilon_r \epsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (2.5)$$

$$\text{bzw. } \Delta \cdot \vec{H} = \sigma \mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} + \epsilon_r \epsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} \quad (2.6)$$

Eine Lösung für eine ebene Welle mit Ausbreitung in x -Richtung lautet

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{j\omega(t - \frac{x}{v})} \quad (2.7)$$

$$\text{bzw. } \vec{H} = \vec{H}_0 e^{j\omega(t - \frac{x}{v})} \quad (2.8)$$

mit der Phasengeschwindigkeit v , für die gilt

$$\frac{1}{v^2} = \epsilon_r \epsilon_0 \mu_0 - j \frac{\sigma \mu_0}{\omega} \quad (2.9)$$

Multipliziert man beide Seiten mit $c^2 = 1/(\epsilon_0 \mu_0)$, erhält man die Definition für den komplexen Brechungsindex n :

$$\begin{aligned} \frac{c^2}{v^2} \equiv n^2 &= c^2 \epsilon_r \epsilon_0 \mu_0 - j \frac{c^2 \sigma \mu_0}{\omega} \\ \Leftrightarrow n^2 &= (n_{\text{Re}} - j n_{\text{Im}})^2 = \epsilon_r - j \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} \end{aligned} \quad (2.10)$$

Nun kann Gleichung 2.7 umgeformt werden in

$$\begin{aligned} \vec{E} &= E_0 e^{j(\omega t - \frac{\omega}{c} n x)} \\ \Leftrightarrow &= \vec{E}_0 e^{-n_{\text{Im}} x} e^{j(\omega t - k_0 n_{\text{Re}} x)}. \end{aligned} \quad (2.11)$$

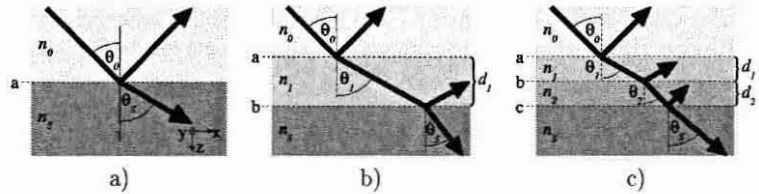


Abbildung 2.1: Reflexion an geschichteten Systemen: a) Übergang zweier halbunendlicher Medien, b) mit einer dünnen Zwischenschicht, c) mit zwei dünnen Zwischenschichten ($d_1, d_2 < \lambda$)

Analog gilt für Gleichung 2.8

$$\vec{H} = \vec{H}_0 e^{-n_{\text{Im}} x} e^{j(\omega t - k_0 n_{\text{Re}} x)} \quad (2.12)$$

mit der Wellenzahl $k_0 = 2\pi/\lambda$. Hieraus geht hervor, daß der Imaginärteil des komplexen Brechungsindex für eine Dämpfung der Lichtwelle in Ausbreitungsrichtung sorgt.

Aus den Gleichungen 2.2, 2.7 und 2.8 läßt sich eine zweite Relation für den Brechungsindex herleiten. Diese ist im Folgenden nötig, um die Reflexion an einem geschichteten optischen System zu berechnen. Für eine sich in Richtung eines beliebigen Einheitsvektors \vec{r} ausbreitende ebene Welle in einem homogenen Medium gilt

$$\begin{aligned} \text{rot } \vec{E} &= -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \\ \Rightarrow -j k_0 n (\vec{r} \times \vec{E}) &= -j\omega\mu_0 \vec{H} \\ \Leftrightarrow n (\vec{r} \times \vec{E}) &= c\mu_0 \vec{H} \\ \Rightarrow n &= \frac{Z_0 \vec{H}}{\vec{r} \times \vec{E}} \end{aligned} \quad (2.13)$$

mit dem Feldwellenwiderstand im Vakuum

$$Z_0 = \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}}. \quad (2.14)$$

Gleichung 2.13 gilt auch für den Fall, daß die Welle auf eine Grenzfläche trifft, die sich senkrecht zu \vec{r} aufspannt, und an der sich der Brechungsindex sprunghaft ändert. Trifft die Welle jedoch in einem Winkel θ auf diese Grenzfläche auf, wie in Abbildung 2.1 a) zu sehen, muß sie als Überlagerung aus einer TM-Welle und einer TE-Welle betrachtet werden, da die Tangentialkomponenten der Felder an der Grenzschicht a um den Winkel θ gegenüber

2.1 Reflexion an dünnen Schichten

der Ausbreitungsrichtung gedreht sind und dann der effektive Brechungsindex von der Polarisation des einfallenden Lichts abhängt. Für eine TM- bzw. TE-Welle kann ein modifizierter Brechungsindex η mit

$$\eta_{\text{TM}} = \frac{n}{\cos \theta} \quad (2.15)$$

$$\text{und } \eta_{\text{TE}} = n \cos \theta \quad (2.16)$$

definiert werden. Für senkrechten Lichteinfall ($\theta = 0$) sind $\eta_{\text{TM}} = \eta_{\text{TE}} = n$.

Nun führt man zwischen die beiden halbinendlichen Medien eine dünne Schicht mit der Dicke d_1 und dem Brechungsindex n_1 wie in Abbildung 2.1b ein. Der Einheitsvektor \vec{e}_z sei der Normalenvektor der beiden Grenzflächen a und b und zeige in Richtung der z -Achse. Das elektrische und magnetische Feld in der dünnen Schicht besteht aus der Überlagerung einer vorwärts laufenden und einer rücklaufenden Welle. An der Grenzschicht b gelten für die Tangentialkomponenten \vec{H}_b und \vec{E}_b

$$\vec{H}_b = \vec{H}_b^+ + \vec{H}_b^- = \frac{\eta_1}{Z_0} (\vec{e}_z \times \vec{E}_b^+ - \vec{e}_z \times \vec{E}_b^-) \quad (2.17)$$

$$\vec{e}_z \times \vec{E}_b = \vec{e}_z \times \vec{E}_b^+ + \vec{e}_z \times \vec{E}_b^- \quad (2.18)$$

Durch Auflösen von Gleichung 2.18 und Einsetzen in Gleichung 2.17 erhält man jeweils einen Ausdruck für $\vec{e}_z \times \vec{E}_b^+$ und $\vec{e}_z \times \vec{E}_b^-$:

$$\vec{e}_z \times \vec{E}_b^+ = \frac{1}{2} \left(\frac{Z_0 \vec{H}_b}{\eta_1} + \vec{e}_z \times \vec{E}_b \right) \quad (2.19)$$

$$\vec{e}_z \times \vec{E}_b^- = \frac{1}{2} \left(-\frac{Z_0 \vec{H}_b}{\eta_1} + \vec{e}_z \times \vec{E}_b \right) \quad (2.20)$$

Das elektrische Feld \vec{E}_a an der Grenzschicht a ist zum selben Zeitpunkt nur in der z -Koordinate um die Schichtdicke d_1 zu \vec{E}_b verschoben. Da die Schichten ausreichend dünn sind, erhält man \vec{E}_a , indem \vec{E}_b mit einem Phasenfaktor $e^{j\delta_1}$ multipliziert wird:

$$\vec{e}_z \times \vec{E}_a^+ = (\vec{e}_z \times \vec{E}_b^+) e^{j\delta_1} \quad (2.21)$$

$$\vec{e}_z \times \vec{E}_a^- = (\vec{e}_z \times \vec{E}_b^-) e^{-j\delta_1} \quad (2.22)$$

$$\text{mit } \delta_1 = k_0 n_1 d_1 \cos \theta_1. \quad (2.23)$$

Für $\vec{e}_z \times \vec{E}_a$ gilt dann

$$\vec{e}_z \times \vec{E}_a = \vec{e}_z \times \vec{E}_a^+ + \vec{e}_z \times \vec{E}_a^-$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{e^{j\delta_1} + e^{-j\delta_1}}{2} (\vec{e}_z \times \vec{E}_b) + \frac{e^{j\delta_1} - e^{-j\delta_1}}{2} \frac{Z_0 \vec{H}_b}{\eta_1} \\
 &= \cos \delta_1 (\vec{e}_z \times \vec{E}_b) + \frac{j \sin \delta_1}{\eta_1} Z_0 \vec{H}_b.
 \end{aligned} \tag{2.24}$$

Dementsprechend erhält man für

$$Z_0 \vec{H}_a = j \eta_1 \sin \delta_1 (\vec{e}_z \times \vec{E}_b) + \cos \delta_1 Z_0 \vec{H}_b. \tag{2.25}$$

Die Gleichungen 2.24 und 2.25 können als Matrixgleichung zusammengefaßt werden, so daß man

$$\begin{aligned}
 \begin{pmatrix} \vec{e}_z \times \vec{E}_a \\ Z_0 \vec{H}_a \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} \cos \delta_1 & \frac{j}{\eta_1} \sin \delta_1 \\ j \eta_1 \sin \delta_1 & \cos \delta_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \vec{e}_z \times \vec{E}_b \\ Z_0 \vec{H}_b \end{pmatrix} \\
 \Leftrightarrow &= \vec{M}_1 \begin{pmatrix} 1 \\ \eta_S \end{pmatrix} (\vec{e}_z \times \vec{E}_b) \\
 \Rightarrow &\begin{pmatrix} V_E \\ V_H \end{pmatrix} = \vec{M}_1 \begin{pmatrix} 1 \\ \eta_S \end{pmatrix}
 \end{aligned} \tag{2.26}$$

mit dem effektiven Brechungsindex des umgebenen Mediums η_S und der charakteristischen Matrix der Schicht \vec{M}_1 erhält.

Erweitert man das Schichtsystem um eine weitere Schicht mit der Grenzfläche c wie in Abbildung 2.1c, können die tangentialen Feldkomponenten \vec{E}_b und \vec{H}_b mit Hilfe von \vec{E}_c und \vec{H}_c über Gleichung 2.26 berechnet werden. Auf diese Weise wird deutlich, daß der Einfluß der i -ten Schicht auf das elektromagnetische Feld über die charakteristische Matrix \vec{M}_i mit Materialeigenschaften der Schicht ausgedrückt werden kann. Um die Reflektivität eines Lichtstrahls für ein System mit n dünnen Schichten zwischen zwei halbunendlichen Medien zu berechnen, ist somit der folgende Satz Gleichungen gültig:

$$\begin{pmatrix} V_E \\ V_H \end{pmatrix} = \left(\prod_{i=1}^n \vec{M}_i \right) \begin{pmatrix} 1 \\ \eta_S \end{pmatrix} \tag{2.27}$$

$$\vec{M}_i = \begin{pmatrix} \cos \delta_i & \frac{j}{\eta_i} \sin \delta_i \\ j \eta_i \sin \delta_i & \cos \delta_i \end{pmatrix} \tag{2.28}$$

$$\delta_i = k_0 n_i d_i \cos \theta_i \tag{2.29}$$

Die Winkel θ_i für den Phasenfaktor δ_i ergeben sich aus dem Snellius'schen Gesetz

$$n_0 \sin \theta_0 = n_i \sin \theta_i. \tag{2.30}$$

Es ist zu beachten, daß bei verlustbehafteten Medien ($\Im\{n_i\} \neq 0$) der Winkel θ_i ebenfalls komplex wird. Da aber nicht der Winkel θ_i selbst gesucht ist, sondern sein Cosinus, wird dieser über

$$\cos \theta_i = \sqrt{1 - \left(\frac{n_0}{n_i} \sin \theta_0\right)^2} \quad (2.31)$$

direkt berechnet. Aus den Vektorkomponenten V_E und V_H läßt sich ein effektiver Brechungsindex η_e definieren

$$\eta_e = \frac{V_H}{V_E}, \quad (2.32)$$

der von einem einfallenden Lichtstrahl gesehen wird und vom Schichtsystem und dem Einstrahlwinkel abhängt. Der Reflexionsgrad oder die Reflektivität R eines solchen Strahls an der Grenzfläche a ist definiert durch

$$R = \left| \frac{\eta_0 - \eta_e}{\eta_0 + \eta_e} \right|^2. \quad (2.33)$$

Die hier vorgestellte Matrixmethode erlaubt es, Anregung von SPR in beschichteten Lichtleitern zu simulieren. Für die Reflexion eines Lichtstrahls, der in eine angespitzte Glasfaser eingekoppelt wird, muß zunächst der Strahlenverlauf modelliert werden, um anschließend für jede einzelne Reflexion im Taper die Reflektivität bei einzelnen Wellenlängen zu berechnen. Die multiplizierten Reflektivitäten ergeben dann den Reflexionsgrad für eine geführte Mode in der Faser. Die Iteration über alle geführten Moden ergibt das Reflexionsspektrum.

2.2 Brechungsindexabhängigkeit von SPR

Mit Hilfe der im vorigen Abschnitt hergeleiteten Matrixmethode läßt sich die Reflexion an Mehrschichtsystemen berechnen. Ein Modellsystem bestehend aus einem Lichtleiter mit dem Brechungsindex $n = 1.4623$ RIU, der mit einer Schicht Chrom der Dicke $d_{Cr} = 2$ nm und einer zweiten Schicht aus Gold von $d_{Au} = 50$ nm Dicke beschichtet ist, zeigt Abbildung 2.2. Variiert man den Einfallswinkel θ des Lichtstrahls von 0 bis 90° und seine Wellenlänge λ von 400 bis 1000 nm, erhält man für die Reflektivität den Konturplot in Abbildung 2.3. Zugrunde gelegt wurde ein Brechungsindex der Umgebung von 1.33 RIU. Die Differenz zur Reflektivität bei einem Brechungsindex von 1.34 ist in Abbildung 2.4 zu sehen. In dieser Darstellung sind nur die Regionen hervorgehoben, die vom Brechungsindex abhängen. Für die gewählten

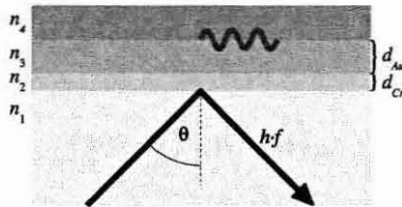


Abbildung 2.2: Modellsystem bestehend aus einem mit Chrom und Gold beschichteten Lichtleiter

Brechungsindizes sind dies der Winkelbereich von etwa 70° bis 90° bei einer Wellenlänge ab ca. 600 nm .

Extrahiert man nun Profile bei einer definierten Wellenlänge, zeigen diese die typische Kurvenform einer winkelmodulierten SPR-Messung mit monochromatischem Licht. Das aus der Modulation der Wellenlänge resultierende Spektrum erhält man auf analoge Weise durch ein Profil bei festem Winkel. Abbildung 2.5 zeigt die extrahierten Reflexionskurven. Die winkelmodulierte Messung weist im nahen Infrarotbereich ein wesentlich schärferes Minimum auf als wellenlängen-aufgelöste Messungen bei festem Einstrahlwinkel. Unterhalb von 600 nm wird sehr wenig Energie in eine Oberflächen-Plasmonen-Mode eingekoppelt, d.h. das charakteristische Minimum verschwindet. Das selbe gilt für Messungen unter festem Einkoppelwinkel für Winkel unterhalb etwa 70° . Eine Glasfaser mit einer numerischen Apertur von $NA = 0.28$ hat einen maximalen Einkoppelwinkel von 16.3° , was zu Einfallswinkeln am Kern/Cladding-Übergang zwischen 73.7° und 90° führt. Um das Reflexionsspektrum einer solchen Faser zu modellieren, müssen die Spektren aus dem rechten Graphen in Abbildung 2.5 nach der Modenverteilung in der Faser gewichtet aufsummiert werden. Dadurch wird deutlich, daß sich das Reflexionsminimum durch vermischte Anregung von SP-Moden verbreitert.

Das Schichtsystem aus Abbildung 2.2 weist nicht nur eine hohe Empfindlichkeit gegenüber den Einkoppelbedingungen und dem Brechungsindex der Umgebung auf, sondern ist auch querempfindlich gegenüber Temperatur und den Dicken der Metallbeschichtungen. Die Temperatur verschiebt das Minimum hin zu einem größeren Winkel bzw. Wellenlänge. Dabei entspricht eine Änderung um 1°C einer Brechungsindexänderung an der vierten Nachkommastelle. Mit anderen Worten: es darf für eine Auflösung von 10^{-4} RIU kein Temperaturgradient größer als 1°C auftreten. Extrem präzise Meßaufbauten kommen deshalb nicht ohne Temperaturkompensation aus. Die Abhängigkeit der Reflexionskurve von der Dicke der Goldschicht d_{Au} ist in Abbildung 2.6 zu sehen. Im linken Graphen sind mehrere Kurven für die

2.2 Brechungsindexabhängigkeit von SPR

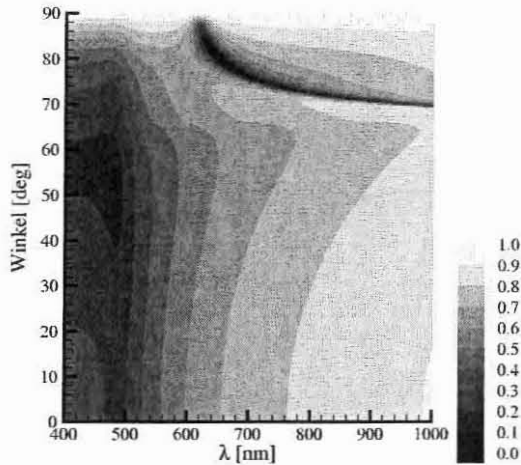


Abbildung 2.3: Reflektivität eines goldbeschichteten Lichtleiters in Abhängigkeit der Wellenlänge λ und des Einfallswinkels θ bei einem Brechungsindex von 1.33 RIU.

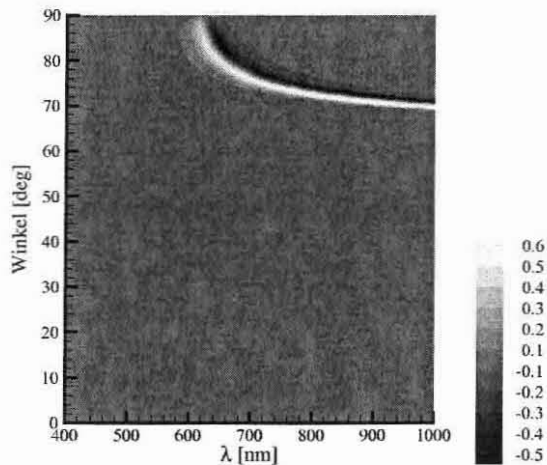


Abbildung 2.4: Differenz der Reflektivitäten bei einem Brechungsindex von 1.33 und 1.34 RIU. In Schwarz und Weiß sind deutlich die Wellenlängen- und Einfallswinkelbereiche zu sehen, die eine Abhängigkeit vom Brechungsindex zeigen.

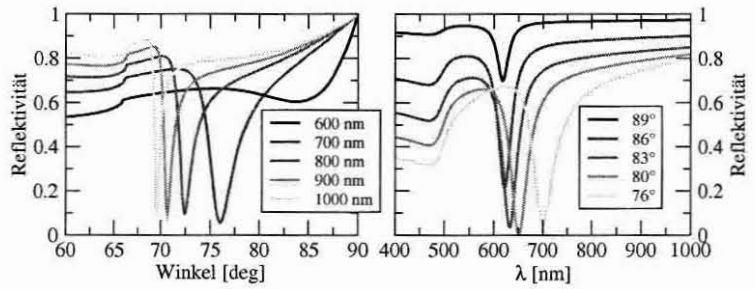


Abbildung 2.5: Reflexionskurven für definierte Wellenlängen (links) und feste Einkoppelwinkel (rechts).

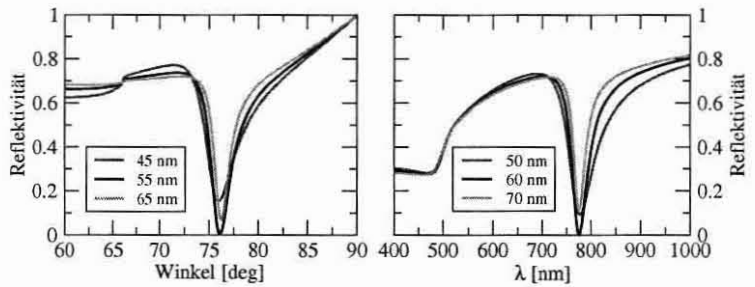


Abbildung 2.6: Reflexionskurven bei einer Wellenlänge von 700 nm (links) und für einen festen Einkoppelwinkel von 73° (rechts) in Abhängigkeit der Dicke d_{Au} .

winkelmodulierte Messung bei einer festen Wellenlänge von 700 nm dargestellt. Die Schichtdicke für ein besonders tiefes Minimum liegt bei ca. 55 nm. Für die wellenlängenabhängige Messung bei einem Einkoppelwinkel von 73° (rechter Graph), liegt diese Dicke bei 60 nm. Je nach Modulationsart und den jeweiligen Einkoppelbedingungen, existiert also eine Schichtdicke, die eine optimale Einkopplung in SP-Moden erlaubt. Hierbei ist wieder zu beachten, daß bei SP-Anregung in einer Multimode-Glasfaser die Dicke d_{Au} von der Modenverteilung abhängt. Abgesehen von der Tiefe des Minimums verschiebt sich auch die Position bei der Variation der Dicke. Im Fall der Winkelmodulation erhöht sich der optimale Einkoppelwinkel von 75.95° bei 45 nm bis zu 76.25° bei 65 nm Schichtdicke. Die Wellenlänge der minimalen Reflexion verschiebt sich bei der Wellenlängenmodulation von 778 nm auf 775 nm bei Schichtdicken von 50 nm bzw. 70 nm.

Kapitel 3

SPR Meßsysteme

Das Prinzip der Plasmaschwingungen auf Oberflächen wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von Wood beschrieben [2]. Aber erst Ende der Sechziger Jahre wurde ein Meßaufbau von Otto [3] und Kretschmann et al. [4, 5] beschrieben. Sie verwendeten SPR zur präzisen Bestimmung des komplexen Brechungsindex verschiedener Metalle sowie zahlreicher anderer Materialien. Nach Kretschmann ist auch die Prisma-Konfiguration benannt, die bis Anfang der neunziger Jahre die einzige bekannte Anregungsmethode für SPR war. Raether lieferte seit den siebziger Jahren die Theorie, die nötig ist, um SPR auf verschiedenen Oberflächen (z.B. optische Gitter und glatte Oberflächen) anzuregen [6, 7]. Das Potential, das in dieser Meßmethode steckt, ist ab 1982 an der Universität Linköping, Schweden zunächst von Nylander für die Gassensorik [8] und ein Jahr später von Liedberg für die Biosensorik [9] entdeckt worden. Die Vielseitigkeit verdankt SPR der Tatsache, daß die Eindringtiefe der Plasmaschwingungen in der Größenordnung der verwendeten Wellenlänge liegt. Eine spezifische Molekülbindung in diesem Bereich führt zu einer lokalen Änderung des Brechungsindex und somit zu einem Meßsignal. Aus einer Forschungsgruppe in Umeå, die sich mit der labelfreien Detektion von biomolekularen Wechselwirkungen befaßte, entstand 1986 die Firma Pharmacia Biosensor, die 1990 ihr erstes SPR Produkt namens BIAcore auf den Markt brachten. BIAcore war so erfolgreich, daß der Zweig SPR-Sensorik als eigene Firma gleichen Namens ausgelagert wurde, die bis heute Marktführer für SPR-Meßgeräte mit hohen Durchsatzraten ist. Seitdem hat es zahlreiche Forschungsprojekte und Firmengründungen gegeben, die sich mit verschiedenen Aspekten von SPR beschäftigen. Im Folgenden ist diese Entwicklung in drei Gebiete eingeteilt, nämlich der prismabasierten SPR, faseroptischen SPR und dem in den letzten Jahren aufkommenden bildgebenden SPR Verfahren. Einen Überblick über die Entwicklung der SPR Sensorik im letzten Jahrhundert findet man auch bei Homola et al. [10].

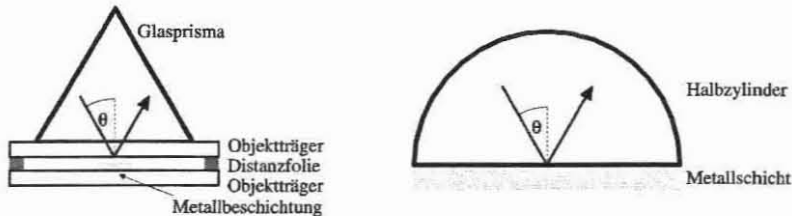


Abbildung 3.1: Prismenkonfigurationen zur Anregung von Oberflächenplasmonen nach Otto (links) und nach Kretschmann (rechts).

3.1 Prismabasierende SPR

Der ursprüngliche Aufbau zur Anregung von Oberflächenplasmonen mit monochromatischem Licht geht zurück auf Arbeiten von Otto [3] und Kretschmann et al. [4, 5]. Sie verwendeten Aufbauten mit Prismen, wie sie in Abbildung 3.1 zu sehen sind. Otto verwendete ein 60° -Prisma und befestigte an der Unterseite einen Objektträger mit einer Distanzfolie von etwa 200 nm Dicke. Auf einen zweiten Objektträger wurde eine ca. 100 nm Dicke Silberschicht aufgedampft und ebenfalls unter dem Prisma befestigt. Der Zwischenraum der beiden Glasscheiben wurde evakuiert. Das Ziel des Versuches war es, nachzuweisen, daß Oberflächenplasmonen in Silber angeregt werden können. Der Aufbau verdeutlicht sehr gut, daß die Oberflächenplasmonen vom evaneszenten Feld des totalreflektierten Lichts an der Grenzfläche Glas/Vakuum angeregt werden.

Kretschmann entwickelte einen Aufbau auf der Basis eines halbzylindrischen Prismas, das auf der Unterseite mit einem Metall beschichtet ist. Dieser Aufbau diente zur Bestimmung der Dispersionskurven verschiedener Metalle. Das monochromatische Licht der beiden ersten Aufbauten ist aus einer Halogenlampe durch verschiedene Interferenzfilter erzeugt worden.

Der von Nylander, Liedberg et al. [8, 9] vorgeschlagene Meßaufbau für Chemo- und Biosensoren unterscheidet sich nur marginal von dem Kretschmanns. Ein silberbeschichteter Objektträger wird an einem 60° -Prisma angebracht, und mit monochromatischem Licht werden Oberflächenplasmawellen angeregt. Die Lichtquelle ist ein HeNe-Laser, dessen Einstrahlwinkel auf das Prisma variiert werden kann. Der Detektor, eine Photodiode, mißt unter einem festen Winkel die Intensität. Der Einstrahl- und Detektionswinkel sind so gewählt, daß sich eine maximale Signaländerung bei kleinen Brechungsindexänderungen in der Nähe der Metallbeschichtung ergibt. Dieser Aufbau ist der am meisten verwendete in Labormeißgeräten, da er sich einerseits aus kommerziell erhältlichen Komponenten zusammensetzt, und zudem auch

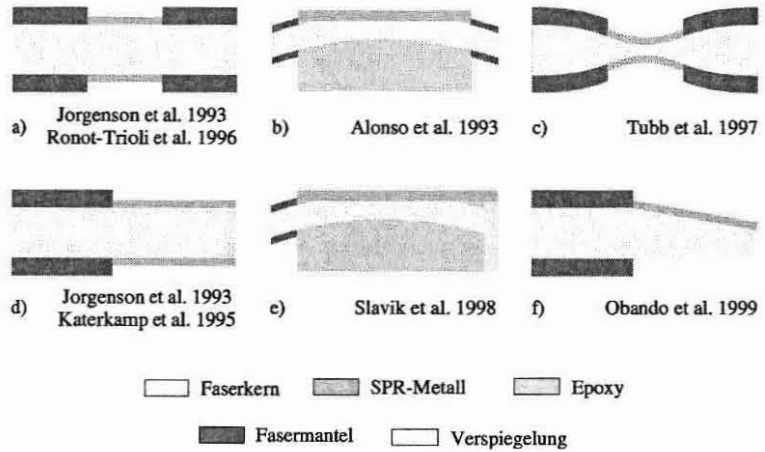


Abbildung 3.2: Konfigurationen verschiedener faseroptischer SPR-Sensoren

noch sehr empfindlich ist. Mit einer Temperaturkompensation sind Empfindlichkeiten von bis 10^{-7} RIU möglich.

3.2 Faseroptische SPR

Eine Übersicht der bisher entwickelten faseroptischen Sensorkonfigurationen ist in Abbildung 3.2 zu sehen. In der oberen Reihe sind Konfigurationen abgebildet, die den sensitiven Teil in eine Faserschleife integrieren, wohingegen die Sensoren der unteren Reihe nur einen Anschluß besitzen und Anregungs- sowie Meßlicht durch dieselbe Faser leiten. Für stationäre Anwendungen werden eher Faserschleifen eingesetzt. Ein größeres Potential der Miniaturisierung haben jedoch die Sensoren mit einer Meßspitze.

Der erste faseroptische SPR Sensor wurde 1993 von Jorgenson et al. in Seattle, USA, vorgestellt und ist dort von der Firma EBI Systems zu einem Produkt weiterentwickelt worden (Abb. 3.2a) [11]. Der Sensor wurde gleichermaßen als Faserschleife und als Faserspitze vorgestellt. Ziel war es, einen transportablen Biosensor für verschiedene Analyten zu entwickeln. Der Sensor ist in der Lage, die Reaktionskinetik für ein spezifisches Molekül zu detektieren. Durch den Verlauf der Kinetik kann die Konzentration bestimmt werden. Später wurde der Sensor von BIAcore als Produkt übernommen und kurze Zeit später als wenig erfolgreiche Produktlinie eingestellt, da sich BIAcore auf die Herstellung von Analysegeräten für hohe Durchsatzraten und

damit den Sektor der transportablen Meßgeräte verlassen hat. Der Sensor besteht aus einer PCS Multimodefaser, deren Fasermantel auf einer Länge von 10 mm entfernt und dessen Kern mit einer Goldbeschichtung versehen ist. Die SPR-Anregung erfolgt mit einer Halogenlampe. Der Bezug zum Brechungsindex bzw. zur Menge der an der Oberfläche gebundenen Moleküle wird über die Wellenlänge der minimalen Reflektivität hergestellt. Auf diese Weise reicht der dynamische Bereich von 1.2 bis 1.4 RIU bei einer Auflösung von $5 \cdot 10^{-5}$ RIU. Der Meßbereich kann mittels unterschiedlich dicker Tantaloxydschichten an verschiedene Bedürfnisse angepaßt werden [12]. Von Katerkamp et al. ist dieselbe Konfiguration später ausschließlich als Faserspitze vorgestellt worden (Abb. 3.2 d) [13]. Der Sensor besteht aus einer HCS-Faser mit einem Kerndurchmesser von $400 \mu\text{m}$. Die Länge des mit 55 nm Silber beschichteten Faserendes beträgt 5 mm und kann den Brechungsindex mit einer Genauigkeit von $4 \cdot 10^{-5}$ RIU bei einem Dynamikbereich von 1.33 bis 1.36 RIU messen.

Ebenfalls 1993 stellten Alonso et al. eine Konfiguration basierend auf einer Monomodefaser vor (Abb. 3.2 b) [14]. Hierbei handelt es sich um eine in Epoxidharz eingegossene, leicht gebogene Faser mit $4.5 \mu\text{m}$ Kerndurchmesser, die anschließend an einer Seite poliert wird, bis der Faserkern auf einer Länge von einigen Millimetern freigelegt ist. Eine Goldbeschichtung von 10 bis 50 nm Dicke bildet die sensitive Schicht. Als Lichtquelle dient eine Halogenlampe mit Monochromator für eine Wellenlänge von 1300 nm. Gemessen wird die transmittierte Leistung mit einer pin-Diode. Der betrachtete Brechungsindexbereich liegt bei 1.435 bis 1.465 RIU und kann durch eine zusätzliche Aluminiumoxidbeschichtung um bis zu ± 0.15 RIU variiert werden. Die Ortsauflösung der Anordnung ist nicht charakterisiert worden.

Eine Mischung aus Multimodefaser und monochromatischer Anregung von SPR stellte 1996 Ronot-Trioli et al. als Ringkonfiguration vor (Abb. 3.2 a) [15]. Es kommt dabei eine PCS-Faser mit $600 \mu\text{m}$ Kerndurchmesser zum Einsatz, in die unter einem festen Winkel mit einer Laserdiode (670 nm) Licht eingekoppelt und die transmittierte Lichtleistung gemessen wird. Die Faserrummantelung wird auf einer Länge von 15 mm entfernt und der Kern mit 30 bis 70 nm Gold beschichtet. Die erzielte Auflösung beträgt im Bereich von 1.33 bis 1.44 RIU etwa $2 \cdot 10^{-4}$ RIU.

Auf der Basis einer in der Mitte verjüngten Monomodefaser entwickelten Tubb et al. 1997 einen chemischen SPR Sensor (Abb. 3.2 c) [16]. Der gesamte Durchmesser der Faser wird über eine Länge von 20 mm durch Erhitzen und Ziehen von $125 \mu\text{m}$ auf $6 \mu\text{m}$ reduziert und anschließend mit 50 nm Silber oder Gold beschichtet. Angeregt wird in einer ersten Anwendung mit dem Licht einer Halogenlampe, das über einen Monochromator auf einen optischen Zehner gegeben wird, so daß man eine wellenlängenmodulierte

SPR-Anregung erhält. Eine optimierte Version verwendet als Lichtquelle eine Laserdiode ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$). Die Detektion des Meßlichts geschieht über eine Photodiode. Der Sensor löst den Brechungsindex mit einer Genauigkeit von $2 \cdot 10^{-4}$ RIU auf und hat einen Meßbereich von 1.32 bis 1.44 RIU.

Ein verbesserter Aufbau mit einer eingegossenen und polierten Singlemodefaser ist 1998 von Slavik et al. vorgestellt worden (Abb. 3.2e) [17]. Der Ansatz ähnelt stark dem von Obando et al., ist aber nicht nur als Ring konzipiert worden sondern auch als Sensorspitze. Eine PCS-Faser mit $560 \mu\text{m}$ Durchmesser wird gebogen in einen Silikatblock eingegossen und auf einer Seite bis zum Faserkern poliert. Auf dieser Fläche wird eine 35 nm Dicke Goldschicht aufgebracht. Das Faserende wird ebenfalls poliert und mit einer Chromverspiegelung versehen. Der Aufbau ist sehr kompakt und hatte mit einer SPR-aktiven Länge von ca. 2 mm die bis dahin beste Ortsauflösung. Als Anregung dient monochromatisches Laserlicht mit einer Wellenlänge von 825 nm . Das reflektierte Licht wurde mit einer Photodiode gemessen. Der Meßbereich des Sensors liegt bei 1.33 bis 1.34 RIU mit einer Auflösung von $4 \cdot 10^{-5}$ RIU. Durch eine zusätzliche Tantaloxid Schicht kann der Meßbereich bis auf 1.34-1.35 RIU verschoben werden.

Obando et al. entwickelten 1999 eine Reihe faseroptischer Sensoren, die auf angespitzten Faserenden basieren (Abb. 3.2f) [18]. Als Fasermaterial dient eine Multimodefaser mit $400 \mu\text{m}$ Kerndurchmesser, von der an einem Ende auf der Länge zwischen 2.5 und 5 mm die Ummantelung entfernt wird. Anschließend wird das Faserende fixiert und von zwei Seiten unter definierten Winkeln angeschliffen. Eine Seite des Faserendes wird mit einer 50 nm Goldbeschichtung versehen, wohingegen das Ende der Faser mit Chrom verspiegelt wird. Eine CCD-Kamera nimmt das von der Spitze reflektierte Licht einer Halogenlampe auf. Je nach Wahl der Winkel deckt der Sensor einen Meßbereich von 1.33 bis 1.41 RIU bei einer Auflösung von bis zu 10^{-4} RIU ab.

Die wichtigsten Eigenschaften der hier vorgestellten Sensorkonfigurationen sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Es existieren darüber hinaus noch zahlreiche andere Arbeiten über SPR-Anregung mit optischen Fasern, bei der die Glasfaser allerdings nicht das sensitive Element bildet, sondern Licht z.B. zu einer Prismenanordnung leitet. Außerdem bleibt festzustellen, daß in den letzten vier Jahren keine grundlegend neuen Konfigurationen entwickelt worden sind. Für hohe Empfindlichkeit gegenüber dem Brechungsindex haben sich die auf Singlemodefasern basierenden Sensoren durchgesetzt. Sie haben aber meist einen geringeren Meßbereich als Lösungen mit Multimodefasern, die in der Regel mit weniger Aufwand hergestellt werden können. Die Ortsauflösung der faseroptischen Brechungsindexmessung hat bisher keine große Beachtung gefunden, da der Entwicklungsschwerpunkt in der Chemo- und

Tabelle 3.1: Meßbereich, Empfindlichkeit und Ortsauflösung einiger faseroptischer SPR-Sensoren.

	Abb. 3.2	Meßbereich [RIU]	Empfindlichkeit [RIU]	Ortsauflösung [mm]
Jorgenson et al.	a, d	1.2 - 1.4	$5 \cdot 10^{-5}$	10
Kateramp et al.	d	1.33 - 1.36	$4 \cdot 10^{-5}$	5
Slavik et al.	e	1.33 - 1.34	$4 \cdot 10^{-5}$	2
Obando et al.	f	1.33 - 1.41	$1 \cdot 10^{-4}$	2.5
Alonso et al.	b	1.435 - 1.465	$1 \cdot 10^{-3}$	n.a.
Ronot-Trioli et al.	a	1.33 - 1.44	$2 \cdot 10^{-4}$	15
Tubb et al.	c	1.32 - 1.44	$2 \cdot 10^{-4}$	20

Biosensorik auf Reaktionen liegt, die nur mittels eines Waschvorgangs reversibel sind. Profilmessungen sind mit solchen Sensoren nicht durchführbar.

3.3 Bildgebende SPR

Bildgebende SPR-Verfahren sind nach ihrer Entwicklung 1987 von Yeatman et al. [19] und 1988 von Rothhäusler et al. [20] zunächst als Technik zur Kontrastverstärkung für die Mikroskopie angewendet worden. Molekularbiologische Anwendungen – wie z.B. die Beobachtung von Bindungskinetiken – folgten kurze Zeit später. Diese ersten Systeme beruhten auf der Kretschmann-Konfiguration und regten SPR mit Laserlicht an. Hierfür kamen gebräuchliche Mikroskope zur Anwendung, so daß die Beobachtung des entstehenden Bildes häufig nur mit dem bloßen Auge geschah. Erst Anfang der Neunziger Jahre sind optimierte Systeme entwickelt worden, deren Bilder mit CCD-Kameras aufgenommen werden konnten. Um die zweidimensionale Auflösung zu erhalten, kann man entweder das Prisma mit einem Laserstrahl abtasten, oder einen kollimierten Strahl erzeugen, der auf der gesamten Grundfläche des Prismas SPR anregt. Abbildung 3.3 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines SPR Imaging Systems, das ohne Abtastung auskommt. Der Kollimator und das Interferenzfilter sind bei Verwendung einer Weißlichtquelle nötig. Für Laserlicht ist dagegen eine Optik zur Strahlaufweitung erforderlich. Da die Oberfläche der Metallbeschichtung nicht ideal glatt ist, hat die Verwendung eines aufgeweiteten Laserstrahls den Nachteil, daß es aufgrund der diffusen Reflexion zu einem Fleckenmuster (engl.: speckle pattern) bei der Aufnahme kommt. Dieser Nachteil wird allerdings meist wegen der wesentlich größeren Intensität der Bilder in Kauf genommen. In zwei Arbeiten von Knobloch

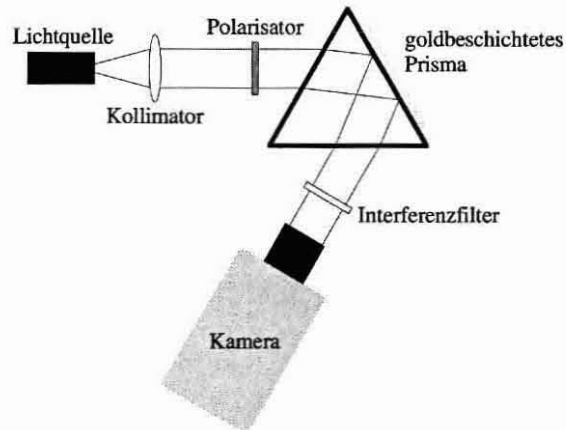


Abbildung 3.3: Aufbau eines SPR Imaging Systems

et al. [21] und Nelson et al. [22] ist ein SPR-Imaging-Aufbau auf der Basis von Weißlicht vorgestellt worden, die allerdings für die Messung der Bindungskinetik von DNS auf einer modifizierten Goldbeschichtung, die eine Brechungsindexänderung von 10^{-6} RIU verursacht, nicht ausreichen.

Eine Anwendung von SPR Imaging ist die Messung der Bindung von DNS an Oligonukleotide, die nach dem Schlüssel/Schloß-Prinzip funktioniert. Ein bestimmtes Oligonukleotid bindet spezifisch an nur ein Stück DNS. Für eine Messung wird eine goldbeschichtete Fläche in mehrere gleichgroße Felder unterteilt und mit unterschiedlichen Oligonukleotiden beschichtet. Wird eine Probe mit unbekannter DNA auf diese Fläche gebracht, zeigt nur ein Feld, dessen Oligonukleotid zur DNA paßt, eine Reaktion. Die Ortsauflösung von SPR-Imaging ist in diesem Fall für eine große Zahl unterschiedlicher Oligonukleotide nötig. Die maximale Ortsauflösung beträgt aufgrund der mittleren Weglänge der Oberflächenplasmonen etwa $5 \mu\text{m}$.

Kapitel 4

Faseroptischer Brechungsindexsensor

4.1 Modellierung

Die Modellierung eines faseroptischen Brechungsindexsensors wurde bereits in einer Diplomarbeit behandelt [23]. Der Schwerpunkt lag dort auf dem theoretischen Nachweis, daß SPR in getaperten Fasern angeregt werden kann. In dieser Arbeit ist das Modell soweit verfeinert worden, daß der Einfluß einer Maskierung zur Erhöhung der Ortsauflösung auf die Signalqualität berechnet werden kann. In diesem Abschnitt wird das verfeinerte Modell für die Anregung von Oberflächenplasmonen in unterschiedlich getaperten Faserenden beschrieben und die Simulationsergebnisse diskutiert.

4.1.1 Lichtausbreitung in beschichteten Glasfasern

In einem angespitzten Glasfaserende breitet sich Licht unter komplexeren Bedingungen aus als in einem geraden Faserende. Für ungetaperte Fasern ist es möglich, einen einfachen Ausdruck der Reflektivität zu finden, da der Reflexionswinkel an der Kern/Mantel-Schnittstelle über die gesamte Faserlänge konstant bleibt. Dies ist bei getaperten Faserenden nicht der Fall, so daß der Verlauf des Lichtstrahls nach Eintritt in den Taper Reflexion für Reflexion berechnet werden muß. Hierfür wurde bereits bei der Diplomarbeit die Simulationssoftware SPRsim programmiert. Dieses Programm ist seitdem weiterentwickelt und optimiert worden. Es war aus Effizienzgründen nötig, das Programm von Pascal in C++ zu portieren, um auch komplexere Modelle in annehmbarer Rechenzeit simulieren zu können. Hierbei wurden gleichzeitig einige Einschränkungen der vorherigen Version aufgehoben.

In der vorigen Version konnte pro Simulation das Reflexionsspektrum für nur einen Brechungsindex berechnet werden, so daß für mehrere Brechungsindizes der Strahlenverlauf jedesmal neu simuliert werden mußte. Die zeitaufwendige Berechnung des Strahlenverlaufs für jeden Brechungsindex ist dieselbe, so daß die Implementierung einer „Sweep“-Funktion, mit der ein Brechungsindexbereich anstatt eines einzelnen Wertes simulierbar ist, die Anzahl der Simulationsgänge auf einen einzigen reduziert. Ein weiterer Unterschied zur Vorgängerversion von SPRsim besteht in der Annahme, daß die Lichtquelle nicht idealerweise eine Punktlichtquelle in der Mitte des Faserquerschnittes ist, sondern homogen über den gesamten Querschnitt der Faser Licht einkoppelt. Durch diese Annahme erhöht sich die simulierte Anzahl der Reflexionen im Taper unter unterschiedlichen Winkeln erheblich und sorgt für eine realitätsnähere Abschätzung der Reflektivität. Desweiteren kann für jede einzelne Stelle auf der x -Achse ein Schichtsystem auf dem Faserkern definiert werden, so daß ein Modell eines teilweise maskierten Tapers simuliert werden kann. Prinzipiell sind sogar Analysen über den Einfluß inhomogener Metallbeschichtungen möglich, die aber den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten.

Der Algorithmus, der SPRsim zugrunde liegt, besteht aus zwei Schritten: der erste Schritt modelliert die Lichtausbreitung, d.h. den Strahlenverlauf eines Lichtstrahls, in der gegebenen Tapergeometrie. Im zweiten Schritt wird für jede Reflexion innerhalb des Tapers der Reflexionsgrad eines Schichtsystems bestehend aus dem Faserkern, der Metallbeschichtung und dem Brechungsindex der Umgebung berechnet. Diese Werte werden für einen Lichtstrahl bei jeder Reflexion über das Spektrum von 400 bis 800 nm ermittelt und über alle Reflexionen multipliziert. Das sich hieraus ergebende Reflexionsspektrum wird mit der Modenverteilung gewichtet und summiert. Abbildung 4.1 zeigt den simulierten Strahlenverlauf in der zweidimensionalen Projektion einer getaperten Glasfaser, sowie die die Tapergeometrie bestimmenden Parameter Faserkerndurchmesser d_c , Taperdurchmesser d_t und Taperlänge l . Der dreidimensionale Taper ergibt sich aus der Rotation um die x -Achse. Das Modell besteht aus Punktlichtquellen, die Licht im Winkelbereich der Modenverteilung in den Taper abstrahlen. In Abbildung 4.1 sind sie als Punkte auf der y -Achse erkennbar. Die Position dieser Punktlichtquellen wird in Schritten von $\Delta y = 5.5 \mu\text{m}$ über den gesamten Faserdurchmesser von $d_c = 110 \mu\text{m}$ variiert. Der Winkelbereich reicht bei einer Faser mit $NA = 0.28$ von 0 bis $\pm 16.3^\circ$ und wird in 200 Schritte zu $\Delta\theta = 0.163^\circ$ eingeteilt. Für jede einzelne dieser 4000 möglichen Kombinationen aus Abstrahlwinkel θ und Position (x_0/y_0) der Punktlichtquellen muß der Strahlenverlauf berechnet werden.

Um die Stelle und den Winkel der nächsten Reflexion zu ermitteln, werden

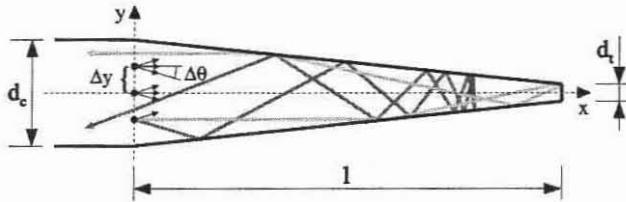


Abbildung 4.1: Strahlenverlauf in einer getaperten Glasfaser.

die drei Begrenzungen des Tapers als Geradengleichung ausgedrückt:

$$\text{allgemeine Form:} \quad Ax + By + C = 0, \quad (4.1)$$

$$\text{obere Begrenzung:} \quad \frac{d_c - d_t}{2l}x + y - \frac{d_c}{2} = 0, \quad (4.2)$$

$$\text{untere Begrenzung:} \quad -\frac{d_c - d_t}{2l}x + y + \frac{d_c}{2} = 0, \quad (4.3)$$

$$\text{Faserende:} \quad x - l = 0. \quad (4.4)$$

Der Lichtstrahl der Lichtquelle in Punkt (x_0/y_0) schließt mit der x -Achse den Winkel θ ein. Der Abstand dieses Punktes von den Begrenzungen gibt ein Parameter p über

$$p = -\frac{Ax_0 + By_0 + C}{A \cos \theta + B \sin \theta}, \quad \text{für } A \cos \theta + B \sin \theta \neq 0 \quad (4.5)$$

an, der für jede Gerade bestimmt werden muß. Ein negatives p bedeutet, daß sich der Schnittpunkt in rückwärtiger Ausbreitungsrichtung befindet und ist somit physikalisch nicht sinnvoll. Der Lichtstrahl wird also an der Begrenzung reflektiert, die das kleinste, positive p größer Null aufweist. Der Schnittpunkt (x/y) des Strahls mit dieser Begrenzung berechnet sich aus

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix} + p \begin{pmatrix} \cos \theta \\ \sin \theta \end{pmatrix} \quad (4.6)$$

Der Lichtstrahl hat den Taper verlassen, wenn er sich entweder mit keiner Gerade mehr schneidet oder wenn die x -Koordinate des Schnittpunktes negativ ist. Der Winkel θ_0 , mit dem der Lichtstrahl am Rand des Tapers auftrifft, ist

$$\tan \theta_0 = \frac{A \cos \theta - B \sin \theta}{A \sin \theta + B \cos \theta}. \quad (4.7)$$

Mit Hilfe dieses Winkels berechnet man die Reflektivität R_i der i -ten Reflexion nach Gleichung 2.33 für den gewünschten spektralen Bereich und die

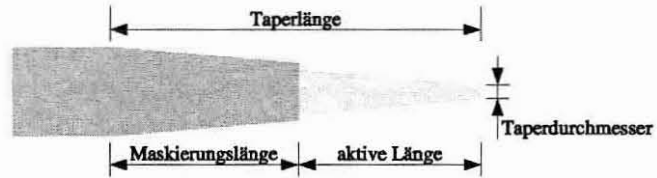


Abbildung 4.2: Erklärung einiger verwendeter Begriffe.

gewählten Brechungsindizes. Die Werte für alle k Reflexionen werden multipliziert und über die Variation des Ursprungs ($0/y_0$) sowie der Winkel θ gemäß

$$R(\lambda, n) = \sum_{\theta, y_0} \left(a(\theta) \cdot \prod_{i=1}^k R_i(\theta_i, \lambda, n) \right) \quad (4.8)$$

summiert, wobei $a(\theta)$ ein Gewichtungsfaktor gemäß der Modenverteilung in der Faser ist. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen ist $R(\lambda, n)$ eine Matrix mit etwa 4500 Elementen, die sich aus 4000 Strahlenverläufen ergeben. Die vorherige Version von SPRsim verwendete lediglich 200 Strahlenverläufe.

4.1.2 Simulationsergebnisse

Die hier präsentierten Simulationsergebnisse sind mit SPRsim erstellt worden. Das Modellsystem besteht aus einer angespitzten, beschichteten Glasfaser mit einem Kerndurchmesser von $110 \mu\text{m}$ und einem Spitzendurchmesser von $20 \mu\text{m}$. Eine erste Schicht besteht aus Chrom und hat eine Dicke von 2 nm . Die abschließende Goldbeschichtung wird mit einer Dicke von 50 nm angenommen. In den Simulationen sind die Taper- und Maskierungslänge variiert worden. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, bezeichnet dabei die Maskierungslänge den Teil des angespitzten Faserendes, der mittels einer Maskierung passiviert wurde. In einer früheren Arbeit [23] wurde ein Vergleich der Empfindlichkeit zwischen geraden und angespitzten Faserenden mit dem Ergebnis durchgeführt, daß getaperte Faserenden sogar eine potentiell höhere Empfindlichkeit aufweisen können als gerade. Aus diesem Grund wird auf einen weiteren Vergleich dieser an dieser Stelle verzichtet.

Länge des Tapers

Die Taperlänge ist einer der maßgeblichen Designparameter des Brechungsindexsensors. Die Reflexionsspektren für vier verschiedene Taperlängen (200,

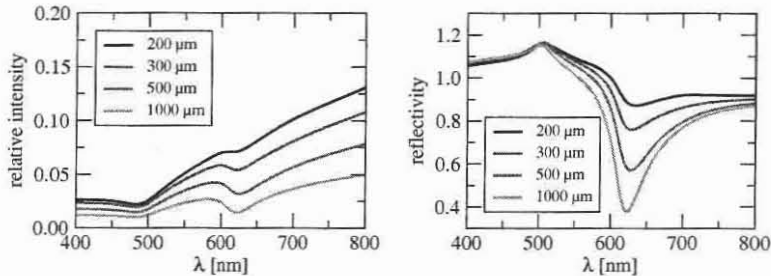


Abbildung 4.3: Einfluß der Taperlänge auf das absolute Spektrum (links) und das normierte Spektrum (rechts). Mit zunehmender Taperlänge verringert sich die Reflektivität und das Resonanzminimum wird deutlicher.

300, 500 und 1000 μm) sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Spektren im linken Graphen sind nicht normiert, so daß sich nicht die typische Form eines SPR-Spektrums ergibt. In dieser Darstellung wird aber besonders deutlich, wie groß die reflektierte Lichtintensität ist, und daß diese mit steigender Taperlänge abnimmt. Ein 1000 μm langer Taper reflektiert nur die Hälfte des Lichts eines 300 μm -Tapers. Andererseits zeigt der rechte Graph, daß sich das Reflexionsminimum mit steigender Taperlänge stärker ausbildet. Ein solches Minimum kann zwar genauer bestimmt werden, nur wird das gemessene Signal aufgrund der geringen Intensität wesentlich stärker verrauscht sein, so daß sich der Empfindlichkeitsvorteil relativiert. Es muß also ein Kompromiß zwischen Empfindlichkeit und Intensität gefunden werden. Vergleichende Messungen haben ergeben, daß ein Sensor mit einer Taperlänge von mehr als 1000 μm nur noch mit einer hohen Integrationszeit des Spektrometers von mehreren Sekunden arbeiten kann und sehr verrauschte Ergebnisse liefert. Demgegenüber sind die Minima von Tapern kürzer als 500 μm nur noch mit unzureichender Genauigkeit detektierbar, da sich das Minimum zu schwach ausbildet und sich Spektren unterschiedlicher Brechungsindizes zu wenig unterscheiden. Aus diesem Grund wurde sinnvollerweise eine Länge zwischen 500 und 1000 μm gewählt.

Maskierte Taper

Mit steigender Taperlänge erhöht sich nicht nur die reflektierte Lichtintensität, sondern die Ortsauflösung verringert sich ebenfalls. Außerdem ist nach dem Taperprozeß nicht nur der Faserkern auf der Länge des Tapers freigelegt, sondern über etwa 2 bis 7 mm (siehe Kapitel 4.2). Von daher muß ein Weg gefunden werden, eine Maskierung auf den Taper aufzubringen, die un-

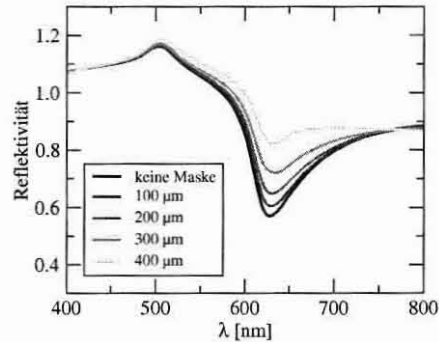


Abbildung 4.4: Unterschiedliche Maskierungslängen eines $500\ \mu\text{m}$ langen Tapers.

erwünschte Wechselwirkungen verhindert. Der Einfluß einer solchen Maskierung wird mit Hilfe der Simulation eines $500\ \mu\text{m}$ Tapers untersucht, bei dem nur die letzte Spitze des Sensors in Kontakt mit dem umgebenen Medium treten kann. Die Maskierungslänge der Spitze ist in Abbildung 4.4 von 0 bis $400\ \mu\text{m}$ variiert worden, d.h. die freie Taperlänge beträgt 500 bis $100\ \mu\text{m}$. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Maskierung die Ausbildung des Minimums reduziert. Die größte Veränderung ist zwischen 300 und $400\ \mu\text{m}$ zu sehen, was darauf schließen läßt, daß in der Region etwa 100 bis $200\ \mu\text{m}$ von der Spitze entfernt eine sehr effektive Anregung von Oberflächenplasmonen stattfindet. Um den kombinierten Einfluß von Taperlänge und Maskierungslänge zu charakterisieren, sind in Abbildung 4.5 Spektren von Sensoren unterschiedlicher Taperlänge mit einer freien, sensitiven Spitze von $100\ \mu\text{m}$ abgebildet. Ein $1000\ \mu\text{m}$ -Taper liefert maskiert auf einer Länge von $900\ \mu\text{m}$ eine um 50 % höhere Lichtintensität als unmaskiert. Jedoch ist das Reflexionsminimum wesentlich weniger ausgeprägt. Es ist auch erkennbar, daß sich Taperlängen von weniger als $500\ \mu\text{m}$ nicht für eine Ortsauflösung in der Größenordnung von $100\ \mu\text{m}$ eignen, da sich nahezu kein Minimum ausbildet.

Empfindlichkeit

Der Einfluß der Tapergeometrie auf die Empfindlichkeit des Sensors soll nun anhand der Verschiebung des Reflexionsminimums genauer untersucht werden. In Kapitel 4.3 wird ausführlich die Kalibrierung von SPR-Sensoren und komplexere Methoden als die Minimumsuche beschrieben. Eine genaue Kalibrierung ist hier zum Zwecke der Veranschaulichung allerdings nicht nötig.

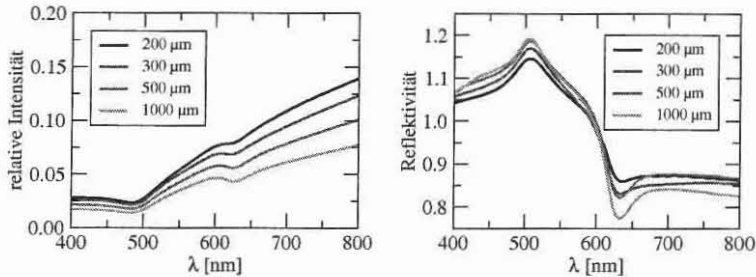


Abbildung 4.5: Nicht normiertes (links) und normiertes (rechts) Spektrum von unterschiedlichen Taperlängen mit einer freien Spitze von $100\ \mu\text{m}$ Länge.

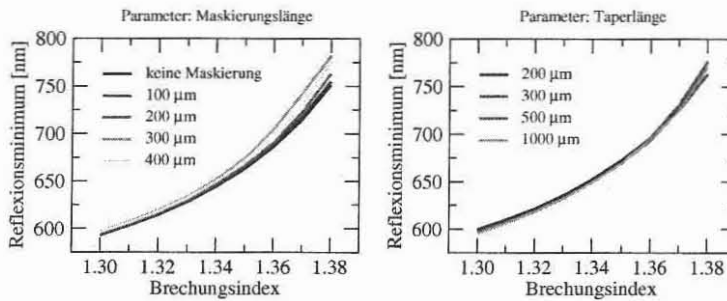


Abbildung 4.6: Position des Minimums im Reflexionsspektrum in Abhängigkeit der Taperkonfiguration. Ein $500\ \mu\text{m}$ langer Taper mit variierten Maskierungslänge (links) und unterschiedliche Taperlängen mit einer aktiven Länge von $100\ \mu\text{m}$ (rechts).

Der Einfluß einer Maskierung auf die Verschiebung des Minimums ist in den Kalibrierungskurven in Abbildung 4.6 zu erkennen. Im linken Graphen ist ein $500\ \mu\text{m}$ langer Taper mit verschiedenen Maskierungslängen simuliert worden. Es zeigt sich, daß die Einschränkung der sensitiven Taperlänge die Empfindlichkeit ansteigen läßt. Ein Optimum ist bei einer aktiven Länge von $200\ \mu\text{m}$ erreicht. Dies bestätigt die Annahme aus dem vorigen Abschnitt, daß in der Region 100 bis $200\ \mu\text{m}$ von der Spitze entfernt die effektivste SPR-Anregung stattfindet.

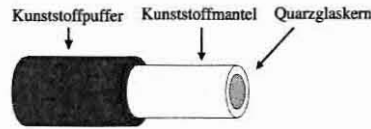


Abbildung 4.7: Aufbau der verwendeten 110/125 μm HCS-Faser.

4.2 Herstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zuverlässiges Herstellungsverfahren gesucht, das mit vertretbarem Aufwand reproduzierbare Sensoren liefert. Ein wesentlicher Bestandteil war die Verwendung eines modifizierten Spleißgerätes zum Anspitzen eines geraden Faserendes in der vorangegangenen Diplomarbeit. Dieses Verfahren ist sehr gut kontrollierbar und wurde in Details optimiert. Wesentlich verändert wurde hingegen die Metallbeschichtung der Faserenden, die jetzt homogen über den gesamten Faserumfang erfolgt. Außerdem ist durch eine Maskierung der angespitzten Faser die Ortsauflösung wesentlich erhöht worden. In den folgenden Abschnitten wird der Herstellungsprozeß detailliert erläutert.

4.2.1 Anspitzen („Tapern“) der Faser

Als Fasermaterial wurde eine HCS-Faser mit einem Kern-/Manteldurchmesser von 110/125 μm gewählt. Ihr Vorteil besteht in der einfachen Handhabung und guten Lichtausbeute. Da sie aus einer zweischichtigen Kunststoffummantelung und einem Quarzglaskern besteht, kann der Kern leicht durch Verbrennen der Ummantelungen freigelegt werden. Der Aufbau der Faser ist in Abbildung 4.7 gezeigt. Um die gewünschte Ortsauflösung bei der Brechungsindexmessung zu erreichen, ist ein Anspitzen des Faserendes vonnöten. Das Entfernen des Fasermantels und das Anspitzen erfolgt gleichzeitig mit einem modifizierten Spleißgerät Modell X75 (RXS Kabelgarnituren GmbH, Hagen), wie in Abbildung 4.8 links zu sehen. Die Umbauten für den Hebelarm mit Servomotor und das Steuergerät sind in der Diplomarbeit [23] beschrieben. Links und rechts von der Spleißeinheit befinden sich zwei Schlitten, von denen der linke fixiert ist und der rechte über einen Hebelarm mit einem Servomotor verbunden ist. Der Kunststoffpuffer muß zur Vorbereitung mit Hilfe einer Abisolierzange von der Faser auf einer Länge von ca. 10 cm entfernt werden. Mit dem abisolierten Ende nach links wird dann die Faser auf den Schlitten und der Spleißeinheit befestigt. Das andere Ende der Faser wird über einen Steckverbinder mit der Steuereinheit verbunden. Während des Spleiß-

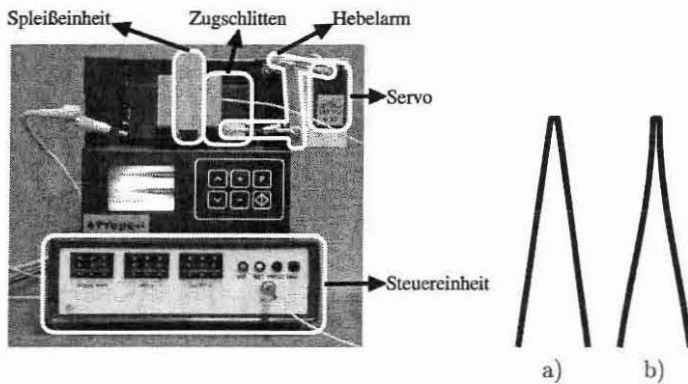


Abbildung 4.8: Modifiziertes Spleißgerät zum Anspitzen von Glasfaserenden (links) und zwei mögliche Taperformen (rechts).

Bens zündet ein Lichtbogen, dessen Licht über die Faser zur Steuereinheit übertragen wird. Diese startet nach einstellbarer Verzögerungszeit mit definierter Geschwindigkeit den Servomotor, so daß sich der Zugschlitten von der Spleißeinheit entfernt und die geschmolzene Faser auseinanderzieht. Die hohe Temperatur läßt den Kunststoffmantel verbrennen und legt auf einer Länge von 2 bis 7 mm den Quarzglaskern frei. Durch das Verbrennen der Ummantelung muß die Spleißeinheit nach einigen Vorgängen intensiv gereinigt werden, da Ablagerungen für eine erhöhte Temperatur sorgen und so ein kontrolliertes Anspitzen der Faser verhindern. Über die Zugeschwindigkeit und den Strom des Lichtbogens (Temperatur) kann die Geometrie des Tapers in engen Grenzen kontrolliert werden. Beide Parameter beeinflussen sich gegenseitig, d.h. ein höherer Strom erfordert eine höhere Zugeschwindigkeit für die gleiche Geometrie. Generell zeigt die Spleißtemperatur einen größeren Einfluß auf die Taperlänge. Ströme zwischen 15 und 10 mA erzielen Taperlängen von 500 bis 1000 μm . Außerhalb dieser Stromgrenzen formt sich entweder bei hohem Strom eine Kugel am Faserende aus oder die Faser ist bei zu niedriger Temperatur an der Spleißstelle nur verjüngt. Die Form des Tapers variiert mit der Zugeschwindigkeit. Kegelförmige Taper wie in Abbildung 4.8 a) ergeben sich bei einer Zugeschwindigkeit des Schlittens zwischen 2 und 5 $\frac{\text{mm}}{\text{s}}$. Bei höheren Geschwindigkeiten ähnelt die Form des Tapers eher der in Abbildung 4.8 b), wohingegen eine zu langsam gezogene Faser denselben Effekt wie bei einem zu niedrigen Strom zeigt.

In der Regel ist jeder erste bis dritte Tapervorgang erfolgreich und führt zur gewünschten Geometrie. Dies liegt an den Verunreinigungen, die das

Verbrennen des Kunststoffummantelung hervorruft. Aus diesem Grund ist es notwendig, nach dem Tapervorgang die Geometrie des Tapers zu kontrollieren. Unter einer Stereolupe mit Größenskala im Okular kann die Länge und der Durchmesser des Tapers mit einer Genauigkeit von etwa $5\ \mu\text{m}$ gemessen werden. Eine Kontrolle jedes einzelnen Tapers ist dabei recht zeitaufwendig, weshalb ein Schnelltest entwickelt wurde. Von jedem Taper wird mit einem Spektrometer ein Reflexionsspektrum aufgenommen und mit dem eines vorher genau vermessenen Taper verglichen. Wenn die Intensität geringer ist, ist der Taper zu lang. Ein zu kurzer Taper hingegen zeigt eine höhere Lichtintensität. Dieser Zusammenhang geht aus den Simulationen (siehe Kapitel 4.1.2) hervor. Liegt das Ergebnis im Toleranzbereich von $\pm 10\%$, kann die Faser anschließend unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Die fertige, angespitzte Faser wird im Reinigungsmittel RBS 50 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) von Rückständen befreit, mit Ethanol gespült und in Stickstoff getrocknet.

4.2.2 Maskierung

Während des Taperens der Faser wird der Faserkern über eine Länge von 2 bis 5 mm freigelegt. Mit einer Goldbeschichtung würde SPR auf der gesamten Länge des Tapers angeregt werden, was zu einer Ortsauflösung in derselben Größenordnung führt und damit deutlich über dem Zielbereich von unter einem Millimeter liegt. Aus diesem Grund muß der Taper maskiert werden. Das Beschichtungsmaterial muß ähnliche optische Eigenschaften wie das ursprüngliche Cladding haben, damit möglichst wenig Licht aus der Faser ausgekoppelt wird. Dies bedeutet für den Brechungsindex der Maskierung, daß er kleiner sein muß als der des Kerns ($n_c = 1.4623$ RIU). Die meisten Polymere, die in flüssiger Form leicht zu handhaben sind, haben einen Brechungsindex von meist größer als 1.5 RIU. Eine Ausnahme bildet Teflon AF (DuPont, Wilmington, USA), das im Gegensatz zu anderen Polymeren gute optische, mechanische und chemische Eigenschaften aufweist. Im sichtbaren Bereich ist es klar und hat mit 1.31 RIU den derzeit niedrigsten Brechungsindex für ein Polymer. Außerdem ist es extrem widerstandsfähig gegen aggressive Chemikalien und Ablagerungen, da aufgrund seiner molekularen Struktur nichts an der Oberfläche anhaften kann. Teflon AF wird zunehmend als Material für optische Faserummantelungen vor allem in Bereichen eingesetzt, in denen eine große chemische Widerstandsfähigkeit gefordert ist.

In Abbildung 4.9 ist der Ablauf des Maskierungsprozesses zu sehen. In eine Aluminiumplatte befindet sich ein $200\ \mu\text{m}$ breiter Spalt, auf den ein Tropfen Teflon AF 1600 in Perfluordecalin-Lösung kommt. Durch seine hohe Viskosität verläuft der Tropfen nicht im Spalt. Die getaperte und gereinigte Faser wird von der Seite mit der Spitze nach oben in den Spalt eingeführt

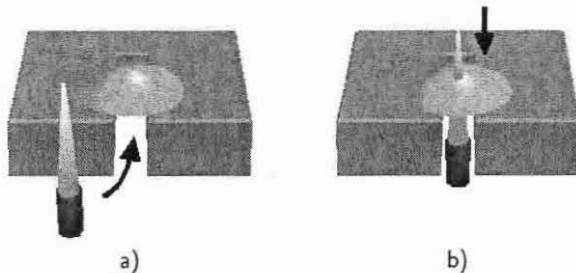


Abbildung 4.9: Maskierung des Tapers mit einer Teflonlösung: a) einführen in den Spalt, b) herunterziehen bis vom Taper nur noch die gewünschte Länge unbeschichtet ist.

und durch langsames nach unten ziehen über den ganzen Umfang mit Teflon benetzt. Wenn nur noch die gewünschte Taperlänge unmaskiert ist, wird die Faser wieder seitlich aus dem Spalt gezogen und das Lösungsmittel darf abdampfen. Der Prozess wird durch eine Stereolupe kontrolliert. Die Dicke der Schicht liegt in der Größenordnung von 10 bis 20 μm .

Die Maskierung kann entweder vor oder nach der Metallbeschichtung erfolgen. Es ist zu erwarten, daß eine Beschichtung nach der Maskierung ein Minimum im Reflexionsspektrum verursacht, das seine Position in Abhängigkeit vom umgebenen Brechungsindex nicht ändert. Diese Eigenschaft könnte als Referenzierung dienen. Da der Brechungsindex von Teflon AF 1600 nahe dem Meßbereich liegt, ist aber auch ein Einfluß auf die Empfindlichkeit nicht auszuschließen, weil sich das Minimum der Maskierung mit dem des Analyts überlagern kann. Aus diesem Grund werden beide Maskierungsmethoden und ihr Einfluß auf Empfindlichkeit und Ortsauflösung in Kapitel 4.4 verglichen.

4.2.3 Beschichtung

Die Fasern müssen mit einem SPR-fähigen Metall beschichtet werden. Das Metall, in das besonders effektiv SP-Moden eingekoppelt werden können, ist Silber, gefolgt von Gold. Silber eignet sich wegen seiner starken Korrosionsfähigkeit nicht für die Anwendung in der oxidierenden Umgebung von Meerwasser, weshalb Gold die einzige Alternative darstellt. Da Gold in dünnen Schichten keine gute Haftung auf Quarzglas hat, muß zuvor eine Haftvermittlerschicht aufgebracht werden. Hierfür eignet sich besonders Chrom aufgrund seiner guten Haftung auf Glas und Gold. Die Schichtdicke für Chrom soll als Haftschiicht nur ein bis zwei Nanometer betragen. Für eine



Abbildung 4.10: Blick unter die Vakuummotte der Edwards Auto 306 Sputteranlage mit Targethalter und Schichtdickenmesser.

gute Empfindlichkeit des Sensors soll die Dicke der anschließenden Goldschicht zwischen 50 und 60 nm liegen.

Bisher wurde ein Verfahren verwendet, das die Fasern von zwei gegenüberliegenden Seiten mit Gold beschichtet. Auf diese Weise wurden nur zwei schmale Streifen auf die Fasern aufgebracht, so daß viel Licht ausgekoppelt wurde. Mit dem hier vorgestellten modifizierten Verfahren wird eine Beschichtung über den gesamten Umfang des Tapers gewährleistet. Beide Beschichtungen werden in einer Sputteranlage (Auto 306 Vacuum Coating System, BOC Edwards, Crawley, UK) im Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und angewandte Materialforschung durchgeführt. Eine eigens für diese Anlage entwickelte Halterung faßt zwölf Fasern und hat eine Achse, die von einem Motor in der Vakuumeinheit aufgenommen werden kann. Dieser Motor dreht die Faserhalterung mit einer Drehrate von ca. 180 %/s. Die Schichtdicke kann mittels eines in der Kammer angebrachten Schwingquarzes kontrolliert werden. Allerdings erfaßt diese Kontrolle nur die Schichtdicke, die sich ohne Rotation auf einer ebenen Fläche ergeben würde. Die nachträgliche Kontrolle der Schichtdicke erwies sich mit den zur Verfügung stehenden Meßgeräten als nicht durchführbar. Mittels Ellipsometrie könnte ein ebenes Mehrschichtsystem aus Chrom und Gold auf Glas durchaus charakterisiert werden. Wegen der zylindrischen Form der Faser ist dieses Verfahren jedoch hier nicht anwendbar. Es wurde stattdessen eine Meßreihe zur empirischen Bestimmung der optimalen Schichtdicke durchgeführt, in der mehrere Sätze unterschiedlich lange beschichtet und anschließend ihr Reflexionsspektrum in Wasser und Ethanol aufgenommen wurden. Eine ebene Dicke zwischen 75 und 80 nm Gold zeigte hervorragende Ergebnisse und ließ im Vergleich mit

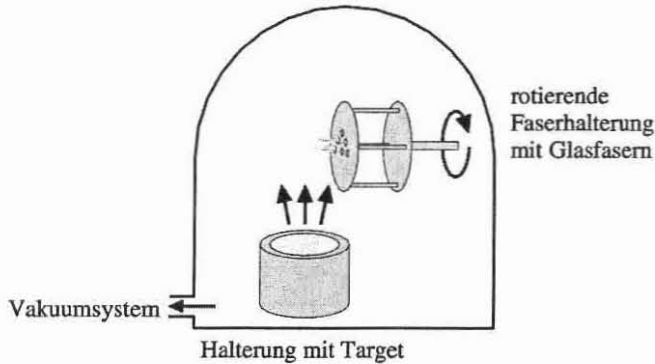


Abbildung 4.11: Schema des Beschichtungsprozesses

Simulationen auf eine 55 bis 60 nm Dicke Beschichtung schließen. Die Genauigkeit dieses Verfahrens ist völlig ausreichend, da die Positionierung der Fasern und des Schwingquarze über dem Target manuell geschieht und somit eine große Streuung aufweist.

4.3 Kalibrierung von SPR-Sensoren

Die Herausforderung bei der Kalibrierung von SPR-Sensoren besteht darin, keinen einzelnen Meßwert, sondern ein Reflexionsspektrum – d.h. einen Vektor von Meßwerten – einem Brechungsindex zuzuordnen. Der gewohnte Bezug von einem Meßwert für einen Meßpunkt kann aufgrund der grundsätzlichen Eigenschaft von SPR-Spektren, ein charakteristisches Minimum aufzuweisen, auf einfache Weise hergestellt werden.

Im Gegensatz zur Bestimmung des Minimums verwenden sogenannte multivariante Kalibrierungsverfahren das gesamte Spektrum für die Kalibrierung und stellen so den Vektor einer Messung mit dem Brechungsindex in Bezug. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß auch Merkmale zur Kalibrierung beitragen, die nicht offensichtlich mit dem Meßwert in Verbindung zu bringen sind. In diesem Abschnitt werden diese zwei unterschiedlichen Ansätze genauer untersucht.

4.3.1 Bestimmung des Reflexionsminimums

Ein typisches Reflexionsspektrum eines faseroptischen SPR-Sensors mit dem ausgeprägten Minimum ist in Abbildung 4.12 zu sehen. Die Bestimmung des

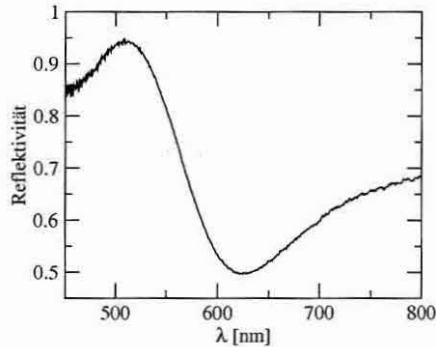


Abbildung 4.12: Beispiel eines gemessenen Reflexionsspektrums bei einem Brechungsindex von 1.33 RIU.

Reflexionsminimums (auch: Minimum-Hunt) sucht die Wellenlänge minimaler Reflektivität, die sich in Relation zum jeweiligen Brechungsindex eine Kalibrationskurve ergibt. Der schnellste Weg, das Minimum zu ermitteln ist, das Pixel mit der geringsten Reflektivität zu bestimmen. In diesem Fall würde die Minimumbestimmung nie besser sein, als der spektrale Abstand zwischen zwei Pixeln, der bei dem verwendeten Spektrometer bei ca. 0.5 nm liegt. Eine Verschiebung des Minimums um 0.5 nm kann aber schon eine Brechungsindexänderung von mehr als 10^{-3} zur Ursache haben. Außerdem können Rauschprozesse den Wert eines einzelnen Pixels „ausreißen“ lassen und so die Auflösung weiter verschlechtern. Aus diesem Grund ist die Methode wenig praktikabel. Eine anderer weit verbreiteter Ansatz ist die Bestimmung des Minimums über die Ableitung des Spektrums. An der Stelle des Minimums muß die Ableitung Null werden und einen Vorzeichenwechsel aufweisen. Abbildung 4.13 zeigt einen Ausschnitt um das Minimum und seine Ableitung. In grau ist der Differenzenquotient dargestellt und in rot die Ableitung nach Savitzky-Golay [24]. Dieser Algorithmus approximiert den Wert eines Pixels mit Hilfe eines Polynomfits durch ein Fenster von Meßwerten. Im vorliegenden Fall ist durch Daten eines Fensters von 50 Pixeln Breite ein Polynom fünften Grades gelegt worden. Zur Orientierung sei erwähnt, daß die Breite des dargestellten spektralen Bereichs 70 nm bzw. 140 Pixel beträgt. Die gepunktete Linie bezeichnet die Nulllinie der Ableitung. Die Bestimmung des Nulldurchgangs ist nicht eindeutig möglich, selbst wenn die Daten mit einem Filter großer Fensterbreite gemittelt werden. Das Spektrum in der Region um das Minimum verläuft zu flach, so daß sich selbst kleine Unstetigkeiten stark in der Ableitung bemerkbar machen.

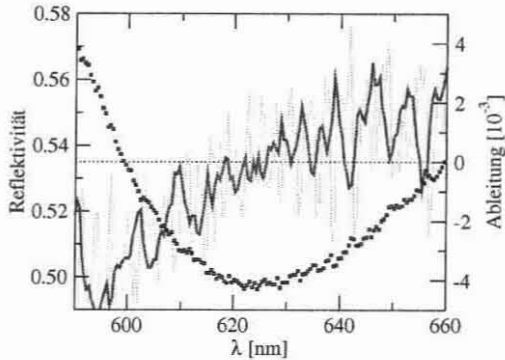


Abbildung 4.13: Suche des Reflexionsminimums mit Hilfe der Ableitung: Reflexionsspektrum (Quadrate), Differenzenquotient (hellgrau) und Ableitung nach Savitzky-Golay (dunkelgrau). Die Ableitung weist keinen definierten Null-durchgang auf.

Eine zuverlässigere Methode zur Suche des Minimums bei verrauschten Meßdaten besteht in der Approximation der Daten in einem definierten Betrachtungsfenster durch ein Polynom. Das Minimum des Polynoms ist dann identisch mit dem Minimum der Daten. Man kann dieses Verfahren iterativ anwenden und das bestimmte Minimum als Startwert für eine erneute Minimumberechnung verwenden, um eine höhere Genauigkeit zu erzielen. Im vorliegenden Fall ist aber der Startwert für das Minimum mit dem Pixel geringster Reflektivität schon so nah am Minimalwert des approximierten Polynoms, daß ein Berechnungsdurchgang genügt. Abbildung 4.14 veranschaulicht das Verfahren. Das Kreuz markiert den Pixel minimaler Reflektivität, um das rechts und links ein Fenster von 50 Pixeln gelegt wird. Das Minimum des Polynoms ist als gestrichelte Linie zu sehen. Die Genauigkeit der Minimumbestimmung dieses Verfahrens beträgt bis zu 0.1 nm, was deutlich besser ist als die spektrale Auflösung des Spektrometers.

4.3.2 Nichtlineare Regression der Hauptkomponenten

Die Reduktion eines SPR-Spektrums auf die Position des Minimums vernachlässigt zugunsten der einfachen Kalibrierung sämtliche andere Eigenschaften der Spektren, die ebenfalls für eine Kalibrierung herangezogen werden können. Abbildung 4.15 zeigt Reflexionsspektren von vier verschiedenen Brechungsindizes. Man erkennt deutlich die Verschiebung des Reflexionsminimums, aber auch einen Anstieg der absoluten Reflektivität an der Stelle

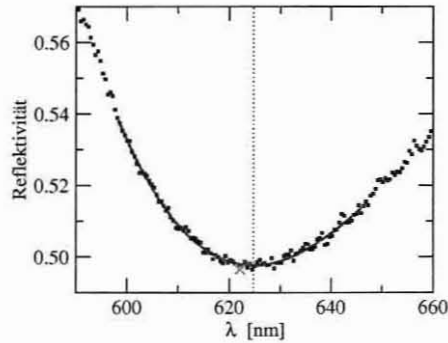


Abbildung 4.14: Approximation um den Pixel minimaler Reflektivität (graues Kreuz) mit einem Polynom dritten Grades (dunkelgraue Linie). Das Minimum der Approximation ist gestrichelt eingezeichnet.

des Minimums mit zunehmendem Brechungsindex. Trotz der höheren Reflexion an dieser Stelle ist bei 800 nm der Reflexionswert für einen hohen Brechungsindex kleiner als für einen niedrigeren, d.h. die Kurve flacht mit steigendem Brechungsindex ab. Solche Merkmale eines Spektrums können dazu dienen, die Qualität der Kalibrierung zu verbessern. Zur statistischen Analyse mehrdimensionaler Abhängigkeiten werden multivariate Methoden wie z.B. die Hauptkomponentenregression (engl.: principal component regression, kurz: PCR) angewandt. Andere Arbeiten [25] haben gezeigt, daß sich eine individuell angepaßte nicht-lineare PCR-Methode (kurz: NPCR) sehr gut zur Kalibrierung von Zusammenhängen zwischen spektralen Daten und chemischen Konzentrationen eignen. Dieses Verfahren läßt sich auch auf SPR-basierte Sensoren anwenden [26].

Für die Hauptkomponentenregression notiert man die Kalibrationsspektren als Matrix. Angenommen, es werden Spektren mit n Stellen und m unterschiedlichen Brechungsindizes erfaßt, dann läßt sich eine Meßwertmatrix \vec{A} der Form

$$\vec{A} = (a_{ij}) = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \dots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & a_{m2} & \dots & a_{mn} \end{pmatrix} \quad (4.9)$$

aufstellen, wobei a_{ij} die Reflektivität des i -ten Brechungsindex von Pixel j des Spektrometers ist. Auf diese Matrix wird die Singulärwertzerlegung

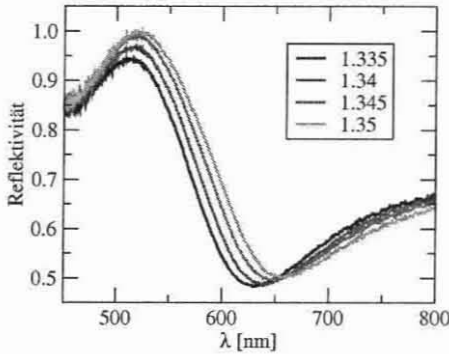


Abbildung 4.15: Reflexionsspektren von vier verschiedenen Brechungsindizes.

(engl.: singular value decomposition, kurz: SVD) angewendet, so daß

$$\underbrace{\vec{A}}_{m \times n} = \underbrace{\vec{U}}_{m \times m} \underbrace{\vec{S}}_{m \times n} \underbrace{\vec{V}^T}_{n \times n} \quad (4.10)$$

gilt. Die Matrix \vec{S} ist eine Diagonalmatrix und enthält auf ihrer Hauptdiagonalen die Singulärwerte, d.h. die positiven Wurzeln der Eigenwerte von \vec{A} . Die Spalten von \vec{U} bzw. \vec{V} sind Links- bzw. Rechtssingulärvektoren, auch Punktwerte (engl.: scores) respektive Gewichtungen (engl.: loadings) genannt. Die Matrizen \vec{U} und \vec{V} enthalten signifikante und unbedeutende Singulärvektoren in Bezug auf spektrale Änderungen durch den Meßparameter. Die unbedeutenden Vektoren beschreiben zufällige Fehlerquellen der Messung wie z.B. Rauschen des Spektrometers. Für die Kalibrierung des Sensors werden nur die ersten k Vektoren verwendet, die man als signifikant identifiziert hat, die sogenannten Hauptkomponenten. Aus diesen werden die Spalten einer Matrix der signifikanten Hauptkomponenten \vec{U}_k zusammengestellt, die über einen Regressionsvektor \vec{r} mit den Meßparametern der Kalibrationsmessungen \vec{p} in Beziehung gesetzt wird:

$$\underbrace{\vec{p}}_{m \times 1} = \underbrace{\vec{U}_k}_{m \times l} \underbrace{\vec{r}}_{l \times 1}. \quad (4.11)$$

Dieses lineare Gleichungssystem mit unbekanntem Regressionsvektor \vec{r} ist in den wenigsten Fällen analytisch lösbar, da je nach Zusammenstellung der Hauptkomponenten nicht notwendigerweise die Spaltenzahl l von \vec{U}_k gleich der Anzahl der Kalibrationspunkte sein muß, d.h. \vec{U}_k ist meist nicht quadratisch. Bei mehreren Kalibrationspunkten als Hauptkomponenten ($m > l$)

ist das Gleichungssystem überbestimmt und es kann mittels eines „Least-Squares“-Algorithmus ($\|\vec{p} - \vec{U}_k \vec{r}\| = \min$) näherungsweise gelöst werden. Im Falle eines unterbestimmten Gleichungssystems ($m < l$) existieren unendlich viele Lösungen, von denen die Lösung mit minimaler Norm ($\|\vec{r}\| = \min$) gesucht wird.

Für die Messung eines unbekanntem Meßparameters p_u muß der Vektor des Spektrums der unbekanntem Probe \vec{a}_u auf den Vektor \vec{u}_u über die Gleichung

$$\underbrace{\vec{u}_u^T}_{1 \times k} = \underbrace{\vec{a}_u}_{1 \times n} \underbrace{\vec{V}}_{n \times k} \underbrace{\vec{S}^{-1}}_{k \times k} \quad (4.12)$$

abgebildet werden. Um Rechenzeit und Speicherplatz zu sparen, werden nur die signifikanten Komponenten von \vec{u}_u berechnet, indem man \vec{V} auf die ersten k -Spalten und \vec{S}^{-1} auf die ersten k Zeilen reduziert. Anschließend erfolgt die Zusammenstellung der Spalten von \vec{u}_{uk} auf die selbe Weise wie für \vec{U}_k . Dann errechnet sich der Meßparameter aus

$$p_u = \vec{u}_{uk} \vec{r}. \quad (4.13)$$

Die Zusammenstellung der Hauptkomponenten in \vec{U}_k ist von zentraler Bedeutung bei diesem Verfahren. Zunächst muß entschieden werden, welche Komponenten signifikant sind. Einen Anhaltspunkt bieten die mit den Spaltenvektoren in \vec{U} verknüpften Singulärwerte in der Hauptdiagonalen von \vec{S} . Je größer der Singulärwert ist, desto signifikanter ist auch die zugehörige Komponente. In Abbildung 4.16 sind repräsentativ die Singulärwerte einer Meßwertmatrix mit zwölf Kalibrationsspektren dargestellt. Normiert man die Singulärwerte auf ihre Gesamtsumme, erhält man den prozentualen Anteil der Abhängigkeit, den jede mit diesem Singulärwert verknüpfte Komponente auf die Meßwertmatrix hat. In diesem Beispiel decken die ersten beiden Komponenten bereits einen Anteil von 94.7% ab. Der dritte Singulärwert hat noch einen Einfluß von 3.7%, die restlichen neun Komponenten zusammen nur noch 1.6%. Letztere können als unbedeutend klassifiziert werden. Für eine Abdeckung von 98.4% sind also drei Hauptkomponenten nötig. Sind die Hauptkomponenten identifiziert, gilt es, aus ihnen die Spalten der Kalibrationsmatrix \vec{U}_k zusammenzustellen. Das ursprüngliche PCR-Verfahren geht von einem linearen Zusammenhang zwischen \vec{U}_k und dem Meßparameter aus, so daß bei zwei Komponenten

$$\vec{U}_k = (u_1 | u_2) \quad (4.14)$$

ist. Da der Zusammenhang zwischen spektraler Änderung und Brechungsindexänderung nicht linear ist, kann man die Genauigkeit der Lösung von Gleichung 4.11 erhöhen, indem man auch höhere Ordnungen und Kreuzprodukte

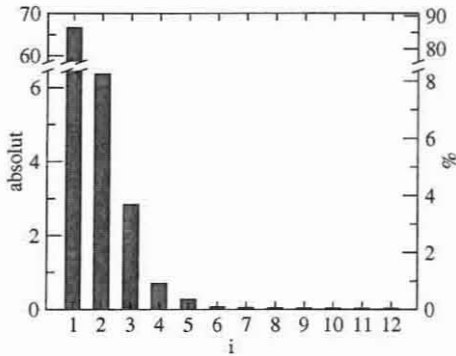


Abbildung 4.16: Singulärwerte d_i einer Meßwertmatrix und der prozentuale Anteil an ihrer Gesamtsumme.

der Spaltenvektoren berücksichtigt. Dieses Verfahren nennt sich nicht-lineare PCR (NPCR). Für zwei Komponenten und ein Polynom zweiten Grades gilt

$$\vec{U}_k = (u_1 \mid u_2 \mid u_1^2 \mid u_2^2 \mid u_1 u_2). \quad (4.15)$$

Damit ergeben sich bereits fünf Spalten. Die maximale Anzahl der Elemente N für k Hauptkomponenten und ein Polynom n -ten Grades berechnet sich aus

$$N = \sum_{i=1}^n \binom{k+i-1}{i}. \quad (4.16)$$

Jedoch wird die Kalibrierung nicht unendlich genau, je größer die Anzahl der Elemente ist. Außerdem ist es nicht möglich, eine optimal zusammengestellte Matrix zu berechnen, sondern sie muß empirisch gefunden werden. Aus N Elementen können aber $2^N - 1$ Regressionsvektoren erstellt werden, woraus sich schon bei drei Hauptkomponenten und einem Polynom dritten Grades 524287 Möglichkeiten ergeben. Ein einfaches aber effektives Verfahren zur Ermittlung der optimalen Regressionsmatrix ist das Streichen von Spalten aus \vec{U}_k , deren entsprechendes Element im berechneten Regressionsvektor einen besonders kleinen Wert hat. Mit der modifizierten Matrix wird die Genauigkeit der Kalibrierung errechnet und der Vorgang für den Vektor gestoppt, der bei jeder weiteren gestrichene Spalte zu einer signifikanten Verschlechterung des Ergebnisses führt. Jenseits dieser Methode sind durch zufälliges Probieren Kalibrierung möglich, die weit besser sind als die Genauigkeit der Testflüssigkeiten. Diese Ergebnisse sind praktisch gesehen irrelevant, weil eine Kalibrierung nie genauer sein kann als die zugrunde gelegte Referenz.

Für dieses Kalibrationsverfahren ist eine Software nötig, mit der die Kalibrierung für Sensoren ausprobiert und die Auswirkungen einer Änderung der Zusammenstellung von \vec{U}_k sofort sichtbar werden. Nur so kann eine optimale Anpassung an einen Sensor geschehen. Im folgenden Abschnitt wird auf ein selbst entwickeltes Werkzeug eingegangen, das auch sämtliche statistischen Auswertungen der Kalibrierung erleichtert.

4.3.3 Praktische Kalibrierung

Für die Durchführung der Kalibrierung von SPR-Sensoren ist eine Software nötig, mit der beide Verfahren auf Messungen angewendet werden können. Die in Borland Delphi programmierte Applikation SPRmeasure ist während der Arbeit mit SPR-Sensoren entstanden, um die Messung von Spektren direkt mit der Kalibrierung zu verbinden. Es besteht aus einem Modul zur Steuerung der Spektrometer-Hardware und einem zur Kalibrierung der gemessenen Spektren. Beide in diesem Abschnitt besprochenen Kalibrationsverfahren, Minimum-Hunt und NPCR, sind in der Software implementiert und unter einer Benutzeroberfläche zusammengefasst. Mit SPRmeasure können Spektren direkt aus einem an den PC angeschlossenen Spektrometer eingelesen oder gespeicherte Spektren geladen werden. Jedes Spektrum wird durch einen Parameter identifiziert und besitzt eines der drei Attribute „Referenz“, „Kalibrierung“ oder „Messung“. Ein Referenzspektrum bezeichnet das Spektrum, auf das alle anderen Spektren in dieser Messung normiert werden. Während jeder Kalibrierung gibt es nur ein Referenzspektrum. Hat ein Spektrum das Attribut „Kalibrierung“, muß der Parameter der Brechungsindex der gemessenen Lösung sein. Normale Messungen können beliebige Namen als Parameter haben. Ihr Brechungsindex errechnet sich mit Hilfe der gewählten Kalibrationsmethode. SPRmeasure erlaubt es, für eine Probe mehrere Messungen durchzuführen und unter einem Parameter zu speichern. Die Kalibrierung wird mit den gemittelten Daten durchgeführt und anschließend auf die einzelnen Messungen angewandt. Auf diese Weise wird der statistische Meßfehler und die Güte der Kalibrierung bestimmt.

Abbildung 4.17 zeigt das Hauptfenster von SPRmeasure nach Öffnen eines Satzes von Kalibrationsspektren. Im rechten Teil des Hauptfensters befindet sich eine Liste aller verfügbaren Spektren mit ihren Parameternamen und jeweils einem Ankreuzfeld. Dieses zeigt an, ob das entsprechende Spektrum momentan dargestellt wird und welches Attribut es hat. Das Referenzspektrum hat ein graues, gesperrtes Ankreuzfeld. Ein „c“ anstatt eines Hakens bedeutet, daß dieses Spektrum zur Kalibrierung verwendet wird. In der Statuszeile am unteren Fensterrand werden Informationen über das angeschlossene Spektrometer, wie z.B. Integrationszeit und Mittelung, angezeigt. Darüber

4.3 Kalibrierung von SPR-Sensoren

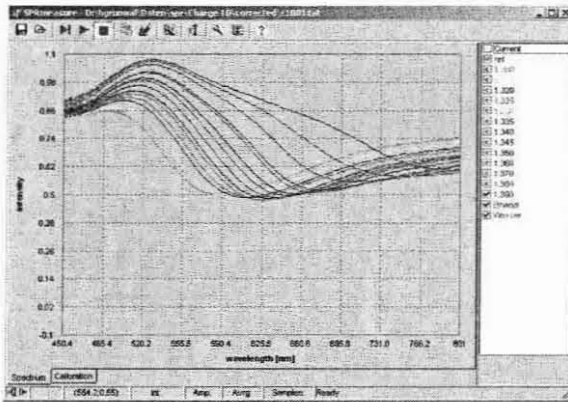


Abbildung 4.17: Benutzeroberfläche von SPRmeasure.

befinden sich zwei Registerkartenreiter mit der Aufschrift „Spectrum“ und „Calibration“. Der erste Reiter zeigt die momentan geladenen Spektren an, wohingegen bei Auswahl des „Calibration“-Reiters ein Analysefenster mit je nach Kalibrationsverfahren unterschiedlichen Parametern und Anzeigen erscheint.

In Abbildung 4.18 ist das Analysefenster für Minimum-Hunt abgebildet. In einem Textfeld unter dem Plot der Kalibrationsfunktion sind die Parameter der gefitteten Funktion und statistische Daten zu finden. Dazu gehören der Regressionskoeffizient r^2 der Eichkurve und die Standardabweichungen der Minimumbestimmung (σ_λ) und des Brechungsindex der Kalibrationspektren (σ_n). Änderungen an den Parametern für die Minimum-Hunt-Methode (Fensterbreite, Polynomgrad der Approximation und der Kalibrationsfunktion) führen zu einer sofortigen Neuberechnung der Kalibrierung, die so für jeden Sensor individuell optimiert werden kann.

Für NPCR sind die Möglichkeiten SPR-Sensoren zu kalibrieren, wie im vorherigen Abschnitt erläutert, nahezu endlos. Die Zusammenstellung des Regressionsvektors spielt hierbei eine bedeutende Rolle. Aus diesem Grund bietet SPRmeasure für die NPCR Kalibration eine Oberfläche an, unter der beliebige Vektoren zusammengestellt werden können. Das Analysefenster für NPCR ist in Abbildung 4.19 zu sehen. Gleich unterhalb der beiden Knopfleisten enthält eine Tabelle die Hauptkomponenten der Meßwertmatrix mit ihrer jeweiligen prozentualen Abdeckung. Mit der Maus kann eine beliebige Anzahl von Hauptkomponenten ausgewählt werden, für die zusammen mit der eingestellten Ordnung ein Regressionsvektor zusammengestellt wird. Die

Faseroptischer Brechungsindexsensor

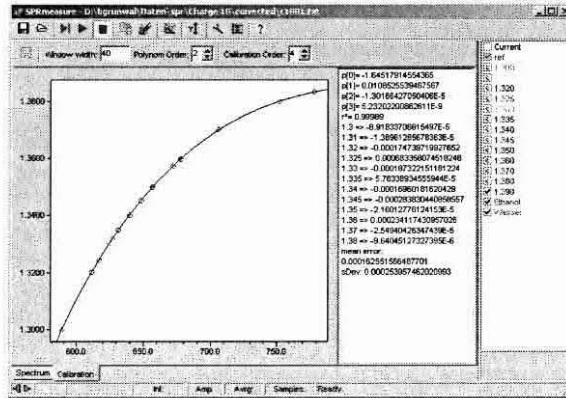


Abbildung 4.18: Analysefenster von SPRmeasure für die Kalibrierung mit der Minimum-Hunt-Methode.

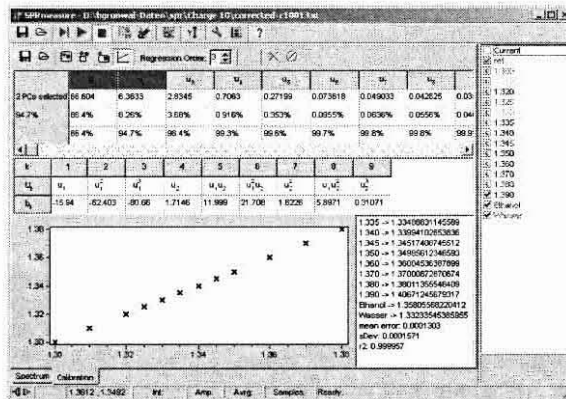


Abbildung 4.19: Kalibrierung mit NPCR.

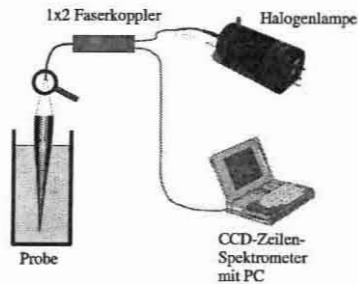


Abbildung 4.20: Meßaufbau zur Messung von Reflexionsspektren.

Elemente dieses Vektors sind unterhalb der Tabelle mit den Hauptkomponenten zu finden. Einzelne Elemente können gelöscht oder neue durch Ziehen und Ablegen einer Hauptkomponente erzeugt werden. Wenn beispielsweise das Element $u_1 u_2^2$ dem Vektor hinzugefügt werden soll, muß einmal die Hauptkomponente u_1 und zweimal u_2 auf ein freies Feld gezogen werden. Nach jeder Änderung der Zusammenstellung wird der Vektor, die Standardabweichung und der Regressionskoeffizient neu berechnet.

Mit SPRmeasure steht eine Anwendung zur Verfügung, die die Kalibration von SPR-Sensoren mit wenig mathematischen Vorkenntnisse über die jeweilige Kalibrationsmethode ermöglicht. Die Methoden sind auf wenige Parameter reduziert, deren Einfluß auf die Kalibration in Echtzeit veranschaulicht werden kann. Dadurch erschließt dieses Programm dem Anwender die Messung des Brechungsindex, der lediglich eine funktionsfähige Messung wünscht und nicht das mathematische Hintergrundwissen zur manuellen Optimierung besitzt.

4.4 Charakterisierung der Sensoren

4.4.1 Meßaufbau

Der zur Charakterisierung verwendete Meßaufbau ist in Abbildung 4.20 gezeigt und besteht aus einer Lichtquelle (Mikropack HL-2000-FHSA, Ostfildern, Deutschland), einem 1x2 Faserkoppler (CA.141.50.12.11-1, ATI Optique, Courcouronnes, Frankreich), einem Spektrometer (PMA-11, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan) und dem Fasersensor. Die Lichtquelle ist eine Wolfram-Halogenlampe mit einem faseroptischen SMA-Anschluß. Das Licht wird über den Faserkoppler in den Sensor eingekoppelt und das reflektierte Licht am Spektrometer gemessen. Das PMA-11 deckt

einen spektralen Bereich von 300 bis 800 nm ab und mißt über eine CCD-Zeile mit 1024 Pixeln. Daraus ergibt sich eine Auflösung von ca. 0.5 nm. Ein Computer steuert das Spektrometer über eine SCSI-Schnittstelle und liest die Daten aus. Mit Hilfe des Programms SPRmeasure können die Spektren unmittelbar kalibriert und gespeichert werden.

4.4.2 Empfindlichkeit

Die Charakterisierung der Empfindlichkeit erfolgte mit Hilfe von handelsüblichen Brechungsindexlösungen. Bei den Lösungen handelte es sich um Cargille Refractive Index Liquids der Serie AAA (Half Set, 10 Lösungen) mit einem Brechungsindexbereich von 1.30 bis 1.39 RIU bei 589.3 nm in 0.01 RIU Schritten und einer Genauigkeit von ± 0.0002 RIU (R.P. Cargille Laboratories Inc. USA). Ergänzt wurde der Satz um Einzellösungen der Brechungsindizes 1.325, 1.335 und 1.345 RIU des selben Herstellers, um eine möglichst genaue Kalibration im Bereich von Meerwasser (1.33 bis 1.34 RIU) zu erzielen. In jeder Lösung wurden zehn Messungen mit einer Mittelwertbildung von vier Spektren durchgeführt. Dies diente dazu, den statistischen Fehler der Kalibrationsmethoden zu ermitteln. Zwischen zwei Messungen sind Rückstände der Lösungen durch eine Reinigung in Rotisol entfernt worden. Der Mittelwert aller zehn Messungen je Brechungsindex ging in die Kalibration ein, die anschließend wieder auf jede einzelne Messung angewandt wurde. Auf diese Weise konnte man ermitteln, wie empfindlich die Kalibration gegenüber statistischen Fehlerquellen ist.

Minimum-Hunt

Die Qualität einer Kalibration mit Hilfe der Minimumsuche hängt von der Fensterbreite und dem Polynomgrad der Minimumsuche sowie dem Polynomgrad der Kalibrationsfunktion ab. Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen den Kalibrationsparametern und der erzielten Genauigkeit der Sensoren sind in Abbildung 4.21 die durchschnittlichen Regressionskoeffizienten eines Sensors abgebildet. Variiert wurde die Fensterbreite von zehn bis 200 Pixel bei einem Polynomgrad von zwei bis sechs. Die Durchschnittswerte ergeben sich aus der Minimumbestimmung von elf Spektren mit unterschiedlichem Brechungsindex. Für jedes Spektrum ist die Umgebung um den Pixel minimaler Reflexion mit unterschiedlichen Fensterbreiten und Polynomgraden approximiert worden. Aus den jeweiligen Regressionskoeffizienten berechnet sich der Durchschnitt und ihre Standardabweichung. Man erkennt deutlich, daß eine Fensterbreite von weniger als 50 Pixeln zu keiner guten Approximation der Form des Spektrums führt ($r^2 \ll 1$), wohingegen eine Fensterbreite

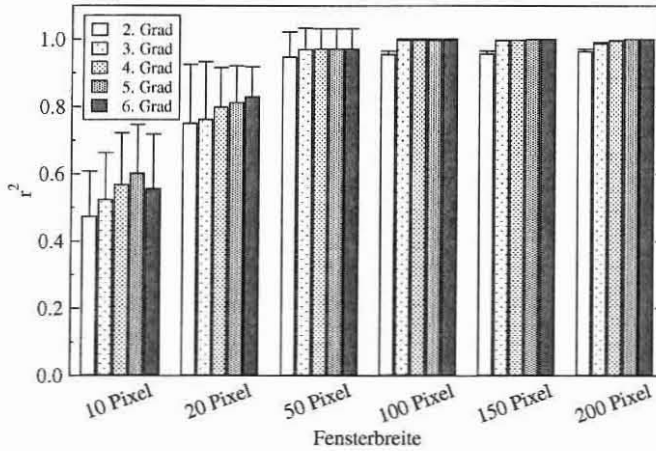


Abbildung 4.21: Durchschnittliche Regressionskoeffizienten der approximierten Polynome unterschiedlichen Grades und bei verschiedenen Fensterbreiten.

von über 150 Pixeln die Qualität nicht weiter verbessern kann. Mit zunehmender Fensterbreite nimmt die Standardabweichung ab, d.h. die Approximation zeigt keine unerwünschte Abhängigkeit vom Brechungsindex mehr. Das Diagramm zeigt auch, daß ein Polynomgrad von mehr als drei keine signifikanten Verbesserungen bewirkt. Wenn man nun von der Mindestanforderung einer Fensterbreite von 50 Pixeln und einem Polynom 3. Grades ausgeht, bleibt zu untersuchen, ob eine Obergrenze dieser Parameter existiert. Zu diesem Zweck sind für elf Brechungsindizes jeweils zehn Spektren aufgenommen und deren Minimum approximiert worden. Aus den zehn Minima pro Brechungsindex ergibt sich ein Mittelwert und eine Standardabweichung. Abbildung 4.22 zeigt den Durchschnitt dieser Standardabweichung über die vermessene Brechungsindexspanne in Abhängigkeit von der gewählten Fensterbreite und dem Polynomgrad. Aus dieser Darstellung ist erkennbar, daß mit steigender Fensterbreite auch ein höherer Polynomgrad gewählt werden muß, um eine geringere statistische Streuung in der Minimumbestimmung zu erzielen. So ist beispielsweise bei einer Fensterbreite von 200 Pixeln ein Polynom 6. Grades nötig, um die gleiche durchschnittliche Standardabweichung zu erreichen wie mit einem Polynomgrad von 4 bei einem 100 Pixel breitem Fenster, welches die niedrigste Standardabweichung zeigt. Dieses Ergebnis zeigt einen scheinbaren Widerspruch zu Abbildung 4.21. Bei breiteren Fenstern wird der Regressionskoeffizient zwar fast eins, aber andererseits nimmt

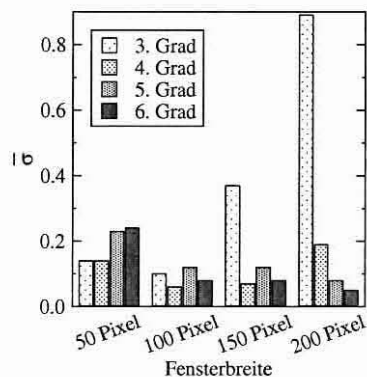
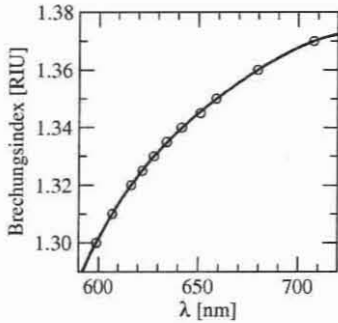


Abbildung 4.22: Durchschnittliche Standardabweichung der Minimumbestimmung von elf verschiedenen Brechungsindizes in Abhängigkeit von der Fensterbreite und dem Polynomgrad.

die Standardabweichung bei der Minimumbestimmung zu. Dieser Sachverhalt ist damit zu erklären, daß zwar das gefittete Polynom sehr gut mit den Datenpunkten korreliert, aber die Position des Minimums im Spektrum nicht erhalten bleibt. Die durch ein breiteres Fenster zusätzlich hinzugewonnene Information eignet sich nicht für die exakte Bestimmung des Minimums. Die optimale Fensterbreite variiert von Sensor zu Sensor und liegt für die verwendeten Sensoren in der Größenordnung von 104 ± 65 Pixeln. In keinem Fall bringt ein Polynom von mehr als vierter Ordnung eine Ergebnisverbesserung.

Nachdem die Minima ausreichend genau bestimmt sind, müssen sie über eine Kalibrationsfunktion ins Verhältnis zum jeweiligen Brechungsindex gebracht werden. Für einen Sensor sind in Abbildung 4.23 exemplarisch die Wellenlängen der minimalen Reflexion und ein gefittetes Polynom 4. Grades dargestellt. In der Tabelle sind die statistischen Eckdaten für unterschiedliche Polynomgrade zusammengefaßt. Der Regressionskoeffizient zeigt ab einem Polynomgrad von vier keine signifikante Verbesserung des Fits. Mit einer solchen Kalibrationsfunktion kann der Brechungsindex mit einer Standardabweichung von bis zu $\sigma = 1.7 \cdot 10^{-4}$ nm bestimmt werden. Bei höheren Polynomgraden besteht auch die Gefahr, daß die Kalibrationsfunktion in den Randbereichen stark ausreißt und somit den Meßbereich für diese Funktion einschränkt. In der Praxis hat sich ein Polynom vierten Grades als optimal erwiesen.

Die Ergebnisse der Kalibration mit Hilfe der Minimumsuche für die einzelnen Sensoren sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Ein standardisiertes



Polynom-grad	r^2	$\sigma \cdot 10^4$
2	0.99816	9.0
3	0.99978	3.1
4	0.99990	2.0
5	0.99992	1.9
6	0.99992	1.9

Abbildung 4.23: Links: Minima eines Sensors bestimmt mit einer Fensterbreite von 100 Pixel und einem Polynom 4. Grades sowie ein Polynomfit 4. Grades. Rechts: Regressionskoeffizient r^2 und Standardabweichung σ für Kalibrationskurven mit unterschiedlichem Polynomgrad.

und ein optimiertes Verfahren sind hier gegenübergestellt. Das Standardverfahren beruht auf einer Approximation des Minimums mit Hilfe eines 100 Pixel breiten Fensters und einem Polynom dritten Grades. In der optimierten Version wurde zunächst mit einer Fensterbreite von 10 Pixel und einer quadratischen Funktion die Standardabweichung berechnet und anschließend das Fenster in Schritten zu 10 Pixel solange verbreitert, bis sich die Standardabweichung nicht weiter verringerte. In einem nächsten Schritt wurde der Polynomgrad um eins erhöht und wieder die Fensterbreite variiert, um eine noch geringere Standardabweichung zu erzielen. Bei einem Polynomgrad von fünf wurde der Vorgang abgebrochen und die Parameterkombination mit der geringsten Standardabweichung als optimal bewertet. Das optimierte Verfahren zeigt einen durchweg höheren Regressionskoeffizienten und eine geringere Standardabweichung. Die erzielte Verbesserung schwankt stark zwischen den Sensoren und ist mit Ausnahme von den Sensoren 2 und 10 signifikant.

NPCR

Für die Kalibration mit NPCR ist vor allem die Zusammenstellung des Regressionsvektors von Bedeutung. Die maximale Anzahl der Elemente dieses Vektors wird durch die Anzahl der Hauptkomponenten und der gewählte Polynomgrad nach Gleichung 4.16 bestimmt. Beliebig viele Elemente können aus diesem Vektor gestrichen werden, um einerseits die Anzahl der Kalibrationsparameter zu reduzieren und andererseits die Genauigkeit zu erhöhen. Um den Einfluß des Regressionsvektors auf die Güte der Kalibration deutlich

Tabelle 4.1: Regressionskoeffizient der Kalibrationsfunktion und Standardabweichung der Brechungsindexbestimmung für zehn Sensoren mit einer standardisierten Minimumsuche (100 Pixel Fensterbreite, Polynom 3. Grades) und mit optimierten Parametern.

Sensor	standard		optimiert			
	r^2	$\sigma \cdot 10^4$	Fensterbreite	Polynomgrad	r^2	$\sigma \cdot 10^4$
1	0.99985	2.9	40	2	0.99995	1.7
2	0.99990	2.1	110	4	0.99991	2.0
3	0.99972	4.0	50	2	0.99986	2.8
4	0.99962	3.6	120	3	0.99977	2.8
5	0.99957	4.4	40	2	0.99967	3.8
6	0.99943	5.0	160	4	0.99966	3.8
7	0.99976	3.3	120	4	0.99984	2.7
8	0.99961	3.7	70	3	0.99971	3.2
9	0.99910	7.1	250	4	0.99951	5.3
10	0.99980	2.9	90	3	0.99982	2.8

zu machen, sind die Sensoren mit jeweils einem vollständigen Vektor und einem optimierten Vektor kalibriert und ihre Ergebnisse miteinander verglichen worden.

Es wurde bereits erläutert, daß nicht mehr als drei Hauptkomponenten nötig sind, um eine Abdeckung von über 98% zu erzielen. Für den hier betrachteten Satz von zehn Sensoren hat die erste Hauptkomponente eine durchschnittliche Abdeckung von $88.9 \pm 2.4\%$, die ersten beiden von $96.1 \pm 1.1\%$ und die ersten drei von $98.9 \pm 0.4\%$. Der optimale Regressionsgrad wurde mit drei ermittelt und ergab sich daraus, daß ein höherer Grad zwar die Anzahl der Elemente des Regressionvektors erhöht, diese aber keinen positiven Einfluß auf die Genauigkeit haben, d.h. für eine bestimmte Anzahl an Hauptkomponenten existiert ein maximaler, sinnvoller Polynomgrad. Wählt man nun zwei oder drei Hauptkomponenten aus, ergeben sich Regressionsvektoren mit 9 oder 19 Elementen. Der Vektor aus zwei Hauptkomponenten ist nicht weiter optimiert worden und stellt die Standardmethode dar. Zum Vergleich ist ein Vektor aus drei Hauptkomponenten erstellt und optimiert worden.

Zwei verschiedene Vorgehensweisen sind bei der Optimierung verfolgt worden: zum einen wurden ausgehend vom 9 Elemente großen Vektor der Regression zweiten Grades jedes der zehn zusätzlichen Elemente eines Regressionsvektors dritten Grades einzeln hinzugefügt und die Standardabweichung neu berechnet. Alle Elemente, die die Standardabweichung der Kalibration

Tabelle 4.2: Regressionskoeffizient der Kalibrationsfunktion und Standardabweichung der Brechungsindexbestimmung für zehn Sensoren kalibriert mit NPCR. N gibt die Zahl der Elemente des Regressionsvektors an. In Spalte „standard“ ist $N = 9$ für alle Sensoren.

Sensor	standard		N	optimiert	
	r^2	$\sigma \cdot 10^4$		r^2	$\sigma \cdot 10^4$
1	0.99996	1.6	10	0.99999	0.7
2	0.99994	1.6	9	0.99995	1.4
3	0.99984	3.0	9	0.99995	1.7
4	0.99972	3.1	14	0.99998	0.8
5	0.99993	1.7	10	0.99998	0.9
6	0.99991	2.0	10	0.99999	0.7
7	0.99993	1.7	11	0.99999	0.8
8	0.99921	5.2	10	0.99994	1.5
9	0.99992	2.2	10	0.99998	1.1
10	0.99993	1.7	10	0.99998	1.0

reduziert haben, wurden anschließend dem Ausgangsvektor angehängt. Nun sind wieder nach und nach die Elemente mit dem kleinsten Wert aus dem Vektor gestrichen worden, bis sich die Standardabweichung signifikant erhöht. In der zweiten Methode wird von dem 19-zeiligen Regressionsvektor dritten Grades ausgegangen und wieder solange die niedrigwertigen Elemente gestrichen, bis sich die Standardabweichung nicht weiter minimieren läßt. Der bessere der beiden so erzielten Vektoren ist dann der Kalibrationsvektor.

Die erzielten Ergebnisse in Form von Standardabweichung und Regressionskoeffizient für zehn Sensoren sind in Tabelle 4.2 zusammengefaßt. Die Daten der nicht optimierten Regressionsmatrix mit zwei Hauptkomponenten sind in der Spalte „standard“ zu finden. Die Spalte „optimiert“ enthält die Daten für die manuell optimierte Matrix mit drei Hauptkomponenten. Es ist deutlich zu erkennen, daß eine Optimierung der Kalibration mit NPCR die Standardabweichung der Brechungsindexbestimmung durchweg unter die Genauigkeit der Kalibrationsflüssigkeiten bringen kann. Aber auch die standardisierte Kalibration weist mit Ausnahme der Sensoren 3, 4 und 8 eine gute Genauigkeit auf.

Schlußfolgerung

Die Ergebnisse der Kalibration für die einzelnen Sensoren sind in Abbildung 4.24 zusammengefaßt. Durchschnittswerte für die betrachteten Sensoren zeigt Abbildung 4.25. In allen Fällen erzielt die optimierte NPCR-

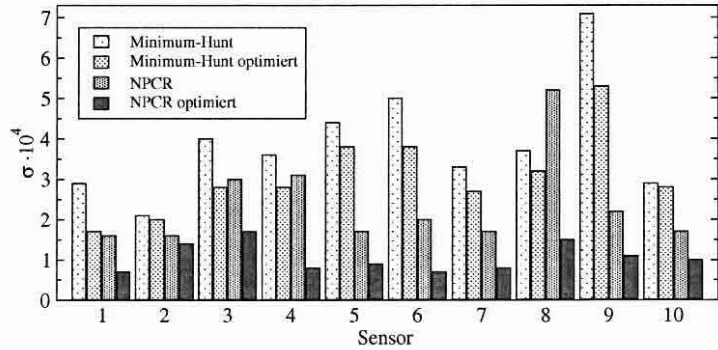


Abbildung 4.24: Standardabweichung der Brechungsindexbestimmung σ für alle betrachteten Sensoren.

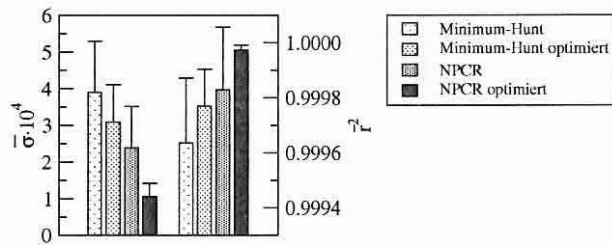


Abbildung 4.25: Durchschnittliche Standardabweichung der Brechungsindexbestimmung $\bar{\sigma}$ und durchschnittlicher Regressionskoeffizient der Kalibrationsfunktion \bar{r}^2 mit verschiedenen Kalibrationsmethoden.

Methode die geringste Standardabweichung und die geringste Streuung über alle Sensoren. Bis auf die Sensoren 3, 4 und 8 kann standardisiertes NPCR ein besseres Ergebnis erreichen als eine Kalibration mit optimierter Minimumsuche. Eine optimierte NPCR-Kalibration erreicht im Vergleich zu einer nicht optimierten Minimumsuche eine um den Faktor 1.5 bis 7 geringere Standardabweichung. Im Durchschnitt liegt der Faktor bei 4.

Der Aufwand, eine NPCR-Kalibration manuell zu optimieren, ist deutlich höher als für die Minimumsuche. Allerdings lassen sich diese Optimierungen gut als Algorithmus formulieren und sind somit auch in die Software SPRmeasure integrierbar. Im Vergleich zur Minimumsuche sind mit NPCR für kalibrierte Messungen von unbekanntem Proben sehr viel mehr Daten nötig. Ein Satz Kalibrationsdaten besteht bei NPCR aus dem Matrixprodukt

$\vec{V}\vec{S}^{-1}$ mit $n \times k$ Elementen, dem Regressionsvektor mit l Elementen und der Vorschrift für die Zusammenstellung von \vec{U}_k . Eine mit der Minimumsuche kalibrierte Messung benötigt lediglich die Parameter der Eichkurve.

4.4.3 Ortsauflösung

Die Ortsauflösung der Sensoren, die direkt nach dem Tapervorgang mit der sensitiven Goldschicht beschichtet werden, wird maßgeblich durch die Länge des entfernten Fasermantels bestimmt. In der Regel kann diese Länge bis zu 5 mm betragen. Für eine Ortsauflösung unterhalb eines Millimeters ist deshalb eine Maskierung unerlässlich. Das verwendete Maskierungsverfahren mit einer Teflonschicht ist bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben worden. Die Charakterisierung der Ortsauflösung wurde experimentell mit drei unterschiedlichen Konfigurationen an einem geschichteten System durchgeführt.

Die Erzeugung einer Meßprobe mit definierten Grenzflächen zweier Stoffe unterschiedlichen Brechungsindex, die zudem die Metallbeschichtung nicht oder nur minimal beansprucht, gestaltete sich als schwierig. Eine präzise Charakterisierung ist nur möglich, wenn der Unterschied der beiden Stoffe im Brechungsindex und damit auch das Signal/Rauschverhältnis an der Grenzfläche ausreichend hoch ist. Dennoch darf der höhere Brechungsindex nicht den Meßbereich des Sensors überschreiten. Dieser Wert liegt zwischen 1.37 und 1.39 RIU, weshalb ein Öl/Wasser System wegen des zu hohen Brechungsindex fast aller Öle und Fette ($n > 1.4$ RIU) ungeeignet ist. In ersten Versuchen ergaben Schichten aus Gemischen von Agar und Wasser unterschiedlicher Salinität wenig zufriedenstellende Ergebnisse, obwohl die mechanischen Eigenschaften hervorragend waren. Diffusion zwischen den beiden Schichten machte jedoch eine klare Trennung der Grenzschicht unmöglich.

Die Wahl fiel letztendlich auf ein System aus Percoll und Wasser mit 0.9% Salinität eingedickt in Agar. Abbildung 4.26 zeigt den Sensor im Percoll/Agar Schichtsystem. Percoll wird in der Biotechnologie zur Zelltrennung verwendet und ist ein mineralisches Material mit sehr geringem osmotischem Druck und geringer Ionenkonzentration. Die Dichte, und einhergehend damit auch der Brechungsindex, kann durch Zentrifugieren kontrolliert erhöht werden. Der Brechungsindex von handelsüblichem Percoll (Sigma-Aldrich, München) beträgt 1.354 RIU und liegt damit deutlich über dem vom Wasser/Agar Gemisch mit 1.335 RIU.

Das Agar wurde in viereckige Küvetten gefüllt und im Kühlschrank ausgehärtet. Der zu charakterisierende Sensor wurde senkrecht nach unten an einem Mikromanipulator befestigt und wenige Millimeter in die Agar-Schicht eingeführt. Wenn das thermodynamische Gleichgewicht erreicht war, wurde Percoll auf das Agar gegeben. Nun wurde der Sensor in Schritten von 100 μm

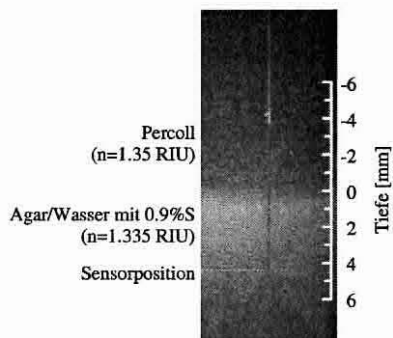


Abbildung 4.26: Sensor in einem Percoll/Agar-Schichtsystem.

herausgezogen und an jeder Position zehn Reflexionsspektren aufgenommen. Dieser Messung wurde für drei unterschiedlich konfigurierte Sensoren durchgeführt. Der erste Sensor war ein unmaskierter Sensor, der über seine ganze Taperlänge mit Gold beschichtet wurde. In einem zweiten Schritt wurde derselbe Sensor mit Teflon AF beschichtet und das Profil wiederholt. Ein drittes Profil mit einem Sensor, dessen Spitze vor der Goldbeschichtung maskiert wurde, schließt die Charakterisierung ab. Abbildung 4.27 zeigt die Profile der drei Maskierungskonfigurationen.

Der unmaskierte Sensor zeigt eine Minimumverschiebung von 586.6 nm in Agar auf 602.8 nm in Percoll. Die Tiefe, über die 10 und 90 % der Verschiebung des Minimums um 16.2 nm geschieht, beträgt 2.5 mm, d.h. ein abrupter Übergang zweier Medien unterschiedlichen Brechungsindexes kann mit einer Genauigkeit von 2.5 mm gemessen werden. Die Standardabweichung der Minimumbestimmung beträgt im Mittel 0.12 nm. Wenn nun eine Maskierung auf die Spitze gebracht und damit die aktive Länge auf etwa 500 μm reduziert wird, verschiebt sich das Minimum in Richtung größerer Wellenlängen, wie im zweiten Profil zu erkennen. Die Ortsauflösung verbessert sich auf ca. 1.6 mm. Allerdings wird der Unterschied des Reflexionsminimums zwischen Agar und Percoll stark reduziert, d.h. die Dynamik des Sensors wird durch die Maskierung vermindert. Deutlich wird dies auch durch die größere durchschnittliche Standardabweichung der Minimumbestimmung von 0.31 nm. Den Einfluß der Maskierung auf das Reflexionsspektrum verdeutlicht der rechte Graph in Abbildung 4.27, in dem das Reflexionsspektren in Agar jeweils eines Sensors dargestellt ist. Durch Aufbringen der Maskierung auf das Gold flacht das Spektrum gerade in der Region um das Minimum extrem ab, so daß die Minimumbestimmung weniger genau wird.

4.4 Charakterisierung der Sensoren

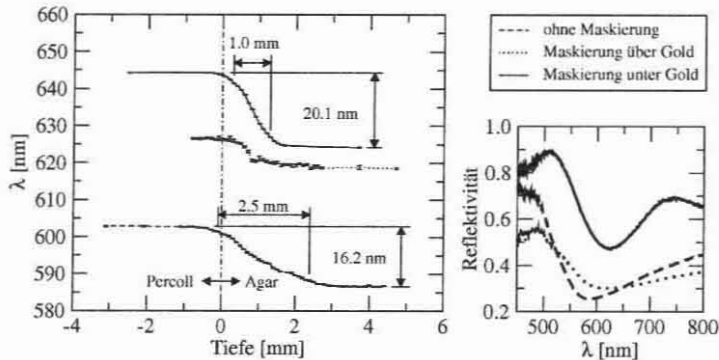


Abbildung 4.27: Einfluß der Maskierung auf die Ortsauflösung: Profile des Reflexionsminimums in einem Schichtsystem aus Percoll und Agar mit 0.9% Salinität (links) und Reflexionsspektren in Agar (rechts) gemessen mit Sensoren ohne Maskierung, einer Maskierung über der Goldbeschichtung und einer vor der Goldbeschichtung maskierten Spitze.

Bei der Spitze des Sensors, mit dem das dritte Profil aufgenommen wurde, handelt es sich um eine vor der Metallbeschichtung maskierte Faserspitze. Zwischen Agar und Percoll verschiebt sich das Minimum um 20.1 nm. Die Breite von 10 bis 90% dieser Verschiebung beträgt 1 mm. Die durchschnittliche Standardabweichung der Minimumbestimmung beträgt 0.05 nm. Bei der Herstellung ist der Taper über eine Länge von ca. 800 μm mit Gold beschichtet worden. Während der Messung wurde beobachtet, daß sich das Minimum mit der Zeit auch dann verschiebt, wenn der Sensor knapp unter der Grenzfläche positioniert wurde. Dies ist auf zwei Effekte zurückzuführen: zum einen hat das Licht der Halogenlampe bei Dauerbeleuchtung an der Faserspitze das Agar verflüssigt und zum anderen schien das Percoll die Agarschicht mit der Zeit aufzuweichen. Beide Ursachen zeigen, daß es sich bei der gemessenen Ortsauflösung um eine obere Grenze handelt. Auch wenn das Ziel einer Ortsauflösung in der Größenordnung von 100 μm bisher nicht erreicht wurde, zeigt dieser Versuch, daß der Sensor dieses Potential besitzt.

4.4.4 Mechanische Stabilität

Die Kenntnis des lokalen Brechungsindex in einer Sedimentprobe ist nötig, um ein Modell für die Lichtausbreitung im Meeresboden zu erstellen. In früheren Arbeiten sind bereits Messungen der skalaren Beleuchtungsichte in Sedimenten durchgeführt worden, die eine heterogene Verteilung über Tiefe

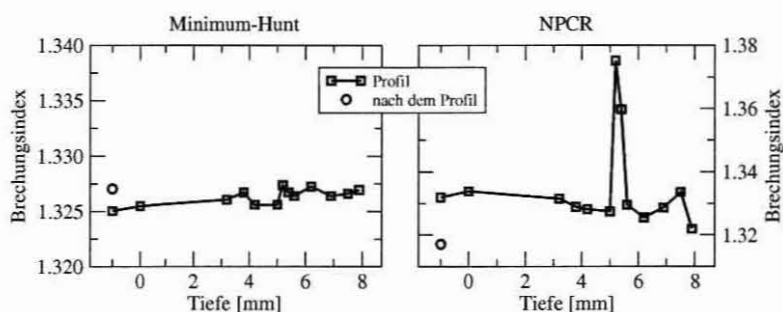


Abbildung 4.28: Brechungsindexprofil einer Sedimentprobe der Lagune von Heron Island, Great Barrier Reef, Australien. Es handelt sich um dasselbe Profil kalibriert mit Minimum-Hunt (links) und NPCR (rechts).

und Fläche des Sediments ergab. Dennoch wurde vielfach für modellhafte Berechnungen der Brechungsindex als konstant angenommen. Der Grund für die ungleichmäßige Verteilung kann unterschiedliche Ursachen haben. Bei konstantem Brechungsindex bestimmen Absorption und Transmission des Sonnenlichts durch Sand, Bakterien und organisches Material die Lichtverteilung. Sind jedoch lokale Brechungsindexänderungen zu beobachten, kann dies auf unterschiedliche Nährstoffkonzentrationen oder Salinitäten in der Meßumgebung hinweisen, die eine Mikroumgebung für Lebewesen schafft bzw. von ihnen erzeugt wird.

Der Versuchsaufbau besteht aus einer Flußkammer, die eine Sedimentprobe enthält und mit einer Halogenlampe als künstliches Sonnenlicht kontrolliert beleuchtet werden kann. Ein Aquarium enthält einen Wasservorrat vom Probenort, der über eine Pumpe als definierter, konstanter Wasserstrom über die Probe fließt, um natürliche Strömungsbedingungen zu simulieren. Das mit dem Brechungsindexsensor aufgenommene Profil zeigt Abbildung 4.28. Hierbei handelt es sich um dasselbe gemessene Profil, das mit Minimum-Hunt und NPCR kalibriert wurde. Zusätzlich ist als Kreis der Brechungsindex dargestellt, der nach der Profilnahme im Überstandswasser des Sediments gemessen wurde. Dieser sollte idealerweise identisch sein mit dem Startwert der Messung. Es ist zu erkennen, daß sich der Wert bei der Kalibration mit Minimum-Hunt nach oben verschoben hat, wohingegen eine NPCR-Kalibration desselben Profils eine Verschiebung zu einem kleineren Brechungsindex hin ergibt, d.h. die Profilnahme sorgt bereits für ein Sensorsignal, das nicht mit dem Brechungsindex der Probe zusammenhängt. Eine Minimumverschiebung eines Reflexionsspektrums hin zu größeren Wel-

lenlängen kann entweder durch einen steigenden Brechungsindex oder durch eine dünnere Metallbeschichtung erreicht werden. Da der Sensor nach der Profilnahme sorgfältig gereinigt wurde, sind Ablagerungen, die den gemessenen Brechungsindex verändern, auszuschließen. Demnach ist die Goldbeschichtung durch das Sediment beschädigt worden, was unter dem Mikroskop als Kratzer auf der Sensorspitze erkennbar war. Der Fehler, der durch die veränderte Goldschicht bei der Brechungsindexbestimmung gemacht wird, ist bei Kalibration mit NPCR sehr viel größer als bei Verwendung der Minimum-Hunt-Methode und verändert den Meßwert auch in gegensätzliche Richtungen. Minimum-Hunt erzeugt eine Abweichung von ca. 0.0025 RIU nach der Profilmessung. Der mit NPCR bestimmte Brechungsindex liegt mehr als 0.01 RIU unter dem Startwert.

Im Profil der mit NPCR kalibrierten Werte ist außerdem deutlich eine Spitze bei 5.25 mm zu erkennen. An dieser Position ist schon bei der Messung erkennbar gewesen, daß der Sensor offensichtlich auf ein Hindernis gestoßen ist, das nicht ohne weiteres durchstoßen werden kann. Während des Vorfahren verbog sich die Faser außerhalb des Sediments. Diese Spannung löste sich während der nächsten Meßschritte. NPCR zeigte sich gegenüber solcher nicht kalibrierbaren Einflüsse äußerst empfindlich. Zwar weist auch die Messung mit Minimum-Hunt an derselben Stelle ein lokales Maximum auf, was sich jedoch nicht signifikant von der Verschiebung durch das Abtragen der Goldschicht abweicht.

4.5 Anwendung

Nachdem der Brechungsindexsensor während der Charakterisierung seine hohe Empfindlichkeit und gute Ortsauflösung gezeigt hat, wurde er in Anwendungen der marinen Mikrobiologie eingesetzt. In einem Versuch wurde ein Profil durch eine Ascidie der Art *Diplosoma virens* aufgenommen. Der Versuch ist auf der Forschungsstation Heron Island im Great Barrier Reef der University of Queensland, Brisbane, Australien in Zusammenarbeit mit Meeresbiologen durchgeführt worden.

Ascidien beherbergen Kolonien von Wirtszellen und entsprechenden Symbionten, häufig photogene Bakterien oder Algen. Diese Symbionten versorgen ihren Wirt mit Kohlenstoffverbindungen, die die Ascidie nicht selbst produzieren oder aufnehmen kann. Im Gegenzug schafft sie eine förderliche Umgebung für die Symbionten und verteidigt sie vor Feinden. Die Art *Diplosoma virens* kann beispielsweise Schwefelsäure ausscheiden, wenn sie unter Streß steht. Die genaue Zusammensetzung des Gewebes, der Kohlenstoffzyklus und das Photosystem dieser Kolonien sind bis heute nicht gänzlich bekannt. Ein

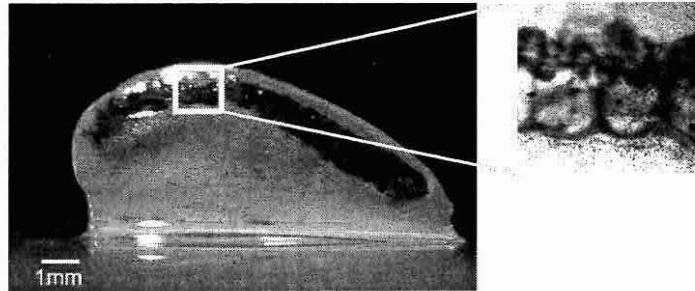


Abbildung 4.29: Scidie *Diplosoma virens* mit Symbionten *Prochloron* sp. und *Acariochloris* sp.

guter Überblick über das Zusammenspiel zwischen Wirt und Symbiont für die hier betrachtete *Diplosoma virens* und andere Scidien, die *Prochloron* beherbergen, ist bei Kühl et al. [27] zu finden.

Diplosoma virens beherbergt Symbionten der Arten *Prochloron* sp. und *Acariochloris* sp.. *Prochloron* sind oxygene, phototrophe Prokaryoten. Abbildung 4.29 zeigt eine solche Scidie. Diese Symbionten befinden sich im äußeren Gewebe etwa ein bis zwei Millimeter unter der Oberfläche der Scidie und versorgen die Kolonie mit Nährstoffen, die sie mittels Photosynthese gewinnen. Das Gewebe fungiert als Filter gegen UV-Licht mittels MAAs (mycosporine-like amino acids), Aminosäuren, die eine starke Absorption im UV-Bereich haben [28]. Im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm hingegen trägt die Dämpfung des Lichts nur ein Achtel bis ein Viertel der Dämpfung im UV-Bereich. Messungen der skalaren Lichtstärke mit Mikrosensoren im Gewebe der Scidie ergaben ein Maximum genau dort, wo sich die Symbionten befinden. Dieses offensichtliche Einfangen von Licht in der Umgebung der Symbionten läßt auf ein Maximum eines Gradienten des Brechungsindex schließen. Bisher war es jedoch nicht möglich, den Brechungsindex *in situ* mit entsprechender Ortsauflösung zu messen.

Mit dem faseroptischen Brechungsindexsensor sind Profile im äußeren Gewebe einer Scidie gemessen worden. Hierfür wurde die Scidie in einer Petrischale fixiert und der an einem Mikromanipulator befestigten Sensor in das Gewebe eingestochen. Anschließend wurde er in 100 μm Schritten herausgezogen und das Reflexionsminimum bestimmt. Abbildung 4.30 zeigt den Versuchsaufbau. Ein typisches Profil ist in Abbildung 4.31 dargestellt. Das Einstecken des Sensors in die Scidie gestaltet sich recht schwierig, da das Gewebe sehr fest ist. Dabei verbiegt sich die Faserspitze und es wird durch

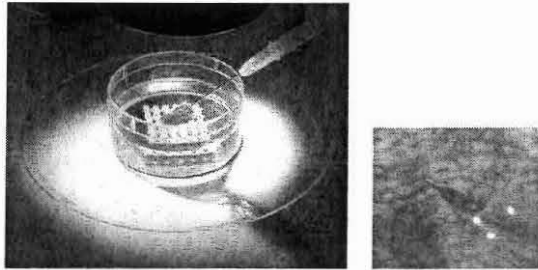


Abbildung 4.30: Versuchsaufbau zur Messung des Brechungsindex im äußeren Gewebe einer Ascidie. Rechts ist der Sensor in einer Kanüle vergrößert dargestellt.

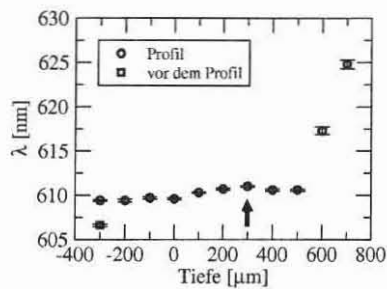


Abbildung 4.31: Profil des Reflexionsminimums im äußeren Gewebe einer Ascidie. Der Pfeil markiert die Stelle des maximalen Brechungsindex. Die beiden Meßpunkte bei 600 und 700 μm sind Artefakte durch mechanischen Streß, der auf den Fasersensor ausgeübt wird.

die veränderten Reflexionsbedingungen Licht ausgekoppelt. Bei der Messung ist ein Absinken der Signalintensität und ein starkes Abflachen des SPR-Minimums zu beobachten. Die Bestimmung des Reflexionsminimums weist bei diesem Effekt eine etwa fünfmal größere Standardabweichung auf als ohne mechanischen Streß, so daß sich die Genauigkeit der Messung stark reduziert. Außerdem verschiebt sich das Minimum zu größeren Wellenlängen, so daß ein Meßsignal erzeugt wird, das nicht auf einen veränderten Brechungsindex zurückzuführen ist. Aufgrund dieses Effektes wurde der Sensor nicht kalibriert betrieben, sondern das Reflexionsminimum aufgenommen. An der Form des Spektrums kann festgestellt werden, ob der Sensor unter mechanischem Streß steht. Vor der Profilnahme wurde ein Meßpunkt im umgebenen

Wasser aufgenommen, der in Abbildung 4.31 als Quadrat eingezeichnet ist. Es ist deutlich erkennbar, daß die Messung die Position des Minimums zu größeren Wellenlängen hin verschoben hat. In $600\ \mu\text{m}$ Tiefe konnte der Sensor nicht weiter in die Ascidie eingebracht werden, was an einer starken Verbiegung der Glasfaser und einem dadurch verursachten Anstieg der SPR-Wellenlänge und der Standardabweichung im Profil erkennbar ist. Während des Herausziehens des Sensors aus der Ascidie entspannte sich die Faser schnell und die Form des Spektrums normalisierte sich wieder, so daß ab einer Tiefe von $500\ \mu\text{m}$ auswertbare Ergebnisse vorliegen.

Der maximale Brechungsindex wurde in einer Tiefe von $300\ \mu\text{m}$ gemessen. Das Reflexionsminimum liegt dort bei $611 \pm 0.1\ \text{nm}$ im Vergleich zu $606.6 \pm 0.14\ \text{nm}$ in Meerwasser vor der Messung und $609.4 \pm 0.16\ \text{nm}$ nach der Messung. Die Minimumverschiebung, verursacht durch den Abrieb der Goldschicht, beträgt somit $2.8\ \text{nm}$. Die Verschiebung zwischen Meerwasser und der Stelle des maximalen Brechungsindex beträgt $1.6\ \text{nm}$, was einer Änderung des Brechungsindex von mindestens $+0.001\ \text{RIU}$ gegenüber Meerwasser entspricht. Gesetzt den Fall, daß das Minimum auch während des Herausziehens durch Abrieb an der Faserspitze verschoben wird, wäre der maximale Brechungsindex im Ascidiengewebe noch größer. In jedem Fall genügt die gemessene Differenz zwischen dem Brechungsindex des umgebenen Meerwassers und dem Innern des Ascidiengewebes, um das einmal eingekoppelte Licht innerhalb der Ascidie zu halten und somit eine lichtleitende Wirkung zu haben.

Kapitel 5

Konzept eines bildgebenden SPR Systems

Der faseroptische Brechungsindexsensor konnte seine Funktionsfähigkeit und Ortsauflösung in der Profilmessung im äußeren Gewebe einer Ascidie unter Beweis stellen. Jedoch bleibt der Nachteil einer Punktmessung, daß mehrere gleichzeitige Messungen an unterschiedlichen Orten nur mit mehreren Sensoren möglich sind. Als Lösung für die zweidimensionale Messung kommen bildgebende Verfahren wie das SPR Imaging in Frage. Das Funktionsprinzip ist bereits in Kapitel 3.3 erläutert worden. In diesem Kapitel wird das Konzept eines solchen SPR Imaging Systems, das für die Anwendung in der marinen Mikrobiologie entwickelt worden ist, näher erläutert.

5.1 Struktur des Meßsystems

Die Wahl der Lichtquelle für die Anregung fiel auf eine Weißlichtquelle. Eine Laserlichtquelle kommt trotz der höheren Empfindlichkeit gegenüber des Brechungsindex wegen der Streifenbildung auf den Aufnahmen nicht in Frage. Für erste Versuche soll eine Halogenkaltlichtlampe KL-2500 (Schott GmbH, Mainz) eingesetzt werden. Das Sensorelement besteht aus einem unbeschichteten, rechtwinkligen BK7-Glasprisma (W32-527, Edmund Industrie Optik GmbH, Karlsruhe), auf das mit Immersionsöl zur Anpassung des Brechungsindex ein beschichteter Objektträger befestigt wird. Dieser ist mit 2 nm Chrom als Haftvermittlerschicht zwischen Objektträger und einer 50 nm Goldbeschichtung versehen. Die zu messende Probe wird auf den beschichteten Objektträger aufgebracht. Zur Untersuchung von marinen Organismen ist es nötig, eine Flußkammer zur Erzeugung definierter Umgebungsbedingungen mit dem Objektträger zu verbinden. Es ist auch denkbar, mikrobielle

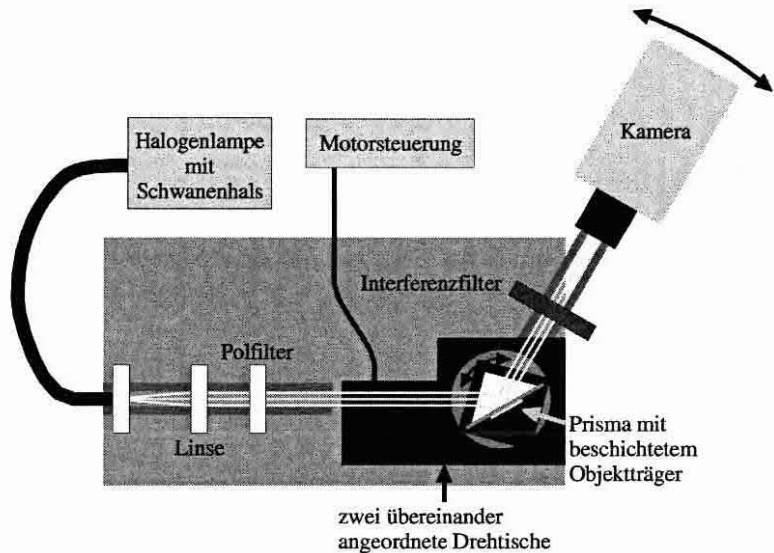


Abbildung 5.1: Aufbau eines SPR Imaging Systems basierend auf der Anregung mit einer Weißlichtquelle. Erläuterungen siehe Text.

Matten direkt auf dem Objektträger aufwachsen zu lassen, um den Wachstumsprozeß der Matten unter verschiedenen Bedingungen zu beobachten. Als Detektor dient die CCD-Kamera „sensicam sensimod“ (PCO Computer Optics GmbH, Kelheim). Zusätzliche Komponenten sind eine Kollimationsoptik sowie ein Polarisationsfilter für die Lichtquelle und ein Interferenzfilter vor der Kamera. Falls die Messung nicht in Dunkelheit durchgeführt werden kann, ist zur Minimierung des Einflusses von Umgebungslicht ein zusätzlicher Polarisationsfilter vor der Kamera erforderlich.

Die Anordnung von Lichtquelle, Prisma und Kamera ist in Abbildung 5.1 gezeigt. Das System basiert auf zwei Drehtischen (DT-80, Micos, Umkirch) und einem optomechanischen Schienensystem („moskito“, ebenfalls Micos). Auf einer Grundplatte sind die beiden Drehtische genau übereinander angeordnet. Auf dem unteren wird eine Schiene befestigt, die verschiebbare Reiter aufnehmen kann, so daß ein Interferenzfilter und die Kamera in einer optischen Achse liegen. Das Prisma wird auf einem Verschiebetisch, der sich lateral in zwei Achsen um ± 2.5 mm justieren läßt, auf dem oberen Drehtisch befestigt. An dem Prisma wird der goldbeschichtete Objektträger und auf diesem die zu messende Probe fixiert. Da die Goldschicht nicht den gesamten

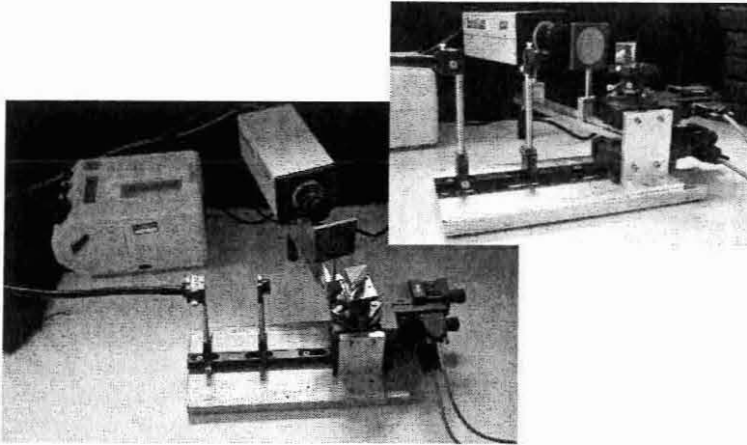


Abbildung 5.2: Photo des SPR Imaging Systems.

Objekträger homogen bedeckt und auch die Meßprobe nicht immer exakt positioniert werden kann, kann mit den lateralen Stellschrauben das Prisma so justiert werden, daß das Anregungslicht den gewünschten Bereich beleuchtet. Als Lichtquelle dient eine Halogenlampe mit Schwanenhals. Das Ende des Schwanenhalses wird an einem Reiter befestigt, der auf einer zweiten Schiene bewegt werden kann. Diese Schiene ist fest mit der Grundplatte verbunden, so daß zur Einstellung des Einfallswinkels das Prisma bzw. die Kamera bewegt werden muß. Um den gleichen Einfallswinkel wie auch Ausfallswinkel einzustellen, muß die Kamera um den doppelten Winkel verfahren werden wie das Prisma. Die Drehtische sind mit Schrittmotoren bestückt, die den Tisch in Schritten von 0.01° bewegen lassen. Die Motoren werden über eine Motorsteuerung geregelt, die an einen PC angeschlossen ist. Diese Steuerung ist in der Lage, die Drehtische in eine definierte Position zu drehen, von wo aus eine präzise Einstellung der Winkel erfolgen kann.

5.2 Ausblick

Der mechanische Aufbau ist bis auf den beschichteten Objektträger komplett. Die Beschichtung sollte in derselben Sputteranlage durchgeführt werden, wie für die faseroptischen Sensoren. Aufgrund technischer Schwierigkeiten der Beschichtungsanlage ist es bisher jedoch nicht gelungen, die Glasträger mit einer SPR-fähigen Metallbeschichtung zu versehen. Deshalb liegen im zeitli-

chen Rahmen dieser Arbeit noch keine Ergebnisse des Meßsystems vor. An dieser Stelle soll nun ein Ausblick auf geplante Aktivitäten für bildgebende SPR gegeben werden.

Der erste Schritt ist eine Charakterisierung des Systems im Hinblick auf die in dieser Arbeit nicht experimentell untersuchte Winkelabhängigkeit der SPR-Anregung. Zu diesem Zweck werden mit unterschiedlichen Interferenzfiltern in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 800 nm in Schritten zu 10 nm Aufnahmen im Winkelbereich von 60 bis 85° gemacht. Die Berechnungen in Kapitel 2.2 haben gezeigt, daß in diesem Wertebereich eine sehr effektive SPR-Anregung erfolgt. Die Messungen werden für unterschiedliche Objektträger durchgeführt, um eine optimale Kombination aus Anregungswinkel und Filter zu finden. Als optimal ist die Anordnung zu bezeichnen, die für den gewünschten Meßbereich des Brechungsindex die größte Intensitätsdynamik zeigt, also an der Stelle, an der die Steigung der Reflektivitätskurve den größten Betrag hat. In Abbildung 2.5 auf Seite 16 beispielsweise zeigt im linken Graphen die Reflexionskurve für 600 nm die größte Änderung bei einem Einstrahlwinkel 75° oder 77°. Je größer die Wellenlänge des Interferenzfilters gewählt wird, desto kleiner wird der Meßbereich des Brechungsindex, da mit steigender Anregungswellenlänge der Kurvenverlauf steiler wird. Allerdings erhöht sich die Auflösung stark, weil eine kleine Änderung des Brechungsindex eine große Intensitätsänderung bewirkt. Dieses Verhalten kann ausgenutzt werden, um in einer ersten Messung mit einer kleinen Wellenlänge den Brechungsindexbereich der Probe zu ermitteln und anschließend mit einer größeren Wellenlänge die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Für eine automatisierte Messung ist dann ein motorisiertes Filterrada anstelle eines einzelnen Interferenzfilters nötig.

Nach einer ausreichenden Charakterisierung des Systems sind Labormessungen an Ascidien geplant, um die Ergebnisse aus den Messungen mit dem faseroptischen Sensor zu vertiefen. An den Ascidien soll die Brechungsindexverteilung um die Symbionten untersucht werden. Mit Hilfe des Kamerasystems kann auch beobachtet werden, ob der aus den Profilmessungen ermittelte Brechungsindexunterschied zwischen dem Gewebe der Ascidie und dem Umgebungswasser mit der Aktivität der Symbionten zusammenhängt oder ob es eine Eigenschaft des Gewebes selbst ist. Hierfür muß der Brechungsindex in Abhängigkeit von der Intensität einer aktinischen Lichtquelle betrachtet werden.

Kapitel 6

Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist ein großer Markt für SPR-basierende Meßsysteme im Bereich der Chemo- und Biosensorik entstanden. Die Brechungsindexabhängigkeit wird bei diesen Systemen z.B. als Wandlungsmechanismus für sehr spezifische Molekülbindungen verwendet. In dieser Arbeit ist das Meßprinzip direkt auf die Messung des Brechungsindex in der Umgebung von phototrophen, marinen Mikroorganismen angewandt worden.

Der Sensor besteht aus einer Multimode-Glasfaser, deren Ende über eine definierte Länge angespitzt wird und mit einer SPR-unterstützenden Metallbeschichtung versehen wird. Durch eine Maskierung unter der Metallbeschichtung werden Bereiche des Sensors passiviert, um bei der Messung die Ortsauflösung zu erhöhen. Die Anregung von SPR geschieht durch Einkopplung von Weißlicht einer Halogenlampe in die Faser. Das reflektierte Licht der Faserspitze wird über einen Faserkoppler mit einem Spektrometer gemessen und anhand des spektralen Verlaufs bzw. der Wellenlänge minimaler Reflektivität der Brechungsindex einer unbekannt Probe bestimmt.

Simulationen des Strahlenverlaufs innerhalb des Tapers und der Wechselwirkung mit der Metallbeschichtung haben gezeigt, daß die Länge des Tapers die reflektierte Lichtintensität stark beeinflußt. Je länger der Taper ist, desto geringer ist auch die reflektierte Lichtmenge. Andererseits wird das Reflexionsminimum durch lange Taper stärker betont, so daß ein Kompromiß zwischen Lichtintensität und SPR-Wechselwirkung im Taper gefunden werden mußte. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß bei einem 500 bis 1000 μm langen Taper eine Ortsauflösung von 100 μm bei ausreichender Signalstärke erzielt werden kann. Die Empfindlichkeit gegenüber dem Brechungsindex wird durch die Tapergeometrie zudem nicht maßgeblich beeinflußt, d.h. die theoretische Verschiebung des Reflexionsminimums bei Variation des Brechungsindex ist nahezu unabhängig von der Geometrie der Faserspitze.

Auf die hergestellten Sensoren wurden zwei Kalibrationsverfahren ange-

wandt und miteinander verglichen. Einerseits wurde mit Hilfe der Minimumsuche die Wellenlänge der minimalen Reflektivität bestimmt und in Relation zum gemessenen Brechungsindex gesetzt. Andererseits kam die nichtlineare Regression der Hauptkomponenten (NPCR) zum Einsatz, bei der die gesamte Kurvenform mit dem Brechungsindex korreliert wird. Die Parameter der beiden Methoden sind für sich optimiert und die erzielten Empfindlichkeiten miteinander verglichen worden. Dabei zeigte sich, daß mit NPCR durchschnittlich eine um den Faktor 4 genauere Messung des Brechungsindex möglich ist als mit der Minimumsuche. Die Minimumsuche zeigte sich jedoch robuster gegenüber Drifterscheinungen des Sensors durch Abrieb an der Metallbeschichtung.

Mit den hergestellten Sensoren ist es möglich, den Brechungsindex mit einer Genauigkeit von 10^{-4} RIU zu messen. Dieser Wert ist vergleichbar mit anderen Arbeiten, deren Sensor keine ausreichend hohe Ortsauflösung aufweisen. Für die Messung von Brechungsindexprofilen in marinen Lebensräumen ist der hier vorgestellte Sensor sehr gut geeignet. Die Ortsauflösung wurde in einem Schichtsystem aus Agar und Percoll bestimmt und betrug 1 mm, obgleich mit den beiden Stoffen kein idealer Übergang zwischen unterschiedlichen Brechungsindizes erzeugt werden konnte. Deshalb liegt die Ortsauflösung eher in der Größenordnung einiger hundert Mikrometer. Unmaskierte Sensoren haben im Gegensatz hierzu eine Ortsauflösung von 2.5 bis 7 mm. Mit diesem Sensor ist es somit gelungen, den Brechungsindex in wässrigen Medien mit bisher nicht erzielter Ortsauflösung zu messen.

Der Sensor ist an biologischen Proben zur Anwendung gekommen. Profile im äußeren Gewebe einer Ascidie zeigten ein Maximum des Brechungsindex in der Nähe von phototrophen Symbionten. Dadurch konnte die Vermutung bestätigt werden, daß ein Maximum der Lichtintensität, das zuvor an derselben Stelle gemessen wurde, auf die Änderung des Brechungsindex zurückzuführen ist. In weiteren Experimenten soll nun untersucht werden, ob es sich um eine Eigenschaft des Gewebes handelt oder ob beispielsweise Nährstoff- oder Salzkonzentrationen den Unterschied erzeugen. Desweiteren sind Versuche an schleimbildenden Biofilmen geplant, die ebenfalls eine stark heterogene Verteilung der Lichtintensität zeigen.

Für die Visualisierung zweidimensionaler Brechungsindexverteilungen ist ein Konzept für ein bildgebendes SPR-System entwickelt worden. Die SPR-Anregung erfolgt wie beim Fasersensor mit einer Weißlichtquelle, jedoch mit Hilfe einer Kretschmann-Konfiguration. Das vom Prisma reflektierte Licht wird hinter einem Interferenzfilter mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Eine Änderung des Brechungsindex schlägt sich in der Intensität der Aufnahme nieder. Mit diesem System sollte es möglich werden, den Brechungsindex mit einer Ortsauflösung von maximal $5\ \mu\text{m}$ bei einer Empfindlichkeit

besser als 10^{-4} RIU zu messen. Aufgrund technischer Schwierigkeiten in der Beschichtungsanlage konnte das System im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr charakterisiert werden.

Der hier vorgestellte faseroptische Brechungsindexsensor konnte in bisher nicht lösbaren Meßaufgaben in der marinen Mikrobiologie eingesetzt werden und lieferte Ergebnisse, durch die weitere Anwendungen und Untersuchungen an Meereslebewesen möglich werden. Bislang sorgten die durchgeführten Messungen für ein klareres Verständnis für das Zusammenspiel zwischen Symbiont und Wirt einer Ascidie. Die Anwendungen werden auf mikrobielle Matten in Gewässern mit sehr hohem Salzgehalt erweitert, da hier durch die Salinität der Brechungsindex des Wassers maßgeblich beeinflußt wird und Auswirkungen auf die Lichtausbreitung in der Nähe phototropher Organismen hat. Erste Ergebnisse und Anwendungen des SPR-Imaging-Systems sind ebenfalls in naher Zukunft geplant.

Literaturverzeichnis

- [1] H. Macleod, *Thin-Film Optical Filters*, Adam Hilger Ltd., London, 1969.
- [2] R. W. Wood, On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical Magazine* 4 (1902) 396–402.
- [3] A. Otto, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik* 216 (4) (1968) 398–410.
- [4] E. Kretschmann, Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light, *Zeitschrift für Naturforschung A* 23 (12) (1968) 2135–2136.
- [5] E. Kretschmann, Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen, *Zeitschrift für Physik* 241 (4) (1971) 313–324.
- [6] H. Raether, Surface plasma oscillations and their applications, *Physics of Thin Films* 9 (1977) 145.
- [7] H. Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Springer, Berlin, 1988.
- [8] C. Nylander, B. Liedberg, T. Lind, Gas detection by means of surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators* 3 (1982) 79–88.
- [9] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators* 4 (1983) 299–304.
- [10] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review, *Sensors and Actuators B* 54 (1-2) (1999) 3–15.
- [11] R. C. Jorgenson, S. S. Yee, A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators B* 12 (1993) 213–220.

LITERATURVERZEICHNIS

- [12] R. C. Jorgenson, S. S. Yee, Control of the dynamic range and sensitivity of a surface plasmon resonance fiber optic sensor, *Sensors and Actuators A* 43 (1994) 44–48.
- [13] A. Katerkamp, P. Bolsmann, M. Niggemann, M. Pellmann, K. Cammann, Micro-chemical sensors based on fiber-optic excitation of surface plasmons, *Mikrochimica Acta* 119 (1995) 63–72.
- [14] R. Alonso, F. Villuendas, J. Tornos, J. Pelayo, New ‘in-line’ optical-fibre sensor based on surface plasmon excitation, *Sensors and Actuators A* 37-38 (1993) 187–192.
- [15] C. Ronot-Trioli, A. Trouillet, C. Veillas, H. Gagnaire, Monochromatic excitation of surface plasmon resonance in an optical-fibre refractive-index sensor, *Sensors and Actuators A* 54 (1996) 589–593.
- [16] A. J. C. Tubb, F. P. Payne, R. B. Millington, C. R. Lowe, Single-mode optical fibre surface plasma wave chemical sensor, *Sensors and Actuators B* 41 (1997) 71–79.
- [17] R. Slavik, J. Homola, J. Ctyroky, Miniaturization of fiber optic surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B* 51 (1998) 311–315.
- [18] L. A. Obando, K. S. Booksh, Tuning dynamic range and sensitivity of white-light, multimode, fiber-optic surface plasmon resonance sensors, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 5116–5122.
- [19] E. Yeatman, E. A. Ash, Surface-plasmon microscopy, *Electronics Letters* 23 (20) (1987) 1091–1092.
- [20] B. Rothhäusler, W. Knoll, Surface-plasmon microscopy, *Nature* 332 (1988) 615–617.
- [21] H. Knobloch, G. von Szada-Borrryszkowski, S. Woigk, A. Helms, L. Brehmer, Dispersive surface plasmon microscopy for the characterization of ultrathin organic films, *Applied Physics Letters* 69 (16) (1996) 2336–2337.
- [22] B. P. Nelson, A. G. Frutos, J. M. Bröckman, R. M. Corn, Near-infrared surface plasmon resonance measurements of ultrathin films. 1. Angle shift and SPR imaging experiments, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 3928–3934.

LITERATURVERZEICHNIS

- [23] B. Grunwald, Faseroptischer Mikrosensor zur Messung des Brechungsindex nach dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz, Diplomarbeit, Universität Bremen (1999).
- [24] A. Savitzky, M. J. E. Golay, Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Analytical Chemistry* 36 (8) (1964) 1627–1639.
- [25] T. Isaksson, T. Næs, The effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy, *Applied Spectroscopy* 42 (7) (1988) 1273–1284.
- [26] K. Johnston, S. Yee, K. Booksh, Calibration of surface plasmon resonance refractometers using locally weighted parametric regression, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 1844–1851.
- [27] M. Kühl, C. Lassen, N. P. Revsbech, A simple light meter for measurements of PAR (400 to 700nm) with fiber-optic microprobes: Application for P vs E_0 (PAR) measurements in a microbial mat, *Aquatic Microbial Ecology* 13 (1997) 197–207.
- [28] M. Kühl, A. W. D. Larkum, The microenvironment and photosynthetic performance of *prochloron sp.* in symbiosis with didemnid ascidians, in: J. Secklach (Hrsg.), *Cellular origin and life in extreme habitats Vol. 4, Symbiosis: Mechanisms and Model Systems.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002.

Teil II

Pulsweitenmoduliertes Kamerasystem zur Messung von Chlorophyll-Fluoreszenz

Kapitel 7

Chlorophyll-Fluoreszenz

7.1 Biologische Bedeutung

Die Photosynthese ist einer der wichtigsten Prozesse in der Biologie. Die Fähigkeit, mittels Licht Kohlenstoff zu fixieren, dient zur Erzeugung von Biomasse oder Nährstoffen und bedeutet damit Wachstum. Es existieren verschiedene Prozesse zur Kohlenstofffixierung, von denen aber die Photosynthese der bekannteste, wichtigste und am besten untersuchte ist. Sie wird nicht nur in den grünen Blättern von terrestrischen Pflanzen betrieben, sondern z.B. auch von grün-blauen Bakterien (Cyanobakterien) und roten oder grünen Algen. Somit wird klar, daß die Evolution der Photosynthese je nach Lebensraum und Lichtbedingungen unterschiedlich verlief. Aus der Kenntnis der Photosyntheserate, dem Maß der Umwandlung von Licht in organisches Material, Sauerstoff oder auch oxidierte Schwefelverbindungen, lassen sich Einblicke in die Physiologie der Lebewesen gewinnen und somit Stoffkreisläufe in Ökosystemen erschließen [1].

Photosynthese beruht auf der Absorption von Lichtenergie mit Hilfe sogenannter Antennen-Komplexe. Dies sind Farbpigmente, die ähnlich der Solarzelle in der Lage sind, Lichtenergie zur Ladungstrennung und damit zur Erzeugung freier Elektronen zu verwenden. Das bekannteste Pigment für diesen Prozess ist Chlorophyll. Die erzeugten Ladungsträger durchlaufen eine Reihe biochemischer Reaktionen, bis sie letztendlich die Energie zur Fixierung von anorganischem Kohlenstoff liefern. Die Elektronentransportkette der Photosynthese für Organismen, die zur Gewinnung von Elektronen Wasser oxidieren (oxygene Phototrophen), ist schematisch in Abbildung 7.1 abgebildet. Zu erkennen sind zwei Reaktionszentren (Photosystem I und II), mit zwei unterschiedlichen Antennen-Komplexen P680 und P700, die Licht unterhalb von 680 nm bzw. 700 nm „einfangen“ können. Ausgehend von Pho-

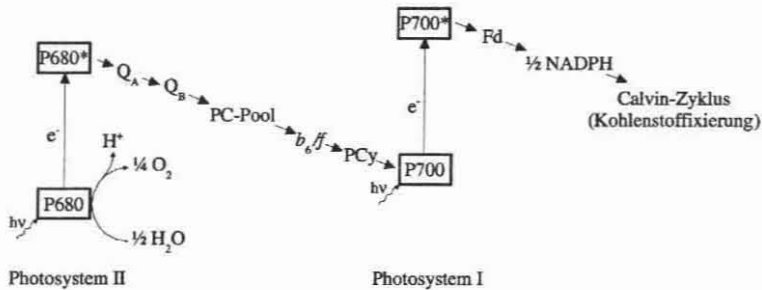


Abbildung 7.1: Die photosynthetische Elektronentransportkette von oxygenen Phototrophen. P680 und P700 sind Antennen-Pigmente zur Lichtabsorption. Der Prozess startet mit der Oxidierung von Wasser zu O_2 im Photosystem II, wofür vier Lichtquanten nötig sind. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Photosystem II wird durch Licht die Oxidierung von Wasser zu reinem Sauerstoff angeregt, wobei P680 durch ein entstehendes freies Elektron in einen angeregten Zustand gehoben wird. Für diesen Prozess sind vier Lichtquanten nötig. Zunächst wird dann der primäre Elektronenakzeptor Q_A reduziert, der dann wiederum nach Aufnahme von zwei Elektronen den sekundären Akzeptor Q_B reduziert. Q_A und Q_B sind Plastochinone, die an Proteine gebunden sind. Anschließend löst sich das Q_B -Molekül aus seiner Bindung und diffundiert innerhalb der Chloroplast-Membran zu einem weiteren Molekül-Komplex (b_6/f) und gibt dort seine Elektronen an ein Plastocyanin (PCy) wieder ab. Die Diffusion ist die langsamste Reaktion in der Transportkette, wodurch sich reduziertes Q_B zu einem Plastochinon-Pool (PC-Pool) akkumulieren kann. Wenn sich dieser Pool weitgehend gefüllt hat, wird ein Übergang der Elektronen von Q_A nach Q_B sehr unwahrscheinlich, so daß das ursprünglich angeregte P680 unter Lichtabgabe in seinen Grundzustand zurückfällt. Haben Elektronen das Photosystem I erreicht, ist ein weiterer Lichtquant nötig, um P700 in einen angeregten Zustand zu bringen, wodurch Ferredoxin (Fd) reduziert wird. Mit Hilfe der Oxidation von Ferredoxin kann ein Energieträger für den Stoffwechsel (NADPH) gebildet werden, dessen Reduktionsäquivalent über den sogenannten Calvin-Zyklus mit anorganischem Kohlenstoff (CO_2) in organischen Verbindungen – z.B. Zucker – fixiert werden kann. Dieser Prozess ist nicht mehr auf Lichtenergie angewiesen und wird deshalb im Gegensatz zur beschriebenen Lichtreaktion der Elektronentransportkette als Dunkelreaktion bezeichnet. Die gesamte Lichtreaktion bis zur Reduktion von Ferredoxin dauert abhängig vom Füllstand des PC-Pools 5 bis 20 ms.

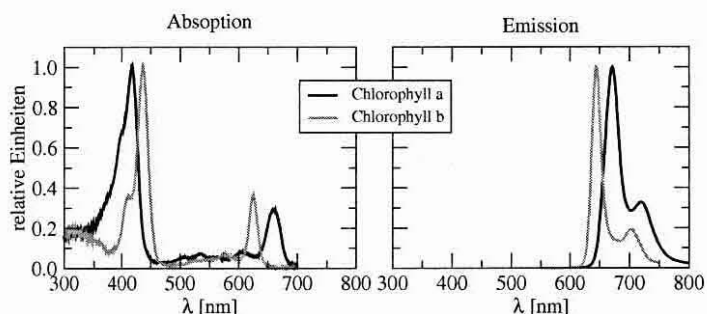


Abbildung 7.2: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von Chlorophyll a (Chl a) und b (Chl b) gelöst in Methanol. Das Emissionsspektrum wurde bei einer Anregungswellenlänge von 417 nm (Chl a) bzw. 435 nm (Chl b) gemessen.

7.2 Fluoreszenzmessung mit gepulstem Licht

Die Lichtenergie, die die Photosysteme erreicht, wird durch drei konkurrierende Mechanismen umgewandelt. Diese sind die Erzeugung von freien Elektronen in den Photosystemen, Erzeugung von Wärme und die Chlorophyll-Fluoreszenz. Wenn beispielsweise die Photosyntheserate abnimmt, erhöht sich entweder die Wärmeabgabe oder die Fluoreszenz. Der Grund für eine erhöhte Fluoreszenzausbeute liegt meist in einem aufgefüllten PC-Pool, so daß die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs von angeregtem P680 in seinen Grundzustand unter Abgabe von Licht zunimmt. Es ist auch möglich, die Reduktion von Q_B chemisch durch Zugabe eines Hemmstoffes zu unterbinden. In diesem Fall mißt man die maximale Fluoreszenzausbeute. Wenn man die Fluoreszenz von isoliertem Chlorophyll in einem organischen Lösungsmittel mißt, ist die Fluoreszenzausbeute immer konstant und maximal groß. Die Absorptions- und Emissionsspektren von Chlorophyll a und b [2], den beiden häufigsten Formen von Chlorophyll, sind in Abbildung 7.2 gezeigt. Es sind jeweils zwei Absorptionsmaxima bei 417 und 660 nm für Chlorophyll a und bei 435 und 625 nm für Chlorophyll b zu erkennen. Das Emissionsmaximum für Chlorophyll a liegt bei 671 nm mit einem Nebenmaximum bei 719 nm. Für Chlorophyll b liegt das Maximum bei 644 nm und das Nebenmaximum bei 703 nm.

Die *in vitro* – d.h. in einer künstlichen Laborumgebung gemessenen – Spektren unterscheiden sich von den *in vivo*, d.h. im lebenden Organismus, gemessenen. Bei *in vivo*-Spektren steht nicht die reine Absorption des Lichts

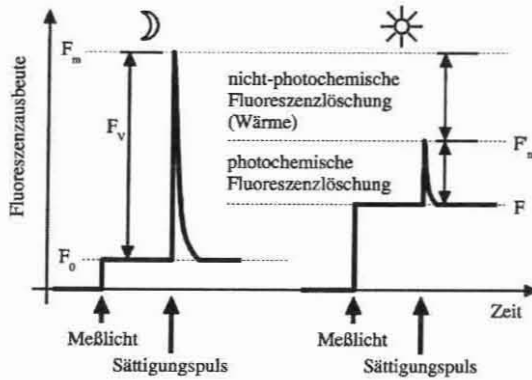


Abbildung 7.3: Verlauf der Fluoreszenzausbeute jeweils eines dunkeladaptierten (links) und eines lichtadaptierten phototrophen Organismus (rechts) bei Beleuchtung mit Meßlicht und einem Sättigungspuls.

im Vordergrund, sondern die Umwandlung der absorbierten Lichtenergie in eine für den Organismus direkt verwertbare Energieform, z.B. in Sauerstoffproduktion oder Kohlenstofffixierung. Diese Spektren nennen sich Aktionspektren. Sie zeigen beispielsweise bei der Darstellung der Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge, daß bei Wellenlängen größer 600 nm kaum noch Sauerstoffproduktion stattfindet, obwohl Licht absorbiert wird. Dies ist dadurch begründet, daß langwelliges Licht nicht genügend Energie für die Erzeugung von Elektronen zur Verfügung stellt. Ein weiterer Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* gemessener Chlorophyll-Fluoreszenz, den Kautsky 1931 mit bloßem Auge entdeckte [3, 4], ist die Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke und -dauer. Diese Variabilität der Fluoreszenz, der sogenannte Kautsky-Effekt, läßt den Schluß zu, daß die Fluoreszenz ein indirekter Parameter für Energiegewinnungsprozesse innerhalb des Organismus ist.

Eine Methode, mit der die Fluoreszenz unter Vernachlässigung der erzeugten Wärme gemessen werden kann, basiert auf gepulstem Licht [5, 6]. Zur Einhaltung dieser Bedingung darf die Länge der Lichtpulse wenige Sekunden nicht überschreiten. Durch Variation der Impuls-Lichtstärke lassen sich zwei unterschiedliche Situationen in den Photosystemen erzeugen. Diese sind in Abbildung 7.3 dargestellt. Bei sehr geringer Lichtstärke (Meßlicht) werden keine Elektronen im PC-Pool akkumuliert, sondern werden sofort an das Photosystem I weitergeleitet. Die sich für diesen Fall ergebende Fluoreszenzausbeute F hat einen niedrigen Wert. Als Fluoreszenzausbeute definiert

man das Verhältnis von absorbierter und emittierter Lichtenergie. Gibt man nun einen ausreichend starken Lichtpuls (Sättigungspuls) auf die Probe, wird der PC-Pool so schnell mit Elektronen aus dem Photosystem II aufgefüllt, daß diese nicht vom Photosystem I verarbeitet werden können. Nun wird die maximale Energie in Fluoreszenz umgewandelt und man erhält die maximale Fluoreszenzausbeute F'_m . Die absoluten Werte für F und F'_m hängen von der Vorgeschichte der Photosysteme ab. Ein dunkeladaptierter (an Dunkelheit angepaßter) Organismus hat den kleinstmöglichen F -Wert und wird als F_0 bezeichnet. Der F'_m -Wert hingegen ist dunkeladaptiert am größten und wird F_m genannt. Die Differenz zwischen F und F'_m bezeichnet die variable Fluoreszenz F_v und quantifiziert den Teil der Fluoreszenz, der bei Meßlicht durch den photochemischen Elektronentransport gelöscht wird. Im lichtadaptierten Zustand ist die maximale Fluoreszenz F'_m kleiner als F_m . Dieser Unterschied ist auf die Wärmeentwicklung bei dauerhafter Beleuchtung zurückzuführen, wodurch die Fluoreszenzausbeute reduziert wird. Mit Hilfe dieses Meßschemas können viele biologisch interessante Parameter, wie z.B. die Quantenausbeute ϕ_p des Photosystems und die damit einhergehende Elektronenflußrate ETR nach den Formeln

$$\phi_p = \frac{F'_m - F}{F'_m} \quad (7.1)$$

$$\text{bzw. } ETR = \phi_p \cdot E_e \quad (7.2)$$

mit der Bestrahlungsstärke E_e , berechnet werden. Die Bestrahlungsstärke wird in der Biologie meist in der Einheit $\frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2 \text{s}}$ angegeben, also einer Anzahl von Photonen pro Fläche und Zeit. Betrachtet wird dabei nur der spektrale Bereich der photosynthetisch aktiven Strahlung von 400 bis 700 nm (photosynthetic active radiation, kurz: PAR). Bei starker Sonneneinstrahlung beispielsweise im australischen Sommer kann man Bestrahlungsstärken von über 2000 $\frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2 \text{s}}$ messen, wohingegen im Mittelmeerraum bei blauem Himmel etwa 1300 $\frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2 \text{s}}$ gemessen werden können.

Neben den kurzen Pulsen, die keinen photochemischen Einfluß auf die Probe haben, ist die Beobachtung der Photosynthese bei unterschiedlichen Lichtbedingungen biologisch von großer Bedeutung. Deshalb ist eine aktinische, d.h. photochemisch aktive, Lichtquelle nötig, die im Labor das Sonnenlicht ersetzt, um z.B. zu messen, ab welcher Lichtstärke die Photosynthese inhibiert wird. Die Entwicklung superheller LEDs in den letzten Jahren hat eine zusätzliche Halogenlampe zumindest für Organismen, die in ihrem Lebensraum nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sind und somit keine hohen Lichtintensitäten gewohnt sind, überflüssig gemacht. Das aktinische Licht kann in den Meßpausen von den selben LEDs erzeugt werden, wie das Meßlicht und der Sättigungspuls.

7.3 Gegenwärtiger Entwicklungsstand von Chlorophyll-Fluoreszenzmeßsystemen

Das Prinzip, mit gepulstem Licht Chlorophyll-Fluoreszenz zu messen, wurde von Schreiber et al. 1986 als PAM (pulse amplitude modulation) veröffentlicht [5]. In den folgenden Jahren sind mehrere kommerzielle Fluorometer auf den Markt gekommen, mit denen zahlreiche Parameter aus der Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt werden können. Die Entwicklung von Meßgeräten auf der Basis der PAM-Methode bei der Walz GmbH (Effeltrich) führte Anfang der 1990er Jahre zu einer großen Zahl von Ergebnissen über unterschiedliche Aspekte der Bedeutung von Chlorophyll-Fluoreszenz. Bis heute hat sich die Produktpalette auf elf Geräte für z.B. Unterwassereinsätze, Mikroskope oder faseroptische Messungen erweitert. Das Anregungslicht wird von einer Halogenlampe, einer LED oder einer Blitzlampe erzeugt. Als Detektor dient entweder ein Photomultiplier oder eine Photodiode.

Eine Anwendung der gepulsten Lichtmessung für zweidimensionale Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz ist Anfang 1990 entwickelt worden, als die ersten ausreichend empfindlichen CCD-Kameras verfügbar waren. Die Empfindlichkeit war dennoch so niedrig, daß in den meisten Fällen ein Bildverstärker nötig war. Takahashi et al. verwendete 1994 ein System mit Bildverstärker, CCD-Kamera und einem HeNe-Laser mit einer Linienoptik als Anregungslicht [7]. Einer der ersten Aufbauten ohne Bildverstärker ist von Siebke et al. ein Jahr später veröffentlicht worden [8]. Als Anregungslicht diente eine Halogenlampe. Beide Systeme hatten das Problem, den Parameter F_0 nicht messen zu können, da die Intensität der Fluoreszenz zu gering war, um ein ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen. Aus diesem Grund beschränkten sich die Messungen auf die maximale Fluoreszenz F_m und F'_m sowie auf F bei ausreichender Lichtstärke. Bei Siebke et al. betrug die minimale Beleuchtungsstärke $450 \frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2\text{s}}$. Diese Einschränkung machte die Messung von F_0 unmöglich und wurde von Oxborough et al. 1997 umgangen [9], indem sie argumentierten, daß eine Änderung von F_0 sich auf das Verhältnis von F_m und F'_m niederschlägt und somit F_0 indirekt bestimmt werden kann. Er zeigte dies an Messungen, die mit einem modifizierten Mikroskop durchgeführt wurden. Desweiteren waren bis zu diesem Zeitpunkt Aufnahmen der zeitlichen Dynamik in einer Zeitspanne von weniger als einigen zehn Sekunden wegen langer Integrationszeiten der verwendeten Kameras nicht möglich. Ein Durchbruch gelang Nedbal et al. im Jahr 2000 mit einem Kamerasystem, das für Meßlicht, aktinisches Licht und den Sättigungspuls unterschiedliche Lichtquellen verwendete [10] und in der Lage war, auch die minimale Fluoreszenz F_0 zu messen. Dieses Instrument

Chlorophyll-Fluoreszenz

ist bei P.S. Instruments (Brno, Tschechische Republik) bereits kommerziell verfügbar. Die Firma Walz GmbH hat in der Zwischenzeit ebenfalls ein PAM-Imaging-System auf den Markt gebracht. Die Anwendungen der Kamerasysteme decken einen Bereich von der kontaktlosen Qualitätskontrolle von Früchten [11], bis zur Messung des Einflusses von Lichtstreß auf Blätter [12] ab. Veröffentlichte Anwendungen in marinen Lebensräumen sind derzeit rar und werden wie z.B. von Berman-Frank et al. [13] mit speziell optimierten Mikroskopen durchgeführt.

Kapitel 8

Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz

In diesem Kapitel wird die benötigte Hard- und Software zur Messung der zweidimensionalen Chlorophyll-Fluoreszenz im Detail beschrieben. Zunächst wird das Gesamtsystem vorgestellt und anschließend die entwickelte Zeitsteuerung genauer erläutert. Den Abschluß bildet die Beschreibung des Meßvorgangs mit der Software Look@PAM.

8.1 Aufbau

Das System zur Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz besteht aus einer CCD Kamera mit einer lateralen, örtlichen Auflösung von 640×480 Pixeln und 4096 Graustufen (12 Bit), einem LED Ring und einer Zeitsteuerung für die zeitliche Koordinierung von Lichtquelle und Kamera. Den Aufbau des Kamerasystems zeigt Abbildung 8.1

Die CCD-Kamera ist eine „sensicam sensimod“ von PCO Computer Optics GmbH (Kelheim). Der CCD-Chip wird zur Rauschunterdrückung mit einem Peltierelement auf -15°C gekühlt. Außerdem besitzt die Kamera einen elektronischen Shutter, der mittels eines Triggereingangs mit einer Gatezeit von 100 ns geschaltet werden kann. Im Gegensatz zu einem mechanischem Shutter, der den Lichteinfall auf den Chip verhindert, zwingt dieser in geschlossenem Zustand die durch Lichteinfall erzeugten Ladungsträger ab, so daß sie nicht zum Bildsignal beitragen. Dies macht eine schnelle Modulation der Kameraaufnahme möglich. Die maximale Integrationszeit für eine Aufnahme ist durch die interne Kameraelektronik auf maximal 450 ms eingeschränkt.

Die verwendeten LEDs (HLMP-CB15, Agilent, Böblingen und E1L51-

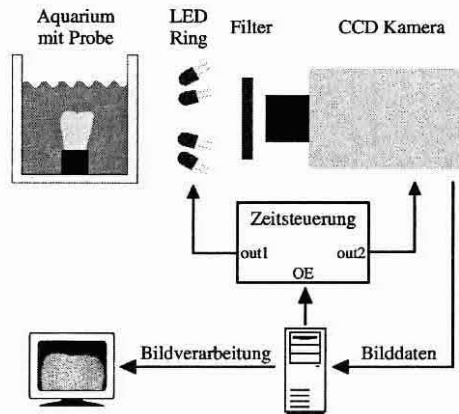


Abbildung 8.1: Schematischer Aufbau des Fluoreszenz-Meßsystems.

3B0A-02, Toyoda Gosei, Haruhi, Japan) haben ihr Emissionsmaximum bei 470 nm und können eine Lichtstärke von bis zu 1800 mcd abgeben. Als Filter zur Trennung von Anregungslicht und Fluoreszenz dient ein RG695 Langpaß-Filter (Schott, Mainz). Die LEDs sind ringförmig angeordnet und fokussiert, so daß die Flächenausleuchtung der Probe vom Abstrahlwinkel der LEDs abhängt. Dieser beträgt bei beiden LED-Typen 15° , d.h. der Durchmesser des Lichtspots beträgt ungefähr ein Viertel der Entfernung zum Objekt. Die ersten Versuche sind mit einem Ring aus 24 LEDs durchgeführt worden. Ein zweiter Ring mit 54 LEDs ist später zur besseren Fokussierung, effizienteren Kühlung der LEDs und Maximierung der Lichtstärke entwickelt worden.

Die selbst entwickelte Zeitsteuerung besitzt einen Eingang (OE), mit dem der Meßablauf gestartet werden kann. Das Signal hierfür stellt die PC-Karte der Kamera zur Verfügung. Aus der Sicht der Software müssen die Timingdaten an die Zeitsteuerung übertragen werden und ein Aufnahmezyklus der Kamera gestartet werden. Ein Signal der PC-Karte, welches während der Aufnahmezeit logisch Null ist, startet die Zeitsteuerung. An einen Ausgang (out1) kann eine LED-Lichtquelle angeschlossen werden. Mit diesem Leistungsausgang können bis zu 77 LED angesteuert werden. Ein zweiter Ausgang (out2) liefert ein TTL-Signal zur Triggerung der Kamera. In einem zweiten Modus kann die Zeitsteuerung die Lichtquelle auch dann ansteuern, wenn keine Aufnahme gemacht wird. Auf diese Weise kann auch aktinisches, d.h. photochemisch wirksames Licht zwischen den Aufnahmen für die Probe erzeugt und beispielsweise die Elektronenflußrate bei unterschiedlichen Lichtintensitäten

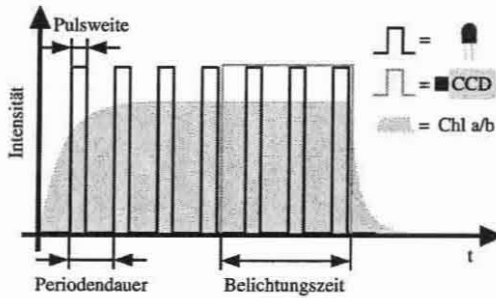


Abbildung 8.2: Zeitlicher Ablauf der Triggersignale für Lichtquelle und Kamera.

gemessen werden.

Die Aufnahme wird von der Software Look@PAM gesteuert, die für diese Anwendung entwickelt wurde. Mit der Software ist es möglich, die Timing-Parameter einzustellen, Intensitätsbilder aufzunehmen, in Bilder der Fluoreszenzausbeute und Quantenausbeute umzurechnen und abzuspeichern.

8.2 Zeitsteuerung

Von den verwendeten Komponenten her ähnelt der Aufbau dem MOLLI-System (MODular Luminescence Lifetime Imaging, siehe [14]), mit dem zweidimensionale Sauerstoffverteilungen mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes gemessen werden können. Es kommt derselbe Kamerateyp zum Einsatz und es können dieselben LEDs zur Anregung verwendet werden. Allerdings unterscheidet sich die Filterung der Fluoreszenz und der zeitliche Ablauf bei beiden Systemen. Da das MOLLI-System bereits für mobile Laboranwendungen am MPI zur Verfügung steht, sollte ein Wechsel zwischen beiden Systemen mit möglichst wenig Aufwand durchzuführen sein.

Die Zeitsteuerung bildet das Herzstück des Meßsystems. Sie hat die Aufgabe, den zeitlichen Ablauf der Lichtpulse und des Kamera-Shutters zu steuern. Außerdem sollte es möglich sein, die Lichtintensität der LEDs softwareseitig zu variieren, um Meßlicht, den Sättigungspuls und aktinisches Licht ohne manuelle Eingriffe generieren zu können. Zur Erzeugung verschieden heller Lichtpulse, ohne den Strom regeln zu müssen, bietet sich eine Pulsweitenmodulation an. Dabei werden zyklische Impulsfolgen mit einem bestimmten Tastverhältnis erzeugt. Je größer das Tastverhältnis aus Pulsweite T_{pw} und Periodendauer T_{cd} ist, desto größer ist auch die mittlere Leistung und

Tabelle 8.1: RS232-Befehle zur Steuerung der Zeitsteuerung

Zeichen	Hex-Code	Beschreibung
'?'	3Fh	Kommunikationstest
'A'+XXX	41h+XXX	T_{off} von out1 einstellen
'B'+XXX	42h+XXX	T_{on} von out1 einstellen
'C'+XXX	43h+XXX	T_{off} von out2 einstellen
'D'+XXX	44h+XXX	T_{on} von out2 einstellen
'>'	3Eh	Signalausgabe starten
'.'	2Eh	Signalausgabe beenden
'O'+X	4Fh+X	OutputReg setzen
'S'+X	53h+X	SetupReg setzen

damit die Helligkeit der LEDs.

Das Signal, das den Shutter der Kamera steuert, verfügt über eine einstellbare Verzögerung, damit starke Fluoreszenzsignale ohne manuelle Einstellungen, etwa an der Blende des Objektivs, aufgenommen werden können. Abbildung 8.2 zeigt den zeitlichen Ablauf des modulierten LED-Signals und der Belichtungszeit T_{exp} der Kamera. Das Tastverhältnis aus Pulsweite zu Periodendauer bestimmt die mittlere Bestrahlungsstärke der LEDs. Für einen Sättigungspuls ist dieses Verhältnis gleich Eins, d.h. die LEDs leuchten kontinuierlich. Für Meßlicht und aktinisches Licht kann das Verhältnis beliebig klein gewählt werden. Die untere Grenze des Tastverhältnisses wird durch die Quanteneffizienz der Kamera limitiert.

Die Schaltung besteht aus einem Kommunikationsmodul realisiert mit einem PIC-Mikrocontroller als Schnittstelle zum PC und einem Altera FPGA als Timingmodul zur Erzeugung der Ausgangssignale für Lichtquelle und Kamera. Der PIC-Baustein ist in C programmiert, wohingegen die Funktionen des FPGA in einem VHDL-Design implementiert wurden. Die Kommunikation zwischen Zeitsteuerung und PC wird über die RS232-Schnittstelle hergestellt. Die zur Verfügung stehenden Befehle sind ASCII-Zeichen, die in Tabelle 8.1 zusammengestellt sind. Wenn ein Befehl von der Zeitsteuerung als gültig erkannt wird, antwortet sie mit einem Ausrufungszeichen (21h) sonst mit einem Fragezeichen (3Fh). Die Antwort für einen erfolgreichen Kommunikationstest ist '42' (34h+32h). Die beiden Ausgänge out1 und out2 können unterschiedliche pulswertenmodulierte Signale ausgeben. Die Zeiten für den eingeschalteten (T_{on}) und den ausgeschalteten (T_{off}) Zustand können für Ausgang out1 mit den Befehlen 'A' bzw. 'B' und für Ausgang out2 mit 'C' bzw. 'D' gefolgt von drei Bytes gesetzt werden. Die drei Bytes bezeichnen

Tabelle 8.2: Konfigurationsregister und ihre Funktion

Register	Bit	Funktion
OutputReg	4	Software Trigger
	3	Hardware Trigger (OE) zulassen
	2	outC
	1	outB
	0	outA
SetupReg	4	out2 wartet auf out1
	3..2	Takteiler
		00: 1
		01: 2
		10: 4
	11: 8	
	1	$\overline{\text{out2}}$
0	$\overline{\text{out1}}$	

die Anzahl der Pulse n , die über

$$n = f_{\text{clk}} \cdot T_{\text{on/off}} \quad (8.1)$$

berechnet werden kann. Die Taktfrequenz f_{clk} der Schaltung beträgt 20 MHz, so daß Zeiten zwischen 50 ns und 838 ms in Schritten zu 50 ns eingestellt werden können. Die Befehle '>' und '.' sind der Software-Trigger und starten bzw. stoppen die Ausgabe der Signale. Das Verhalten der Zeitsteuerung wird über zwei 5-Bit breite Konfigurationsregister eingestellt. Die Bedeutung der einzelnen Bits ist in Tabelle 8.2 zu finden. Das Register OutputReg konfiguriert die Art der Triggerung und setzt asynchron die zusätzlichen Ausgänge outA, outB und outC, mit denen z.B. externe Halogenlampen, Pumpen usw. an- und ausgeschaltet werden können. SetupReg bestimmt, ob die Ausgabe des Ausgangs out2 von out1 getriggert wird. Diese Einstellung hat für die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz keine Bedeutung, sondern ist für die Messung von Fluoreszenz-Abklingzeiten mit MOLLI nötig. Außerdem kann ein Takteiler eingestellt werden, durch den die Taktfrequenz f_{clk} geteilt wird. So kann der Zeitbereich für die Ausgangssignale durch eine geringere zeitliche Auflösung auf bis zu 6.7s bei einer Schrittweite von 400 ns erweitert werden. Diese Funktion wird verwendet, um Sättigungspulse länger als 838ms zu erzeugen. Die Ausgänge out1 und out2 können auch invertiert ausgegeben werden, um z.B. den low-aktiven Eingang des Kamerashutters ansprechen zu können.

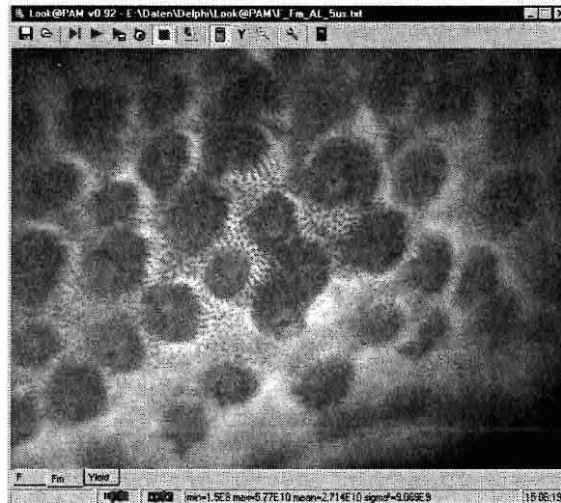


Abbildung 8.3: Hauptfenster von Look@PAM mit einem Bild der maximalen Fluoreszenzausbeute (F'_m -Bild) einer Koralle.

8.3 Bildaufnahme

Für die Aufnahme von Fluoreszenzbildern wird das Programm Look@PAM verwendet. Mit dieser Software kann der Benutzer die Stärke der Lichtpulse einstellen und einzeln sowie kontinuierlich Bilder der Fluoreszenzintensität bei Meßlicht (F -Bilder) aufnehmen. Zu frei wählbaren Zeitpunkten kann mittels eines Sättigungspulses die maximale Fluoreszenzausbeute (F'_m -Bild) gemessen werden. In den Zeiträumen zwischen zwei Messungen wird die Probe bei Bedarf mit aktinischem Licht beleuchtet. Wenn jeweils ein F - und ein F'_m -Bild vorliegt, kann ein Bild der Quantenausbeute (ϕ_p -Bild) berechnet und dargestellt werden. Um den Einfluß des Umgebungslichts zu minimieren, wird vor jeder Aufnahme ein Dunkelbild mit denselben Zeiteinstellungen wie bei der Messung jedoch ohne Anregungslicht aufgenommen. Dieses Dunkelbild wird vom Bild bei Lichtanregung subtrahiert. Das Hauptfenster von Look@PAM ist in Abbildung 8.3 zu sehen. Unter der Titelleiste des Hauptfensters ist eine Reihe von Schaltflächen zu erkennen, mit der auf alle Funktionen der Software zugegriffen werden kann. Darunter befindet sich der Bereich zur Darstellung der Aufnahmen. Über eine Reihe von Registerkartenreitern am unteren Bildrand ist es möglich, zwischen der Anzeige von

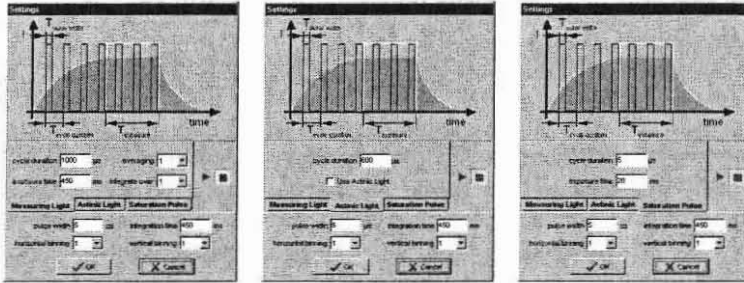


Abbildung 8.4: Einstellung der Zeitparameter für Meßlicht, aktinisches Licht und den Sättigungspuls (v.l.n.r).

F -, F_m' - und einem berechneten ϕ_p -Bild umzuschalten. Die Bilder können als Intensitätsbild oder aber als Bild der Fluoreszenzausbeute F dargestellt werden. Die Umrechnung erfolgt pixelweise über die Formel

$$F = I \cdot \frac{T_{cd}}{T_{exp} \cdot T_{pw}} \quad (8.2)$$

mit der gemessenen Intensität des Pixels I , der Belichtungszeit der Kamera T_{exp} , der Periodendauer des Lichtsignals T_{cd} und seiner Pulsbreite T_{pw} . Der Bruch auf der rechten Seite ist der Kehrwert des Maßes der auf die Probe abgestrahlten Lichtenergie. Die Einheiten von I und F sind willkürlich.

Eine Messung beginnt mit der Einstellung von Pulsweite und Periodendauer der einzelnen Beleuchtungsarten. Dies geschieht im Setup-Fenster von Look@PAM. Abbildung 8.4 zeigt das Setup-Fenster mit den Parametern für Meßlicht, aktinisches Licht und den Sättigungspuls. Bei lichtschwachen Aufnahmen können Bildpunkte horizontal und vertikal zusammengefasst werden (Binning), um die Intensität zu erhöhen. Diese Funktion gilt gleichermaßen für Meßlicht und den Sättigungspuls, damit beide Aufnahmen dieselben Dimensionen haben und in ein ϕ_p -Bild umgerechnet werden können. Für alle Beleuchtungsarten wird außerdem dieselbe Pulsweite verwendet. Die unterschiedlichen Lichtintensitäten sind dann über die Periodendauer einstellbar. Alle Aufnahmen werden immer bei ganz geöffneter Objektivblende gemacht, um die Empfindlichkeit der Kamera voll auszunutzen.

Von besonderer Bedeutung ist die richtige Einstellung des Meßlichts, da es keinen photochemischen Effekt auf die Probe haben darf. Um die optimale Periodendauer zu ermitteln wird diese zunächst auf einen hohen Wert eingestellt, so daß die gemessene Intensität an der Detektionsschwelle der Kamera liegt. In der Regel liegt dieses Tastverhältnis bei 1:200, d.h. die Pulsweite

beträgt $5 \mu\text{s}$, weshalb die Periodendauer in der Größenordnung von 1 ms liegen sollte. Dieser Wert variiert jedoch von Probe zu Probe und hängt auch vom Abstand der Kamera sowie vom verwendeten Kameraobjektiv ab. Nun werden kontinuierlich F -Bilder aufgenommen und die Intensität beobachtet. Look@PAM verfügt für diesen Zweck über die Möglichkeit, mit der Maus eine Region auf einem Bild auszuwählen, dessen durchschnittliche Fluoreszenzausbeute in einem Graphen dargestellt wird. In diesem Graphen läßt sich nun beobachten, ob sich bei kontinuierlicher Messung die Fluoreszenzausbeute aufgrund des aktinischen Effektes erhöht. Ist dies nicht der Fall, kann eine größere Intensität, d.h. kürzere Periodendauer für das Meßlicht eingestellt werden, um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erzielen. Nachdem das Meßlicht eingestellt ist, wird nun die Belichtungszeit während eines Sättigungspulses so gewählt, daß der CCD-Chip der Kamera gerade eben nicht übersteuert wird. Dieser Ablauf ist während der Anwendung des Systems soweit standardisiert worden, daß er zukünftig als automatischer Abgleich in Look@PAM implementiert sein wird.

Der eigentliche Meßablauf hängt stark von der Fragestellung der Anwendung ab. Für eine generelle Charakterisierung des Photosystems wird die Probe dunkeladaptiert, d.h. für 20 bis 30 Minuten an die Dunkelheit „gewöhnt“, um die maximale variable Fluoreszenz über ein F_0 - und ein F_m -Bild zu ermitteln. Anschließend wird aktinisches Licht von zunächst geringer Stärke auf die Probe gegeben und nach 10 bis 15 Minuten wieder ein F - und ein F'_m -Bild aufgenommen. Die Intensität des Lichts wird schrittweise bis zum Maximalwert erhöht und die Aufnahme wiederholt. So entsteht ein Meßdatensatz, mit dem für jeden Bildpunkt die Abhängigkeit der Quanteneffizienz von der Beleuchtungsstärke berechnet werden kann. Zum Abschluß der Messung wird nach Abschalten des aktinischen Lichts in Zeitabständen von ca. 10 bis 60 s ein F - und ein F'_m -Bild aufgenommen, bis die Probe wieder dunkeladaptiert ist. Diese sogenannte „rapid light curve“ kann wahlweise auch schon während der Steigerung der Lichtintensität aufgenommen werden. Somit eignet sich das Kamerasystem nicht nur zur statischen Charakterisierung des Photosystems, sondern auch zur Messung von zeitlichen Abläufen der Photochemie.

8.4 Anwendung

Das Kamerasystem ist in der Forschungsstation der University of Queensland (Brisbane, Australien) auf Heron Island (Capricorn Inseln, Great Barrier Reef) eingesetzt worden. Hier sind Korallenproben untersucht worden, um die örtliche Verteilung der Chlorophyll-Fluoreszenz zu charakterisieren. Von einer Koralle der Art *Porites cylindrica* ist zum einen die Chlorophyll-

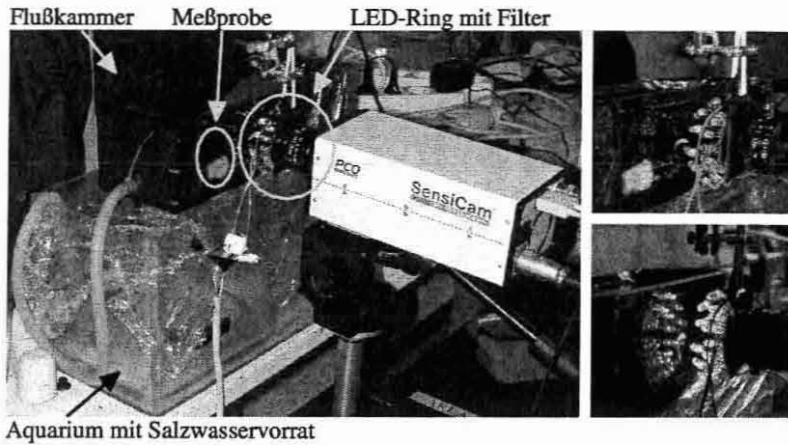


Abbildung 8.5: Aufbau zur Fluoreszenzmessung in einer Flußkammer.

Fluoreszenz von außen und zum anderen an einem Schnitt im Innern der Koralle gemessen worden. Die Koralle bildet eine fingerartige Skelettstruktur und beherbergt neben zahlreichen Polypen mit ihren kleinen Fangarmen auch verschiedene phototrophe Algenarten, sogenannte endolithische („im Stein“ bzw. im Kalkskelett lebende) Algen, deren Eindringtiefe in die Koralle und photosynthetische Aktivität von Interesse ist. Bisher ist mit Fluorometern lediglich ein Durchschnittswert über die Fläche der Probenspitze gemessen worden. Heterogene Fluoreszenzverteilungen konnten aus diesem Grund bislang nicht untersucht werden. Da jedoch vermutet wird, daß das Photosystem der Polypen einer Koralle, die einer stärkeren Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind als etwa endolithische Algen, einen anderen Quantenwirkungsgrad haben, bietet sich das bildgebende Verfahren an. Es bietet allerdings nicht nur den Vorteil, die örtliche Variabilität zu messen, sondern kann auch die zeitliche Dynamik erfassen.

Für die Messungen ist ein Stück der Spitze einer Koralle in einer Flußkammer fixiert worden. Eine Seitenwand der Flußkammer ist aus durchsichtigem Polycarbonat, so daß Aufnahmen von der Seite der Probe gemacht werden können. Der LED-Ring und der Filter befinden sich direkt vor dem Objektiv der Kamera in einem Abstand von etwa 6 cm zur Probe. Ein Photo des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 8.5 zu sehen. Zunächst wurde die Probe abgedunkelt für 20 Minuten ruhen gelassen. Anschließend wurde eine Aufnahme der dunkeladaptierten Koralle aufgenommen (F_0 - und F_m -Bild). Nun

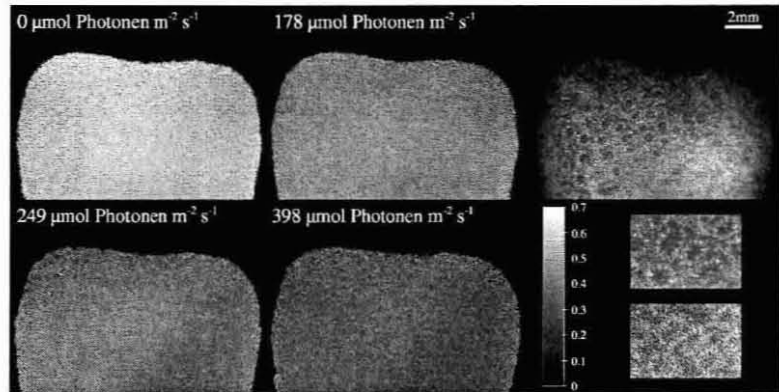


Abbildung 8.6: Zweidimensionale Verteilung der Quantenausbeute ϕ_p bei vier verschiedenen Lichtstärken und Intensitätsbild der Fluoreszenz (oben rechts). Die Aufnahmen unten rechts zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Korallenpolypen.

wurden nacheinander drei verschiedene Lichtstärken als aktinisches Licht auf die Koralle gestrahlt und nach jeweils zehn Minuten wieder eine Aufnahme gemacht (F - und F'_m -Bilder). Danach sind diese Aufnahmen in Bilder der Quantenausbeute umgerechnet worden (ϕ_p -Bilder). Abbildung 8.6 zeigt die Quantenausbeute der dunkeladaptierten Koralle (oben links) und bei den drei verwendeten Lichtstärken. Man erkennt deutlich, daß die Quantenausbeute bei steigender aktinischer Lichtintensität sinkt. Die dunkeladaptierte Koralle zeigt ein durchschnittliches ϕ_p von 0.558. Dieser Wert sinkt bei knapp $400 \frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2 \text{s}}$ auf durchschnittlich 0.314 ab. Die Quantenausbeute zeigt jedoch eine stark heterogene Verteilung, worauf die Verdoppelung der Standardabweichung der Quantenausbeute von 0.028 bei der dunkeladaptierten Messung auf 0.057 bei größter Lichtintensität hinweist und aus den ϕ_p -Bildern deutlich hervorgeht. Insbesondere auf der auf den Aufnahmen rechts gelegenen Seite zeigt die Quanteneffizienz einen besonders starken Rückgang, was darauf zurückzuführen sein kann, daß diese Seite der Koralle vor der Probenahme z.B. durch den Sonnenstand an niedrigere Lichtintensitäten adaptiert war als die restliche Probe. Außerdem ist an den Ausschnittvergrößerungen in Abbildung 8.6 (unten rechts) zu erkennen, daß die Quantenausbeute in den Polypen größer als im umgebenden Skelett ist. Die Umrisse der Polypen mit den Fangarmen zeichnen sich sowohl im Intensitätsbild als auch im ϕ_p -Bild ab. Die gezeigte Ausschnittsvergrößerung hat einen recht

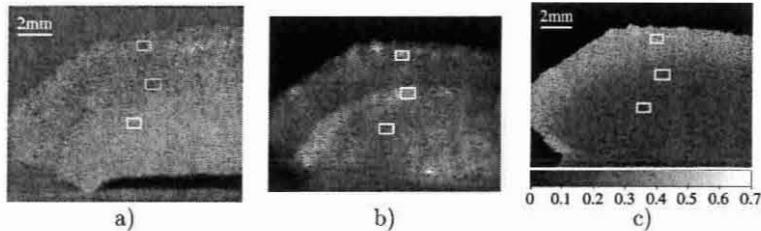


Abbildung 8.7: a) Photo eines Schnitts durch eine Koralle, b) Fluoreszenzintensitätsbild und c) Bild der Fluoreszenzausbeute bei $300 \frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2 \text{s}}$ aktinischem Licht. Weitere Erläuterungen siehe Text.

großen Rauschanteil, der hauptsächlich durch die Aufnahme bei Meßlicht begründet ist. Die Empfindlichkeit der Kamera reicht aus, um ein Meßsignal in der selben Größenordnung wie das Rauschen zu erzielen. Die Intensität des Meßlichts konnte bei den Versuchen nicht weiter erhöht werden, weil dann schon ein photochemischer Effekt sichtbar wurde. Eine längere Integrationszeit der Kamera als die möglichen 450 ms würde die Qualität der Aufnahmen erheblich steigern. Als ein weiterer einschränkender Faktor ist die maximale Intensität des mit 24 LEDs bestückten Lichtrings zu erwähnen. Bei vereinzelt Aufnahmen lag die Vermutung nahe, daß der erzeugte Sättigungspuls nicht stark genug war, um alle Reaktionszentren des Photosystems mit Ladungsträgern zu fluten. Da die LEDs von Hand auf einen Lichtspot von etwa 3 cm Durchmesser in 6 cm Entfernung fokussiert werden konnten, kann mit einem präzise fokussierten Lichtring der Durchmesser des Spots aufgrund des Abstrahlwinkels der LEDs theoretisch halbiert und somit die Bestrahlungsstärke vervierfacht werden.

In einem zweiten Versuch soll die Quanteneffizienz der endolithischen Algen im Korallenskelett gemessen werden. Hierfür wurde die Fluoreszenz an einem Schnitt durch die Koralle gemessen. Abbildung 8.7 zeigt das Photo der Probe im Querschnitt, ein Intensitätsbild der Chlorophyll-Fluoreszenz und ein Bild der Quanteneffizienz. Die in der Koralle befindlichen Algen sind als verschiedenfarbige Streifen erkennbar. Ein bräunlicher, etwa drei Millimeter breiter Streifen an der Außenseite beherbergt die Polypen. Darunter befindet sich ein knapp ein Millimeter breiter grünlicher Streifen aus Algen. Auch bei dieser Messung erfolgte zunächst eine Messung der dunkeladaptierten Koralle gefolgt von Aufnahmen bei acht verschiedenen Lichtintensitäten. Das Bild der Quantenausbeute bei einer Lichtstärke von $300 \frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2 \text{s}}$ zeigt drei Streifen mit von außen nach innen abnehmenden ϕ_p -Werten. Der in Abbildung 8.7a äußere braune Streifen bildet im ϕ_p -Bild 8.7c ein Gebiet

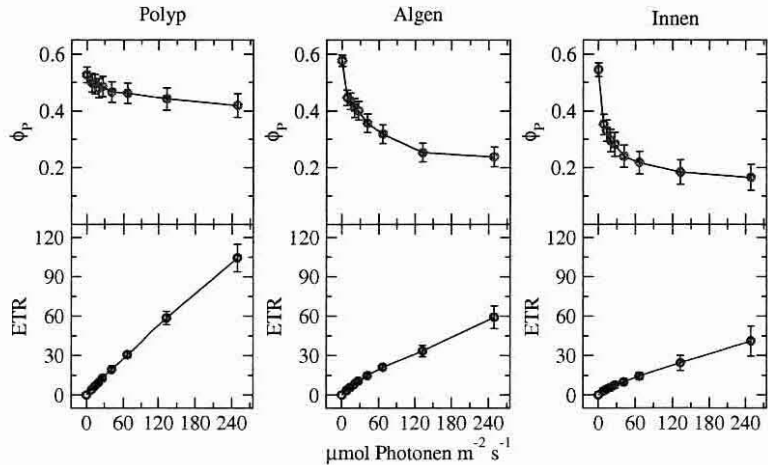


Abbildung 8.8: Quanteneffizienz ϕ_p und Elektronentransportrate ETR in Abhängigkeit der Beleuchtungsstärke von drei unterschiedlichen Stellen an einem Schnitt durch eine Koralle.

verhältnismäßig homogener Verteilung, der bei der gewählten Skalierung in grün dargestellt ist. Darunter befindet sich ein schmaler blauer Streifen, der die Quantenausbeute der Algen repräsentiert. Im Intensitätsbild der Fluoreszenz sind die Algen als heller Streifen erkennbar. Die hellen Stellen an der Außenseite der Koralle sind die Polypen.

Zur Visualisierung der Auswertung sind drei Regionen in Abbildung 8.7 eingezeichnet, deren durchschnittliche Quantenausbeute und die Elektronenflußrate bestimmt und in den Graphen von Abbildung 8.8 dargestellt worden sind. Eine Region ist um einen Polypen im äußeren braunen Streifen gelegt, die zweite um ein stark fluoreszierendes Gebiet der endolithischen Algen und das dritte im weniger stark fluoreszierenden Innern der Koralle. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Quantenausbeute der endolithischen Algen im Innern der Koralle eine wesentlich größere Dynamik in Abhängigkeit von der Lichtintensität zeigt als die der Polypen. Schon bei geringer Bestrahlungsstärke fällt ϕ_p stark ab. Ein Grund hierfür ist, daß die Algen normalerweise einer wesentlich geringeren Lichteinstrahlung ausgesetzt sind und sich ihr Photosystem auf diese Bedingungen eingestellt hat. Dies ist auch an der Elektronenflußrate erkennbar, die in etwa halb so groß ist wie in den Polypen, und damit verdeutlicht, daß das Photosystem der Algen die Flut von erzeugten Ladungsträgern nicht bewältigen kann, also der PC-

Pool im Verhältnis zu dem der Polypen kleiner ist. Im Innern der Koralle ist die stärkste Reduktion der Quanteneffizienz zu beobachten. Die gewählte Region zeigt dunkeladaptiert denselben ϕ_p -Wert wie die äußeren Schichten, aber er fällt schon bei der kleinsten Lichtstufe stark ab. Die hier gewählte zweidimensionale Darstellung der Chlorophyll-Fluoreszenz kann nur einen Eindruck vom Informationsgehalt der gemessenen Daten vermitteln. Besser geeignet zur Darstellung der Bildserien ist eine Filmsequenz, mit der besonders dynamische Bereiche identifiziert werden können. Ein Beispiel hierfür ist auf der Internetseite der Mikrosensorgruppe im Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie (<http://www.mpi-bremen.de/~bgrunwal>) zu finden.

Kapitel 9

Zusammenfassung

Die Entwicklung von Kamerasystemen für die Messung von Chlorophyll-Fluoreszenz hat sich seit der Verfügbarkeit entsprechend empfindlicher CCD-Kameras rapide entwickelt. Jedoch weist der Aufbau existierende Systeme eine unzureichende Flexibilität zur Untersuchung verschiedener Lebensräume in der marinen Mikrobiologie auf und flexiblere Kamerasysteme sind nicht empfindlich genug, um die dunkeladaptierte, minimale Fluoreszenzausbeute direkt messen zu können. In dieser Arbeit ist es gelungen, ein Kamerasystem zu entwickeln, das entsprechend flexibel im Aufbau ist und auch die nötige Empfindlichkeit besitzt.

Das hier vorgestellte Kamerasystem ist in der Lage, die Fluoreszenzausbeute des Chlorophylls von phototrophen, marinen Organismen örtlich und zeitlich aufgelöst aufzunehmen und in zweidimensionale Darstellungen von wesentlichen physiologischen Parametern, wie z.B. der Quantenausbeute und Elektronenflußrate des Photosystems umzurechnen. Das System beruht auf der Anregung von Chlorophyll-Fluoreszenz mit blauen LEDs und der Aufnahme des emittierten Lichts mit einer CCD-Kamera. Die Trennung von Anregungslicht und Fluoreszenz geschieht über einen optischen Langpaßfilter. Man kann über eine Pulsweitenmodulation das photochemisch inaktive Meßlicht, die Sättigungspulse und das aktinische Licht mit derselben Lichtquelle erzeugen, womit keine zusätzliche Lichtquelle zur Messung verwendet werden muß.

Die Ortsauflösung des Systems ist einzig durch die verwendete Optik limitiert. In den Anwendungen ist eine Makrolinse verwendet worden, mit der eine Ortsauflösung von etwa $20\ \mu\text{m}$ pro Pixel möglich war. Es ist allerdings auch möglich, mit Hilfe der Optik eines Mikroskops örtliche Auflösungen im Mikrometerbereich zu erzielen. Je nach Ausführung des Mikroskops kann dabei sogar das Anregungslicht über den Lichtpfad des Mikroskops auf die Probe fokussiert werden. Dies macht eine Charakterisierung der Photosyn-

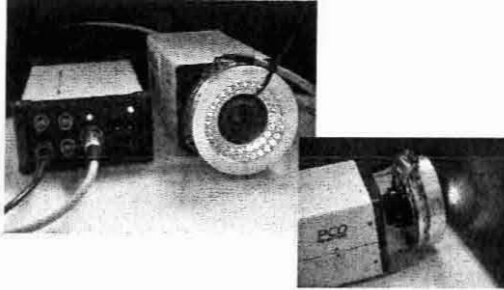


Abbildung 9.1: Optimierte Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenz von Chlorophyll mit Hilfe von 54 fokussierten blauen LEDs.

these auf der Ebene einzelner Zellen möglich.

Mit diesem System ist es gelungen, Chlorophyll-Fluoreszenz von Korallen und den in ihnen lebenden Algen bei unterschiedlichen Lichtstärken aufzunehmen und physiologische Daten über das Photosystem der Organismen zu gewinnen. Es können alle bisher bekannten Fluoreszenzparameter aufgenommen werden und kontinuierlich dargestellt werden. Im Vergleich zu vielen anderen Systemen ist es vor allem möglich, die Fluoreszenzausbeute F_0 dunkeladaptierter Organismen zu messen. Da dieses Fluoreszenzsignal sehr klein ist, müssen diese Aufnahmen für einige Anwendungen an der Detektionsgrenze des verwendeten CCD-Chips aufgenommen werden.

Mit den Messungen an einer Koralle von außen und an einem Schnitt konnte das erste Mal die bereits vermutete heterogene Verteilung der Quantenausbeute des Photosystems zweidimensional visualisiert werden. Die Photosynthese betreibenden Polypen der Koralle zeigten höhere Werte als ihre Umgebung. Am Korallenschnitt konnte die Dynamik der Quantenausbeute endolithischer Algen bei verschiedenen Lichtstärken visualisiert werden.

Die in den gezeigten Messungen eingesetzte Lichtquelle wird künftig durch einen lichtstärkeren LED-Ring ersetzt, der aus einem Aluminiumring zur Kühlung der LEDs besteht wie er in Abbildung 9.1 gezeigt ist. Der Ring kann 54 LEDs aufnehmen, die durch die Bohrungen in einem Abstand von 45 mm fokussiert werden. Hiermit kann etwa eine doppelt so große Bestrahlungsleistung erzeugt werden wie zuvor. Diese Lichtquelle macht die Messung über einen größeren dynamischen Bereich der Fluoreszenzausbeute möglich. Eine weitere Verbesserung wird im Bereich der bildverarbeitenden Software geschehen, deren Potential trotz der guten Bedienbarkeit noch nicht ausgeschöpft ist. Beispielsweise ist eine Online-Darstellung der Quanteneffizienz und der Elektronenflußrate genauso geplant wie automatisierte Meßabläufe.

Literaturverzeichnis

- [1] P. G. Falkowski, J. A. Raven, Aquatic Photosynthesis, Blackwell Science, London, 1997.
- [2] H. Du, R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan, J. S. Lindsey, PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry, Photochemistry and Photobiology 68 (1998) 141–142.
- [3] H. Kautsky, A. Hirsch, Neue Theorie zur Kohlensäureassimilation, Naturwissenschaften 19 (1931) 96.
- [4] H. Kautsky, W. Appel, H. Amann, Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. 13. Die Fluoreszenzkurve und die Photochemie der Pflanze, Biochemische Zeitschrift 332 (3) (1960) 277–292.
- [5] U. Schreiber, U. Schliwa, W. Bilger, Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer, Photosynthesis Research 10 (1-2) (1986) 51–62.
- [6] B. Genty, J. M. Briantais, N. R. Baker, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence, Biochimica et Biophysica Acta 990 (1) (1989) 87–92.
- [7] K. Takahashi, K. Mineuchi, T. Nakamura, M. Koizumi, H. Kano, A system for imaging transverse-distribution of scattered-light and chlorophyll fluorescence in intact rice leaves, Plant, Cell and Environment 17 (1) (1994) 105–110.
- [8] K. Siebke, E. Weis, Assimilation images of leaves of *glechoma hederacea*: Analysis of non-synchronous stomata related oscillations, Planta 196 (1995) 155–165.

LITERATURVERZEICHNIS

- [9] K. Oxborough, N. R. Baker, An instrument capable of imaging chlorophyll *a* fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels of organization, *Plant, Cell and Environment* 20 (1997) 1473–1483.
- [10] L. Nedbal, J. Soukupova, D. Kaftan, J. Whitmarsh, M. Trilek, Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light, *Photosynthesis Research* 66 (1-2) (2000) 3–12.
- [11] L. Nedbal, J. Soukupova, J. Whitmarsh, M. Trilek, Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality, *Photosynthetica* 38 (4) (2000) 571–579.
- [12] N. R. Baker, K. Oxborough, T. Lawson, J. I. L. Morison, High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves, *Journal of Experimental Botany* 52 (356) (2001) 615–621.
- [13] I. Berman-Frank, P. Lundgren, Y.-B. Chen, H. Küpper, Z. Kolber, B. Bergman, P. Falkowski, Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *trichodesmium*, *Science* 294 (5546) (2001) 1534–1537.
- [14] G. Holst, B. Grunwald, Luminescence lifetime imaging with transparent oxygen optodes, *Sensors and Actuators B* 74 (1-3) (2001) 78–90.

Teil III

Zusammenfassung

Zusammenfassung

In der marinen Mikrobiologie werden Meßsysteme mit hoher örtlicher Auflösung unter anderem bei der Untersuchung von Stoffkreisläufen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften eingesetzt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Sensoren für Brechungsindex und Chlorophyll-Fluoreszenz sind besonders für phototrophe, d.h. photosynthetisch aktive, Organismen geeignet, um einerseits die optischen Eigenschaften ihrer Umgebung zu charakterisieren und andererseits zweidimensionale Verteilungen der photosynthetischen Aktivität zu messen.

Der auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz basierende faseroptische Brechungsindexsensor ist in der Lage, den Brechungsindex mit einer Empfindlichkeit von 10^{-4} RIU bei einer Ortsauflösung von weniger als 1 mm zu messen. Er konnte erfolgreich bei der Messung von Profilen im äußeren Gewebe einer Ascidie eingesetzt werden und zeigte ein Maximum in unmittelbarer Umgebung von Algen, die in diesem Gewebe eingebettet sind. Dadurch ist das zuvor in anderen Arbeiten gemessene Maximum der Lichtintensität erklärbar. Außerdem ist ein System zur zweidimensionalen Darstellung des Brechungsindex vorgeschrieben worden, mit dem eine Ortsauflösung an der theoretischen Grenze von $5 \mu\text{m}$ möglich ist bei potentiell besserer Brechungsindexauflösung. Beide Sensoren eignen sich hervorragend zur Analyse der physikalischen Eigenschaften in der Umgebung von phototrophen Organismen.

In einem zweiten Ansatz ist ein Kamerasystem zur Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz entwickelt worden. Hiermit ist es möglich, die Fluoreszenzausbeute von Mikroorganismen bei unterschiedlichen Lichtintensitäten zu bestimmen. Mit den Ergebnissen können Aussagen über die Effektivität der betriebenen Photosynthese getroffen werden. Im Gegensatz zu einigen existierenden bildgebenden Chlorophyll-Fluoreszenz-Meßsystemen kann mit der hier vorgestellten Lösung auch die minimale Fluoreszenzausbeute F_0 bestimmt werden. Dadurch ist es möglich, detaillierte physiologische Informationen über das untersuchte Photosystem bei Dunkelanpassung zu messen und somit die maximal mögliche Photosyntheserate zu bestimmen. Die Orts-

auflösung hängt maßgeblich von der verwendeten Kameraoptik ab und kann mit Hilfe eines Mikroskops bis zu $1\ \mu\text{m}$ pro Pixel betragen. In den vorgestellten Anwendung der Fluoreszenzmessung bei Korallen wurde eine Ortsauflösung von ungefähr $20\ \mu\text{m}$ erzielt. Das System wurde bei der Bestimmung der Quanteneffizienz von Korallen und in ihr lebenden Algen angewendet. Es konnte ein großer Unterschied in der Dynamik der Effizienz zwischen Korallenpolyphen und den Algen ermittelt werden. Die an hohe Lichtintensitäten gewöhnten Polyphen zeigen einen leichten Rückgang der Effizienz mit steigender Lichtintensität, wohingegen die Effizienz der Algen, die im Innern der Koralle normalerweise nur geringer Lichtmengen ausgesetzt sind, schon bei der kleinsten gewählten Lichtintensität zurückgeht.

Beide vorgestellten Systeme haben gezeigt, daß die Entwicklung von optischen Meßgeräten zu neuen Anwendungsfeldern in der marinen Mikrobiologie geführt haben. Aufgrund des interdisziplinären Ansatzes der Arbeit hat sowohl die technische Entwicklung als auch deren Anwendung in realen Meßaufgaben voneinander profitiert. In der Arbeitsgruppe Mikrosensoren des Max-Planck-Instituts für marine Mikrobiologie werden die entwickelten Systeme eingesetzt und weiter optimiert.

Publikationen

Rezensierte Artikel

G. Holst und B. Grunwald, „Luminescence lifetime imaging with transparent oxygen optodes,“ *Sensors and Actuators B* 74 (1-3), S. 78-90 (2001).

B. Grunwald und G. Holst, „Fibre optic refractive index microsensor based on white-light SPR excitation,“ *Sensors and Actuators A*, eingereicht.

B. Grunwald, M. Kühl und G. Holst, „An imaging system for mapping variable chlorophyll fluorescence of phototrophic organisms and tissues,“ *Optics Express*, eingereicht.

M. Kühl, G. Holst, B. Grunwald, A. Salih und A.W.D. Larkum, „The micro-environment of oxyphotobacteria in symbiosis with the dedemnid ascidian *Diplosoma virens*. I. Distribution of symbionts and the dynamics of oxygen around and within the tissue,“ *Marine Microbiology*, in Vorbereitung.

Konferenz Proceedings

G. Holst, B. Grunwald, I. Klimant und M. Kühl, „Luminescence lifetime imaging system using imaging fibers to measure 2D distribution of O₂ in biological samples,“ *Fiber Optic Sensor Technology and Applications*, M. A. Marcus and B. Culshaw (Hrsg.), *Proceedings of SPIE Vol. 3860*, S. 154-163 (1999).

B. Grunwald und G. Holst, „Fiber optic microsensor for refractive index and salinity based on SPR,“ *Fiber Optic Sensor Technology and Applications*, M. A. Marcus und B. Culshaw (Hrsg.), *Proceedings of SPIE Vol. 3860*, S. 472-479 (1999).

G. Holst und B. Grunwald, „Transparent oxygen optodes in environmental applications at fine scale as measured by luminescence lifetime imaging,“ *Advanced Environmental Sensing Technology II*, T. Vo-Dinh und S. Büttgenbach (Hrsg.), *Proceedings of SPIE Vol. 4576*, S. 138-148 (2002).

B. Grunwald und G. Holst, „SPR fibre optic microsensor – System and Applications,“ *Fiber Optic Sensor Technology and Applications*, M. A. Marcus und B. Culshaw (Hrsg.), *Proceedings of SPIE Vol. 4578*, S. 96-107 (2002).

Posterpräsentationen

G. Holst und B. Grunwald, „Luminescence lifetime imaging with transparent oxygen optodes,“ *Europt(r)ode V – 5th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors*, Lyon, Frankreich (1998).

B. Grunwald und G. Holst, „Fibre optic microsensor for high spatial resolution refractive index measurements based on SPR,“ *SPIE Conference on Applications of Optical Fiber Sensors*, Glasgow, Schottland (2000).

B. Grunwald, „SPR Mikrosensor als universelle Plattform für Chemo- und Biosensoren,“ *Deutsches BioSensor Symposium*, Tübingen (2001).

St. Bechtold, B. Grunwald und R. Laur, „Modellierung und Simulation von Interfaceschaltungen für frequenzadaptive Herzschrittmacher“ *5. Workshop, Methoden und Werkzeuge zum Entwurf von Mikrosystemen*, Paderborn (1996).

Lebenslauf

von Björn Grunwald, geboren am 17. April 1972 in Bremen

Berufserfahrung

- seit 06/2003 Postdoc-Stipendium der Max-Planck-Gesellschaft am Max-Planck-Institut (MPI) für marine Mikrobiologie, Bremen
- 01/2000-05/2003 Doktorandenstelle am MPI für marine Mikrobiologie
Thema der Promotion: *Optoelektronische Meßsysteme hoher örtlicher Auflösung für phototrophe Organismen*
Note: magna cum laude (sehr gut)
- 1994-1998 Gewerbe als Hard- und Softwareentwickler

Studium

- WS 1992-WS 1999 Studium der Elektrotechnik an der Universität Bremen
- 11/1999 Diplomprüfung, Note: 1,5 (sehr gut)
Thema der Diplomarbeit: *Faseroptischer Mikrosensor zur Messung des Brechungsindex nach dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz*, erstellt am MPI für marine Mikrobiologie und dem Institut für elektrische Antriebe, Leistungselektronik und Bauelemente (IALB), Bremen
- 01/1999 Studienarbeit, Note: 1,0 (sehr gut)
Thema: *Untersuchung von Verfahren zur Parametrisierung verschiedener Modelle eines Resonanzsensors mittels Messungen und Berechnungen*, erstellt am Institut für theoretische Elektrotechnik und Mikroelektronik (ITEM), Bremen

01/1997	Projektarbeit, Note: 1,3 (sehr gut) Thema: μ -Mikrophon (Studie zur Messung von Schallwellen mittels eines mikromechanischen Drucksensors), erstellt am Institut für Mikrosensoren, -aktuatoren und -systeme (IMSAS), Bremen
WS 1995	Wahl der Studienvertiefungsrichtung Mikroelektronik/Mikrosystemtechnik
WS 1994-SS 1995	Studium <i>Microelectronics and Computing</i> an der Bournemouth University, Großbritannien
10/1994	Vordiplom, Note: 2,5 (gut)

studienbegleitende Tätigkeiten

01-12/1999	Studentische Hilfskraft am MPI für marine Mikrobiologie Arbeitsbereich: Entwicklung und Test von Baugruppen für optisch-chemische Sensormesssysteme
07-10/1997	Praktikum am Natinal Microelectronics Research Centre (NMRC), Cork, Irland Arbeitsbereich: Charakterisierung und Verbesserung eines Resonanzsensors
10/1995-12/1998	Studentische Hilfskraft in Lehre und Forschung an der Universität Bremen Arbeitsbereich: Erstellung von Makromodellen für die Mikrosystemtechnik, u.a. Modellierung eines aktivitätsgesteuerten Herzschrittmachers
07-10/1993	Praktikum bei der RWE Maschinenfabrik, Bremen Arbeitsbereich: Montage, Test und Reparatur von elektronischen Baugruppen

Zivildienst

07/1991-09/1992	Zivildienst im Kindertagesheim Gröpelingen, Bremen
-----------------	--

Schulausbildung

06/1991	Abitur, Note: 2,0 (gut)
1988-91	Gymnasium am Schulzentrum Horn, Bremen Leistungskurse: Mathematik und Physik