

**MIKROFLUIDISCHES SYSTEM MIT INTEGRIERTER  
MULTISENSORIK FÜR MEHRDIMENSIONALE SCREENINGS  
IN DER MINIATURISIERTEN UMWELTTOXIKOLOGIE**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
**doctor rerum naturalium**  
**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt von

**Frau Dipl.-Ing. Jialan Cao**

aus Shanghai, VR China

Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

Technische Universität Ilmenau

Oktober 2014



Diese Doktorarbeit entstand in der Zeit von Januar 2010 bis September 2014 am Institut für Chemie und Biotechnik Fachgebiet physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik der Technische Universität Ilmenau.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Michael Köhler.

## **Promotionskommission**

<b>Vorsitzender:</b>	Prof. Dr. rer. nat. habil. Uwe Ritter
<b>Gutachter:</b>	Prof. Dr. rer. nat. habil. Michael Köhler Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Schober Dr. rer. nat. Stefan Nagl
<b>Mitglieder:</b>	Dr. rer. nat. Cornelius Schilling Dr. rer. nat. Alexander Groß

**Tag der Einreichung:** 21. Oktober 2014

**Tag der wissenschaftlichen Aussprachen:** 26. März 2015



志于道，據于德，依于仁，游于藝。

孔子(公元前 500 年)

*Richte Deinen Willen auf den Weg, halte Dich an die Tugend, stütze Dich auf die Menschlichkeit, suche Muße in den Künsten.*

Konfuzius (500 v. Chr.)

*Stick strictly to the Way, align with virtue and abide by benevolence in handling matters, and immerse in the six arts.*

Confucius (500 B. C.)

***Für meine Familie***



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Chemie und Biotechnik in der Arbeitsgruppe Physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik in der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaft an der TU Ilmenau.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Köhler, für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas und seinem persönlichen Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Durch seine Diskussionsbereitschaft, konstruktiven Anmerkungen und Hinweise hat er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schober und Dr. Nagl für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie bei Herrn Prof. Dr. Ritter für sein Mitwirken in der Prüfungskommission.

Ich bedanke mich bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium und zusätzliche Sachmittel sowie die Organisation des jährlichen Stipendiatenseminars. Letzteres ermöglichte eine fachliche und fachübergreifende Diskussion mit Stipendiaten aus verschiedensten Forschungsrichtungen und viele interessante Kontakte. Ganz herzlich danke ich in diesem Zusammenhang auch meinem DBU Betreuer Herrn Dr. Hempel für sein großes Engagement diese Arbeit mit voranzutreiben.

Außerdem danke ich dem BMBF für die Unterstützung der Untersuchungen zu den schwermetalltoleranten Bodenbakterien durch das BactoCat Projekt.

Weiterhin danke ich dem Gleichstellungsrat der TU Ilmenau für die finanzielle Unterstützung bei der Teilnahme an verschiedenen internationalen Konferenzen sowie die Bewilligung am einen drei-monatigen Abschlussstipendium.

Mein ganz besonderer Dank gilt Steffen Schneider, der zum einen durch motivierenden Zuspruch, stetige Hilfsbereitschaft bei der Hardware- und Softwareentwicklung sowie durch sorgfältiges Korrekturlesen in hohem Maße zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Großer Dank gebührt der mechanischen Werkstatt des Institutes für Physik der TU Ilmenau für die kreative und exakte Arbeit an vielen kleinen und großen für die Arbeit benötigten Einzelteilen, ohne die die Fertigung des Kompaktaufbaus unmöglich gewesen wäre.

Dr. Jürgen Arning vom UFT Bremen, Nachhaltigkeit in der Chemie, danke ich für die große Unterstützung innerhalb des Themengebietes Toxikologie und für die Möglichkeit weiterführende Kenntnisse in verschiedenen toxikologischen Standardverfahren während eines Besuchs am UFT zu erlangen.

Ganz besonders danke ich Herr Prof. Dr. Wolfbeis an der Universität Regensburg und Herr Dr. Nagl an der Universität Leipzig für die großzügige Bereitstellung von Mikrosensormaterialien und die wissenschaftlichen Diskussionen zum Thema pH- und  $pO_2$ -Auslese in Mikrofluidsegmenten.

Auch Dr. Alexander Groß, Dr. Mike Günther, Dana Kürsten und Andrea Knauer möchte ich danken für ihre Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und technischen Fragen sowie für die fachlichen Diskussionen.

Ein großes Dankschön richtet sich auch an Frances Möller, die mir während meiner Schwangerschaft eine "all around" Unterstützung gegeben hat. Ohne sie wären zahlreiche Experimente nicht zustande kommen können.

Ich danke Karin Martin an der HKI Jena und Katrin Krause an der Universität Jena, die mich in den Jahren der Dissertation mit der Bereitstellung verschiedener Bakterienkulturen, mit ihrem fachlichen Rat und mit Hilfestellungen bei Fragestellungen zur Kultivierung der biologischen Systeme immer unterstützt haben.

Von ganz besonderem Wert für mich ist die Freundschaft, die sich während der Promotionszeit zu meiner ehemaligen Kollegin Anette und Shuning entwickelt hat. Als Freundin konnte ich mich immer auf sie verlassen. Ich danke ihr aufrichtig für die schöne gemeinsame Zeit sowohl während als auch nach der Arbeit.

Ein herzlicher Dank gebührt weiterhin meinen Kolleginnen und Kollegen von der AG physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik für die freundliche Aufnahme sowie gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit, durch die ich meine Promotionszeit in schöner Erinnerung behalten werde.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Geduld, Ausdauer und Ruhe, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder motiviert haben. Ich danke Oda Beckmann, die meine Arbeit akribisch nach Fehlern durchforstet hat.

Zum Schluss ist es mir wichtig meinen Eltern, meinen Kindern und meinem Mann zu danken. Von Herzen möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht und mich auf meinem bisherigen Lebensweg vorbehaltlos unterstützt haben, wodurch sie die Basis für meine persönliche und berufliche Entwicklung schufen. Meine Kinder Leonas und Livia, ich danke Euch, dass Ihr mir täglich ein Lächeln ins Gesicht zaubert. Ich kann es gar nicht in Worte fassen, wie glücklich Ihr mich macht. Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Mann Stefan, durch seinen steten Rückhalt, seinen Zuspruch und seine Liebe hat er in wesentlichen Maßen zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Ihnen widme ich diese Arbeit.



## Kurzfassung

Die globale Belastung der Umwelt mit Schadstoffen stellt ein Problem sowohl für Mensch als auch für Ökosysteme dar. Schadstoffe kommen in der Umwelt selten einzeln, sondern meist in komplexen Gemischen vor. Deshalb nimmt die Diskussion über die Kombinationswirkung von Schadstoffen einen immer größeren Stellenwert ein. Die Größe des mehrdimensionalen Parameterfeldes erschwert die Anwendung toxikologischer Standardmethoden und macht die Einführungen neuer Screeningmethoden notwendig. Der Einsatz der Mikrosystemtechnik im Bereich der Biotechnologie bietet erhebliche Vorteile bezüglich Miniaturisierung und Automatisierung verglichen mit herkömmlichen Verfahren. Das Ziel des Promotionsvorhabens bestand in der Entwicklung eines kompakten, automatisierten Fluidhandling- und Messsystems mit integrierter Multisensorik unter Anwendung des Prinzips mikrosegmentierter Flüsse zur Charakterisierung hochaufgelöster Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Einzel- sowie Kombinationswirkung von Umweltschadstoffen.

Mit den entwickelten Labor- und Kompaktsystemen konnten zwei-, drei- und fünfdimensionale Konzentrationsfelder in Mikrofluidsegmenten erzeugt werden. Die Wirkungen verschiedener Schadstoffkombinationen auf Darmbakterium *Escherichia coli*, Grünalge *Chlorella vulgaris*, Bodenbakterien *Streptomyces tendae* F4, *Streptomyces acidiscabies* E13, *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 und Vertebraten-Zelllinien IPC-81 wurden erfolgreich untersucht.

Durch die Integration von  $pO_2$ -sensitiven Nanobeads in die Mikrofluidsegmente gelang die interaktionsfreie Auslese des segmentinternen  $pO_2$ -Wertes während der Zeit- sowie konzentrationsabhängigen Kultivierung der schwermetalldoleranten Bakterienstämmen *Streptomyces acidiscabies* E13 und *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 in Mikrofluidsegmenten.

Mit den entwickelten Systemen konnten zahlreiche binäre- und ternäre Gemische aus verschiedenen Organismen modellhaft untersucht werden. Es konnten Datensätze zu hochaufgelösten Einzelwirkungs- und Kombinationsscreenings der Verbindungsklassen Phenole, ionische Flüssigkeiten, Schwermetalle, Antibiotika, Herbizide, Fungizide, Medikamente (ACE-Hemmer und CSE-Hemmer), Ernährungsbestandteile und Metallnanopartikel anhand der Endpunkte Wachstum, Autofluoreszenz sowie der Änderung der Lumineszenzintensität von  $pO_2$ -sensitiven Nanobeads mittels eines 2-Kanal-Mikrodurchflussfluorimeters und eines 4-Kanal-Mikrodurchflussphotometers gewonnen werden.

Sowohl aus hochaufgelösten Einzelwirkungsscreenings als auch aus mehrdimensionalen Screenings der Mikrofluidsegmente konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Die Versuchsergebnisse demonstrieren bereits die Einsatzfähigkeit der Kompaktanordnung und das große Potential der tropfenbasierten Mikrofluidik für toxikologische Multiparameter-Screenings. Das entwickelte System bildet eine wichtige Grundlage für ein marktfähiges Kompaktgerät in der miniaturisierten Ökotoxikologie.



## Abstract

One of the elementary goals of human health care and sustainable environmental management is protecting organisms from the damaging effects of toxic substances. Hazard assessments often rely on means of quantifying effects caused by a single substance, rather than by assessing the effects of several chemicals present at the same time. In reality, however, organisms are exposed to a complex and always fluctuating mixture of substances. Experimental investigations become exponentially more complex due to dimensionality. Thus, that each additional involved substance requires a tremendous amount of further investigation. Conventional toxicological methods cannot adequately address this challenge. New techniques are therefore required for allowing investigations with larger sets of samples, with lower consumption of chemicals and biological materials, and within a reasonable timeframe. Such a possibility is offered by the application of microfluidics. The aim of this work is to develop a compact, automated fluid-handling and measurement system with integrated multi-sensors utilizing the segmented flow method in order to characterize highly-resolved dose-response relationships for single- and combined effects of environmental harmful substances.

With the developed lab- and compact systems, it is possible to generate a microfluid segment series for the determination of two, three and five-dimensional concentration fields. Successful investigations of different combinations of substances were performed on *Escherichia coli*, leukemia cells IPC-81, *Streptomyces tendae* F4, *Streptomyces acidiscabies* E13, *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 and the green algae *Chlorella vulgaris*.

Through the integration of pO<sub>2</sub>-sensitive nanobeads inside microfluid segments, a simultaneous, non-invasive readout of the segment internal pO<sub>2</sub>-development during the time and concentration dependent cultivation process of the heavy metal-tolerant bacteria *Streptomyces acidiscabies* E13 and *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 inside microfluid segments was achieved.

Using this approach a rapid analysis of interferences among drugs of the substance classes phenols, ionic liquid, heavy metal ions, antibiotics, herbicides, fungicides, drugs based on ACE or CSE inhibitors, food ingredients and metal nanoparticles can be performed as well as the fast and precise determination of the combined substance toxicity. Therefore, the end points of growth, autofluorescence signal, and the segment-internal pO<sub>2</sub>-change were obtained via a two-channel micro flow-through fluorimeter and a four-channel micro flow-through photometer.

From both of the highly-resolved dose-response relation of single substances and the multi-dimensional screenings, various unexpected effects were found. The results have demonstrated the applicability of the developed compact system and the huge potential of the droplet-based microfluidic technique for miniaturized screenings in environmental toxicology and drug development as well as related fields.



## Publikationen zur Dissertation/List of Publications

**J. Cao**, J. M. Köhler, "Droplet-based Microfluidics for Microtoxicological Studie", Review, Journal Eng. Life Sci., **2015**, DOI:10.1002/elsc.201400074

**J. Cao**, S. Nagl, E. Kothe and J.M. Köhler, "Application of oxygen sensor microparticles for monitoring bacterial growth and characterization of dose/response functions in microfluidic screenings", Microchim Acta, **2015**, 182(1), 385-394

**J. Cao**, R. Schultheiß, S. Schneider, A. Schober, J.M. Köhler and G.A. Groß "'DROP-BY-DROP' - TOOLS FOR DROPLET-BASED MICRO-FLUIDIC PROCESSING", Microsyst Technol., **2015**, 21, 539-548

**J. Cao**, D. Kürsten, A. Funfak, S. Schneider and M. Köhler, "Characterization of Combinatorial Effects of Toxic Substances by Cell Cultivation in Micro Segmented Flow" (Title of Book: Micro-Segmented Flow for Chemical and Biological Applications), Publisher: Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering Springer, **2013**, 203-230, ISBN 978-3-642-38780-7

**J. Cao**, J. Goldhan, K. Martin and J. M. Köhler, "Investigation of mixture toxicity of widely used drugs caffeine and ampicillin in the presence of an ACE inhibitor on bacterial growth using droplet-based microfluidic technique", Green Processing and Synthesis, **2013**, 2(6), 591-601

**J. Cao**, D. Kürsten, K. Krause, E. Kothe, K. Martin, M. Roth and J.M. Köhler, "Application of Micro-Segmented Flow for Two-dimensional Characterization of the Combinatorial Effect of Zinc and Copper Ions on Metal-tolerant *Streptomyces* Strains", Appl. Microbiol. Biotechnol., **2013**, 97(20), 8923-8930

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider and J. M. Köhler, "Stimulation and Inhibition of Bacterial Growth by Caffeine Dependent on Chloramphenicol and a Phenolic Uncoupler—A Ternary Toxicity Study Using Microfluid Segment Technique", J. Biomed. Nanotechnol., **2012**, 8(5), 770-778

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, A. Knauer, P. M. Günther and J. M. Köhler, "Uncovering toxicological complexity by multi-dimensional screenings in micro segmented flow: Modulation of antibiotic interference by nano particles", Lab Chip, **2012**, 12, 474-484



# Inhaltverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Motivation .....	1
1.2	Ziel- und Aufgabenstellung.....	4
<b>2</b>	<b>Wissenschaftliche Grundlagen</b> .....	<b>7</b>
2.1	Allgemeine Prinzipien und Konzepte der Ökotoxikologie .....	7
2.2	Grundlagen der segmentbasierten Mikrofluidik .....	12
2.3	Vorteile des segmentierten Flusses.....	15
2.4	Segmentbasierte Mikrofluidik für toxikologische Untersuchungen.....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1	Chemikalien, Lösungen und Geräte.....	21
3.2	Mikrofluidsysteme .....	28
3.2.1	Laboranordnung des mikrofluidischen Systems.....	29
3.2.2	Kompaktes mikrofluidische System.....	30
3.2.3	Adressierung von Konzentrationsräumen in Mikrofluidsegmenten .....	32
3.2.4	Segmenterkennung und Datenverarbeitung.....	36
3.3	Multisensorik unter mikrofluidischen Bedingungen .....	37
3.3.1	Mikrodurchflussphotometrie .....	38
3.3.2	Mikrodurchflussfluorimetrie.....	40
3.3.3	Optische Sensorpartikel.....	42
3.4	Leukämie-Zelllinien IPC-81 im Mikrofluidsegment.....	45
3.4.1	Einbringung und Kultivierung .....	45
3.4.2	Toxizitätstest.....	46
3.4.3	Referenzmessung in Mikrotiterplatten.....	46
3.5	Schwermetall-tolerante Mikroorganismen <i>Streptomyces acidiscabies</i> E13, <i>Streptomyces tendae</i> F4 und <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> Ur PLO1 im Mikrofluidsegment .....	47
3.5.1	Einbringung und Kultivierung .....	47
3.5.2	Wachstumsstudien und Toxizitätstest.....	48
3.6	Umweltorganismus <i>Chlorella vulgaris</i> im Mikrofluidsegment .....	50
3.6.1	Einbringung und Kultivierung .....	50
3.6.2	Toxizitätstest.....	50
3.7	Modellorganismus <i>E. coli</i> im Mikrofluidsegment.....	52
3.7.1	Einbringung und Kultivierung .....	52

3.7.2	Toxizitätstest .....	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>55</b>
4.1	Verifikation des Mikrofluidsystems .....	55
4.1.1	Untersuchung des Signal–Rausch-Verhältnisses des Mikrodurchflussfluorimeters .....	55
4.1.2	Charakterisierung des Kompaktaufbaus .....	56
4.1.3	Systemcharakterisierung des Mikrofluidsystems .....	59
4.2	Toxizitätstests im Mikrofluidsegment mit IPC-81 Zellen .....	67
4.2.1	Wachstumskinetik.....	67
4.2.2	Einzelwirkungsscreenings .....	68
4.3	Erfassung der Stoffwechselaktivität durch ins Mikrofluidsegment integrierte optische pO <sub>2</sub> -Sensorbeads .....	70
4.3.1	Wirkung von Schlauchgeometrie und Atmosphäre auf Lumineszenzintensität im Mikrofluidsegment mit Ps-PtTFPP Partikel .....	70
4.3.2	Segmentinterne pO <sub>2</sub> -Erfassung in verschiedenen Wachstumsstudien.....	71
4.3.3	Charakterisierung der Wirkung von Cu <sup>2+</sup> auf schwermetalltoleranten Stamm <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> UrPLO1 .....	75
4.4	Toxizitätstests im Mikrofluidsegment an schwermetall-resistente Streptomycceten .....	77
4.4.1	Wachstumskinetik.....	77
4.4.2	Hochaufgelöste Dosis-Wirkungsbeziehung für Cu <sup>2+</sup> und Zn <sup>2+</sup> Ionen am <i>Str. acidiscabies</i> E13 und <i>Str. tendae</i> F4.....	78
4.4.3	Kombinationsscreenings binärer Gemische mit <i>Str. tendae</i> F4.....	80
4.5	Toxizitätstests im Mikrofluidsegment mit Umweltorganismus <i>Chlorella vulgaris</i> .....	82
4.5.1	Einzelwirkungsscreening .....	82
4.5.2	Binäre Gemische von Metallnanopartikeln und Atrazin.....	87
4.6	Kombinationsscreenings binärer und ternärer Gemische im Mikrofluidsegment am Modellorganismus <i>E. coli</i> .....	90
4.6.1	Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Beziehung auf einzelne Substanzen .....	91
4.6.2	Kombinationsscreenings binärer Gemische.....	93
4.6.3	Kombinationsscreenings ternärer Gemische.....	96
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>105</b>



---

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>125</b>
	7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	125
	7.2 Abbildungsverzeichnis .....	127
	7.3 Tabellenverzeichnis .....	130
	7.4 Experimentelles .....	131
	7.4.1 Herstellungsvorschrift von Goldnanopartikel.....	131
	7.4.2 Herstellungsvorschrift von Silbernanopartikel .....	132
	7.4.3 Größenverteilung Metallnanopartikel DCS-Messung.....	133
	7.4.4 Konzentrationsberechnung für Metallnanopartikel.....	134
	7.5 Wissenschaftliche Veröffentlichungen .....	135
	7.5.1 Buchbeiträge .....	135
	7.5.2 Zeitschriftenbeiträge .....	135
	7.5.3 Vorträge .....	136
	7.5.4 Poster .....	137
	7.6 Lebenslauf.....	139
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>141</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Chemische Substanzen sind die Bausteine des Lebens. Ohne sie gäbe es kein Leben. Chemische Substanzen können sowohl natürlicher Herkunft als auch künstlich hergestellt sein. Die industriell hergestellte Form der sogenannten „Chemikalien“ sind um uns herum und in uns. Chemikalien bieten viele Vorteile, auf die unsere moderne Gesellschaft in vollem Umfang angewiesen ist. Man findet sie in Kleidung und Kosmetika, in Farben und Arzneimitteln, in Waschmittel oder Zahnpasta und vielem mehr. Neben diesen gewünschten Effekten treten oft auch umwelt- und gesundheitsschädigende Auswirkungen zu Tage [1, 2]. Des Öfteren berichten Medien über Schadstoffe in unserer Nahrung, in der Luft, im Wasser und in unserem Umfeld. Darunter sind beispielsweise Hormoncocktails in Pflege- und Kosmetikprodukten<sup>1</sup>, Pestizide in Obst und Gemüse<sup>2</sup>, sowie Weichmacher<sup>3</sup> und Schwermetalle<sup>4</sup> in Spielzeug.

Eine sichere Verwendung von Chemikalien ist nur möglich, wenn die Wirkung chemischer Substanzen auf Organismen bzw. Umwelt bekannt ist. Diese Problemstellung wird in der Ökotoxikologie behandelt. Bis jetzt haben die Risikobewertungen diverser Einzelexpositionen auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit bereits zur Festsetzung von Umweltstandards geführt [3]. Die explizite und dabei möglichst allgemeingültige Formulierung von Dosis-Wirkung-Beziehungen bleibt bis heute ein offenes Problem, da die Toxizität einer Substanz vom Zielorganismus (z.B. Pflanzen, Mikroben, Wirbellose, Fische, Säugetiere, Menschen), von der Höhe und Dauer der Exposition sowie von Art und Umfang der Resorption durch den Organismus abhängig ist. Darüber hinaus hängt die Empfindlichkeit gegen eine toxische Substanz von der individuellen Entwicklung der Zellen bzw. Organismen ab, die wiederum in ihrer Umwelt einer Vielzahl von Stressoren ausgesetzt sind. Neben biotischen Faktoren, wie Nahrungsverfügbarkeit, Reproduktion, Konkurrenz spielen abiotische Faktoren wie Temperatur, Sauerstoff, pH-Wert und chemischer Stress eine große Rolle [4]. Einige Studien berichten, dass die abiotischen Stressoren die Wirkung von Chemikalien auf Organismen verändern und ähnliche Interaktionen wie Mischungen von Chemikalien ausüben können [5-9]. Schließlich werden aber die Zellen, Gewebe, Organe und ganze Organismen nicht nur einer Substanz, sondern permanent in einer sich ändernden Interaktion unterschiedlichen Stoffgemischen ausgesetzt. Dies führt zwangsläufig zu der Frage nach dem

---

<sup>1</sup> Bund-Studie: Hormonell wirksame Stoffe in Kosmetika, 2013

[http://www.bund.net/themen\\_und\\_projekte/chemie/toxfox\\_der\\_kosmetikcheck/bund\\_studie](http://www.bund.net/themen_und_projekte/chemie/toxfox_der_kosmetikcheck/bund_studie)

<sup>2</sup> Bundesinstitut für Risikobewertung, 2013

<http://www.bfr.bund.de/cm/343/mehrfachrueckstaende-in-obst-und-gemuese-aus-sicht-von-greenpeace.pdf>

<sup>3</sup> Bundesinstitut für Risikobewertung, 2013

[http://www.bfr.bund.de/de/gesundheitsliche\\_bewertung\\_von\\_spielzeug-7527.html](http://www.bfr.bund.de/de/gesundheitsliche_bewertung_von_spielzeug-7527.html)

<sup>4</sup> Bundesinstitut für Risikobewertung, 2012

<http://www.bfr.bund.de/cm/343/gesundheitsliche-risiken-durch-schwermetalle-aus-spielzeug.pdf>

Gefährdungspotential durch mögliche Wechselwirkungen der Substanzen. Im gleichen Rahmen nimmt die Diskussion zu Kombinationswirkungen chemischer Schadstoffe zunehmenden Raum in der Toxikologie und Ökotoxikologie ein, da sie die realen Verhältnisse der Schadstoffexposition des Menschen und der Umwelt widerspiegeln<sup>5</sup> [10-12]. Die Kombination mehrerer Substanzen kann zur einfachen Dosisaddition, Effektaddition und/oder zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten führen, die dann zu einer antagonistischen (schwächenden) oder einer synergistischen (verstärkenden) Wirkung führen [12, 13]. Es wurden verschiedene Konzepte entwickelt, um die Kombinationswirkung mehrerer Noxen abzuschätzen. Diese sind in Kapitel 2.1 zusammengefasst.

Die enorme Vielfalt sowohl der Kombinationswirkungsmöglichkeiten als auch der unterschiedlichen Substanzen lässt jedoch eine Überprüfung der toxischen Wirkungen aller Substanzkombinationen mit bereits existierenden Standardmethoden nicht zu [10, 14]. Außerdem umfasst die Anwendung toxikologischer Standardmethoden die Aufgaben der Probenpräparation, -handhabung und -reaktion bzw. -analyse in jeweils spezifischen Formen und Kombinationen. Enormes Rationalisierungspotential bietet die Probenhandhabung, weil sie besonders zeit- und arbeitsintensiv ist. Aufgrund ihres vorwiegend manuellen Charakters sind diese Tätigkeiten in der Praxis eine große Fehlerquelle. Daher müssen neue Strategien und Konzepte für die Beurteilung der Wirkung von Chemikaliengemischen entwickelt werden.

Europaweit befinden sich derzeit mehr als 100.000 Chemikalien im Umlauf, von denen lediglich etwa 4% auf ihre Umwelt- und Gesundheitsverträglichkeit untersucht wurden. Hinzu kommt, dass die Anzahl neuer synthetisierter Chemikalien rasant wächst. Daher wurde im Jahr 2007 das neue europäische Chemikaliengesetz REACH verabschiedet, um dieses gewaltige Problem in den Griff zu bekommen. **REACH** steht für „**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemicals“, also die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien. Mit der Einführung ist die Industrie nachträglich verpflichtet, Daten über die Umwelt- und Gesundheitsfolgen von circa 30.000 Alt-Chemikalien bis 2018 vorzulegen, von denen mindestens eine Tonne pro Jahr in Europa produziert oder importiert wird<sup>6</sup>. Gefährliche Stoffe bzw. Stoffe mit hohem Risikopotential werden nicht mehr zugelassen. Das betrifft vor allem die Chemikalien, die als „besonders besorgniserregend“ klassifiziert sind, wie z.B. persistente, bioakkumulierende, toxische (PBT) Stoffe, kanzerogene, mutagene und reproduktionstoxische (CMR) Stoffe, sehr persistente, sehr bioakkumulierende (vPvB) Stoffe sowie endokrine Substanzen [15, 16].

Das Chemikaliengesetz REACH macht sowohl die Entwicklung alternativer Prüfmethode zum Tierversuch als auch schnellere und bessere Testverfahren dringend notwendig. In der Toxikologie wurden noch vor wenigen Jahrzehnten viele Tierexperimente zur Untersuchung von Arzneimitteln und Chemikalien durchgeführt. Inzwischen geht die Zahl der Tierversuche in den meisten Bereichen zurück. Durch das gestiegene ökologische Umweltbewusstsein und langjährige staatliche Förderung von zahlreichen Forschungsprojekten ist die Entwicklung der

---

<sup>5</sup> European Commission, Environment, Chemicals: State of the Art Report on Mixture Toxicity

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report\\_mixture\\_toxicity.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf)

<sup>6</sup> Umwelt Bundesamt Informationsportal,

<http://www.reach-info.de/glossar.htm>

Alternativen zum Tierversuch gut vorangekommen. Aktuell kann die Mehrheit der Substanzen durch *In-vitro*-Tests (Zell- und Gewebekulturen, biochemischen Verfahren etc.) nicht nur auf mögliche toxische Effekte sondern auch im Hinblick auf ihre Wirkungsweise erforscht werden.

Ein weiterer Ansatz sind toxikologische Tests in Hochdurchsatz-Screening-Systemen, die mit minimalem Material- und Energieverbrauch und in kürzester Zeit größere Datensätze erzeugen können [17]. Entscheidend bei all diesen Anwendungen ist, dass sie mit herkömmlichen Analysemethoden nur relativ zeitintensiv durchzuführen sind oder aufgrund des hohen benötigten Probenvolumina kostenintensiv sind oder gar nicht erst durchgeführt werden können. Aus diesen Gründen sind in den letzten Jahren erhebliche Anstrengungen unternommen worden, um Analysegeräte sowie Bio- bzw. Umweltmonitoringsysteme zu entwickeln, die mit wenigen Mikro- bis Nanolitern als Probevolumina auskommen, schnelle Resultate ermöglichen und über eine einfache und damit handhabungssichere Technik verfügen.

Die in der Pharmaindustrie bereits standardisierte und automatisierte Nano- (NTP) und Mikrotiterplatten (MTP)-Workstation sind im Prinzip anwendbar für Analyse-, Synthese- und Screeningapplikationen. Die Probenvolumina reichen von einigen hundert Nanolitern bis in den unteren Mikroliterbereich. Heutige Standards in der Pharmaforschung setzen Mikrotiterplatten mit 384, 1536 oder 3456 Well-Positionen ein. Damit ist eine parallelisierte Erzeugung und Analyse größerer Datensätze möglich [18, 19]. Nicht nur in der Pharmaindustrie, sondern auch in der Ökotoxikologie werden MTP mit vorzugsweise 96 Well-Position für die Durchführung verschiedener Assays und Bioprozesse eingesetzt [20-22]. Nachteile dieser Methoden sind neben dem großen technischen Aufwand noch Vermischungs-, Benetzungs- und Verdunstungsprobleme aufgrund der geringen Probenvolumina [23].

Neben den MTP- und NTP-Methoden stellt der Einsatz der tropfenbasierten Mikrofluidik eine zukunftsweisende Alternative dar [24-26]. Mikrofluidische Plattformen ermöglichen den Einsatz der Lab-on-a-Chip (LoC) Technologie, welche die Grundlage für die Miniaturisierung von Laborverfahren für chemische Reaktionen und biologische Prozesse bietet. Tropfenbasierte Mikrofluidik ist ganz besonders bei Multiparameterproblemen, die aufgrund der großen Anzahl an Kombinationsvarianten mit herkömmlichen Labormethoden nicht mehr lösbar sind, eine sehr ressourcenschonende, ökonomische und erfolgversprechende Technik.

Für diese Arbeit konnte nach einer umfassenden Recherche kein standardisiertes, automatisiertes Gerät auf Basis der segmentbasierten Mikrofluidik für die Miniaturisierung von Ökotests auf dem Markt gefunden werden. Es bietet sich an, die Anwendung mikrosegmentierter Flüsse auf automatisierte Mehrkomponenten-Screenings in der Ökotoxikologie zu erforschen und aus dem vorhandenen Laboraufbau ein marktreifes Kompaktgerät zu entwickeln [27].

Eine entsprechende Zielstellung ist, konventionelle ökotoxikologische Standardverfahren, sowie die MTP- und NTP-Technik mit zusätzlichen und neuen Erkenntnissen - gewonnen aus hochaufgelösten Einzelwirkungsscreenings und mehrdimensionalen Screenings in Mikrofluidsegmenten - zu unterstützen.

### 1.2 Ziel- und Aufgabenstellung

In Abschnitt 1.1 wird beschrieben, wie groß das Interesse der wissenschaftlichen Forschung im Bereich Toxikologie und Ökotoxikologie an der Untersuchung von Kombinationswirkungen von Substanzgemischen ist. Die Mikroreaktionstechnik und die Methode des segmentierten Flusses besitzen ein großes Potential zur Generierung mehrdimensionaler Konzentrationsfelder zur Analyse von Kombinationswirkungen potentieller Umweltschadstoffe.

Auf dem momentanen Entwicklungsstand findet man viele Forschungsberichte, die sich mit dem High-Throughput-Screening mittels Mikro- und Nanotechnologie befassen [28-33]. Jedoch waren zu Beginn der Arbeit keine Veröffentlichungen bekannt, welche die Mikrofluidsystementwicklung für die Analyse der Kombinationswirkung von Schadstoffgemischen in der miniaturisierten Ökotoxikologie zum Thema hatten. Die Einsetzbarkeit dieser Technik für ein- und zweidimensionale Konzentrationsfelder zur Analyse von Kombinationswirkungen wurde erstmals in der Dissertation von A. Funfak nachgewiesen [27].

Das Ziel des Promotionsvorhabens besteht in der Entwicklung eines kompakten, automatisierten Fluidhandling- und Messsystems mit integrierter Multisensorik unter Anwendung des Prinzips mikrosegmentierter Flüsse zur Charakterisierung hochaufgelöster Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Einzel- sowie Kombinationswirkung von potentiellen Umweltschadstoffen. Das mikrofluidische Kompaktsystem soll mit einem wirtschaftlich vertretbaren Fertigungsaufwand hergestellt werden können und zeigen, welche toxikologischen Screeningprozesse in einem extrem miniaturisierten Ansatz bei hoher Präzision möglich sind. Dazu sind Messserien mit einigen hundert bis einigen tausend Einzelsträumen vorgesehen.

Um ein automatisiert arbeitendes kompaktes Messsystem für ein miniaturisiertes Mehrparameter-Screening zu realisieren ist ein modulares Systemkonzept mit robusten Schnittstellen erforderlich. Es gilt herauszufinden, welches Pumpensystem, welche Ventile, welche Typen von Schläuchen (Material, Durchmesser) und welche Speichermöglichkeiten für den Kompaktaufbau geeignet sind. Von besonderem Interesse ist dabei auch die Schaffung der Möglichkeit einer multiplen Endpunktbestimmung durch simultane Auslesung eines Mehrparametersatzes in jedem einzelnen Mikrofluidsegment. Dazu sind berührungsfreie und schnell arbeitende lokale Ausleseverfahren und Transducer erforderlich, bei denen unerwünschte Interferenzen mit den zu testenden Substanzen und den Organismen unterdrückt werden können. Dieses Ziel soll durch die Entwicklung eines mikrofluidisches Systems mit optischer Signalübertragung erreicht werden.

Multiparameterscreenings sind notwendig, um Aussagen über Wachstumsverhalten und metabolische Aktivität zu treffen und die möglichen Mechanismen zu verstehen. Auch gibt es bisher keine non-invasiven *in-situ*-Analysen zum segmentinternen Sauerstoffverbrauch während der Zellkultivierung in Nanoliter-Segmenten.

Neben der Entwicklung eines Labormusters für ein produktionstaugliches Kompaktgerät und der Erforschung der Anwendung mikrosegmentierter Flüsse auf automatisierte Mehrkomponenten-Screenings in der Ökotoxikologie ist die Evaluierung des Systems für mindestens zwei ausgewählte Modellorganismen mit unterschiedlichen

Umweltschadstoffklassen ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Die Schadstoffe sollten dabei sowohl einzeln, als auch in Kombination auf verschiedene Organismen einwirken. Mechanismische Fragestellung standen dabei nicht im Vordergrund.

Die Benutzertätigkeit soll sich auf das Probeneinbringen, den Prozess-Start, das Ablesen des Resultats sowie bei evtl. bei längerer Inkubationszeit die Produktauslieferung für spätere Messungen beschränken. Daher sollen automatische Screeningabläufe entwickelt werden, die in der Lage sind, große Segmentserien mit präziser Konzentrationsabstufung der zu testenden Substanzen automatisch zu generieren und das Antwortverhalten von Targetkulturen mit Hilfe unterschiedlicher Endpunkte, die einer miniaturisierten, automatisierten Messung zugänglich sind, zu erfassen. Um eine schnelle Einschätzungen des Gefährdungspotentials sowie Schlussfolgerungen für Einzelwirkung und Schadstoffkombinationen zu ermöglichen, muss ein automatisiertes Auswertungsprogramm entwickelt werden.

Im Vergleich zu den herkömmlichen ökotoxikologischen Methoden hat die Nutzung der Mikrofluidtechnik das Ziel, die Beurteilung einer sehr großen Anzahl von Tests beim Einsatz minimaler Schadstoffmengen zu ermöglichen und eine schnelle Verfügbarkeit von Informationen zu gewährleisten. Aus diesem Kontext ergibt sich die Zielstellung der Arbeit wie folgt:

- Optimierung des vorhandenen Laboraufbaus, Auswahl und Charakterisierung der Methoden für das Fluidhandling und die optische Messtechnik.
- Erstellen der Anforderungsliste, des System- und Schnittstellenkonzepts, Auswahl und Anpassung der Mikrofluidkomponenten für den Aufbau des Kompaktsystems.
  - Abstimmung der Komponenten mit dem Schnittstellenkonzept, unterteilt nach fluidischen, elektrischen und optischen Interfaces unter Berücksichtigung der entsprechenden Signalführung.
  - Integration von mindestens drei Messverfahren für die automatisierte Bewertung der Vitalität der Testorganismen.
  - Entwurf und Integration des Mehrkanal-Mikrodurchflussphotometers für die Trübungsmessung.
  - Entwurf und Integration des Mehrkanal-Mikrodurchflussfluorimeters für die Lumineszenzintensitätsmessung.
  - Auswahl und Integration geeigneter  $pO_2$ -Nanobeads für die *in-situ* Sauerstoffmessung in Mikrofluidsegmenten.
- Charakterisierung des Mikrofluidsystems: Untersuchungen der erreichbaren Messfrequenzen und Messgenauigkeiten anhand der Charakterisierung von Modellfluiden unter den Bedingungen mikrosegmentierter Flüsse.
- Auswahl von geeigneten Testorganismen sowie Anpassung der Kultivierungsbedingungen für ein optimales Wachstum der Testorganismen im Mikrofluidsegment.

- Erstellen von Algorithmen für automatische Screeningabläufe von mehrdimensionalen Konzentrationsfeldern.
- Adaption und Anpassung der Datenauswertungssoftware an die verschiedenen Organismenspezies.
- Applikation des Labor- und Kompaktaufbaus für ökotoxikologische Fragenstellung.
- Beispielgebende Untersuchungen der Kombinationswirkung ausgewählter Substanzen an verschiedenen Organismen.
- Abschätzung des Potentials der Methode für verschiedene Stoffsysteme und Organismen.



## 2 Wissenschaftliche Grundlagen

### 2.1 Allgemeine Prinzipien und Konzepte der Ökotoxikologie

Die Ökotoxikologie ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, in dem Biologie, Toxikologie, Umweltchemie und Ökologie integriert sind. Ökotoxikologie als Zweig der Umweltwissenschaften beschäftigt sich hauptsächlich mit der Analyse und dem Verständnis der Auswirkungen von Chemikalien auf Zellen, Lebewesen, Populationen, Lebensgemeinschaften und das Ökosystem im Allgemeinen [34]. Zu diesem Zweck sind die Abschätzung der Exposition (wohin die Schadstoffe in der Umwelt gelangen) und die Analyse des Effekts (deren ökologische Auswirkung) auf Organismen Bestandteil der Risikoabschätzung von Umweltchemikalien. Die klassische Toxikologie befasst sich mit der dosisabhängigen Wirkung einer Substanz auf einen Organismus. In den letzten Jahren hat sich eine politische und wissenschaftliche Diskussion über die Frage entwickelt, ob die kumulative Exposition gegen niedrige Konzentrationen einer Vielzahl von Chemikalien zu umwelt- und gesundheitsrelevanten Schädigungen führen kann<sup>7</sup>.

Ein berühmtes Gesetz von Paracelsus (1493-1541) „Alle Dinge sind Gift und nichts ohne Gift; allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.“ ist die Grundlage der Toxikologie und Ökotoxikologie [35]. Das Ausmaß der toxischen Wirkung ist von der Wechselwirkung mit bestimmten Makromolekülen und von dem Metabolismus abhängig. Entscheidend ist die Exposition und Konzentration des Stoffes am Zielort. Wichtig sind auch Bioverfügbarkeit und Expositionsweg. Für die quantitative Erfassung der Wirkung einer Substanz dient die Dosis-Wirkungs-Kurve (Abbildung 2.1). **Dosis-Wirkungs-Beziehungen** sind für die Ökotoxikologie grundlegend.

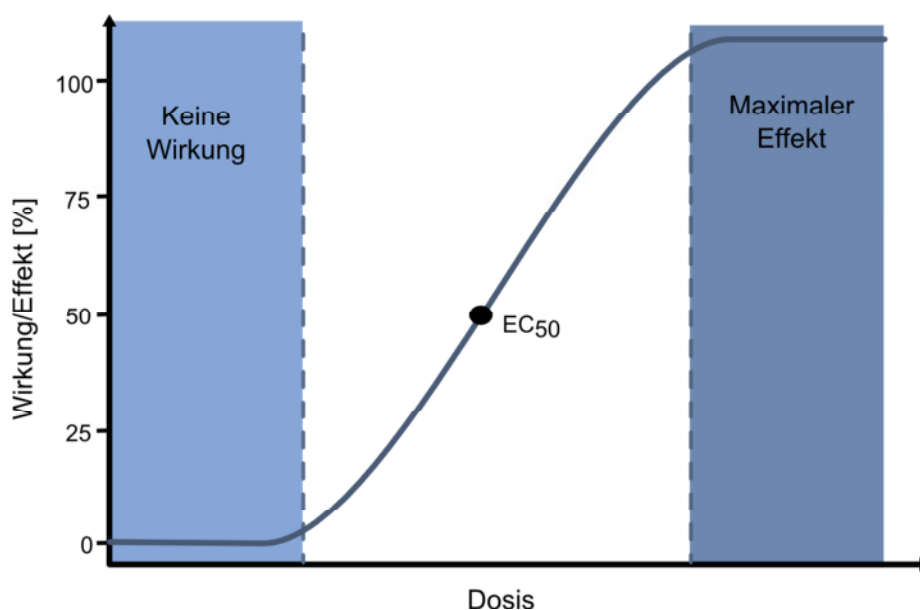


Abbildung 2.1: Dosis Wirkungs-Beziehungen nach Connell and Miller 1984 [36]

<sup>7</sup> Pestizidrückstände in Lebensmitteln: Neues zur kumulativen Risikobewertung

<http://www.akademie-fresenius.de/presse/info.php?page=910>

Zur Charakterisierung der Wirkungsstärke wird oft die Konzentration, die eine halbmaximale Wirkung erzeugt, der sogenannte **EC<sub>50</sub>-Wert** verwendet. Der Kurvenverlauf von Dosis-Wirkungs-Kurven beinhaltet wichtige Informationen, die bei alleiniger Betrachtung des EC<sub>50</sub> fehlen. Zum Beispiel bewirkt bei steilen Dosis-Wirkungs-Kurven schon eine geringe Konzentrationserhöhung eine starke Veränderung der toxischen Effekte. Ein flacher Verlauf hingegen zeigt eine eher langsame Reaktion der Testorganismen an. Aus diesem Grund ist die Kenntnis des Kurvenverlaufs zur Charakterisierung der Substanztoxizität sehr bedeutend. Leider wird dies in der Praxis noch selten berücksichtigt aufgrund des hohen zeitlichen und materialen Aufwands. Mit segmentbasierter Mikrofluidik ist die Erstellung einer hochaufgelösten Dosis-Wirkungs-Kurve mit minimalem Materialverbrauch möglich [37, 38].

Neue Stoffe sind vor der Vermarktung einer (öko)toxikologischen Prüfung zu unterziehen. Es soll neben den Abbau-, Ausbreitungs- und Akkumulationsverhalten die Auswirkungen auf ausgewählte Organismen geprüft werden. Die **OECD** (engl. Organisation for Economic Co-operation and Development) hat bereits im Jahr 1981 die Richtlinien zum Test von Chemikalien ausgearbeitet, die laufend ergänzt und aktualisiert werden<sup>8</sup>. Für Bakterien, Algen, höhere Pflanzen, Würmer, Krebse, Insekten, Fische, Amphibien und Vögel wurden standardisierte Prüfsysteme mit entsprechenden Methodenvorschriften entwickelt. Standardisierte Toxizitätstests sind für die Gefährlichkeits- und Risikoabschätzung wichtig.

Die Art der Toxizitätstests und ihr Umfang nehmen mit der Produktionsmenge des fraglichen Stoffes zu. Grundsätzlich ist es nur mit einer Reihe mehrerer Toxizitätstests mit Organismen aus verschiedenen Biotopen möglich, die Wirkung von Chemikalien auf Ökosysteme abzuschätzen. Es gibt drei Stufen zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Chemikalien nach dem deutschen Chemikaliengesetz:

- Grundstufe: akuter Toxizitätstest mit Algen (Wachstumshemmung), Daphnien (Immobilisierung) und Fischen (Mortalität)
- Stufe I: langfristiger Toxizitätstest mit Daphnien (Reproduktion), Fischen (Mortalität) und höheren Pflanzen (Wachstumshemmung), akuter Toxizitätstest mit Regenwürmern (Mortalität) und Bioakkumulationstest mit Fischen
- Stufe II: langfristiger Toxizitätstest mit Fischen (Reproduktion), akuter Toxizitätstest mit Vögeln (Mortalität) und Bioakkumulationstest mit Vögeln

Aus ethischen und ökonomischen Gründen werden zunehmend Zellkulturmethoden entwickelt, in denen toxische Wirkungen *in vitro*, statt am lebenden Tier erfasst werden. Es gibt mehrere Vorteile von *In-vitro*-System gegenüber *In-vivo*-Versuchen, wie zum Beispiel kontrollierte und standardisierte Zelllinien, geringe Variabilität und hohe Reproduzierbarkeit, Screening mit großer Probenzahl und Studium von Toxizitätsmechanismen. Unter **Zytotoxizitätstests** versteht man die Aussaat von Zellen aus Kulturflaschen in Mikrotiterplatten unter Zugabe einer Prüfsubstanz und die Erfassung der Reaktion nach einer bestimmten Zeit. Heutzutage wird wegen der besseren Reproduzierbarkeit und einfachen Handhabung vor allem die Vitalität von Zellen mit Farbreaktionen mittels Mikrotiterplatten-Spektrophotometrie

---

<sup>8</sup> Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung

[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG\\_List\\_EN\\_Jul\\_2013.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG_List_EN_Jul_2013.pdf)

sogenannter ELISA-Reader (engl.: enzyme linked immunosorbent assay) erfasst. ELISAs nutzen die Spezifität spezieller mit einem Enzym markierter Antikörper, um sie an das nachzuweisenden Antigen (Stoff) zu binden [39, 40]. Anhand der biochemischen Reaktionen lässt sich die Schädigung der Zell- und Lysosomenmembran (Neutralrot-Test), die Hemmung von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums (NADH und NADPH) und Enzym Succinat-Dehydrogenase (Mitochondrien) (MTT-Test) oder die Zellvitalität mit weiteren Methoden wie beispielsweise der Kristallviolett-Färbung oder der Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) erfassen [41-44].

Zytotoxizitätstests können für verschiedenen Zwecke verwendet werden, wie zum Beispiel zur Prüfung von Umweltproben (Abwasser, Sedimente, Sickerwasser), Korrelation der Zytotoxizität mit der akuten Toxizität und mit physikalisch-chemischen Stoffparametern (quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, QSAR), zur Bestimmung spezifischer sowie biochemischer Parameter und zur vergleichenden Prüfung der akuten Toxizität von Chemikalien und Chemikaliengemischen. Die Wichtigkeit von Erkenntnissen über die gegenseitige Beeinflussung von Wirkstoffen rückt zunehmend ins Zentrum der Betrachtungen und basiert dabei vor allem auf zwei Vorhersagekonzepten. Zum einen gibt es das Konzept der **unabhängigen Wirkung** (IA) (Abk. IA, independent action nach Bliss, 1939 [45]) und zum anderen das der **Konzentrationsadditivität** (Abk. CA, dose additivity nach Loewe 1926 [46, 47]). Beide gelten als begründet und sind allgemein anerkannt [48]. In die Abbildung 2.2 ist der Unterschied zwischen Konzentrationsaddition und unabhängiger Wirkung schematische dargestellt.

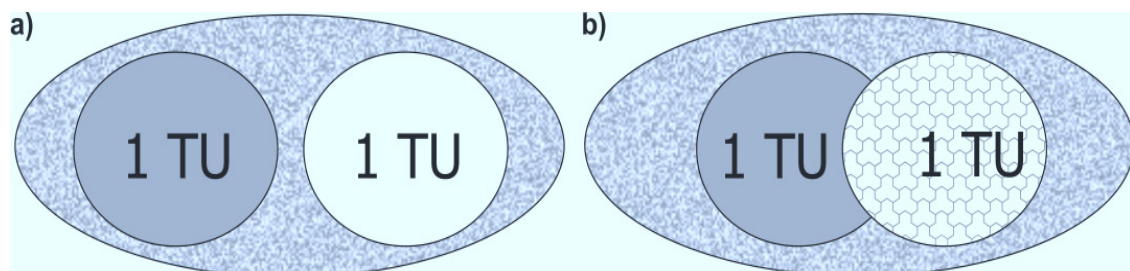


Abbildung 2.2: Konzept der Kombinationswirkungen. a) Konzentrationsaddition:  $1\text{ TU} + 1\text{ TU} = 2\text{ TU}$ , b) unabhängige Wirkung:  $1\text{ TU} + 1\text{ TU} < 2\text{ TU}$  (toxic unit)

Das Konzept der **unabhängigen Wirkung** basiert auf der Annahme, dass mehrere Substanzen zu gemeinsamen Effekten führen können, indem sie miteinander interagieren. Dabei können sie sich an unterschiedlichen Wirkorten befinden und an verschiedenen Wirkketten beteiligt sein. Grundsätzlich besteht in dieser Theorie die Annahme, dass die wechselwirkenden Substanzen sogenannte unähnliche Wirkungen besitzen, ihre Einzelwirkungen also nicht bekannt sein müssen, da nur die resultierenden Effekte betrachtet werden. Ähnlich der Effektsummation werden die Einzelwirkungen im Konzept der IA aufsummiert. Allerdings werden die Effektüberlagerungen der Substanzen von der Summe subtrahiert. Somit kann der Gesamteffekt max. 100% erreichen. Der nach IA zu erwartende Gesamteffekt wird wie folgt berechnet:

$$E(c_{S_A} + c_{S_B}) = E(c_{S_A}) + E(c_{S_B}) - E(c_{S_A}) \cdot E(c_{S_B}) \quad (2.1)$$

Wobei  $c_S$  die Konzentrationen der Substanzen  $S_A$  und  $S_B$  und  $EC_x(S)$  bezeichnet die erforderliche Konzentration, um einen bestimmten Effekt  $x$  durch die Substanz  $S$  hervorzurufen [49].

Man unterscheidet drei Möglichkeiten von Kombinationswirkungen [50-53]:

- Die Additivität, bei der sich die Toxizität der Wirkstoffe aufaddieren.
- Den Synergismus (potenzierende Wirkungsverstärkung), bei dem die Gesamtoxizität größer als die erwartete Summe der Einzeltoxizität ist.
- Den Antagonismus (Wirkungsminderung), bei dem die Gesamtoxizität geringer als die erwartete Summe der Einzeltoxizität ist.

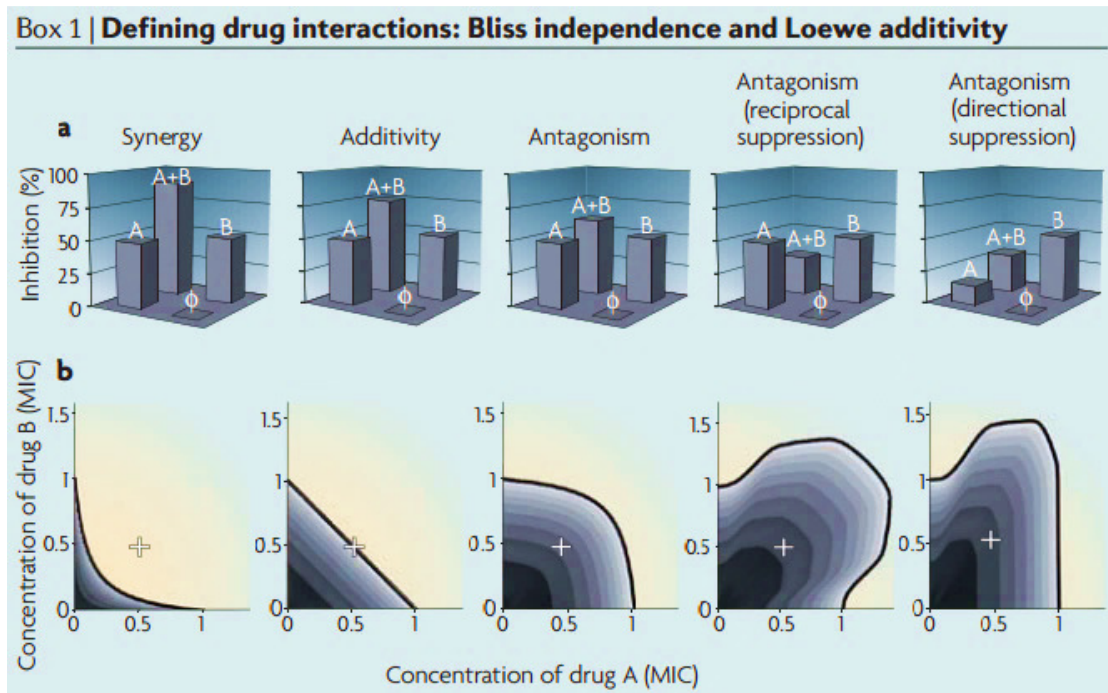
Wenn beispielsweise die Wirkstoffe A und B jeweils 50% Wachstumshemmung verursachen, dann sagt das Konzept der IA voraus, dass bei einer Kombination der beiden Wirkstoffe die Wachstumshemmung 75% beträgt. Positive oder negative Abweichungen von dieser Prognose werden als synergistische bzw. antagonistische Wechselwirkung bezeichnet (siehe Abbildung 2.3a,  $\emptyset$  bedeutet keine Wirkstoffe). Antagonistische Wechselwirkungen unterteilt man in schwache bzw. unabhängige antagonistische Wirkung und verstärkte antagonistische Wirkung verursacht durch beide Wirkstoffe (engl. reciprocal suppression) oder einen Wirkstoff (engl. directional suppression).

Im Konzept der **Konzentrationsadditivität** wird im engeren Sinne davon ausgegangen, dass die kombinierten Substanzen über ähnliche Wirkungsmechanismen und -prinzipien verfügen. Dabei besteht die Annahme, dass bei einer Substitution zweier Stoffe untereinander der Effekt derselbe bleibt und die Addition der beiden Konzentrationen zu keiner Veränderung führt. Konzentrationsadditivität wurde verschiedentlich als „allgemein Lösung“ vorgeschlagen [54]. Es werden dabei Effektkonzentrationen betrachtet, wobei es notwendig ist, auch die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Substanzen im Einzelnen zu kennen. Für die Kombinationswirkung zweier Substanzen gilt daher folgende Beziehung:

$$\frac{c_{S_A}}{EC_x(S_A)} + \frac{c_{S_B}}{EC_x(S_B)} = 1 \quad (2.2)$$

Als Beispiel bei einer additiven wirkenden Substanzenpaar, 50% Wachstumshemmung von Wirkstoff A in Kombination mit 50% Wachstumshemmung von Wirkstoff B ist gleiche wie 100% Wachstumshemmung von Wirkstoff A oder von Wirkstoff B.

Trägt man die Menge aller Konzentrationspaare  $(c_{S_A}, c_{S_B})$ , die zu dem gleichen Effekt  $x$  führen, graphisch auf, so erhält man **Isobole** kurve. Im Abbildung 2.3b zeigt typische Vertreter der solchen Isobolen. Isobolen additiv wirkender Stoffpaare zeigen einen linearen Verlauf. Ein konkaver Isobolenverlauf deutet auf synergistische Wechselwirkungen. Konkav verlaufende Isobolen weisen auf antagonistische bzw. infraadditive oder unabhängige Wirkmechanismen hin, wobei die Kombination beider Stoffe einer erhöhten Konzentration bedarf, um die gleiche Wirkung zu erzielen. Die verstärkten antagonistischen Wirkungen bedingt durch beide Wirkstoffe (engl. reciprocal suppression) oder einen Wirkstoff (engl. directional suppression) werden als nicht-monotone Isobolen bezeichnet (Abbildung 2.3b).



*Abbildung 2.3: Darstellung binärer Mischungen für den Fall der additiven Wirkung (additivity), der verstärkten Wirkung (synergy) und der Abschwächung der Wirkung (antagonism). a) Das Konzept der unabhängigen Wirkung b) Das Konzept der Konzentrationsadditivität [48]*

Die Konzepte der Konzentrationsadditivität und der unabhängigen Wirkung können ggf. genutzt werden, um Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zu ziehen. Stimmt die beobachtete Kombinationswirkung mit der mittels CA oder IA aus den Einzelwirkungen der Substanzen vorhergesagten Kombinationswirkung überein, so kann auf die Wirkung am gleichen, bzw. an unterschiedlichen Wirkorten geschlossen werden.

Das Konzept der unabhängigen Wirkung nimmt an, dass die Wirkstoffe unterhalb einer NOEC (No Observed Effect Concentration) keine Kombinationseffekte verursachen, hingegen sind bei der Konzentrationsadditivität auch unterhalb der NOEC Kombinationseffekte möglich. Belden et al. [55] und Grimm et al. [56] haben durch ihren zahlreichen Experimente gezeigt, dass das Konzept der Konzentrationsadditivität einen besseren Prognosewert ermöglicht als das Konzept der unabhängigen Wirkung. Dies wurde auch durch eine systematische Recherche von Grimm et al. über 200 Publikationen bezüglich Kombinationswirkungen bei aquatischen Organismen bestätigt [56]. Aus diesen Gründen haben wir uns, um unsere Kombinationswirkungen zu bewerten, für das Konzept der Konzentrationsadditivität entschieden.

## 2.2 Grundlagen der segmentbasierten Mikrofluidik

**Mikrofluidik** ist ein Teilgebiet der Mikrosystemtechnik (Abk. MST engl.: micro systems technology) und wird oft als Synonym für den Begriff „Lab-on-a-Chip“ (Abk. LoC) und „micro total analysis systems“ (Abk.  $\mu$ TAS) genutzt. Die Mikrofluidik umfasst Methoden zum Entwurf, zur Herstellung, Anwendung und Untersuchung von Mikrosystemen, deren Kanalquerschnitte bei Abmessungen im Bereich von  $0,1\ \mu\text{m}$  bis  $1\ \text{mm}$  liegen [57, 58]. Das Verhalten von Flüssigkeiten auf der mikroskopischen Skala ist im Vergleich zur Makrofluidik sehr verschieden [59].

Die Geschichte der Mikrofluidik begann in den frühen 1950er Jahren mit der Technik, kleine Mengen von Flüssigkeiten im Nanoliterbereich zu erzeugen, welche die Grundlage der heutigen Tintenstrahl-Technologie bildet [60]. Für die Analytik wurde im Jahr 1979 ein miniaturisierter Gaschromatograph mittels Silizium-Wafer realisiert [61]. Ende der 80er Jahre wurde von Shoji et al. eine Mikropumpe mit Probeninjektionssystem für das Blut-pH-Monitoring entwickelt [62]. 1990 wurde der erste miniaturisierte Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (HPLC) mit Silizium-Chip-Technologie von Manz et al. vorgestellt [63]. Zwei Jahre später war die Durchführung einer Zonenelektrophorese in Anlehnung an die Kapillarelektrophorese sowohl im Silizium-Chip als auch im Glas-Chip erfolgreich [64, 65]. All diese genannten Erfindungen, revolutionierten maßgeblich den Bereich der chemischen Analytik. Im Anschluss an diese Pionierarbeiten beschäftigten sich in den letzten zwei Jahrzehnten viele Forschungsgruppen mit der Entwicklung neuer Mikrofluidik-Komponenten wie beispielsweise Mikropumpen [66-68], Mikroventile [69, 70] oder Mikromixer [71, 72] um die Vorteile der Mikrofluidik in biologischen, chemischen, analytischen und medizinischen Anwendungsgebieten zu nutzen. Auf Basis des verwendeten Prinzips des Fluidtransports, des Aufbaus der Chips und der Fertigungstechnologie haben Haerberle und Zengerle [73] sowie Mark et al. [74] vorgeschlagen, die vorhandenen Mikrofluidik-Methoden in folgenden Gruppen zusammenzufassen:

- Kapillarkraftgetriebene Systeme (z.B. Lateral Flow Assay oder Teststreifen)
  - Hierbei wird die Kapillarkraft zum passiven Transport der Proben und Reagenzien mittels einer mikrostrukturierten Schicht genutzt [75].
- Druckgetriebene Systeme (z.B. Mikrofluidik Large-Scale Integration [76], Laminarströmung [59], segmentierter Fluss [26, 77])
  - Das Fluid (gute charakterisierbare laminare Strömung) wird druckgetrieben durch Mikropumpen in einem System von Kanälen und Ventilen prozessiert.
- Zentrifugale Systeme (z.B. zentrifugale Mikrofluidik)
  - Die Bewegung der Flüssigkeiten wird durch die Rotation des LoC-Systems erzeugt [78, 79].
- Elektrokinetische Systeme (z.B. Elektrokinetik, Elektrobenetzung)
  - Die Tropfenerzeugung, der Fluidtransport und das Dosieren, Mischen und Teilen werden mittels eines elektrischen Feldes im Chip durchgeführt [80-82].
- Akustische Systeme (z.B. akustische Oberflächenwellen)
  - Tropfen werden auf einer hydrophoben Oberfläche von akustischen Wellen generiert und fortbewegt [83, 84].

Eine weitere Unterteilung der Mikrofluidikplattformen lässt sich folgendermaßen vornehmen: Systeme mit kontinuierlichem Flüssigkeitsstrom (engl.: continuous flow) und Systeme mit flüssigen Mikroräumen, die von Luft oder von einer zweiten nicht mischbaren Flüssigkeit umgeben sind. Die letzte beschriebene Variante wird als segmentbasierte Mikrofluidik bezeichnet und im Folgenden näher erläutert.

Unter **tropfen-basierten Mikrofluidik** (engl.: droplet-based microfluidic) unterteilt man **segmentbasierte Mikrofluidik** und **emulsionbasierte Mikrofluidik**. Segmentbasierte Mikrofluidik basiert auf der Verwendung zahlreicher kleiner Flüssigkeitstropfen, die durch eine zweite unmischbare Phase – Gas oder Flüssigkeit – voneinander isoliert sind, welche als **Segmente** oder **Kompartimente** (engl.: microfluid segments) bezeichnet werden. Diese bilden stabile, abgeschlossene Mikroreaktionsräume in geschlossenen Mikrofluidik-Kanälen. Bei allen Segmenten wird eine geordnete Mobilität für die serielle Verarbeitung sichergestellt. Befördert etwa durch Druckgradienten und durch den Einsatz spezieller Bauteile können sie vermischt, gesplittet, sortiert und weiter verarbeitet werden.

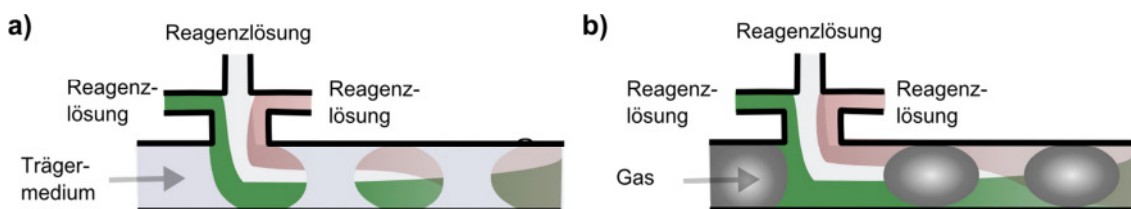


Abbildung 2.4: Zwei Typen von segmentiertem Fluss im Mikrokanal: a) Flüssig/Flüssig-Zweiphasensystem, b) Gas/Flüssig-Zweiphasensystem

Entsprechend dem Anwendungsprinzip wird die segmentbasierte Mikrofluidik in zwei Kategorien unterteilt: a) Flüssig/Flüssig-Zweiphasensysteme (engl.: droplet flow, plugs) und b) Gas/Flüssig-Zweiphasensysteme (engl.: bubble flow, slugs) (Abbildung 2.4). Bei den Flüssig/Flüssig-Zweiphasensystemen erfolgt die Reaktion in den Segmenten, die nicht im Kontakt mit dem Mikrokanal stehen, da der Mikrokanal komplett von Trägerflüssigkeit benetzt wurde. Bei den Gas/Flüssig-Zweiphasensystemen werden die wandbenetzenden Reagenzflüssigkeiten durch Gasblasen voneinander getrennt [24, 85].

Für die Segmenterzeugung sind T-Kreuz-Verbindungen (engl.: T-junction) [86-88] und Fluss-Fokussierungsstrukturen (engl.: flow focusing device) [25, 89] zwei der am häufigsten verwendeten Methoden im mikrofluidischen Zweiphasensystem (Abbildung 2.5). Ein typisches Beispiel einer T-Kreuz-Verbindung ist in Abbildung 2.5a gezeigt. Zwei senkrecht zueinander liegende Mikrokanäle, die zwei nicht mischbare Flüssigkeiten befördern, treffen sich an einer T-Kreuzung. Die disperse Phase wird aufgrund von Scherkräften, die durch die senkrecht zur dispersen Phase strömende kontinuierliche Phase resultieren, in Tröpfchen abgerissen und fließen entlang des Austrittskanals. Oft werden auch mehrere Einzelkanäle nahe der Einmündung zusammengeführt, um Tropfen aus mehreren Bestandteilen zu erzeugen. T-Kreuz-Verbindungen können auch zur Zudosierung weiterer Reagenzien verwendet werden. Viele Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass die Segmentgröße stark von Flussraten und Viskosität [90-93], Kanalgeometrie [86, 94, 95], Grenzflächenspannung [96, 97], Tensid und dessen Konzentration [98, 99] abhängig ist.

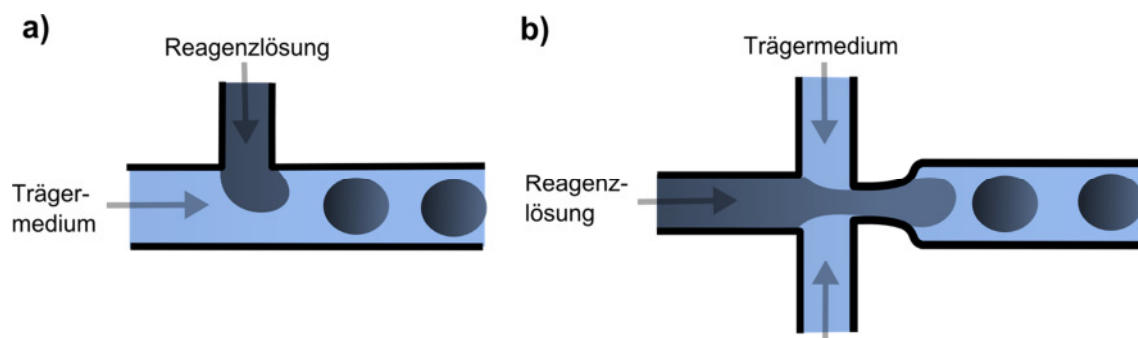


Abbildung 2.5: Strukturen für Tropfenerzeugung a) T-förmige Verbindung, b) Flussfokussierungsstrukturen

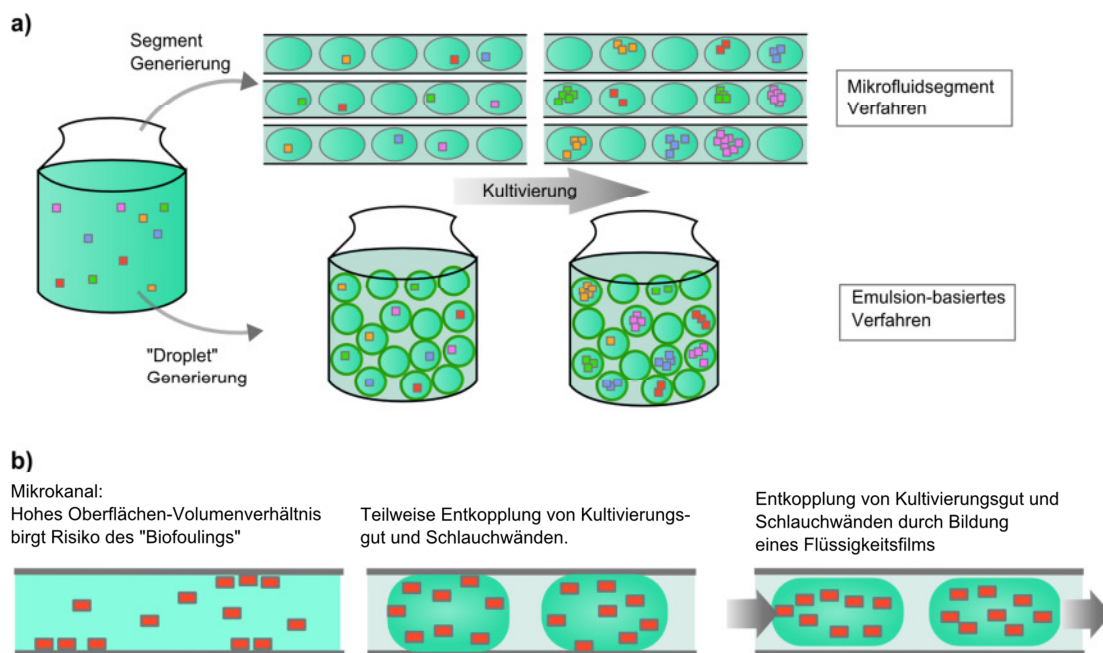
Bei den Fluss-Fokussierungsstrukturen wurde der Flüssigkeitsstrom der dispersen Phase vor einer Düse von zwei senkrecht flankierenden strömenden kontinuierlichen Phasen zentriert in die Düse befördert (Abbildung 2.5b). Hierbei entsteht eine Konkurrenz zwischen Druck- und viskoser Spannung, wobei der Flüssigkeitsstrahl der dispersen Phase auf Grund der Rayleigh-Plateau-Instabilität in Tröpfchen abreist. Abhängig von der Düsengeometrie kann der Tröpfchenabriss in oder nach der Düse erfolgen. Die Segmentgröße kann durch Änderung der Strömungsgeschwindigkeit beider Phasen manipuliert werden. Durch die schmale Düse können sehr kleine Tröpfchen mit sehr hohen Frequenz (bis zu in den kHz-Bereich) erzeugt werden [100, 101]. Im Vergleich zur T-Kreuz-Verbindung benötigen Fluss-Fokussierungsstrukturen höheren technischen Aufwand, bieten aber bei der Segmenterzeugung bessere Monodispersität und höhere Erzeugungsraten.

Für die Durchführung komplexer chemischer und biologischer Reaktionen sowie Hochdurchsatz-Experimente in Mikrofluidsegmenten sind neben Segmenterzeugung noch weitere wichtige Basisoperationen, wie definierte Zudosierung von Reagenzien zu Segmenten, effiziente Segmentinterne Durchmischung (engl. droplet mixing), synchronisierte Vereinigung zweier Tropfensequenzen (engl. droplet fusion), definierte Aufteilung der Tropfensequenz (engl. droplet splitting), Sortierung von Segmenten (engl. droplet sorting), Abtrennung des Separationsfluids, und Segmentspeicherung relevant. Verschiedene Verfahren zu den Basisoperationen werden eingehend in Köhler et al. 2004 [26], Henkel et al. 2004 [88], Adamson et al. 2006 [102], Song et al. 2006 [24], Teh et al. 2008 [77], Niu et al. 2008 und 2011 [103, 104], Malsch et al. 2008 [105], Baroud et al. 2010 und 2014 [106, 107], Granieri et al. [108], Ahn et al. 2011 [109], Simon et al. 2012 [110] und Budden et al. 2013 [111] beschrieben. Die umfassenden charakterisierten Funktionsstrukturen der Segmentsteuerung stehen der Plattform segmentierter Fluss-Technik für die Umsetzung des Lab on a Chip Systems zur Verfügung.



### 2.3 Vorteile des segmentierten Flusses

Die segmentbasierte Mikrofluidik bietet viele Vorteile gegenüber der konventionellen Technik. Die kleinen Volumina (Piko- bis Nanoliterbereich) führen zu einem großen Oberflächen-Volumen-Verhältnis, wodurch größere Ober- und Grenzflächeneffekte Einfluss gewinnen. Außerdem kann die Gravitationskraft im Allgemeinen gegenüber Kapillarkräften nahezu vernachlässigt werden. Da in einer mikrofluidischen Strömung die Reibungskräfte und die Trägheit des Fluides dominieren und somit nur sehr kleine Reynolds-Zahl auftreten (z.B. für ID 0,5 mm Schlauch mit einer Flussrate von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  beträgt die Reynolds-Zahl etwa 2). In den Kapillaren bilden sich im Falle homogener Fluide laminare Strömungen aus. In Mehrphasensystemen spielen Grenzflächenenergie eine dominante Rolle. Eine segmentinterne Durchmischung wird durch segmentinterne Konvektion begünstigt. Aufgrund der geringen Abmessung des Systems sind die Zeitskalen für viele auf größere Entfernungen langsame Abläufe (z.B. Wärmeleitung, Diffusion) deutlich reduziert, was für zahlreiche Anwendungen wie Analytik [112, 113], Nanopartikelsynthesen [114-117], Polymerisationen [118-121], DNA Analysen [122-124], Proteinkristallisationen [125-127], Zellkultivierungen [128-130] und die embryonalen Entwicklungsstudien [131-133] große Bedeutung hat.



**Abbildung 2.6:** Entkopplung von Mikrofluidikkompartimenten a) Entkopplung von Mikroorganismenpopulationen durch segment-basiertes und emulsions-basiertes Verfahren. b) Entkopplung zwischen Kultivierungsvolumen und Kanalwänden durch unterschiedliches Benetzungsverhalten.

Alle diese Eigenschaften vom segmentbasierten Verfahren spielen eine große Rolle für das miniaturisierte zellbasierte Screening [32, 134, 135]. Ein großer Vorteil der segmentbasierten Mikrofluidik ist vor allen die Unterbindung von Dispersionseffekten. Außerdem entsteht eine Vielzahl von monodispersen Reaktionsräumen. Die Zellen, die sich in Mikrofluidsegmenten befinden, werden von einem hydrophoben Trägermedium umgeben, und dies führt zu einer effizienten Trennung und Abkopplung jedes einzelnen Segment und zur Realisierung von hoch parallelisierten Prozessen unter Einsatz minimaler Totalvolumina (Abbildung 2.6a) [129, 135,

136]. Beispielsweise werden für eine Sequenz von ca. 2.000 Mikrofluidsegmenten mit einem Volumen von 0,2  $\mu\text{l}$  lediglich 0,4 ml Kultivierungsflüssigkeit benötigt.

Einen zweiten sehr wichtigen Aspekt stellt die partiale oder totale Entkopplung der Kultivierungsflüssigkeit von den Kanalwänden dar. Die Interaktion von Biomolekülen und Zellen mit Grenzflächen ist in mikrofluidischen Systemen besonders kritisch zu betrachten, da das Verhältnis Oberfläche zu Volumen um ein Vielfaches größer ist als in herkömmlichen Kultivierungssystemen. Zur Veranschaulichung ist die Grenzflächenspannung in Abbildung 2.7 dargestellt. Der zwischen der Tangente an die Tropfenkontur und der Festkörperoberfläche eingezeichnete Winkel  $\alpha$  wird Kontaktwinkel genannt. Er hängt nur von den Materialeigenschaften der beteiligten Phasen ab. Die Messung von Kontaktwinkeln liefert Aussagen über die Oberflächenspannungen und -energien der beteiligten Stoffe. Die Flüssigkeit auf der Oberfläche zieht sich zu einem halbkugelförmigen bis zu fast kugelförmigen Tropfen zusammen, falls  $\alpha$  zwischen  $90^\circ$  und  $180^\circ$  liegt (siehe Abbildung 2.7a). Kontaktwinkel kleiner als  $90^\circ$  werden als partielle Benetzung bezeichnet (Abbildung 2.7b). Im Idealfall handelt es sich bei einer vollständigen Benetzung um einen monomolekularen Film ( $\alpha = 0$ ) (Abbildung 2.7c).

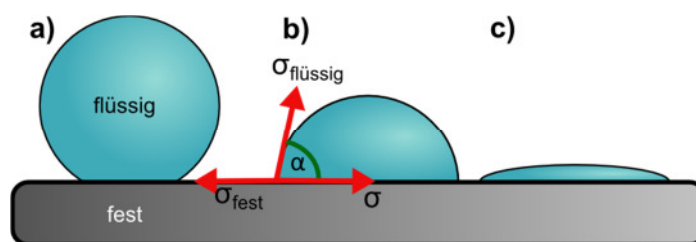


Abbildung 2.7: Grenzflächenspannung a) Keine Benetzung, b) Partielle Benetzung, c) Vollständige Benetzung

Das Biofouling kann im segmentierten Fluss durch eine hohe Benetzung der Schlauchinnenwände durch das Trägermedium und eine niedrige Benetzung der Kultivierungsflüssigkeit signifikant reduziert werden (Abbildung 2.6b). Im Allgemeinen gilt, dass hydrophobe Abgrenzungen oder Schläuche aus fluoriertem (hydrophobem und lipophobem) Material zum Einsatz kommen. Perfluorierte Schläuche und Materialien werden oft mit Perfluoralkan als Trägerphase kombiniert. Hierdurch hat die Trägerflüssigkeit einen geringen Kontaktwinkel mit den Schlauchwänden, während die Kultivierungsflüssigkeit durch die niedrige Benetzbarkeit einen hohen Berührungswinkel formiert. Während des Transportvorgangs baut sich ein flüssiger Film durch einen kapillaren Spalt zwischen Segment- und Trägerflüssigkeit auf. Daher sind die Mikrofluidsegmente vollständig in den Trägerstrom aus physisch inertem Perfluoralkan eingebettet, sodass keine unerwünschten Benetzungseffekte auftreten können. Die Adsorption von Biomolekülen und die Adhäsion der Zellen an den Schlauchinnenwänden werden dadurch verhindert.

Ein dritter wichtiger Aspekt betrifft den Transportvorgang von Biomolekülen, Partikeln, gelösten Gasen und anderen molekularen Bestandteilen in den Segmentflüssigkeiten (Abbildung 2.8). Die Reduzierung der Volumina im Vergleich zu herkömmlichen Kultivierungsbedingungen und Mikrotiterplatten führt zu einer Verkleinerung der Diffusionswege. Der Einsatz von Schläuchen mit niedriger Wandstärke und hoher Gasdurchlässigkeit, z.B. aus perfluoriertem Material unterstützt den Gasaustausch zwischen

der Segmentflüssigkeit und der Umgebung. Weiterhin erfolgt in heterogenen Phasensystemen durch den rezirkulierenden Fluss (segmentinterne Konvektion) eine gute Durchmischung aller Einzelsubstanzen und die Homogenisierung während weiterer Prozesse, da durch Ausgleichströmungen, welche an der Aufrechterhaltung der Phasengrenzen beteiligt sind, entsprechende Scherkräfte wirken.

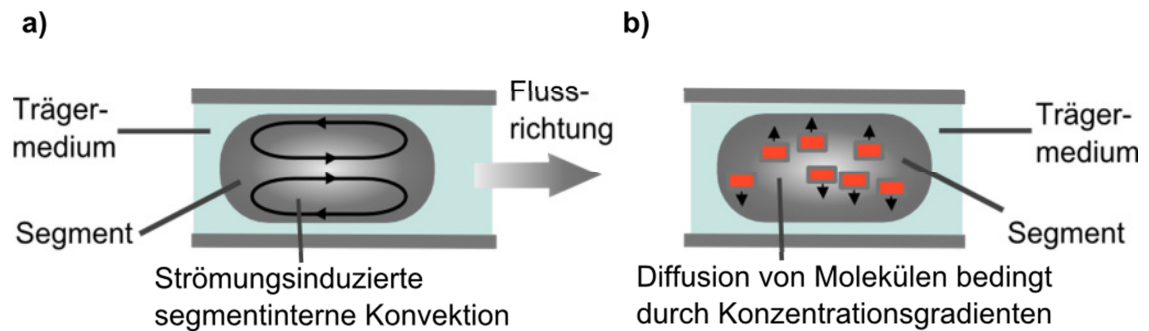


Abbildung 2.8: Segmentinterne Transportprozesse bei a) bewegendem Segment (strömungsinduzierte segmentinterne Konvektion), b) ruhendem Segment (Transport durch Diffusion).

Weiterhin bietet die Integration von Kultivierungsvolumina in Mikrokanälen und Mikroschläuchen einen sicheren Weg, Segmente zu verarbeiten und garantiert den minimalen Verlust von Nährmedium durch Verdunstung oder anderen flüchtigen Bestandteilen. Obwohl das typische Volumen für Mikrofluidsegmente etwa zwei Größenordnungen kleiner ist als Standard-Flüssigkeitsvolumina von MTP, sind die Evaporationsraten wesentlich kleiner als beim offenen MTP-Verfahren. Verschiedene segment-spezifische Operationen wie das Dosieren, Mischen, Teilen und Umschalten oder optische und elektrische Messungen können ohne offen liegende Oberflächen durchgeführt werden [111, 137-140].

Die feste Reihenfolge der Segmente in Kanälen und Mikroschläuchen erlaubt die Adressierung spezifischer Segmente [141]. Dazu ist jede Segmentposition durch eine vordefinierte Startzusammenstellung und einen individuellen Prozessablauf definiert. Somit können Messdaten einzelner Segmente in Gruppen gesammelt und leicht verarbeitet werden. Dies stellt eine wichtige Vorbedingung für den Einsatz der Mikrosegmenttechnik zur Untersuchung von hochaufgelösten Dosis-Wirkungs-Funktionen und toxikologischen Screenings in zwei- und höherdimensionalen Konzentrationsräumen dar.

## 2.4 Segmentbasierte Mikrofluidik für toxikologische Untersuchungen

Laut der Datenbank ISI-Web of Science ist die Publikationsanzahl zum Thema „microfluidic“ und „cell“ im letzten Jahrzehnt drastisch angestiegen<sup>9</sup>. Hauptabnehmer für mikrofluidische LoC Anwendungen sind DNA-Analyse [142, 143], Einzelzellen Analysen [144, 145], Genomik [146], Wirkstoffscreenings [147] und Kristallisation von Proteinen [125, 148].

Auch für miniaturisierte toxikologische Screenings stellen die tröpfchenbasierten mikrofluidischen Systeme und insbesondere segmentiertbasierte Fluidsysteme eine sehr vielversprechende Strategie dar. Emulsionbasierte Systeme ermöglichen in einem Versuchsdurchlauf bis zu  $10^6$  Tröpfchen (im Nanoliter- und Pikoliterbereich) zu erzeugen [149, 150]. Jedoch werden dabei die Tröpfchen nicht in einer bestimmten Position fixiert wodurch die Informationen zur initialen Zusammensetzung der Tröpfchen verloren geht. Außerdem muss zur Stabilisierung einer solchen Emulsion ein Tensid zugesetzt werden, das sich an die Wasser-Öl-Grenzflächen setzt und diese gegen Koaleszenz schützt. Allerdings können Tenside die toxikologischen Screenings beeinflussen. Diese Nachteile können durch den Einsatz der segmentbasierte Fluidsysteme gelöst werden. Bei diesem System findet die Generierung, Transport und Verarbeitung von Segment in einer strengen linearen Anordnung statt (Abbildung 2.6). Auf diese Weise wird die Information an Segmentnummer und deren Komposition gehalten [151].

Neben der Segmentbildung, die bereits im Kapitel 2.2 erwähnt wurde, spielt die Erzeugung der Konzentrationsgradienten eine wesentliche Rolle für die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung. In segmentbasierten mikrofluidischen Systemen gibt es hauptsächlich zwei allgemeine Strategien zur Erzeugung der Konzentrationsgradienten: entweder durch in-situ Mischung [26, 152] oder durch Zudosierung in vorhandene Segmente [88, 110]. Für beide Strategien wurden fünf verschiedenen Verfahren entwickelt, wobei die Volumen der einzelnen Segmente im unteren Pikoliter- bis zu Mikroliterbereich liegen.

Song et al. und Guenther et al. [24, 153] erzeugten die Konzentrationsgradienten durch kontinuierliche Zusammenführung wässriger Proben, Reagenzlösungen und Verdünnungsmedien bei unterschiedlichen Flussraten vor der Segmentbildung (Abbildung 2.9a). Im Jahr 2010 zeigten Trivedi et al. eine Tropfenerzeugung bis zu 200 Hz mit Hilfe einer mikrofluidischen Flussfokussierungsstruktur und fusionierten diese mit einer Reagenzlösung mit einer Frequenz von 10 Hz unter Verwendung einer T-Verbindung [154] (Abbildung 2.9b). Du et al. kombinierten das laminare Strömungs-Diffusionsverfahren mit Tropfenbildung, um Tröpfchen mit einem Konzentrationsgradienten zu erzeugen [155] (Abbildung 2.9c). Clausell-Tormos et al. und unsere Arbeitsgruppe [156, 157] erzeugten die Konzentrationsgradienten durch das Saugen der Probenlösung aus Multiwell-Platten durch die Verwendung eines Mehrkanalventils. Danach werden die Proben aufgeteilt und mit einer Reagenzlösung gemischt (Abbildung 2.9d). Niu et al. entwickelten eine Hochdurchsatz-Mikrotropfen-Verdünnungsplattform, die einen homogenen DNA-Bindungsassay in Nanoliter-Tropfen ermöglicht. Diese Technik ist in der Lage, einen Konzentrationsbereich von über vier Größenordnungen zu erzeugen [104] (Abbildung 2.9e).

---

<sup>9</sup> ISI Web of Science mit den Suchwörtern „microfluidic“ und „cell“ zwischen 2000-2014

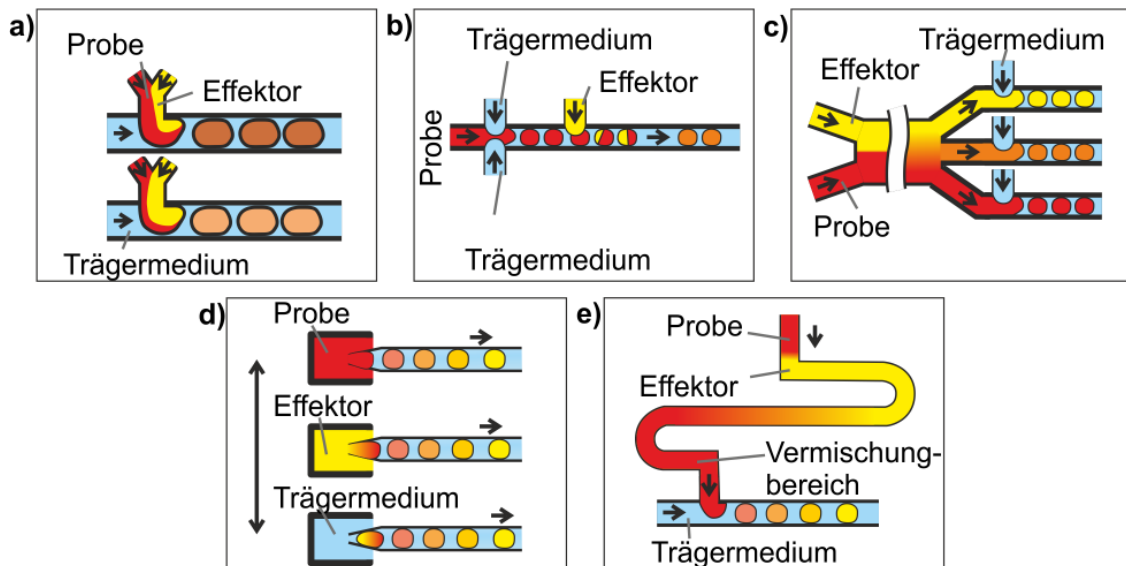


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Generierung von Konzentrationsgradienten in segmentbasierten Mikrofluidsystemen  
 a) Kontinuierlicher Fluss, b) Kontinuierlicher Fluss mit T-Verbindung,  
 c) Multikanal-laminar-Strömung, d) Batch-Verdünnung,  
 e) Dispersionsverfahren [158].

Tropfenvolumen im Mikroliterbereich sind in der Regel für offene Träger oder Kammer-Arrays eingesetzt. Im Gegensatz dazu dominieren Tropfenvolumen im Nanoliter- [104, 159-162] und Pikoliterbereich [155, 163] die Untersuchungen in geschlossenen Mikrokanälen. Die Segmentgröße und die Anzahl der Segmente hängen hauptsächlich von der spezifischen Anwendung ab. Komplexe Assays wie z.B. bei der konzentrationsabhängigen Proteinkristallisation werden durch langsame Tropfenerzeugung und eine kleinere Anzahl von Segmenten pro Versuch bevorzugt [155]. Andererseits konnten einfache Verifikationsversuche mit Farbstoffen bei Sequenzen von mehreren tausend Segmenten durchgeführt werden [153]. Tropfenvolumen zwischen einigen und einigen hundert Nanolitern sind für mikrobiologische Screenings bevorzugt [37, 129, 164, 165].

In den letzten Jahren wurden verschiedene Testorganismen eingesetzt für segmentbasierte mikrobiologische Studien (Tabelle 2.1). Das Spektrum der untersuchten Organismen erstreckte sich, von Bakterien wie *E. coli* [129, 164, 165] über eukaryotische Mikroorganismen wie *Chlorella vulgaris* [130] bis hinzu mehrzelligen Organismen wie Nematoden und Fischen [131, 166], tierische Zelllinien [167] und menschliche Zellkulturen wie HEK [136], Jurkat [168] und A549 [169]. Der Fokus dieser Studien konzentrierte sich vorwiegend auf Einzelwirkungsscreenings. Nur wenige toxikologische Studien über die Kombinationswirkung von binären Gemische in Mikrofluidsegmenten konnten gefunden werden, wie beispielsweise an *E. coli* [164, 165] und an menschlichen Zelllinien A549 [169].

Tabelle 2.1: Mikrotoxikologische Studien in Mikrofluidsegmenten

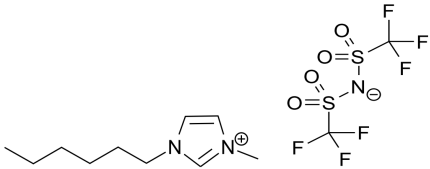
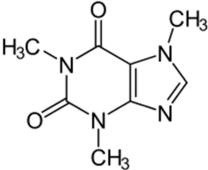
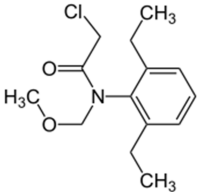
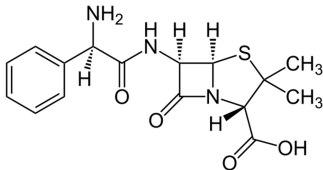
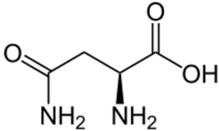
Organismen	Effektor	Konz.	Segment- volumen	Detektions- methode	Ref.
<i>Danio rerio</i>	SDS	0,1 mg/l- 100 mg/l	2-11 µl	Optical imaging	[131] 2007
	CuCl <sub>2</sub>	4-33 µM			
CHO-K1	Propidiumiodide	0-2 mg/l	ca. 25 pl	Optical imaging	[167] 2008
Jurkat	Tween 20	0-0,5 % v/v	150 nl	Optical imaging	[168] 2008
<i>C. elegans</i> , Jurkat, Zelllinien HEK293T	Carboxy-PFPE, DMP-PFPE, PEG- PFPE, Poly-L-Lysine- PFPE	0,5 % w/w	660 nl	Fluoreszenz- spektroskopie	[136] 2008
		0,5 % w/w	0,66 nl		
<i>C. elegans</i>	Neurotoxin MPP+	0-5 mM	28 nl	Optical imaging	[166] 2008
	Neurotoxin 6- OHDA	-	28 nl	Optical imaging	[170] 2010
C2C12 Myoblasts	Bupivacaine	0-3 mM	0,7 nl	Optical imaging	[171] 2008
	Lidocaine	0-5 mM			
U937	Mitomycin C	1 pM-10 µM	0,7 nl	Fluoreszenz	[172] 2009
<i>E. coli</i>	Peptide amide	0-100 mg/l	0,3-0,6 nl	Photometrie, Fluorimetrie	[37] 2009
	Ag-Nanopartikel	0-25 nM	ca. 500 nl	Photometrie	[153] 2011
	Cefotaxime	0,0015 mg/l - 0,03 mg/l	ca. 200 nl	Fluoreszenz	[173] 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	CuCl <sub>2</sub>	0-100 mg/l	ca. 500 nl	Photometrie, Fluorimetrie	[130] 2011
<i>E. coli</i>	2,4-DNP & Ag-Nanopartikel Au-Nanopartikel	0-150 µM 0-1,7 pM 0-10 pM	ca. 500 nl	Photometrie, Fluorimetrie	[165] 2011
<i>E. coli</i>	Chloramphenicol Ampicillin Tetracyclin	0-2 mg/l 0-5 mg/l 0-0,4 mg/l	ca. 100 nl	Fluoreszenz	[164] 2012
<i>Zelllinie A549</i>	Flavopiridol fluorouracil Paclitaxel	5- 1-2 mM	ca. 500 nl	Fluoreszenz	[169] 2013

### 3 Material und Methoden

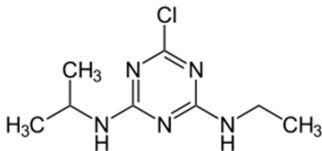
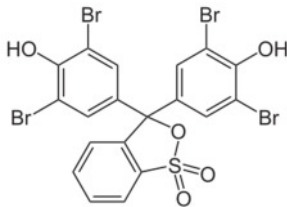
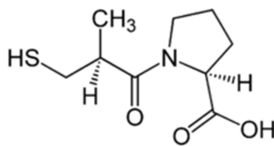
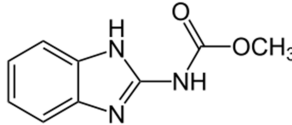
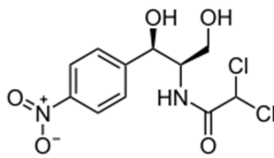
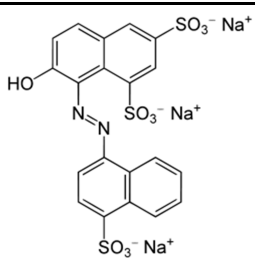
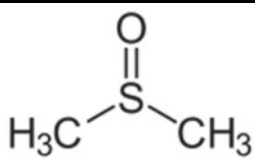
#### 3.1 Chemikalien, Lösungen und Geräte

In diesem Kapitel werden alle für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien (Tabelle 3.1), Lösungen für die Zellkultivierung (Tabelle 3.2) und Geräte (Tabelle 3.3) aufgeführt. Alle Substanzen wurden soweit verfügbar im Reinheitsgrad p.a. verwendet.

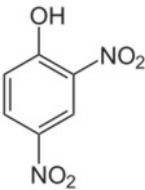
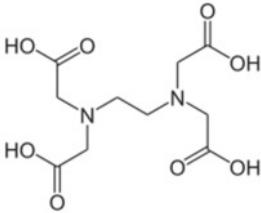
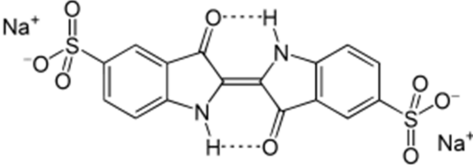
Tabelle 3.1: Chemikalien

Bezeichnung/ Abkürzung	Strukturformel	Abkürzung/Summen- formel/Firma
1-hexyl-3-methyl-imidazolium bis (trifluoromethyl-sulfonyl) amide		IM16 (CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N Universität Bremen
1,3,7-Trimethylxanthin		Coffein/C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> AppliChem Life. Sci.
Agar	---	Agar/---/Carl Roth
Alachlor		--- C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub> Sigma-Aldrich
Ammoniaklösung (25%)	---	---/NH <sub>4</sub> OH/Merck
Ammoniumchlorid	---	---/NH <sub>4</sub> Cl/Merck
Ammonium-molybdat	---	---/ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·6H <sub>2</sub> O/ AppliChem Lif. Sci.
Ammoniumsulfat	---	---/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Merck
Ampicillin		--- C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>4</sub> S Carl Roth GmbH
Asparagin		Asn C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Sigma-Aldrich

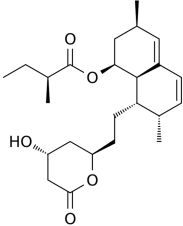
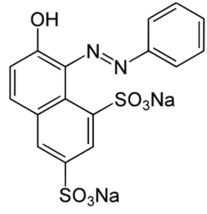
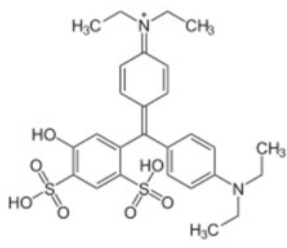
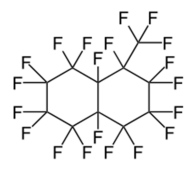
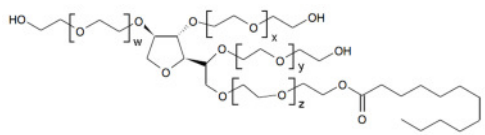
### 3 Material und Methoden

Atrazin		---/C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub> / Dr. Ehrenstorfer GmbH
Borsäure	---	---/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /Carl Roth
Bromphenolblau		--- C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S Merck
Calciumcarbonat	---	---/CaCO <sub>3</sub> /ProLabo-VWR
Calciumchlorid	---	---/CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O /Neo lab
Captopril		--- C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S Molekula Ltd.
Carbendazim		--- C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> AppliChem
Chloramphenicol		--- C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Sigma-Aldrich
Cobalt(II)-nitrat	---	---/Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O/ Sigma-Aldrich
Cobalt(II)-sulfat	---	---/CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O/ Sigma-Aldrich
Cochenille Rot A		--- C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub> VWR International
Dimethylsulfoxid		DMSO/C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS/ Merck



2,4-Dinitrophenol		DNP C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Acros Organics
D(+)-Glucose	---	---/C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> / Carl Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	---	---/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	---	---/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O/ Carl Roth
Eisen(III)-chlorid	---	---/FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O/ Merck
Eisen(II)-sulfat	---	---/FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O/ Merck
Ethanol	---	EtOH/C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O/ VWR International
Ethylendiamintetraessigsäure		EDTA C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum	---	FSK/---/ Invitrogen Life Technologies
Hefeextrakt	---	---/---/Carl Roth
Hafermehl	---	---/---/Sigma-Aldrich
Indigokarmin		--- C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> Fluka Analytical
Kaliumchlorid	---	---/KCl/Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	---	---/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Carl Roth
Kaliumhydroxid	---	---/KOH/Merck
Kaliumnitrat	---	---/KNO <sub>3</sub> /Merck
Kupferchlorid	---	---/CuCl <sub>2</sub> /Merck
Kupfersulfat	---	--/CuSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O/Merck

### 3 Material und Methoden

Lovastatin		--- C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub> Alfa Aesar GmbH
L(+)-Ascorbinsäure	---	---/C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> /Merck
Magnesiumsulfat	---	---/ MgSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O/Merck
Mangan(II)-chlorid	---	---/ MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O/Merck
Mangan(II)-sulfat	---	---/MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O/ Merck
Molybdän(VI)-oxid	---	---/MoO <sub>3</sub> /---
Natriumchlorid	---	---/NaCl/Carl Roth
Natriumhydroxid	---	---/NaOH/Merck
Natriumnitrat	---	---/NaNO <sub>3</sub> / VWR BDH Prolabo
Natriumtetraborat	---	Borax/Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> / Carl Roth
Orange G		--- C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> Merck
Patentblau		--- C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub> Omnikon
Perfluormethyl-decalin		PP9 C <sub>11</sub> F <sub>20</sub> F2 Chemicals Ltd.
Polysorbat 20		Tween 20 C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> Merck
Salpetersäure	---	---/HNO <sub>3</sub> /Merck

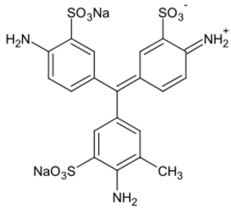
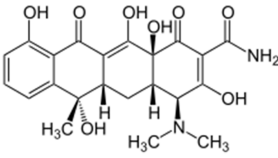
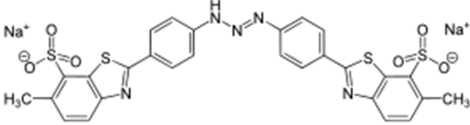
Säurefuchsin		--- C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub> Omnikon
Schwefelsäure	---	---/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Merck
Silbernitrat	---	---/AgNO <sub>3</sub> /Merck
Stärke	---	---/C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> / Carl Roth
Tetrachlorogold(III)-säure-Trihydrat	---	---/HAuCl <sub>4</sub> /Carl Roth
Tetracyclin		--- C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Carl Roth GmbH
Titangelb		--- C <sub>28</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> Merck
Zink(II)-chlorid	---	---/ZnCl <sub>2</sub> /Merck
Zinksulfat	---	---/ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O/ VWR International

Tabelle 3.2: Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
BBM Medium	250 mg/l NaNO <sub>3</sub> , 75 mg/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 25 mg/l CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 175 mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 75 mg/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 25 mg/l NaCl und 1 ml folgenden vier Spurenelementlösungen zugeben: 1) 50 g/l EDTA und 31 g/l KOH; 2) 4,98 g FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O gelöst in 1 l angesäuertem Aqua dest. (1,0 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz. ad 1 l Aqua dest.); 3) 11,42 g/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 4) 8,82 g/l ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,71 g/l MoO <sub>3</sub> , 0,49 g/l Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 1,44 g/l MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 1,57 g/l CuSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O. Anschließend wurde das Flüssigmedium mit ca. 1,5 % Agar verfestigt und bei 121 °C 20 min autoklaviert. Der pH-Wert liegt bei 6,4 ± 0,2.
IGV Medium	0,5 g/l KNO <sub>3</sub> , 0,34 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, 0,014 g/l FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, 50 mg/l EDTA, 7,4 mg/l ZnSO <sub>3</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, 0,57 mg/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 2,38 mg/l CoSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, 2,36 mg/l CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O, 41 mg/l MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O, 2,464 mg/l Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O, 31,072 mg/l MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, pH auf 6,7 einstellen bei 121°C 20 min autoklavieren.
LB-Lennox	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl
Minimal Medium	0,5 g/l-Asparagin, 0,5 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, 0,01 g/l FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, mit Aqua dest. auffüllen und autoklavieren und danach Glucoselösung hinzufügen, welches eine Endkonzentration von 1% D-Glucose in Medium ergibt.
Medium 2 (M2)	30 g/l D-Glucose, 10 g/l Pepton aus Casein, 5 g/l Cornsteep, 1,5 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1,5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5 g/l CaCO <sub>3</sub> und 1 ml Spurensalzlösung.
Medium 3 (M3)	5 g/l D-Glucose, 25 g/l Stärke, 10 g/L Pepton aus Casein, 5 g/l Hefeextrakt, 1,5 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1,5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5 g/l CaCO <sub>3</sub> und 1 ml Spurensalzlösung.
Phosphatpuffer (PBS)	8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,78 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O, 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH-Wert auf 7,4 einstellen.
Spurensalzlösung	40 mg/l ZnCl <sub>2</sub> , 200 mg/l FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 10 mg/l CuCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 10 mg/l MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 10 mg/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 10 mg/l Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>
Hafermehlagar	15 g/l Hafermehl und 20 g/l Agar
Synthetisches Medium	5,57 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,12 g/l MgSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 1 g/l NH <sub>4</sub> Cl mit Aqua dest. auffüllen und bei 121 °C 20 min autoklavieren. Danach Glucoselösung hinzufügen, welches eine Endkonzentration von 1 % Glucose in Medium ergibt.

Tabelle 3.3: Geräte


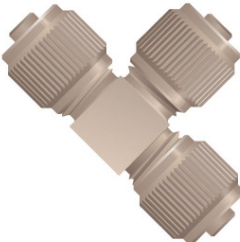
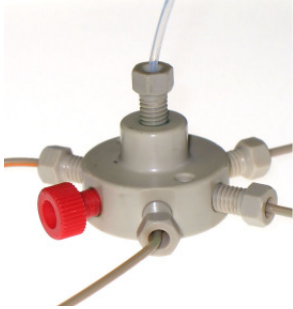
<b>Name</b>	<b>Firma</b>
Analysenwaage	Kern & Sohn KB500-2, VWR-124, Satorius Weighing Technology GmbH
Brutschrank für Bodenbakterien	Incubator MF-6w, HCP Technology GmbH
Brutschrank für <i>E. coli</i>	Heraeus B5060 EC-CO <sub>2</sub>
Brutschrank für <i>Chlorella</i>	EHRET KBK 4200, W. EHRET GmbH
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Thermo Fischer Scientific Model 321
Fluoreszenzspektroskopie	Axioplan 2 imaging, Zeiss
Mikroskope	Axiovert 40 CFL, Zeiss Motic Digital Microscop DMB-1223
Sterilbank	Captair bio cap DAN/RNA, Erlab GmbH, Babcock-BSH Laminar Flow
Vortex	Vortex Genie 2 G-560E, Scientific Industries
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner USC 200T, VWR International
Wasserbad	VWB 12, VWR International
Zentrifugen	Centrifuge Universal 320 R, Hettich lab Centrifuge Model SD 220 VAC, Carl Roth GmbH
UV-Vis Spektrometer	Specord 200/1, Analytik Jena AG
CPS	Disc Centrifuge Model DC20000, CPS Instruments
Platterinkubator	MSC Basic C , IKA laboratory equipment
Schüttler	Shaker S-4, neoLab
pH-Messgerät	CyberScan pH 510 Thermo Fischer Scientific
Inkubator+Schüttler	Incub LG Cap Shaker, VWR International
Autoklaven	AL02-03-100, Advantage-Lab
Universalwärmeschrank	UNB-100, Memmert GmbH

### 3.2 Mikrofluidsysteme

Im Rahmen der Erforschung multi-dimensionaler Kombinationswirkungen war die Weiterentwicklung eines bereits vorhandenen Laboraufbaus notwendig, gleichzeitig sollte eine Kompaktanordnung eines mikrofluidischen Systems mit integrierter Multisensorik für miniaturisierte toxikologische Screenings entwickelt werden.

Sowohl der Laboraufbau als auch das Kompaktsystem setzten sich aus Segmentierungs-, Injektions-, Detektions- und Speicherungseinheiten zusammen, welche mit PTFE (Polytetrafluorethylen)- bzw. im Detektionsbereich mit transparenten FEP (Fluorethylenpropylen)-Schläuchen verbunden wurden. Zur Generierung von Segmentsequenzen wurden kommerziell erhältliche PTFE- und PEEK (Polyetheretherketone)-Komponenten der Firma Upchurch Scientific eingesetzt. Einen Überblick der eingesetzten Segmentierungsmodule zeigt Tabelle 3.4.

Tabelle 3.4: Verbindungselemente für Erzeugung von Mikrofluidsegmenten

Bezeichnung	T-Verbindung P-632	T-Verbindung P-885	7-Port-Manifold P-170
Image			
Schlauch $\varnothing$ (Außen)	1,6 mm	0,8 mm	1,6 mm
Kanal $\varnothing$ (Innen)	0,5 mm	0,152 mm	0,5 mm
Totvolumen	2,9 $\mu$ l	29 nl	2,2 $\mu$ l

Der Einsatz von polymerbasierten Segmentierungsmodulen ermöglichte eine einfache Handhabung, erlaubte den Eingriff in den Segmentierungsprozess zu jedem Zeitpunkt und trug wesentlich zur schnellen Erzeugung von Segmentsequenzen bei. Das Auftreten von Verstopfungen konnte mittels kurzzeitigen Eintauchens der Module im H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) und einem anschließenden 15 minütigem Ultraschallbad beseitigt werden.

### 3.2.1 Laboranordnung des mikrofluidischen Systems

Zur Generierung von Segmentsequenzen für die Untersuchung von Einzel- und Kombinationswirkungen verschiedener Modellsubstanzen für in dieser Arbeit dargestellte Experimente mit *E. coli*, *Chlorella vulgaris* und Leukämiezellen IPC-81 wurde die in Abbildung 3.1 visualisierte Laboranordnung eingesetzt. Für die untersuchten *E. coli* Bakterien und die Grünalge *Chlorella vulgaris* konnte der gleiche modulare Laboraufbau mit denselben Schlauchdimensionen (Außendurchmesser 1,6 mm, Innendurchmesser 0,5 mm) eingesetzt werden. Da die Leukämiezellen IPC-81 einen hohen Sauerstoffbedarf haben, wurde für die Untersuchung mit IPC-81 ein FEP-Schlauch mit einer Wanddicke von 0,2 mm (AD 0,8 mm und ID 0,4 mm) und der damit verbundenen hohen Gaspermeabilität verwendet.

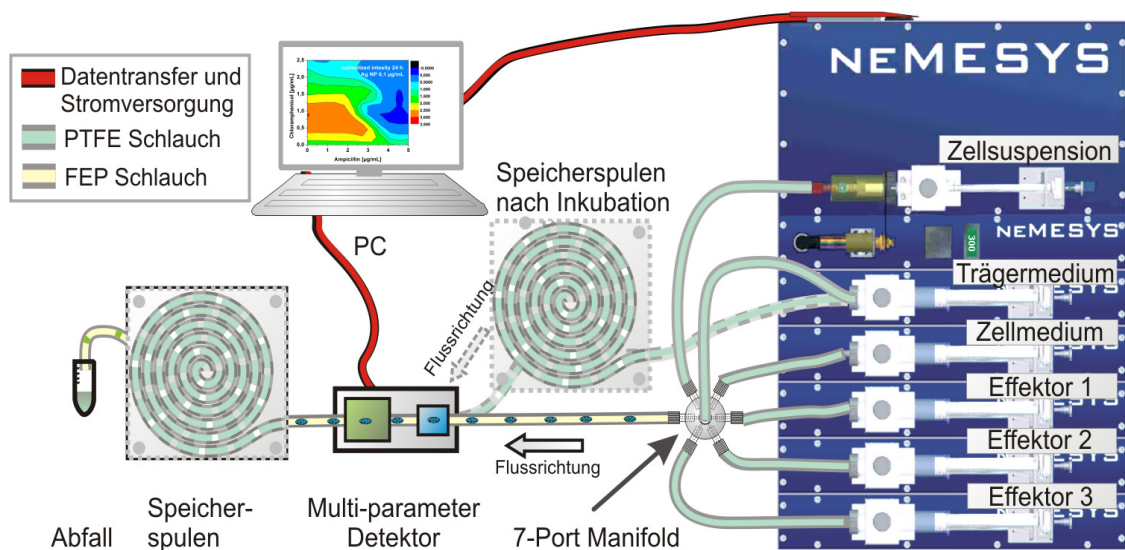


Abbildung 3.1: Laboraufbau des Mikrofluidsystems für die Erzeugung und Charakterisierung von ein- bis dreidimensionalen Parameterfeldern

Zur Untersuchung der Wachstumskinetik wurde das T-Stück eingesetzt. Für die Untersuchung von Multi-parameter-Konzentrationsfeldern wurde ein 7-Port Manifold mit 0,5 mm Kanaldurchmesser und einem Totvolumen von 2,2  $\mu\text{l}$  integriert. Die Volumen der eingesetzten Glasspritzen (ILS) lagen bei 500  $\mu\text{l}$  für das Nährmedium und bei den Effektorlösungen sowie bei 5.000  $\mu\text{l}$  für die Trägerflüssigkeit. Nach der Überführung aller Lösungen in die Spritzen wurden diese über FEP-Schläuche mit dem Manifold verbunden und auf den Spritzenplätzen fixiert. Die homogene Verteilung der Zell- oder Beadsuspension im Mikrofluidsegment konnte durch ein integriertes Spritzenrührersystem (neMIX, Cetoni GmbH) mit 2500  $\mu\text{l}$  Glasspritzen gewährleistet werden. Das Monitoring der Mikrofluidsegmente auf unterschiedliche Screeningparameter erfolgte direkt durch einen transparenten FEP-Schlauch (ID 0,5 mm und AD 1,6 mm). Zwei integrierte Mehrkanal-Mikrodurchflusssensoren ermöglichten die simultane Auslesung von Trübungs- und Fluoreszenzsignalen (siehe Kapitel 3.3).

Zur Lagerung der erzeugten Mikrofluidsegmente wurden PTFE-Schlauchspulen verwendet, die bestehend aus PMMA (Polymethylmethacrylat) Platten mit darauf aufgewickelten 7 m Schlauchspulen in der Lage sind, bis zu 600 Segmente zu speichern. Die Steuerung des Fluidstromes und damit die Einstellung der Konzentrationsbereiche in den Segmenten konnte über spezielle LabView™-Programme zur Erzeugung von Segmentsequenzen für Einzel- und Kombinationswirkungsscreenings realisiert werden (siehe Kapitel 3.2.3).

### 3.2.2 Kompaktes mikrofluidische System

Die Konzeption des Kompaktaufbaus wurde basierend auf der ursprünglichen Vorhabensbeschreibung auf die Anforderungen der Applikationen abgestimmt und konkretisiert. Die notwendigen Geräte-Komponenten wurden anhand bestehender Erfahrungswerte ausgewählt und beschafft. Neben der Auswahl, Spezifikation, Beschaffung und der mechanischen Platzierung einzelner Subkomponenten im Kompaktaufbau war es notwendig, eine Konzeption der erforderlichen Spannungs-versorgungen zu erstellen sowie die Datenkommunikation zwischen dem Steuerrechner und den einzelnen Komponenten zu definieren.

Analog zum Laboraufbau setzte sich die Kompaktanordnung des Mikrofluidsystems aus Injektions-, Segmentierungs-, Detektions-, und Speichereinheit zusammen, welche mit transparenten FEP-Schläuchen miteinander verbunden wurden. Die Dimensionen der Schläuche liegen dabei für den Außendurchmesser bei 1,6 mm und für den Innendurchmesser bei 0,5 mm. Das entwickelte Kompakt-Mikrofluidsystem ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

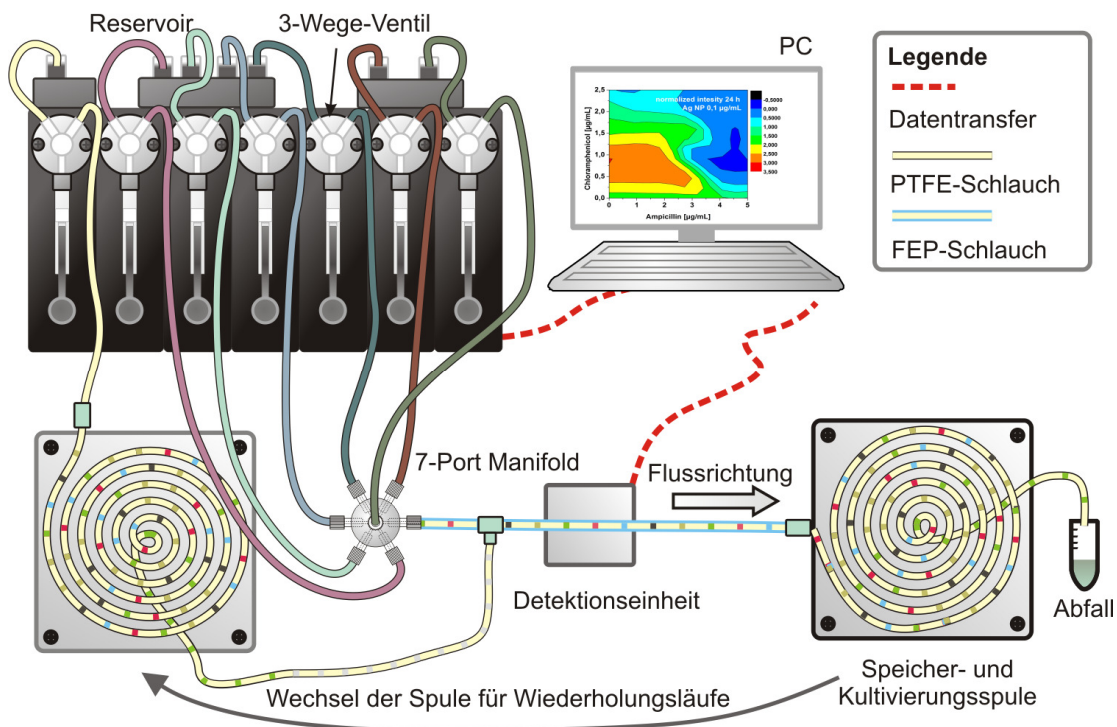


Abbildung 3.2: Kompaktes Mikrofluidsystems für die Erzeugung und Charakterisierung von Mikrofluidsegmenten.



Eine Übersicht aller eingebauten Komponenten für das kompakte Mikrofluidsystem ist in der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

*Tabelle 3.5: Auflistung aller Komponenten des Kompaktaufbaus*

<b>Funktion</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Komponente/Firma</b>
Segment- generierung	7-Kanal Spritzenpumpen mit 3- Weg-Ventil	Cavro (TECAN GmbH)
	Zellsuspension Rührflasche	NEMIX (Cetoni GmbH)
	7-Port-Manifold	Upchurch Deutschland
Segment- speicherung	Speicherspulen aus PMMA	Eigenbau
Segment- erkennung und - analyse	Drucksensor (0..5 bar) mit 3-Weg-Hahn	SML-20.4 (Adz Nagano Sensortechnik) PTFE (Bohlender GmbH)
	4-Kanal-Photometer-Modul	Eigenbau
	2-Kanal-Fluorimeter-Modul mit Photosensor Module (PMT Tube)	Eigenbau H10722-20 (Hamamatsu Photonics GmbH)
	USB Mikroskop-Kamera 10-200 fache Vergrößerung	Somikon
Datenerfassung und -transfer	7-Kanal USB-Hub	DIGI International
	Datenerfassungsmodul NI USB-6211	National Instruments Deutschland
Steuereinheit	Steuerungsrechner	Lenovo ThinkPad Edge

Für die Probeaufnahme zeigte der Kompaktaufbau eine wesentlich bessere Handhabung im Vergleich zum Laboraufbau aufgrund der integrierten 3-Wege-Ventile an den Spritzenpumpensystemen. Auf einer Seite des Ventils wurde ein PTFE-Schlauch mit Reservoir angeschlossen und auf der anderen Seite das 7-Port-Manifold. Letzteres war das Kernelement zur Erzeugung der Segmente. Die verwendeten Glasspritzen wiesen je nach Inhalt verschiedene Volumina auf. Für die Probensuspensionen wurden einheitlich 250 µl- oder 500 µl-Spritzen und für das Trägermedium PP9 stets eine 5 ml-Spritze eingesetzt.

### 3.2.3 Adressierung von Konzentrationsräumen in Mikrofluidsegmenten

Im Gegensatz zu anderen Dosier-techniken wie beispielsweise der Mikropipetierung, ermöglicht die Mikrofluidsegmenttechnik die Realisierung von Proben mit einer gut definierbaren Zusammensetzung ohne einzelne Dosierschritte. Eine stufenweise Änderung der Konzentration der einzelnen Proben kann ohne individuelles Pipettieren oder Fluidschaltung realisiert werden. Durch die Erstellung sequentieller in Schläuchen angeordneter Konzentrationsräume ist die Generierung von ein- und mehrdimensionalen Konzentrationsräumen in hoher Qualität und kürzester Zeit möglich. Dazu wurde eine Datentabelle für die Spritzenpumpen mit LabView erstellt, welche durch eine PC-gesteuerte Variation der Flussraten einzelner Volumenströme die Erzeugung komplex abgestufter Konzentrationsabläufe ermöglichte. Mittels komplementärer Fluidzuführung wurde erreicht, dass bei konstanter Gesamtflussrate die fluiddynamischen Bedingungen bei der Bildung der Segmente konstant gehalten werden konnten, so dass Segmente mit identischem Volumen und regelmäßigem Abstand gebildet werden konnten, deren Zusammensetzung jedoch gemäß der Vorgaben variierte.

Die Konzentration einer bestimmten Komponente  $c_i$  wird durch die Konzentration  $c_{i0}$  der Zulauflösung dieser Komponente, ihrer Flussrate  $\dot{V}_i$  mit

$$\dot{V} = \frac{dv}{dt} \quad (3.1)$$

und der gesamten Flussrate der Lösungen aller, zur Bildung des Segments  $\dot{V}_{ges}$  beteiligten Komponenten, berechnet (Formel 3.2):

$$c_i = c_{i0} \cdot \frac{\dot{V}_i}{\dot{V}_{ges}} \quad (3.2)$$

Wie erwähnt, wurde für alle Experimente die Gesamtflussrate konstant gehalten,

$$\dot{V} = \sum_{i=1}^n \dot{V}_i = const. \quad (3.3)$$

wobei  $n$  die Anzahl der fluidischen Komponenten ist, die an der Segmentbildung beteiligt sind. Die Variation der Konzentration erfolgte mit einer kontinuierlichen bzw. stufenweisen Änderung der Flussrate von einer Komponente zu anderen Komponenten.

$$\dot{V}_{ges} = 0 = \dot{V}_i + \sum \dot{V}_j \quad \text{mit } (j \neq i) \quad (3.4)$$

Die einfachste Konzentrationsvariation ist die lineare Flussratenänderung. Die Konzentration von Substanzen im Fluidsegment hängt lediglich von der ursprünglichen Konzentration der Zulauflösung  $c_{i0}$ , von dem Flussratenverhältnis und der Dauer der Bildung eines einzelnen Segments ab.

Im Fall einer periodischen Linearänderung hängt die Flussrate zu einem bestimmten Zeitpunkt von der Dauer  $t_i$  des Variationsintervalls ab. Im Fall eines regelmäßigen periodischen Variationsintervalls einer bestimmten Komponente wurde  $t_{li}$  definiert als Hälfte der Variationsperiode:

$$t_{li} = \frac{t_i}{2} \quad (3.5)$$

Die gesamte Anzahl der Intervalle in einem Experiment  $I_{li,ges}$  für eine bestimmte Komponente wird durch die Verhältnisbildung der Generierungszeit der gesamten Segmentsequenzen  $t_{ges}$  zu  $t_{li}$  bestimmt.

$$I_{li,ges} = \frac{t_{ges}}{t_{li}} \quad (3.6)$$

Die Intervall-interne Zeit  $t_{vi}$  ist gegeben durch

$$t_{vi} = t - (I_{i,n} - 1) \cdot t_{li} \quad ; \quad l \in \mathbb{N}; \{1..n\} \quad (3.7)$$

Die mittlere Flussrate einer Komponente während der Bildung eines Segments  $\dot{V}_{vi}$  wird durch die maximale Flussrate auf dieser Komponente  $\dot{V}_{i,max}$  multipliziert mit der Intervall-internen Zeit  $t_{vi}$  und der Verhältnisbildung zur Dauer eines Variationsintervalls  $t_{li}$  bestimmt.

$$\dot{V}_{vi} = \begin{cases} \dot{V}_{i,max} \cdot \frac{t_{vi}}{t_{li}} & ; \quad \frac{d\dot{V}_t}{dt} > 0 \\ \dot{V}_{i,max} \cdot \left(1 - \frac{t_{vi}}{t_{li}}\right) & ; \quad \frac{d\dot{V}_t}{dt} < 0 \end{cases} \quad (3.8)$$

Die Konzentration einer Komponente in einem bestimmten Segment ist gegeben durch

$$c_{vi} = c_{i0} \cdot \frac{\dot{V}_{vi}}{\dot{V}_{i,ges}} \quad (3.9)$$

Die Gesamtanzahl der Segmente  $N$  einer Sequenz ist gegeben durch die Gesamtflussrate aller Komponenten, die an der Segmentbildung beteiligt sind  $\dot{V}_{ges}$ , der zur Erzeugung der Sequenzen benötigten Zeit  $t_{ges}$  und das Volumen eines einzelnen Segments  $V_{seg}$ .

$$N = t_{ges} \cdot \frac{\dot{V}_{ges}}{V_{seg}} \quad (3.10)$$

Um eine homogene Verteilung aller Segmente in den Konzentrationsräumen zu erzielen, ist eine stetige und nicht sprunghafte Änderung der Flussrate wichtig. Die Verifikation der tatsächlichen Konzentration im Segment ist auch viel einfacher, wenn eine regelmäßige Flussratenänderung für alle Komponenten verwendet wurde.

Um die Konzentrationsadressierung zu erzielen, muss der Unterschied zur maximalen Gesamtflussrate der erforderlichen Komponenten durch eine komplementäre Flussratenänderung von einem Puffermedium bzw. Nährmedium kompensiert werden.

Die Definition der Konzentrationsauflösung ist stark von der Anzahl der Dimensionen abhängig. Die Gesamtanzahl der Segmente  $N$  zur Abdeckung bestimmter Konzentrationsräume wurde durch die Anzahl der Komponenten  $n$  (Dimensionen, Anzahl der Konzentrationsachsen), die Anzahl von Konzentrationsintervalle  $z$  und die Anzahl der Segmente  $A$  für jeden Konzentrationspunkt bestimmt:

$$N = A \cdot z^n \quad \text{mit} \quad z = z_i = \frac{c_{i0}}{\Delta c_i} + 1 = \text{const.} \quad (3.11)$$

Zur Demonstration sind verschiedene Beispiele von Konzentrationsräumen in Tabelle 3.6 angegeben.

*Tabelle 3.6: Beispiele von Konzentrationsräumen mit symmetrischen Unterteilungen der Konzentrationsintervalle und linearer Flussratenänderung des segmentierten Flusses*

Anzahl der Komponenten (n)	Anzahl der Konzentrationsintervalle (z)	Konzentrationsintervall ( $\Delta c$ )	Segment je Konzentrationspunkt (A)	Gesamtanzahl der Segmente (N)
2	30	3,3%	5	4.500
	11	10%	10	1.210
3	11	10%	4	5.324
	6	20%	5	1.080
4	6	20%	4	5.184
	4	33%	4	1.024
5	4	33%	5	5.120
	3	50%	4	972
	3	50%	22	5.346

Die Adressierung eines kompletten Konzentrationsraums von zwei oder mehr Dimensionen kann auf verschiedene Weise organisiert sein. Abhängig vom Anwendungsfall wurden entweder diskrete Flussratenänderungen mit oder ohne Gaps (Blockprogramm), oder kontinuierliche Flussratenänderungen (Rampenprogramm) verwendet.

Bei den **Rampenprogrammen** ist eine schnelle Einstellung kleinster Konzentrationsabstufungen im Segment möglich. Durch kontinuierliche Änderung der Volumenströme konnten nahezu stufenlose, hochaufgelöste Konzentrationsverläufe realisiert werden. Für die Ermittlung der hochaufgelösten Dosis-Wirkungs-Beziehungen von einzelnen Wirkstoffen wurden im Abbildung 3.3 dargestellten Programm verwendet.

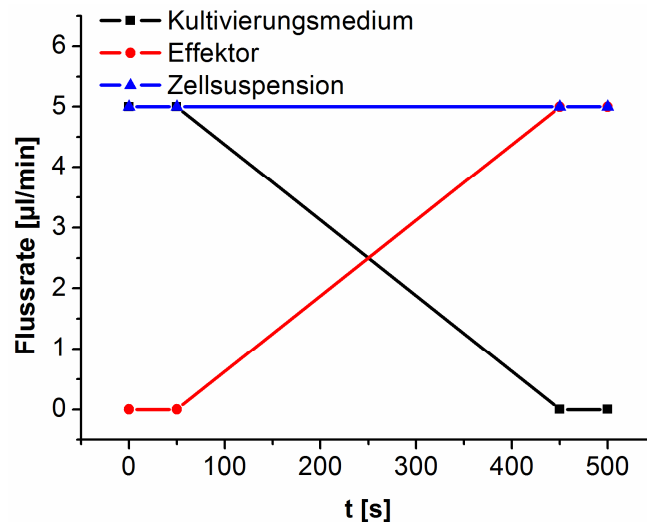


Abbildung 3.3: Pumpenverlauf für die kontinuierliche Erzeugung von Konzentrationsgradienten Einzelwirkungs screening.

Die Anwendung von **Blockprogrammen** mit Gaps (Abbildung 3.4a) ermöglichte die Erzeugung einzelner, durch das Separationsmedium voneinander getrennter Segmentblöcke, wobei innerhalb eines Blockes die Zusammensetzung der Substanzlösung konstant gehalten wurde. Der Vorteil von Blockprogramm liegt in der sehr einfachen und genauen Konzentrationszuordnung. Außerdem erlaubt diese Methode statistische Analysen einer Konzentrationsreihe. Das Programm wurde ausschließlich für das dreidimensionale Screening eingesetzt. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch der hohe Zeit- und Materialaufwand. Mit verbesserten Segmentdetektions- und Analyse-Methoden konnten Blockprogrammen ohne Gaps mit sogenannten **Stufenprogrammen** (siehe Beispiel in Abbildung 3.4b) als Standard zweidimensionale und dreidimensionale Screeningprogramme eingesetzt werden. Die Stufenprogramme eignen sich wegen ihrer hohen statistischen Analysen als auch wegen des geringeren Zeitaufwands im Vergleich zu Blockprogrammen mit Gaps besser zur Erzeugung mehrdimensionaler Screeningsabläufe.

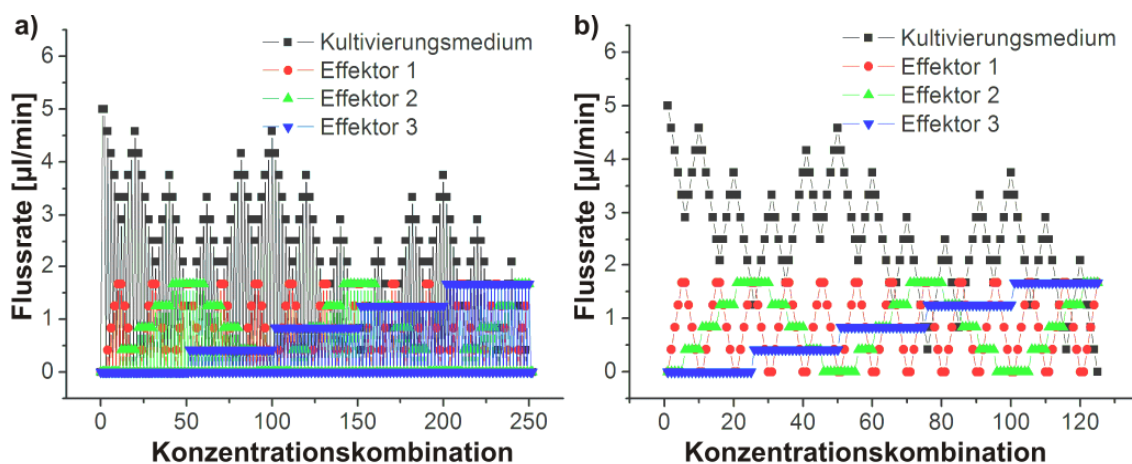


Abbildung 3.4: Pumpenverlauf für das Screening von drei Wirkstoffen mit 20% Konzentrationsabstufungen ( $5^3=125$  Kombinationen)  
a) Blockprogramme mit Gaps, b) Stufenprogramm ohne Gaps.

#### 3.2.4 Segmenterkennung und Datenverarbeitung

Zur Segmenterkennung und Datenverarbeitung wurde das von der Arbeitsgruppe entwickelte LabView-Programm „Segmentanalyse“ verwendet. Das Flussdiagramm zur Datenverarbeitung ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Segmentsequenzen wurden online mit einer Abtastrate von 100 Hz gemessen (Rohdaten). Durch das LabView-Analyseprogramm konnten segmentspezifische Daten wie Segmentgröße, Segmentabstand zwischen zwei Nachbarsegmenten und optische Dichte oder Fluoreszenzintensität offline analysiert werden. Um die Segmente zu detektieren, muss die obere und untere Schwelle des Extinktionsintervalls des Trägermediums sowie das Zeitfenster des minimalen Segmentabstands definiert werden. Das Segment beginnt, wenn die Extinktion außerhalb der Schwellenwerte des Trägermediums liegt und das Ende des Segments wird erkannt, wenn alle Extinktionswerte in diesem Zeitintervall innerhalb der Grenzwerte lagen.

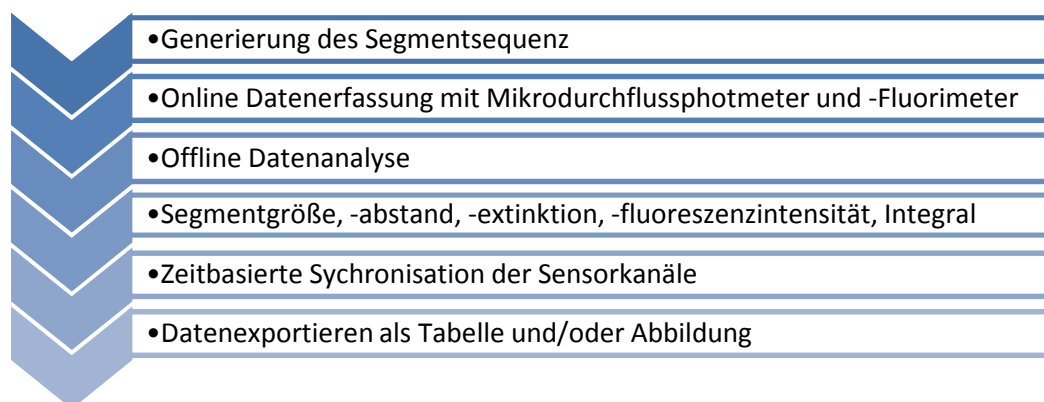


Abbildung 3.5: Flussdiagramm zur Datenverarbeitung der Segmentsequenzen

Da die Mikroorganismen manchmal inhomogen im Segment wuchsen, erfolgte die Auswertung des Wachstums durch Integralbildung der Extinktion bezogen auf die Segmentgröße. Aufgrund möglicher Falscherkennungen in den einzelnen Sensorkanälen, wurde eine zeitbasierte Synchronisation für alle Segmente durchgeführt. Das erste in allen Kanälen richtig erkannte Segment wird als Bezugssegment für einen zeitbasierten Vergleich für folgende Segmente verwendet. Falsche Detektion tritt auf, wenn die Extinktion des Segments für das angegebene Zeitintervall der Extinktion des Trägermediums entspricht (Zunahme der Segmentanzahl) oder wenn der Abstand zwischen zwei Segmenten geringer ist als das definierte Zeitintervall (Abnahme der Segmentanzahl). Normalerweise treten nur wenige Fehler auf. Diese werden durch die Datensynchronisation erkannt und korrigiert. Somit ermöglicht die zeitbasierte Synchronisation eine eindeutige Zuordnung zwischen den einzelnen Segmenten und verhindert Analysefehler. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Tabellen exportiert und in Grafikdaten umgewandelt.

### 3.3 Multisensorik unter mikrofluidischen Bedingungen

Wenn es um die Erforschung biologischer Systeme geht, stehen bedingt durch ihren nicht-invasiven Charakter sehr oft optische Messmethoden im Vordergrund. Bei nicht-invasiven, optischen Messungen werden insbesondere die spektralen Eigenschaften ausgenutzt, um Aussagen über die Biomasse und die metabolische Aktivität der Zellen zu erhalten.

Auf Grund der einfachen Handhabbarkeit, Robustheit und günstiger Anschaffungskosten haben Photometer für photometrische Bestimmungen einen hohen Stellenwert und liegen vielen DIN-Verfahren in der Wasser- und Umweltanalytik zugrunde.

Neben der Photometrie wächst auch die Bedeutung der Fluoreszenz-Messung für die Biowissenschaft. Zum einen dient er zur Messung der Fluoreszenz und Lumineszenz durch Zugabe von Fluorophoren (auch in der Form von Sensorbeads). Zum anderen dient sie zur Messung der endogenous Autofluoreszenz. Da es in pflanzlichen und tierischen Organismen eine Reihe natürlich endogener Fluorophore gibt, z.B. aromatische Aminosäure Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin fluoresziert im UV-Bereich (Absorptionsmaximum unterhalb von 300 nm). Aus Aminosäuren aufgebaute Proteine fluoreszieren in der Regel nach UV-Anregung mit Emissionsmaxima zwischen 350-400 nm. Des Weiteren zählen zu den natürlichen Fluorophoren das Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) mit einer Absorptionsmaximum von 340 nm und Emissionsmaximum von 460 nm, sowie die Flavin-Coenzyme Flavin-Adenin-Dinukleotid (FDA) und Flavin-Mono-Nukleotid (FMN), die im UV-Vis-Bereich fluoreszieren (Absorption: 450 nm und Emission: 525 nm) [174]. Änderung des Zellzustands während physiologischer und/oder pathologischer Prozesse führen zur Änderung der Menge und Verteilung der endogenen Fluorophore und chemisch-physikalischer Eigenschaften in der Mikroumgebung der Zellen. Weshalb erlaubt die Autofluoreszenzmessung die Rückschlüsse auf den Status Zellmetabolismus [175].

Aus den obengenannten Gründen, wurden Mehrkanal-Photometrie und -Fluorimetrie in die Entwicklung der Mikrodurchflusssensorsysteme integriert. Zur Umsetzung eines Messaufbaus zur Bestimmung toxikologischer Endpunkte waren verschiedene Herausforderungen zu bewältigen. Hervorzuheben ist hierbei die erforderliche Verweilzeit eines sich schnell bewegenden Fluidsegments im Sensorbereich, die im oberen Millisekunden-Bereich rangiert. Daher war für die Überwachung und Steuerung der Segmente ein schnelles on-line Messverfahren notwendig. Diese Anforderungen konnten mit Hilfe von uns entwickelten Mikrodurchflussphotometern und Mikrodurchfluss-fluorimetern ermöglicht werden.

### 3.3.1 Mikrodurchflussphotometrie

Die von der Arbeitsgruppe entwickelten Mikrodurchflussphotometer bestehen aus einer Leuchtdiode (LED) zur Lichtversorgung im gewünschten Spektralbereich, einer Monitordiode, zwei Blendenbohrungen und einer Photodiode zur Erfassung. Die Monitordiode gewährleistet via PI-Regelung einen konstanten Lichtstrom und kompensiert Schwankungen der Leuchtdiode, welche z.B. durch Temperatureffekte oder Alterserscheinungen der LED verursacht werden. Alle Komponenten im kompakten Gehäuse mit einer zentralen Bohrung für die Aufnahme des Mikrokanals angebracht (siehe Abbildung 3.6).

Von der Lichtquelle wird zunächst das Licht  $I_0$  mit einer bestimmten Wellenlänge ausgesandt. Die Probe, welche sich im transparenten Schlauch befindet, wird von einem Lichtstrahl durchleuchtet und wirft ein entsprechend abgeschwächtes Licht  $I$  auf den Detektor auf der gegenüberliegenden Seite. Zur Charakterisierung der Absorptionsintensität bzw. der Konzentration der absorbierenden Substanz kann die Extinktion verwendet werden. Diese berechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt:

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = d \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot c \quad (3.12)$$

In einem homogenen Medium wird die Intensität des einfallenden Lichtes  $I_0$  längs des Weges  $d$  exponentiell geschwächt. Der Ausdruck  $I/I_0$  wird Transmission genannt. Die Extinktion  $E$  ist ein Maß für die Verringerung der Strahlungsintensität  $I_0$  beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz und setzt sich aus den Intensitätsverlusten durch Absorption und Reflektion bzw. bei nicht plan-parallelen Objekten durch Streuung und Brechung zusammen. Die stoffspezifische Konstante  $\varepsilon$  wird als molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bezeichnet und ist von der Wellenlänge des einfallenden Lichtes abhängig  $\varepsilon(\lambda)$ . Die Einheiten der Größen lauten wie folgt:

$E$	Extinktion [Einheitslos]
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{m}^2/\text{mol}$ ]
$d$	optischer Weg [m]
$c$	Konzentration [mol/l]

Für die Messung in unterschiedlichen Spektralbereichen, werden mehrere LEDs und Photodioden sequentiell in einem Gehäuse integriert. Der Sensorblock mit vier Spektralbereichen hat eine Abmessung von 6x2x2 cm. Die Blendenbohrungen auf der Anregungsseite betrug 0,3 mm und auf der Detektionsseite 0,5 mm. Um das Streulicht von benachbarten LEDs zu minimieren sowie Intensitätsschwankungen durch Schlauchbewegungen zu verhindern, wurde der Schlauch meanderförmig von Photometer zu Photometer eingebettet (siehe Abbildung 3.6).



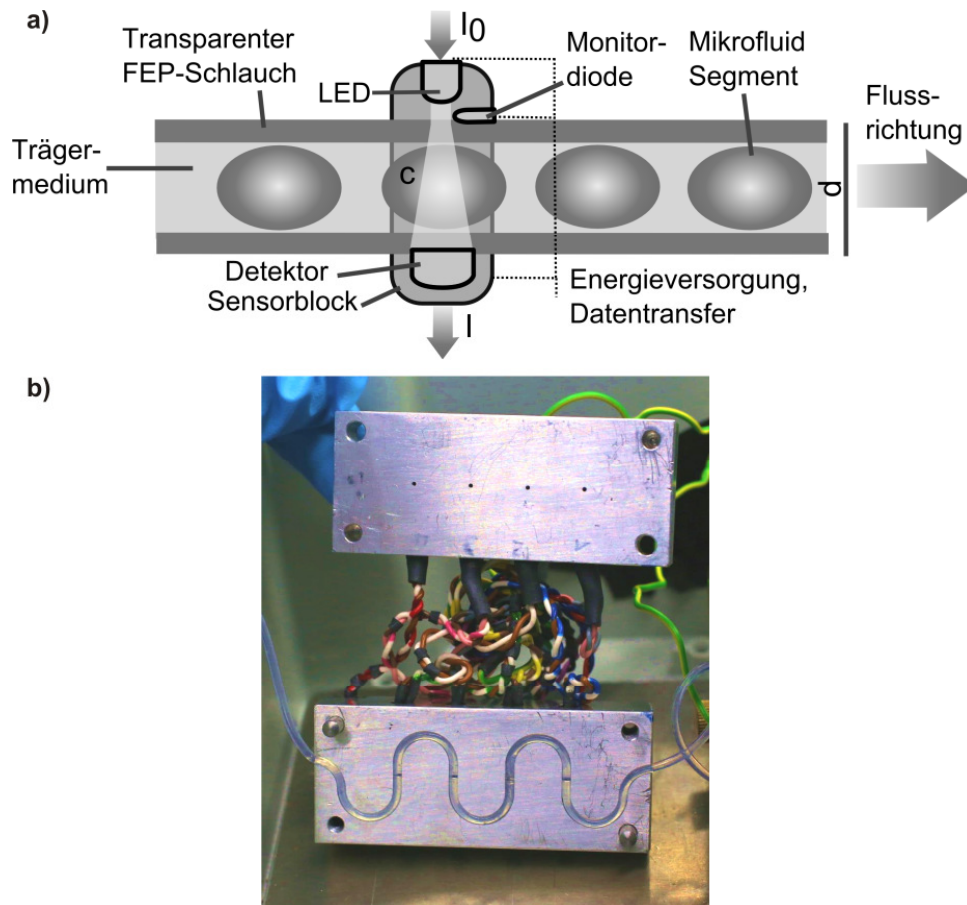


Abbildung 3.6: Mikrodurchflussphotometer zur schnellen optischen Charakterisierung von mikrofluidischen Segmentsequenzen a) Schema der Mikrodurchflussphotometer b) Photo des geöffneten 4-Kanal-Mikrodurchflusssensorblocks.

Ein großer Vorteil dieser Messsensoren bestand in der hohen Messfrequenz von bis zu 10 kHz. Für das Kompaktphotometer kamen LEDs mit Emissionsmaxima bei 470 nm (Nichia), 505 nm (Avago Technologies), 610 nm (Avago Technologies) und 660 nm (Kingbright), je eine Detektions-Photodiode (SFH206K von Siemens) und je eine Monitor-Photodiode (SFH203 von Siemens) zum Einsatz. Durch Einsatz des Mehrkanal-photometers ermöglichte sowohl die Bestimmung des Zellwachstums als auch die Detektion der Bildung von Chromophoren von Zellen.

Die Untersuchungen wurden mit Messfrequenzen zwischen 100-1.000 Hz durchgeführt, sodass bei den eingestellten Gesamtflussraten von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  jedes Segment etwa einhundertmal abgetastet werden konnte. Es wurden zwei verschiedene segmentbezogene Zeiten registriert. Zum einen wurde die Zeitdauer, die ein Segment benötigte um den Sensor zu passieren, erfasst. Aus dieser Zeitdauer lässt sich bei bekannter Flussrate die Segmentlänge abschätzen. Zum anderen wurde die Zeitdauer zwischen zwei aufeinander folgenden Segmenten erfasst, die äquivalent zum Segmentabstand ist. Weiterhin kann das Mikrodurchflussphotometer auch für die Überwachung der Sequenzmarkierungen und für die Qualitätskontrolle der Segmentsequenz durch die Detektion von beispielsweise Segmentfusion und -spaltung eingesetzt werden.

### 3.3.2 Mikrodurchflussfluorimetrie

Die analytische Bedeutung der Fluoreszenzfluorimeter begründet sich aus der hohen Nachweisstärke in ihrem großen, dynamischen Messbereich (Linearität der Intensität/Konzentrations-Beziehung). Bereits in meiner Diplomarbeit wurde ein Mikrodurchflussfluorimeter für die optische pH-Auslesung entwickelt [176]. In der Doktorarbeit folgte eine weitere Entwicklung des Fluorimeters für die Intensitätsmessung der Autofluoreszenz der Zellen sowie für den segmentinternen  $pO_2$ -Wert.

Die Fluoreszenzintensität ist definiert als Anzahl der Photonen (bezogen auf Mol), die pro Zeiteinheit emittiert werden. Nach Anregung einer fluoreszenzfähigen Probe mit Licht der Intensität  $I_0(\lambda')$  bzw.  $N_0(\lambda')$  und der Wellenlänge  $\lambda'$  wird ein Teil der absorbierten Energie wieder in Form von Strahlung der Intensität  $I_F$  bzw. der Photonenzahl  $N_F$  bei der Wellenlänge  $\lambda$  emittiert, die Informationen über die Eigenschaften der Probe enthält.

In der Literatur werden als Maß für die Stärke der Fluoreszenz sowohl die Intensität (als Strahlungsleistung pro Fläche  $F$ , Maßeinheit  $\text{Watt}/\text{cm}^2$ ) bzw. die relative Intensität als auch die Photonenzahl oder die Photonenstromdichte ( $N/(t \cdot F)$ , auch bezeichnet als Photonenintensität) verwendet. Der Zusammenhang zwischen Intensität und Photonenzahl ist nach der Planck'schen Formel (3.13) gegeben:

$$I_F = N \cdot \frac{h \cdot c}{\lambda} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{F} \quad \text{mit} \quad \Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (3.13)$$

mit	$I_F$ :	Intensität des Fluoreszenzlichts
	$N$ :	Photonenzahl
	$h$ :	Planck'sches Wirkungsquantum $h=6,6260693 \cdot 10^{-34}$ [Js]
	$\nu$ :	Frequenz [ $\text{s}^{-1}$ ]
	$c$ :	Vakuumlichtgeschwindigkeit $c=2,99792458 \cdot 10^8$ [m/s]
	$1/\lambda$ :	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]
	$F$ :	Fläche
	$t$ :	Zeit

Bei gegebener Wellenlänge lassen sich Intensität und Photonenzahl leicht ineinander umrechnen. Die Fluoreszenzintensität wird im Wesentlichen durch die Fluoreszenzquantenausbeute und den Absorptionskoeffizienten (bei  $\lambda'$ ) des fluoreszierenden Stoffes, seine Konzentration und die Anregungsintensität bestimmt. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute gibt den Anteil der angeregten Moleküle an, die durch Fluoreszenzemission in den Grundzustand übergehen. Sie ist nur zur Lebensdauer des angeregten Zustandes proportional, wenn keine anderen Deaktivierungspfade zu beobachten sind.

Im Gegensatz zum mikrodurchflussphotometerischem System wurde bei der Mikrodurchflussfluorimetrie eine orthogonale Anordnung gewählt. Es ist grundsätzlich möglich, die Fluoreszenzstrahlung aus allen Richtungen zu empfangen, da sie in jede Raumrichtung abgegeben wird. Es hat sich jedoch gezeigt, dass es messtechnisch am günstigsten ist, wenn die Fluoreszenzstrahlung rechtwinklig zur Anregungsstrahlung detektiert wird. Bei dieser geometrischen Anordnung ist der unerwünschte Anteil an Streustrahlung bei der Anregungswellenlänge, hervorgerufen durch die Schlauchwand und das Lösungsmittel,

minimal. Deswegen wurde eine solche Anordnung in dieser Arbeit verwendet. Zur Illustration ist der Querschnitt eines Mikroliterdurchflussfluorimeters schematisch in Abbildung 3.7a dargestellt.

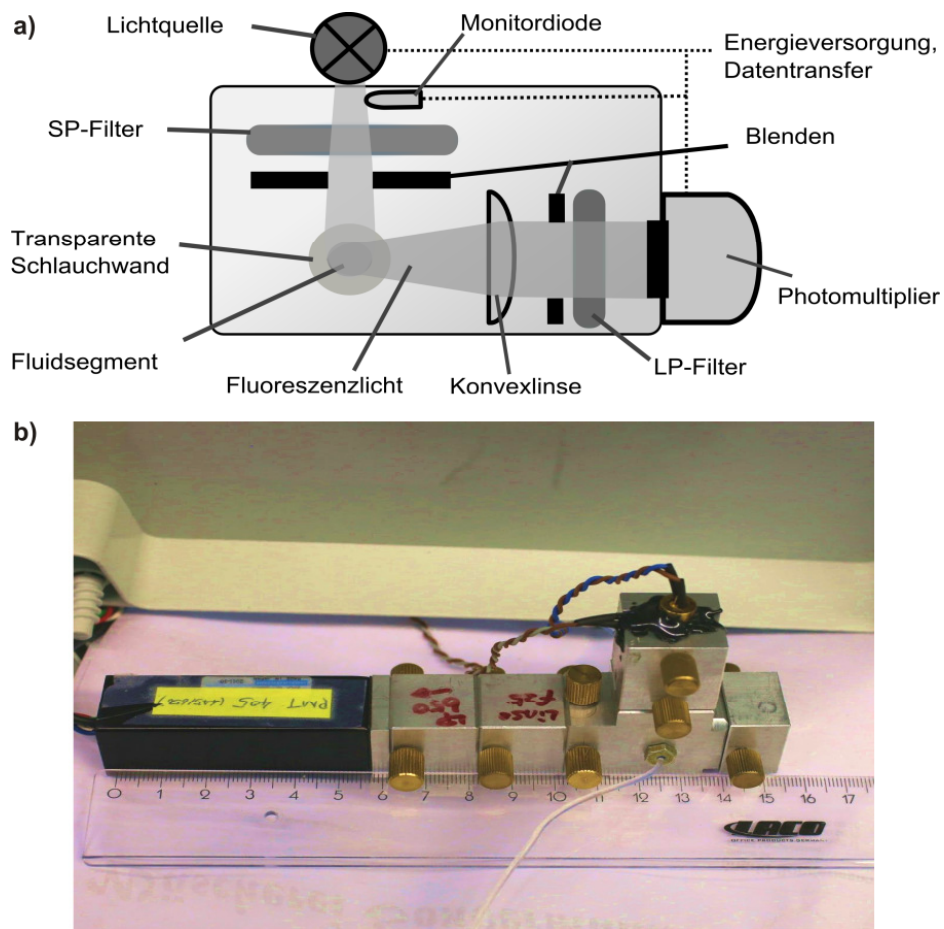


Abbildung 3.7: Mikrodurchflussfluorimeter zur schnellen optischen Charakterisierung für mikrofluidische Segmentsequenzen. a) Schema der Mikrodurchflussfluorimeter. b) Photo eines Mikrodurchflussfluorimeters mit 405 nm Laser-Anregung.

Es enthält folgende Elemente:

- Lichtquelle (Laser 405 nm, LED 470 nm und 515 nm)
- Kurzpass- (cut off 445/480/515 nm) und Langpassfilter (cut on 510/580/650 nm) zur Selektion der Anregungswellenlänge bzw. zur Analyse des Fluoreszenzlichtes
- Probenraum (FEP-Schlauch mit AD 1,6 mm und ID 0,5 mm)
- Photoelektrischer Empfänger (Photomultiplier)
- Elektronik und Rechentechnik zur Signalverarbeitung, Speicherung und Darstellung

Um eine hohe Nachweisstärke bei der quantitativen Fluoreszenzanalyse zu erreichen, ist es vorteilhaft, Strahlungsquellen mit sehr hoher Intensität einzusetzen. Ein dafür besonders geeigneter Strahler ist die lichtemittierende Diode bzw. ein Laser. Daher wurde für diesen Aufbau zur Erzeugung des Lichtstrahls 3 W LEDs (Alustar, Fa. Ledxon, Deutschland) oder 100 mW Laser (Changchun New Industries Optoelectronics, China) verwendet. Das Emissionsmaximum der LED liegt bei einer Wellenlänge von 460 nm bzw. 515 nm. Der

maximale Strom der Diode beträgt 700 mA, wodurch sich eine maximale Ausgangsleistung von ca. 3 Watt ergibt.

Für die Adaption des optischen Detektors an die Erfordernisse bei der Messung in Schläuchen war es notwendig, die mangelhafte Fokussierung des Lichts und den dadurch steigenden Streulichtanteil zu kompensieren. In dem Aufbau wurden deshalb Blenden und Kollimatorlinsen (Qioptiq Photonics GmbH) eingebaut. Durch die Kollimatorlinse wurde das Licht parallel zum Photomultiplier (PMT H10722-20 Fa. Hamamatsu, Japan) geführt (Abbildung 3.7b).

#### 3.3.3 Optische Sensorpartikel

Für die Messung von Indikatoren umweltrelevanter und biologischer Abläufe stellt der Einsatz von Mikro- und Nanosensorpartikeln eine gute Alternative zu den nicht-invasiven Analysetechniken dar [177-181]. Diese ermöglichen eine berührungslose Auslesung der chemischen Parameter wie pH oder  $pO_2$ . Die primäre und die direkte Interaktion zwischen dem Analyten und dem Sensor erfolgt innerhalb der Fluidsegmente. Der Sensor reagiert auf die Veränderung der optischen Eigenschaften wie z.B. die Farbänderung oder die konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 3.8).

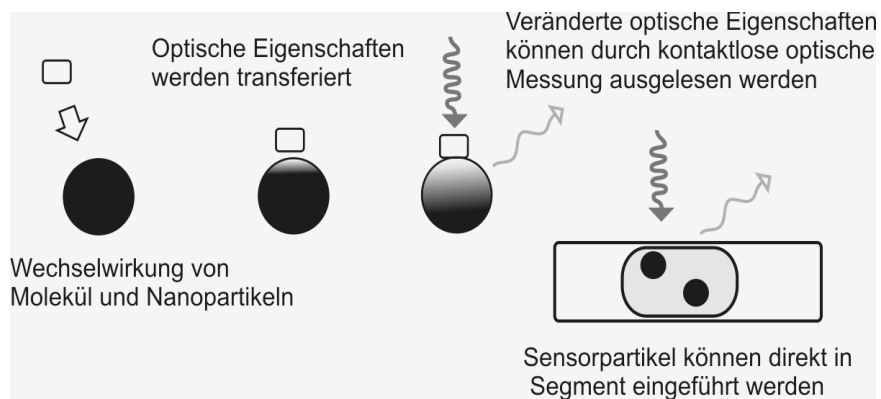


Abbildung 3.8: Kontaktlose Monitoring auf mikrobiotechnische Prozesse im Mikrofluidsegment mittels Sensorpartikel

Diese Änderung kann dann ohne direkten Kontakt mit optischen Messgeräten ausgelesen werden. Die einzige Voraussetzung ist die Anwendung der Sensorpartikel in den Mikrofluidsegmenten. Die Gefahr einer unerwünschten Interferenz zwischen den Zellen und den Indikatormolekülen kann durch die kovalente Bindung der Farbstoffmoleküle an die Polymermatrix der Partikel niedrig gehalten werden. Dadurch bietet das Konzept der Sensorpartikel viele Vorteilen im Vergleich zu gelösten Indikatorfarbstoffen:

- **Biokompatibilität:** Farbstoffmoleküle sind vom biologischen System entkoppelt, somit können die Farbstoffmoleküle nicht durch die Organismen metabolisiert werden. Außerdem wirken Partikel durch die Immobilisierung der Moleküle nicht toxisch auf die Zielorganismen und die Wechselwirkung mit anderen Effektoren ist stark reduziert.

- Einfache Handhabung: Sensorpartikel können direkt im Segment zugeführt werden. Keine zusätzlichen Umwandlungen zwischen chemischen und biologischen Systemen sind erforderlich.
- Stabilität: Die Sensorpartikel sind Einwegmaterial, deshalb können die Alterungseffekte vernachlässigt werden.
- Multiparameter Detektion: Sensorbeads, die unterschiedliche Spektraleigenschaften besitzen, können für ein optisches Mehrparameter-Screening eingesetzt werden.

Die Untersuchung der Stoffwechselaktivität der Zielorganismen erfolgte anhand des  $pO_2$ -Werts als Indikator, welcher über ins Mikrofluidsegment integrierte Nanobeads detektiert werden konnte. Bei den Nanobeads Ps-PtTFPP und PS-PtTPTBP handelt es sich um inerte Polymerpartikel, auf deren Oberfläche, Indikatormoleküle über kovalente Bindungen immobilisiert sind, deren Lumineszenzintensität Sauerstoff abhängig ist [182]. Die Lumineszenzintensität vom Lumineszenzfarbstoff der Gruppe Pt(II)-Porphyrine ist stark von der Sauerstoffkonzentration des den Farbstoff umgebenden Mediums abhängig.

### ***O<sub>2</sub>-sensitiver Sensorpartikel: Ps-PtTFPP***

Die hier eingesetzten Ps-PtTFPP-Sensorbeads (Platinum tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin immobilisiert auf Polystyrene) dienen zur Messung des Sauerstoffgehalts in einer flüssigen Probe [183-185]. Diese Partikel wurden vom Institut für Analytische Chemie Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Wolfbeis zur Verfügung gestellt. Die Absorptionsmaxima liegen bei 392, 508 und 540 nm, und das Emissionsmaximum liegt bei 660 nm (Abbildung 3.9). Die Messwerte von Ps-PtTFPP Sensorbeads unter  $N_2$ - und Luftatmosphäre (Abbildung 3.9 Strichlinien) zeigte, dass mit zunehmendem Sauerstoffgehalt die normierte Intensität abnimmt.

Die Nanopartikel PS-PtTFPP wurden für die Untersuchung der Abhängigkeit von Schlauchgeometrie und Atmosphäre (siehe Kapitel 4.3.1) und der Detektion des Sauerstoffverbrauches für die Kultivierung von *E. coli* (siehe Kapitel 4.3.2) im Mikrofluidsegment eingesetzt.

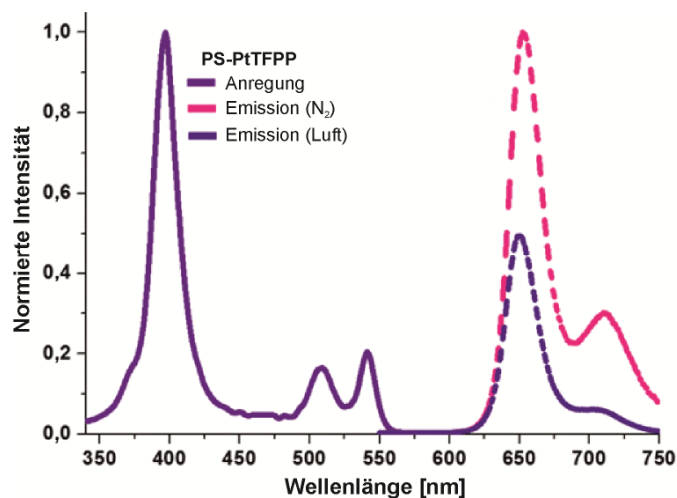


Abbildung 3.9: Spektrum der ps-ptTFPP-Beads und ps-ptTFPP-Partikel suspendiert in mit Stickstoff (Rosa Linie) oder Luft (Lila Linien) gesättigten Lösungen. Quelle: Dipl.-Chem. S. Nagl, Institut für Analytische Chemie, Universität Regensburg.

***O<sub>2</sub>-sensitiver Sensorpartikel: Ps-PtTPBP***

Ps-PtTPBP besteht aus 2% (w/w) Platin (II), 5, 10, 15, 20-meso-Tetraphenyltetraenzoporphyrin in Polystyrol. Diese Partikel wurden vom Institut für Analytische Chemie Universität Leipzig unter Leitung von Dr. Nagl zur Verfügung gestellt. Dieses Material zeigte eine gute langzeitstabile Photo- und Biokompatibilität. Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt ca.  $357\pm 53$  nm. Die optischen Eigenschaften und die Sauerstoffempfindlichkeit der PS-PtTPTBP in PBS sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

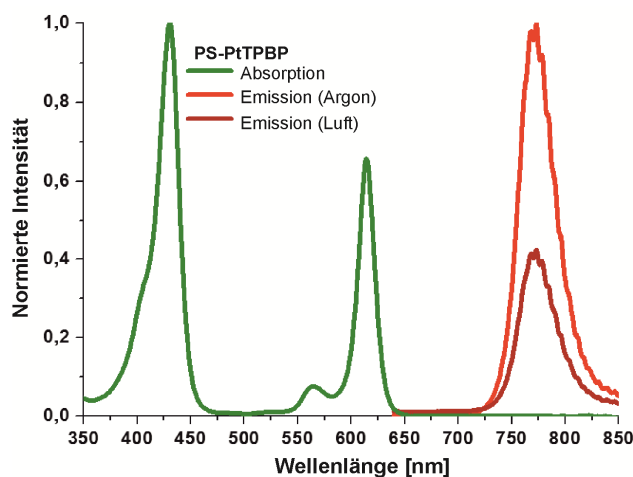


Abbildung 3.10: Optische Spektren von PS-PtTPTBP-Beads (50 ppm (w/w) in PBS, pH 7,4). Absorptionsspektrum von PS-PtTPTBP (grüne Linie) und Emissionsspektrum wenn der Partikel unter Argon-Atmosphäre (rot Linien) oder unter Luft-Atmosphäre (braune Linien) gemessen wird. Quelle: Dr. S. Nagl, Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig

Die Sensorpartikel besitzen zwei Anregungsmaxima bei 430 nm und 614 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 778 nm. PS-PtTPTBP Partikel zeigte eine starke Abhängigkeit ihrer Emissionsintensitäten von Sauerstoffgehalt in wässrigen Suspensionen (Abbildung 3.10, Braun-Linie im Gegenwart von Luftsauerstoff und Rot-Linie in Abwesenheit von Sauerstoff).

Die Nanopartikel PS-PtTPTBP wurden für die Detektion des segmentinternen Sauerstoffverbrauches während des Wachstums von *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1- und *Streptomyces acidiscabies* E13-Bakterienkulturen verwendet (siehe Kapitel 4.3.2). Um die gemessene Phosphoreszenzintensität in den Sauerstoffverbrauch umzurechnen, wurde zuerst eine Zwei-Punkte-Kalibration bei 0% Sauerstoffgehalt und 100% Luftsättigung ermittelt (Tabelle 3.7). Eine 0,08 M Natriumsulfit-Lösung mit Sensorpartikel dient zur Kalibration von 0% Sauerstoffgehalt. Die Sauerstoffkonzentration und die Lumineszenz-Intensität wurden mit einem Multikanal-Mikroglasfaser-Sauerstoffsensoren (PreSens OXY-4) und unserem Mikrodurchflussfluorimeter (LED 405, KP 455, LP 650) bei Raumtemperatur (23,8 °C) ermittelt.

Tabelle 3.7: Zwei-Punkt-Kalibrierung von PS-PtTPTBP für 0% und 100% Luftsättigung

Messmethode	Luftsättigung (100%)	0% Sauerstoffgehalt
PreSens OXY-4	7,8 mg/l	0 mg/l
Mikrodurchflussfluorimeter normierte Intensität (Einheitlos)	0,50±0,05	1,05±0,05

### 3.4 Leukämie-Zelllinien IPC-81 im Mikrofluidsegment

Bei der IPC-81-Zelllinie handelt es sich um eine promyelocytische Leukämie-Zelllinie von Ratten. Die Zelllinie wurde 1983 in der Arbeitsgruppe von Dr. Michel Lanotte (INSERM U-131, Paris) isoliert. Sie zeigt die gleichen histologischen und cytochemischen Eigenschaften wie die Zellen einer menschlichen akuten promyelocytischen Leukämie [186].

#### 3.4.1 Einbringung und Kultivierung

Die IPC-81 wurde in einem RPMI-Medium mit 10% Pferde-Serum bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in sterilen Kulturflaschen gehalten. Zwei Tage vor den Versuchen mussten entsprechende Kulturen angesetzt werden. Hintergrund dafür ist, dass sich die IPC-81-Zellen zweimal pro Tag verdoppeln, wenn sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Zellen wurden dabei zu einer Zelldichte von  $0,2 \cdot 10^5$  Zellen/ml verdünnt (SOP Nr. BOC 02<sup>10</sup>). Zur Erzeugung von Segmentsequenzen für die Untersuchung von Modellschubstanzen wurde die in Abbildung 3.11 dargestellte Versuchsanordnung eingesetzt.

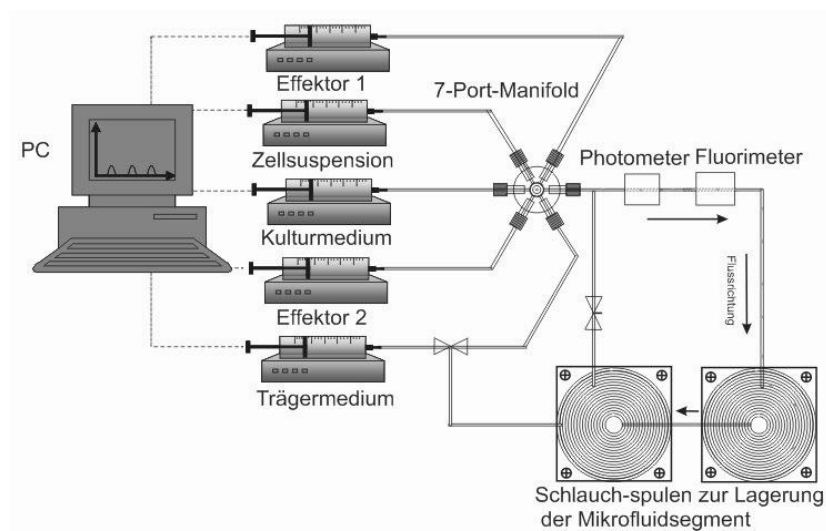


Abbildung 3.11: Allgemeine Versuchsanordnung für Experimente mit IPC-81

Als Segmentierungsmodul diente ein 7-Port-Manifold der Firma Upchurch, welches durch Teflon®-Schläuche (ID 0.5 mm, Bohlender GmbH) mit einem rechnergesteuerten Spritzenpumpensystem (Cetoni GmbH) mit sechs Dosiereinheiten verbunden wurde. Das Monitoring der Mikrofluidsegmente auf unterschiedliche Screeningparameter erfolgte direkt durch einen transparenten FEP-Schlauch (Upchurch). Zwei integrierte Mehrkanal-Mikrodurchflusssensoren (Photometer und Fluorimeter) ermöglichten die simultane Auslesung von Trübungs- und Fluoreszenzsignalen. Zur Speicherung der erzeugten Mikrofluidsegmente wurden FEP-Schlauchspulen (ID 0,4 mm) eingesetzt. Die Steuerung des Fluidstromes und damit die Einstellung der Konzentrationsbereiche in den Segmenten konnten über angepassten Pumpenverlauf realisiert werden (siehe Kapitel 3.2.3).

<sup>10</sup> Standardarbeitsanweisung SOP Nr. BOC 02 Kultur und Pflege von IPC-81-Zellen, Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologie, Universität Bremen

### 3.4.2 Toxizitätstest

Für die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung einzelner Substanzen in Mikrofluidsegmenten wurde ein Rampenprogramm zur Realisierung der kontinuierlichen Konzentrationsänderung verwendet. Dabei wurde die Konzentrationsabstufung durch gezielte Verdünnung der Effekorkonzentrationen mit einem Verdünnungsmedium (Nährmedium) eingestellt. Für die Erstellung eindimensionaler Konzentrationsfelder unterschiedlicher Testsubstanzen wurden zu Beginn ca. 200 Segmente innerhalb von zehn Minuten erzeugt. Die ersten 30 Segmente bildeten dabei die Positivkontrolle (nur Zellen) und die letzten 20 Segmente bildeten die Negativkontrolle (Zellen mit max. Wirkstoffkonzentration). Bei den mittleren 150 Segmenten wurden die Flussraten von Nährmedium und der Wirkstofflösung gegenläufig linear variiert. Für die einheitliche Verteilung der Zellen in den Mikrofluidsegmenten wurde die Flussrate der Zellsuspension konstant gehalten. Die Analyse der Segmente erfolgte für die Experimente direkt nach der Segmenterzeugung 0 h und jeweils nach 24, 48 und 72 h Kultivierung. Die Zellen in den Mikrofluidsegmenten wurden in FEP-Schlauchspulen gelagert und bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.4.3 Referenzmessung in Mikrotiterplatten

Als Referenzmessung wurde das von UFT Bremen standardisierte Verfahren - Zytotoxizität (WST-1)-Assay<sup>11</sup> - zur Ermittlung der Wirkung von Chemikalien auf die Überlebensrate von IPC-81-Zellen verwendet. Die Zytotoxizität wird dabei photometrisch über die stufenweise Reduktion von WST-1 auf die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten gemessen. Für den Test mit den Zelllinien IPC-81 wurden die Zellen in ein Medium inklusive 8% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (Abk. FKS) überführt. Die Zellkonzentration im Test betrug  $9,75 \cdot 10^4$  Zellen/ml bei einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Well. Die zu testenden Substanzen wurden im Medium mit 1% DMSO gelöst, wobei im Test eine weitere 1:2 Verdünnung erfolgte. Durch Vorversuche wurde abgesichert, dass bei diesen DMSO-Konzentrationen keine Beeinträchtigung der Zellvitalität erfolgte.

Aus den gelösten Substanzen wurde direkt in der 96-Well-Titerplatte eine 1:2 Verdünnungsreihe erstellt, wobei jeweils drei Parallelen mit neuen Konzentrationen pro Substanz und Test, sowie 12 Kontroll- und 6 Blindproben getestet wurden. Anschließend wurden die Zellen hinzugegeben und der Ansatz wurde 44 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Zeit werden 10 µl des Farbreagens WST-1 pro Well hinzugegeben und für weitere vier Stunden inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte im Mikrotiterplatten-Reader bei 630 nm und 450 nm.

---

<sup>11</sup> Standardarbeitsanweisung SOP Nr. BOC 01 WST-1-Assay, UFT Bremen



### 3.5 Schwermetall-tolerante Mikroorganismen *Streptomyces acidiscabies* E13, *Streptomyces tendae* F4 und *Psychrobacillus psychrodurans* Ur PLO1 im Mikrofluidsegment

Streptomyceten sind grampositive, aerobe, filamentöse Actinobakterien, deren vegetatives Myzel während der Koloniebildung morphologischer Differenzierung unterliegt [187]. Diese Bakterien kommen sowohl terrestrisch als auch marin vor. Da viele *Streptomyces*-Arten Antibiotika herstellen, spielen Streptomyceten für die Human- und Tiermedizin eine wichtige Rolle.

Die Gattung *Bacillus* gehört zu den aeroben oder fakultativ anaeroben, grampositiven, sporenbildenden Stäbchenbakterien, d.h. überall in der Umwelt vorkommenden sich aktiv bewegender Bakterien. Sie gehört zur Klasse der *Bacillaceae*.

Sowohl *Str. acidiscabies* E13, *Str. tendae* F4 als auch *Psychrobacillus psychrodurans* Ur PLO1 wurden von der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Prof. Kothe zur Verfügung gestellt.

#### 3.5.1 Einbringung und Kultivierung

Die Stämme *S. acidiscabies* E13, *S. tendae* F4 wuchsen auf Hafermehlagar heran. Für die Vorkultur wurden die Bakterien von der Agarplatte in einen Erlenmeyer-Kolben überführt, der mit Vollmedien M2 für den Stamm *S. acidiscabies* E13 und M3 für den Stamm *S. tendae* F4 bei 28°C bei 120 UpM kultiviert wurde. Nach 24 h Inkubationszeit wurden 0,1 ml Sporensuspension mit einem Drigalskispatel gleichmäßig auf Hafermehlagarplatten verteilt und weiter bei 28°C 10-14 Tage lang inkubiert. Danach wurde die Petrischale mit bewachsenen Sporen mit 5 ml steriler PBS-Lösung abgeschwemmt und die Sporensicht vorsichtig in ein steriles Gefäß überführt. Um das Restmyzel zu entfernen, wurde die Sporensuspension bei 1.000 UpM für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues steriles Falcon überführt. Die Sporenanzahl wurde wiederum durch Verwendung einer Thoma-Zählkammer ermittelt. Mit dem AM Minimalmedium (Tabelle 3.2) wurde die Zellzahl auf  $10^6$  Sporen/ml verdünnt. Diese Sporensuspension wurde dann für das nachfolgende Experiment eingesetzt.

*Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 wuchsen auf AM Agar [188]. Für die Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie von UrPLO1 von der Agarplatte in einen mit 10 ml AM Minimalmedium gefüllten Erlenmeyer-kolben übertragen und für 24 h bei 28°C unter ständigem Rühren kultiviert. Für die mikrofluidischen Experimente wurde eine Zellsuspension mit einer initialen Zelldichte von etwa  $10^7$  Zellen/ml angewendet.

### 3.5.2 Wachstumsstudien und Toxizitätstest

Für die Untersuchung an *Str. acidiscabies* E13, *Str. tendae* F4 und *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 im Mikrofluidsegment wurde der entwickelte Kompaktaufbau eingesetzt (Kapitel 3.2.2). In Abbildung 3.12 ist das Mikrofluidsystem für die Erzeugung von Segmentsequenzen zur Untersuchung von Wachstumskinetik und Einzel- und Kombinationswirkungen verschiedener Substanzen mit beiden Schwermetall-toleranten Stämmen E13 und F4 dargestellt. Vier Spritzen mit einem Volumen von 500 µl - für jeweils eine Sporensuspension, das Kultivierungsmedium und die Testsubstanzen - und eine Spritze mit einem Volumen von 5 ml für das Trägermedium PP9 wurden auf einem Computer-gesteuerten Spritzenpumpensystem angebracht (Cavro Centris, Tecan). Die Spritzen wurden mit PTFE-Schlauch mit einem 7-Port-Manifold verbunden. Die Erzeugung von Mikrofluidsegmenten wurde durch die definierte Dosierung aller Lösungen (Zellsuspension, Effektor und Kultivierungsmedium) in einem konstanten Fluss von PP9 realisiert.

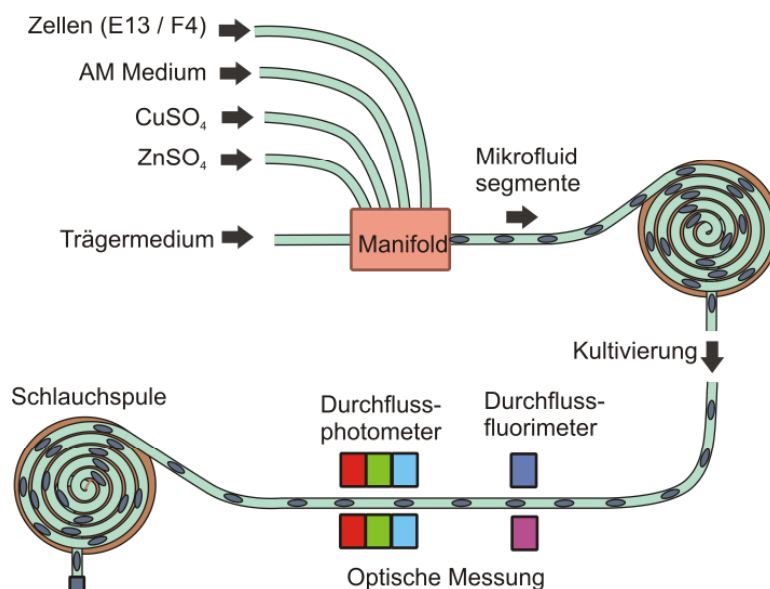


Abbildung 3.12: Mikrofluidische Versuchsanordnung für *S. acidiscabies* E13 und *S. tendae* F4

Zwei integrierte Mikrodurchflusssensorsysteme ermöglichten die simultane Auslesung von Trübungs- und Fluoreszenzsignalen. Für das Mehrkanal-Mikrodurchflussphotometer wurden vier LEDs (470, 505, 615 und 660 nm) für die Überwachung der Segmentgröße, -abstände und -anzahl verwendet. In Bezug auf die Qualitätssicherung konnten somit Segmentverlust oder -fusion aufgrund von längeren Kultivierungszeiträumen oder mehrmaligen Wiederholungsmessungen zur Fehlerkorrektur identifiziert werden. Bedingt durch die Myzelbildende Eigenschaft der *Streptomyces* wurde deren Wachstum mithilfe der Bestimmung der endogenen Autofluoreszenz mittels Mikrodurchflussfluorimeter ermittelt. Die normierte Autofluoreszenzintensität wurde durch das Verhältnis der Intensität des Messwertes zu der Referenzfluoreszenz des FEP-Schlauches gefüllt mit Trägermedium abzüglich der Konstante eins gegeben.

$$I_n = \frac{I_{ftuo}}{I_{ref}} - 1 \quad (3.14)$$

Für die Durchführung der hochaufgelösten Einzelwirkungsscreenings wurden lineare Rampenprogramme mit kontinuierlicher Zunahme der  $\text{CuSO}_4$ - und  $\text{ZnSO}_4$ -Konzentrationen in separaten Versuchsläufen angewandt. Segmente mit einem Volumen von ca. 350-400 nl wurden mit etwa 300 Sporen pro Segment als Ausgangszellidichte erzeugt. Das Wachstum wurde nach 40, 54, 66 und 93 h durch Messung der Autofluoreszenzintensität mittels Mikrodurchflussfluorimeter bestimmt.

Weiterhin wurde die Kombinationswirkung von  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  auf *Str. tendae* F4 untersucht. Für diese binären Mischungen wurde eine stufenweise Änderung der Effektor-Konzentration für eine Auflösung von 12,5% realisiert. Der Einsatz von zwei Effektoren eingeteilt in neun verschiedene Konzentrationsstufen (0, 12,5, 25, 37,5, 50, 62,5, 75, 87,5, 100% der max. Effektor-Konzentration) führte zu  $9^2=81$  verschiedenen Konzentrationskombinationen (Abbildung 3.13). Die Flussraten der Trägerflüssigkeit und der Sporensuspension wurden auf jeweils 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 7,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  eingestellt. Je nach Konzentrationskombinationen wurde die Flussrate der Effektoren und des Kultivierungsmediums variiert, jedoch unter Beibehaltung einer konstanten Gesamtflussrate von 7,5 ml/min. In diesem Experiment wurde eine Ausgangssporendichte von etwa  $10^6$  Sporen/ml eingesetzt, was etwa 500 Sporen pro Segment entspricht. Die Endkonzentrationen von Effektor  $\text{ZnSO}_4$  und  $\text{CuSO}_4$  betragen 36 mM und 2 mM.

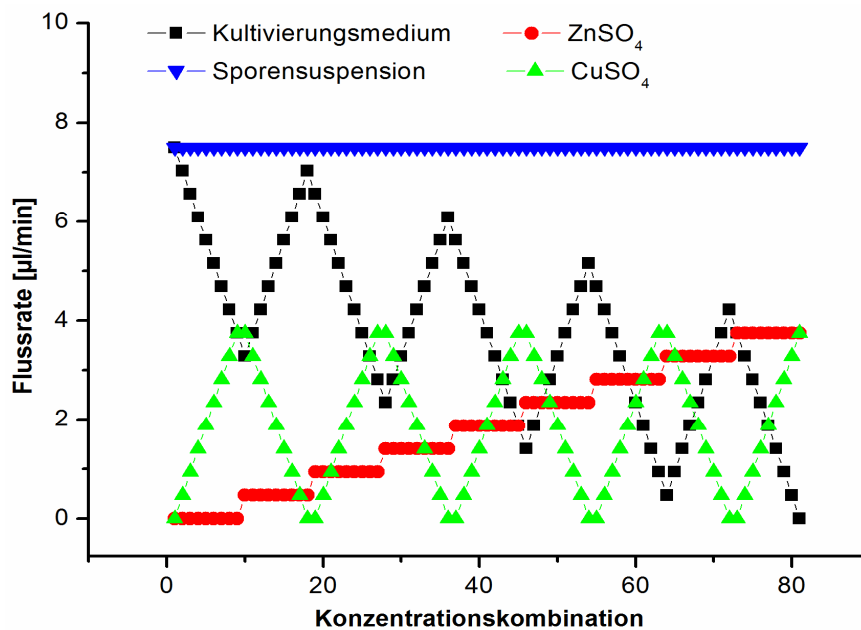


Abbildung 3.13: Pumpenverlauf zur Erzeugung eines 2D-Konzentrationsraumes mit 81 Konzentrationskombinationen.

Für die 2D-Konzentrationsräume wurden etwa 650 Segmente erzeugt, sodass eine 8-fache Redundanz bei jedem Konzentrationspunkt sichergestellt werden konnte. Die hohe Redundanz stellt ein Qualitätskriterium dar, welches die Zuverlässigkeit der Messungen überprüfbar macht und die stochastischen Effekte bedingt durch kleine Reaktionsvolumen und/oder Variationen der Sporenanzahl in den Segmenten minimiert. Das gesamte Volumen der notwendigen Testflüssigkeiten für ein zweidimensionales Screening belief sich auf lediglich 300  $\mu\text{l}$  (650 Segmente-450 nl/Segment).

### 3.6 Umweltorganismus *Chlorella vulgaris* im Mikrofluidsegment

Die Phytoplankton Komponente *Chlorella vulgaris* ist ein kugelförmiger, einzelliger, eukaryotischer Mikroorganismus mit einem Durchmesser von 5-10  $\mu\text{m}$ . Dieser ist in der Natur sehr weit verbreitet und kommt meistens im Süßwasser vor. Seine Vermehrung erfolgt vegetativ über Autosporenbildung. Das Phytoplankton ist der Hauptproduzent von Sauerstoff und damit wird seine Bedeutung für das globale Ökosystem deutlich. Aufgrund der Unempfindlichkeit, hoher Wachstumsraten und der leichten Kultivierbarkeit gehört *Chlorella vulgaris* zu den allgemein akzeptierten Bioindikatoren für die Umweltverschmutzung [189]. Daher wurde dieser Mikroorganismus für mikrotoxikologische Studien mittels Segmentierte-Fluss-Technik eingesetzt.

#### 3.6.1 Einbringung und Kultivierung

Der *Chlorella vulgaris* Stamm wurde von der TU Karlsruhe, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik zur Verfügung gestellt. Die Vorkultur wurde in 100 ml IGV-Medium oder BBM-Medium (Bold's Basal Medium) (250 ml Borosilikatglas Erlenmeyer-Kolben) in fünf Tagen unter Schütteln (50 UpM) und einem 14 h : 10 h Licht : Dunkel-Zyklus, einer Beleuchtung von zwei Brennenstuhl-Lampen mit 1800 cd Lichtintensität mit 24 W und bei  $22\pm 2$  °C herangezogen. Danach befanden sich die Zellkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase. Für die mikrotoxikologischen Screening-Experimente wurde die Inokulumzelldichte auf  $10^6$  Zellen/ml durch entsprechende Verdünnung mit IGV oder BBM Medium eingestellt (Tabelle 3.2). Aufgrund der durch die Zellgröße bedingt schnellen Sedimentation der Zellen in der Spritze, wurde ein Rührsystem (NeMix, Cetoni GmbH) für alle Experimente eingesetzt, wodurch die homogene Verteilung in den Segmenten gewährleistet wurde.

#### 3.6.2 Toxizitätstest

Die Einzelwirkung von Herbiziden (Atrazin und Alachlor), Kupfer(II)-Chlorid, Nanopartikeln (AgNP und AuNP) und deren Kombinationswirkungen auf die Vitalität von *C. vulgaris* wurden in Mikrofluidsegmenten untersucht. Die Übersicht der durchgeführten Screenings ist in Tabelle 3.8 dargestellt. Für die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung einzelner Substanzen sowie Substanzgemische in Mikrofluidsegmenten wurden Rampenprogramme zur Realisierung der kontinuierlichen Konzentrationsänderung verwendet. Die Rampenprogramme mit stufenweiser Änderung der Effektor-Konzentrationen für eine Auflösung von 10% wurden für die Untersuchung des binären Gemisches verwendet (Abbildung 3.14). Der Einsatz von zwei Effektoren eingeteilt in 11 verschiedene Konzentrationsstufen führte zu  $11^2=121$  verschiedenen Konzentrationskombinationen.

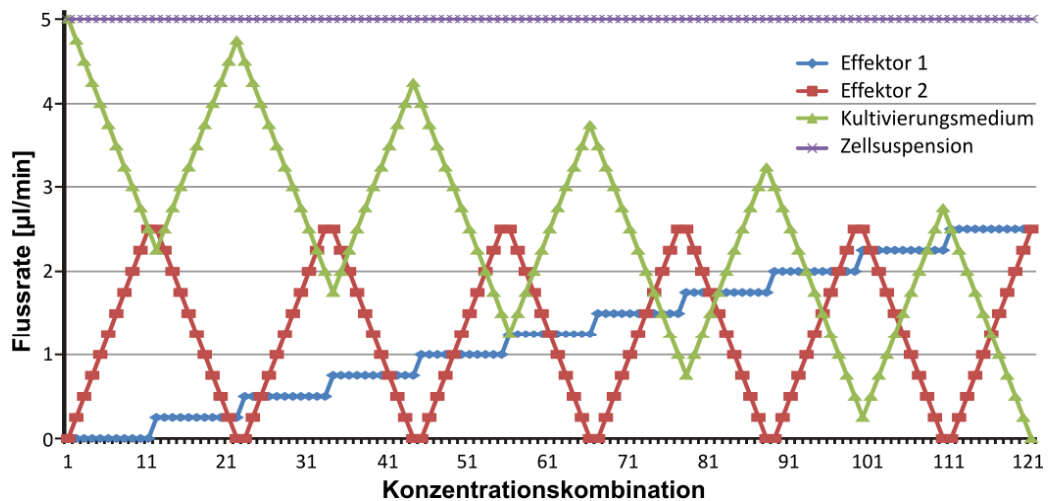


Abbildung 3.14: Pumpenverlauf zur Erzeugung eines 2D-Konzentrationsraumes mit 121 Konzentrationskombinationen.

Für toxikologische Untersuchungen anhand von Grünalgen wurde neben dem Wachstum der Algen (photometrisches Signal) die Autofluoreszenzintensität (fluorimetrisches Signal) erfasst. Die Analyse der Segmente erfolgte für die Experimente direkt nach der Segmenterzeugung und jeweils nach 48 h und 72 h Kultivierungszeit.

Die Flussraten für die Segmentierung wurden auf 40 µl/min für das Trägermedium PP9, 5 µl/min für die Zellsuspension, 5 µl/min für die Summe von Kultivierungsmedium und Wirkstofflösung eingestellt. Die Gesamtflussrate für die Segmenterzeugung und das Monitoring der Segmente lag bei 50 µl/min. Es wurden Segmentsequenzen mit bis zu 150 Segmenten für Einzelwirkungsscreenings und ca. 550 Segmenten für zweidimensionale Screenings und einem durchschnittlichen Segmentvolumen zwischen 400-500 nl erzeugt.

Tabelle 3.8: Übersicht der durchgeführten toxikologischen Screenings an *C. vulgaris*

Screening	Effektor	Antwort	Kapitel/Ref.
Einzelwirkung	Goldnanopartikel (AuNP)	Bis 3 nM keine Hemmung	4.5.1 [190]
	Silber-Nanopartikel (AgNP)	EC <sub>50</sub> =0,5 nM	4.5.1 [165, 191-193]
	Kupferchlorid	EC <sub>50</sub> =39,65 mg/l	4.5.1 [130]
	Atrazin	EC <sub>50</sub> =0,55 mg/l	4.5.1 [194, 195]
	Alachlor	EC <sub>50</sub> =4,53 mg/l	4.5.1 [196]
Binäre Gemische	AuNP und Atrazin	Unabhängige Wirkung	4.5.2
	AgNP und Atrazin	Synergien	4.5.2
	AgNP und AuNP	Starke Synergien	4.5.2

### 3.7 Modellorganismus *E. coli* im Mikrofluidsegment

Das stäbchenförmige, säurebildende Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ist fakultativ anaerob und zählt zu den am besten untersuchten Modellorganismen. In der Biotechnologie wird *E. coli* vor allen zur Herstellung von unterschiedlichen Proteinen ( z.B. Insulin, Antikörper-Fragmenten, Pharmawirkstoffen) verwendet [197]. *E. coli* können sich mittels Geißeln bzw. Flagellen fortbewegen und zählen zu den gramnegativen Prokaryoten, da sie nur eine dünne, einschichtige Mureinhülle besitzen. Mit einem Durchmesser von etwa 1-1,5  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 2-6  $\mu\text{m}$  eignen sich *E. coli* sehr gut für die vorliegenden Forschungszwecke, da sie einfach zu kultivieren sind und eine kurze Generationszeit von etwa 20 Minuten bei optimalen Bedingungen aufweisen.

#### 3.7.1 Einbringung und Kultivierung

Der *E. coli*-Stamm RV308 wurde vom Hans-Knöll Institut (HKI) Jena zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Testkultur erfolgte durch das Abimpfen einer auf der LB-Agarplatte gewachsenen einzelnen *E. coli*-Kolonie in einem mit Minimalmedium (synthetischem Medium) gefüllten Erlenmeyerkolben und einer anschließenden 24-stündigen Inkubation, die bei 37 °C unter Rühren stattfand. Danach wurde die Zellzahl mittels Thoma-Zählkammer bestimmt. Durch geeignete Verdünnung mit Minimalmedium aus der Vorkultur wurden Testkulturen hergestellt und in die Spritzen überführt. Die Anfangszellichten betrug  $10^5$  Zellen/ml. Bei einer Segmentgröße von 500 nl sind somit ungefähr 50 Zellen/Segment enthalten.

#### 3.7.2 Toxizitätstest

Aufgrund der einfachen Handhabung und einer kurzen Kultivierungszeit hat sich das *E. coli* als sehr geeigneter Modellorganismus für den Einsatz in Mikrofluidsegmenten erwiesen [27]. Aus diesem Grund wurde *E. coli* für zahlreiche binäre sowie ternäre Kombinationswirkungsuntersuchungen ausgewählt (Tabelle 3.9). In Mikrofluidsystem wurde *E. coli* u.a. zur Untersuchung von Kombinationswirkung zwischen verschiedene Antibiotika, häufige eingesetzten Medikamenten (ACE-Hemmer Captopril und CSE-Hemmer Lovastatin), Ernährungsbestandteilen (Coffein und Ethanol) sowie 2,4-Dinitrophenol und Silbernanopartikeln eingesetzt.

Tabelle 3.9: Übersicht der Kombinationsscreenings am *E. coli* im Segment

Screening	Verwendete Substanzen	Wirkungen	Kapitel/ Ref.
Binäre Gemische	Chloramphenicol und Coffein	unabhängige Wirkung und Chloramphenicol Stimulation	4.6.1 [198]
	Chloramphenicol und Lovastatin	unabhängige Wirkung	4.6.1
	Coffein und Lovastatin	unabhängige Wirkung	4.6.1
	Ampicillin und Coffein	unabhängige Wirkung	4.6.1 [199]
	Tetracyclin und Coffein	subadditive Effekt und Coffein-Stimulation	4.6.1
	Tetracyclin und Chloramphenicol	additive Wirkung	4.6.1
	Ampicillin und Ethanol	antagonistische Wirkung	4.6.1
	Ampicillin und Chloramphenicol	Chloramphenicol Stimulation	4.6.1 [159]
	Coffein und Captopril	Unabhängige Wirkung, Coffein Stimulation	4.6.3 [199]
	Ampicillin, Coffein und Captopril	Antagonismus, Kompensation, Coffein Stimulation	4.6.3 [199]
Ternäre Gemische	Coffein, CMP und DNP	Coffein Stimulation, komplexe Antwort	4.6.3 [198]
	AMP, CMP und AgNP	CMP Stimulation, verstärkte Toxizität, komplexe Wirkung	4.6.3 [159]





## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Verifikation des Mikrofluidsystems

#### 4.1.1 Untersuchung des Signal-Rausch-Verhältnisses des Mikrodurchflussfluorimeters

Zur Untersuchung des Signal-Rausch-Verhältnisses des Aufbaus (Lichtquelle: 470 nm, Kurzpassfilter: 480 nm und Langpassfilter: 510 nm) in Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung des Photomultipliers wurde die relative Standardabweichung bei destilliertem H<sub>2</sub>O- und bei einer Fluorescein-Konzentration von 25 nmol/l und 50 nmol/l in einer Reihe von Segmenten bestimmt, wobei die durchschnittliche Segmentgröße ca. 500 nl betrug. Dabei wurde das Fluoreszenzsignal mit einer Abtastrate von 10 Hz und einem LED-Strom von ca. 400 mA gemessen (Abbildung 4.1). Jeder Messpunkt besteht aus einem Mittelwert von ca. 20 Segmenten. Daraus ergibt sich, dass mit zunehmender PCM-Verstärkung das Rauschen verringert und ab einer PCM-Verstärkung von 0,6 V die Standardabweichung des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffkonzentration signifikant kleiner wird. Diese Erkenntnis führte dazu, dass für spätere Messungen eine PCM-Verstärkung von 0,6 V ausgewählt wurde.

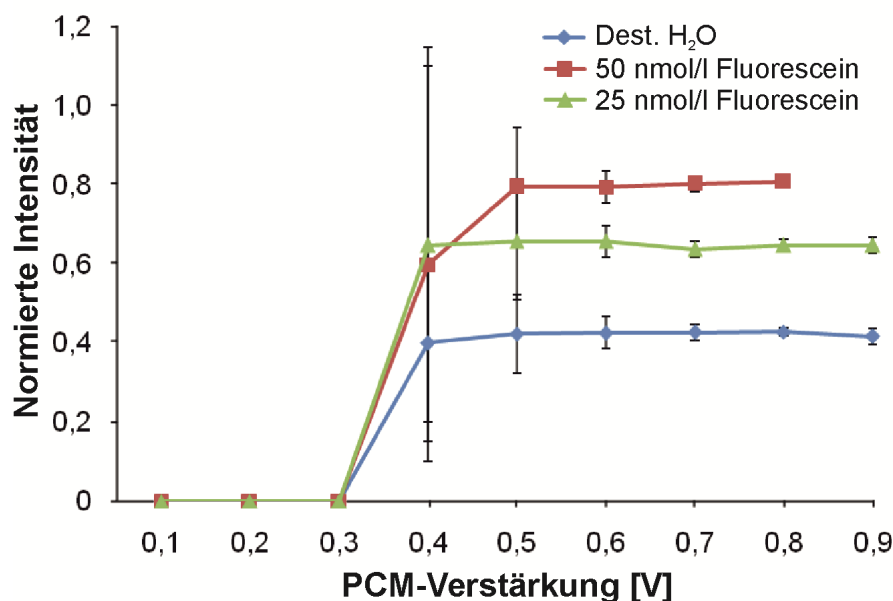


Abbildung 4.1: Untersuchung der Abhängigkeit des Signal/Rausch-Verhältnisses von der Beschleunigungsspannung des Photomultipliers.

Um die maximale Auflösung des Laboraufbaus zu untersuchen wurde eine Konzentrationsreihe mit dem Farbstoff Fluorescein-Natrium gemessen und das Fluoreszenzsignal mit einer Abtastrate von 10 Hz, einer PCM-Verstärkung von 0,6 V und einem LED-Strom von ca. 400 mA gemessen.

Die normierte Fluoreszenzintensität ohne Fluoreszenzfarbstoff betrug ca. 0,5. Danach wurden bei einer gegenläufigen kontinuierlichen Flussratenänderung die Farbstofflösung und destilliertes Wasser in das System mit einer Flussrate von 0-10 µl/min gepumpt, wobei die durchschnittliche Segmentgröße ca. 500 nl betrug. Daraus ergab sich für das Fluoreszenzsignal der in Abbildung 4.2 dargestellte Konzentrationsverlauf.

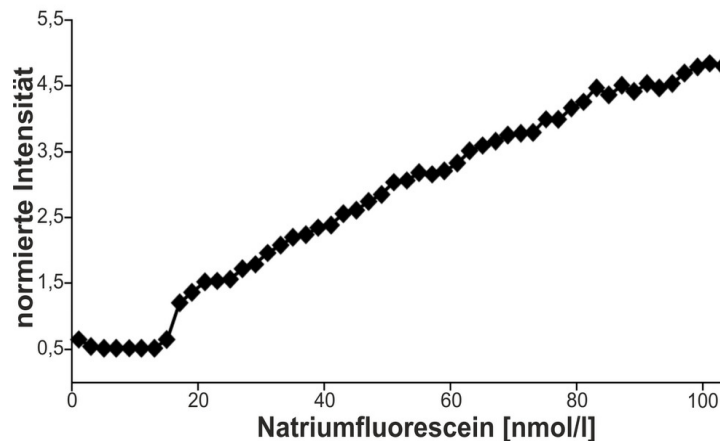


Abbildung 4.2: *Hochaufgelöste Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen von 0-100 nmol/l*

Aus diesem Verlauf ist ersichtlich, dass die Nachweisgrenze des fluorimetrischen Aufbaus bei etwa 20 nmol/l Natrium-Fluorescein liegt und dass ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Farbstoffkonzentration mit einer Konzentration zwischen 20-100 nmol/l in guter Näherung besteht. Allerdings kann diese Linearität bei erhöhten Substanzkonzentrationen, z.B. verursacht durch die Übersteuerung der Photomultiplier, nicht mehr nachgewiesen werden. Daher ist es zweckmäßig, eine Kalibrationsreihe für den Linearitätsbereich der zu messenden Lösung zu ermitteln, um die instrumentell bedingte Nichtlinearität zu vermeiden.

### 4.1.2 Charakterisierung des Kompaktaufbaus

In der Abbildung 4.3 ist das kompakte Mikrofluidsystem dargestellt. Durch die gezielte Ansteuerung der Spritzenpumpen kann die Aufnahme, Zudosierung, Wiederbefüllung und Ausleerung vollautomatisch ablaufen. Es wurde daher eine Steuerungssoftware<sup>12</sup> realisiert, die bereits folgende Grundfunktionen beinhaltet und ständig weiterentwickelt wird:

- Datenauswertung Sensoren:
  - Auslesung und Speichern der Sensorparameter in einer Textdatei (Druck, Durchfluss,...)
  - Auswahl einzelner aufzuzeichnender Sensorverläufe

---

<sup>12</sup> erarbeitet durch S. Schneider

- Kalibrierfunktion für die Druck-, Photometer- und Fluorimeter-sensoren
- Pumpenkontrolle
  - Konfiguration der Spritzenpumpen
  - Volumenstromkontrolle
  - Ventilsteuerung
  - Spritzen füllen oder leeren
  - Förderung eines definierbaren Volumens
  - Individuelle Ansteuerung der einzelnen Dosiereinheiten (z.B. Rampenprogramme, zweidimensionale Kombinationen, Blockweise Segmentierung etc.)
- 4-Kanal-Photometer
  - Einstellen der LED-Intensität
  - Einstellen der Abtastrate
- 2-Kanal-Fluorimeter
  - Einstellen der LED/Laser-Intensität
  - Einstellen der Abtastrate
  - Einsetzen der Photomultiplier-Spannung

Die dabei verwendeten Detektoren sind das Mikrodurchfluss-Photometer und das Mikrodurchfluss-Fluorimeter. Das 4-kanalige Photometer benutzt LEDs mit den Wellenlängen 470 nm, 505 nm, 615 nm und 660 nm, während das 2-kanalige Fluorimeter mit einer Anregungslichtquelle der Wellenlänge von 405 nm (Laser) und 470 nm (LED) arbeitet. Der 405 nm Laser wurde mit einem Kurzpassfilter von 445 nm und einem Langpassfilter von 650 nm kombiniert und die 470 nm LED mit einen Anregungsfilter von 480 nm und einen Emissionsfilter von 510 nm.

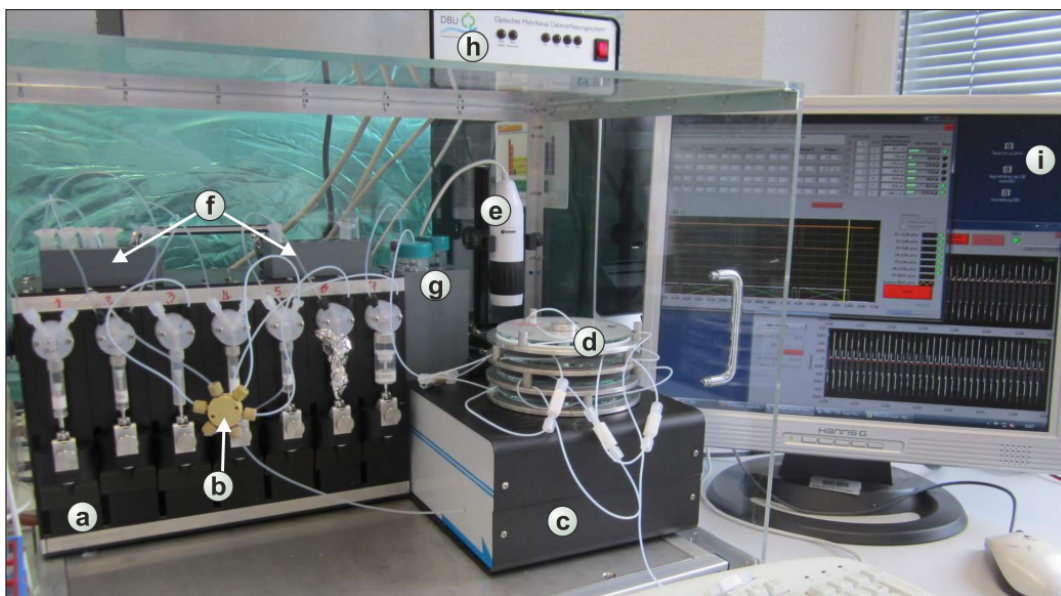


Abbildung 4.3: Aktuelle Anordnung des Kompaktaufbaus mit den folgenden Komponenten: a) 7-Kanal-Spritzenpumpen mit 3-Wege-Ventile, b) 7-Port-Manifold, c) Multikanal Detektionseinheit, d) Speicherspulen, e) Mikroskop-Kamera, f) Reservoirs, g) Abfallbehälter, h) Datenerfassungsmodul und i) Kontrolleinheit.

Es wurde Druckverlusttests und kontinuierliche Rampen mit Farbstoff für die Charakterisierung der Pumpen vom Kompaktaufbau (Tecan Centris) durchgeführt. Bei dem Druckverlust-Experiment wurde der maximale zulässige Druck der 3-Wege-PTFE-Ventile bis 3 bar getestet. Dafür wurden Stahlkapillaren mit einem Innendurchmesser von 245  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 50 cm eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 ersichtlich. Ein lineares Verhalten zwischen Flussrate und Druckdifferenz konnte nachgewiesen werden.

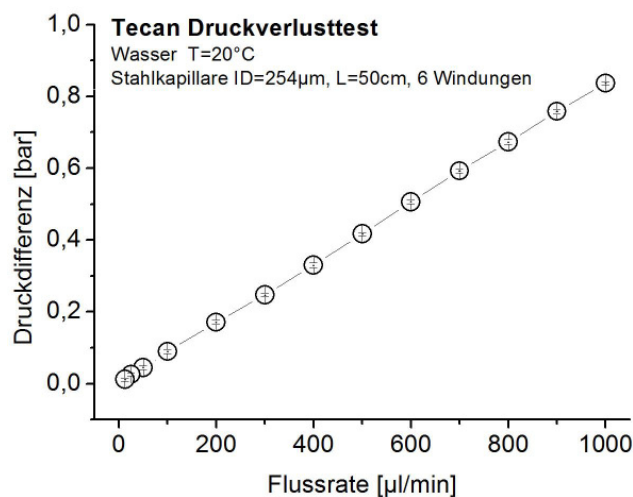


Abbildung 4.4: Druckverlusttest von TECAN-Centris-Pumpen bei 20°C mit destilliertem Wasser.

Für die Ermittlung der Genauigkeit der Konzentrationseinstellung innerhalb einer Mikrofluidsegmentsequenz wurde der Indikatorfarbstoff Cochenille Rot A (Abk. CR) mit einem Absorptionsmaximum von 505 nm eingesetzt. Über die Absorption des Indikators CR kann eine direkte Aussage über die Qualität der Flussrateneinstellung getroffen werden. Zusätzlich dazu konnten die Parameter Segmentabstand und Segmentdauer (Segmentvolumen) ermittelt werden. In Abbildung 4.5 ist visualisiert, dass mit einem hochaufgelösten kontinuierlichen Rampen-Programm die Extinktionswerte vom Farbstoff CR kontinuierlich zunahm. Daraus folgte, dass man mit dem TECAN-Centris-Pumpensystem hochaufgelöste Einzelwirkungscreensing durchführen konnte.

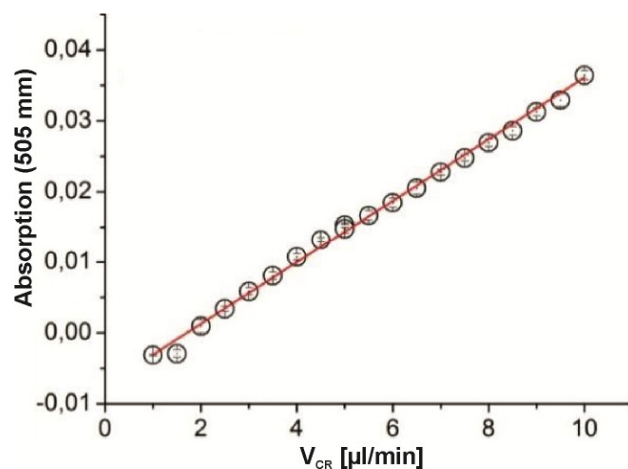


Abbildung 4.5: Kontinuierliche Flussratenänderung der Farbstoffkonzentration Cochenille Rot A gemessen mit Mikrodurchflussphotometer.

### 4.1.3 Systemcharakterisierung des Mikrofluidsystems

Um herauszufinden wie präzise das entwickelte Mikrofluidsystem arbeitet, ist die Ermittlung der Konzentrationsverteilung in allen Segmenten notwendig. Dafür wurde die photometrische Analyse der Farbstoffabsorption zur indirekten Ermittlung der Konzentrationsverteilung der Testsubstanzen im Mikrofluidsegment eingesetzt. Für spätere mehrdimensionale mikrobiologische Screenings wurde davon ausgegangen, dass die Verteilung der eingesetzten Testsubstanzen äquivalent zu der Verteilung des Farbstoffes ist.

Dieser Ansatz zur Erstellung großer dreidimensionaler Konzentrationsräume durch Variieren der Flussraten zugeführter Substanzen kann auch für höherdimensionale konzentrationsabhängige Untersuchungen eingesetzt werden. Somit ermöglicht dieses Verfahren die Untersuchung der Komplexitätswirkung von mehr als zwei Substanzen. Für eine Abstufung in 20%-Schritten und die daraus resultierenden 216 ( $6^3=216$ ) Konzentrationskombinationen wurde ein spezieller Rampenverlauf benutzt, wie in Abbildung 4.6a dargestellt. Das Zufuhrverhalten des ersten Effektors (blaue Linie) kann mit einer stufenweise zunehmenden Rampe beschrieben werden. Die Flussrate des zweiten Effektors (rote Linie) stieg an, wurde aber fünfmal zurückgesetzt. Für den dritten Effektor (orange Linie) wurde die Flussrate am schnellsten variiert, sodass die Flussrate insgesamt 35-mal zurückgesetzt wurde. Für die vierte Lösung ohne Effektoren (graue Linie) wurde die Flussrate so eingestellt, dass diese komplementär zur Summe der anderen drei Lösungen gehalten wurde. Somit blieb die Summe der gesamten Flussraten konstant. Die Absorption der Farbstoffe wurde mit dem Mikrodurchflussphotometer aufgezeichnet, wobei drei verschiedene LEDs zum Einsatz kamen mit jeweils einem Maximum bei 470 nm (Orange G), 505 nm (Cochinille Rot A) und 615 nm (Indigo Karmin) (Abbildung 4.6b) [153, 159].

Die Ermittlung der Substanzkonzentrationen anhand der einzelnen Farbstoffe erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (siehe Formel 4.1). Für Stoffgemische gilt:

$$E(\lambda) = d \cdot \sum_k \varepsilon_k(\lambda) \cdot c_k \quad (4.1)$$

Für einen 3D-Konzentrationsraum mit drei Farbstoffen (A, B, C) und einer Messung bei drei Wellenlängen ( $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ) gilt:

$$\begin{pmatrix} E(\lambda_1) \\ E(\lambda_2) \\ E(\lambda_3) \end{pmatrix} = d \cdot \begin{pmatrix} \varepsilon_A(\lambda_1) & \varepsilon_B(\lambda_1) & \varepsilon_C(\lambda_1) \\ \varepsilon_A(\lambda_2) & \varepsilon_B(\lambda_2) & \varepsilon_C(\lambda_2) \\ \varepsilon_A(\lambda_3) & \varepsilon_B(\lambda_3) & \varepsilon_C(\lambda_3) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_A \\ c_B \\ c_C \end{pmatrix} \quad (4.2)$$

Für höhere Konzentrationsräume wurden entsprechend angepasste Matrizen verwendet. Wichtig bei der Kalibration ist, dass sich die Indikatorfarbstoffe nicht gegenseitig beeinflussen. Daher wurden ausschließlich anionische Farbstoffe eingesetzt.

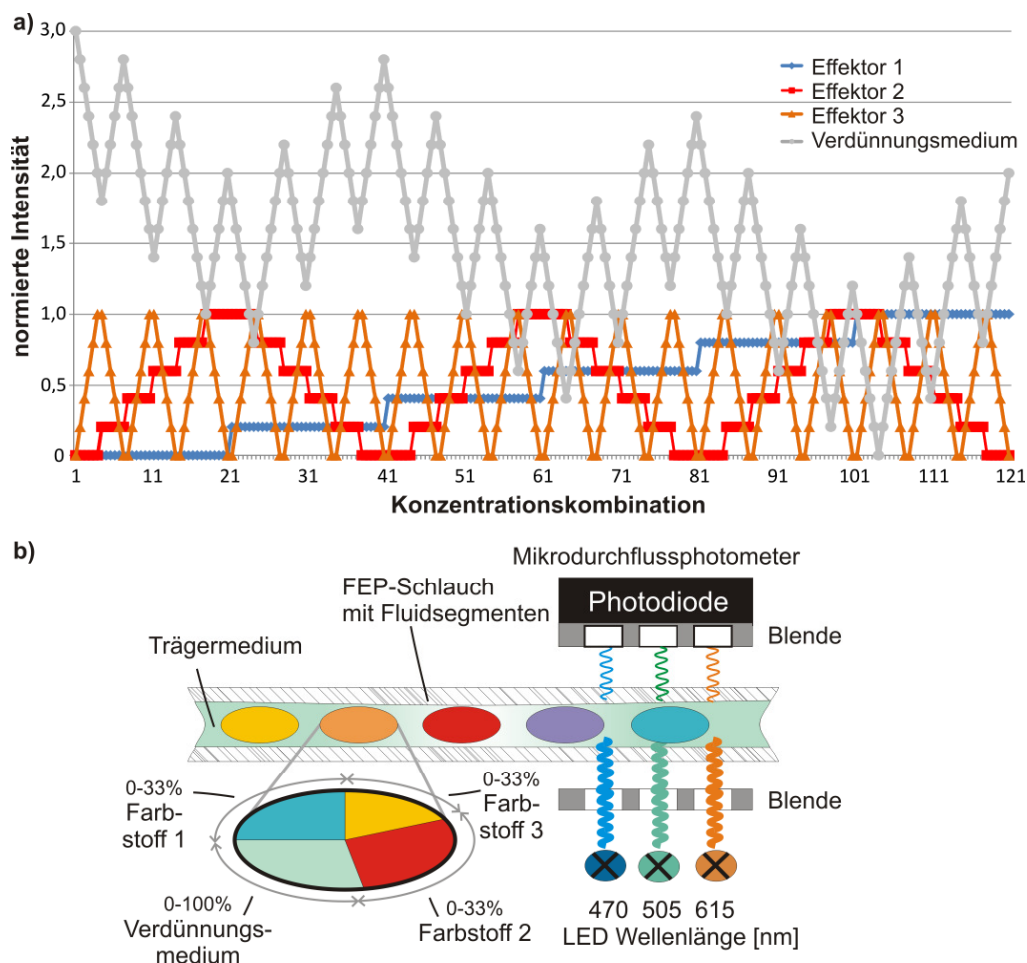


Abbildung 4.6: a) Pumpenverlauf für das Screening von drei Indikatorfarbstoffen mit 20% Konzentrationsabstufungen b) Schema mit optischen Detektoren zur Erfassung dreidimensionaler Konzentrationsräume mit drei Farbstoffen

## Systemcharakterisierung des Laboraufbaus

### Dreidimensionale Konzentrationsräume

Zur Charakterisierung der Laboranordnung unter Einsatz des Cetoni neMESYS Spritzpumpensystems erfolgte die Erzeugung von dreidimensionalen Segmentsequenzen über einen 7-Port-Manifold und mit dem in Abbildung 4.6a visualisierten Pumpenverlauf. Zur Verifikation des Verfahrens wurden ersatzweise drei in NMP (N-Methyl-2-pyrrolidon) gelöste Indikatorfarbstoffe Indigo Karmin (IK), Orange G (OG) und Cochenille Rot A (CR) eingesetzt. Das Volumen der einzelnen Segmente betrug ungefähr 200 nL. Die Flussrate des Trägermediums PP9 wurde bei 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  gehalten und die Flussraten der drei Farbstoffe und des NMP-Mediums wurden auf 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  herabgesetzt. Insgesamt betrug die Flussrate 35  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Es wurde eine Segmentreihe von ca. 5.000 Segmenten erzeugt. Dies entspricht ungefähr 23 Segmenten für jede der 216 Kompositionen.

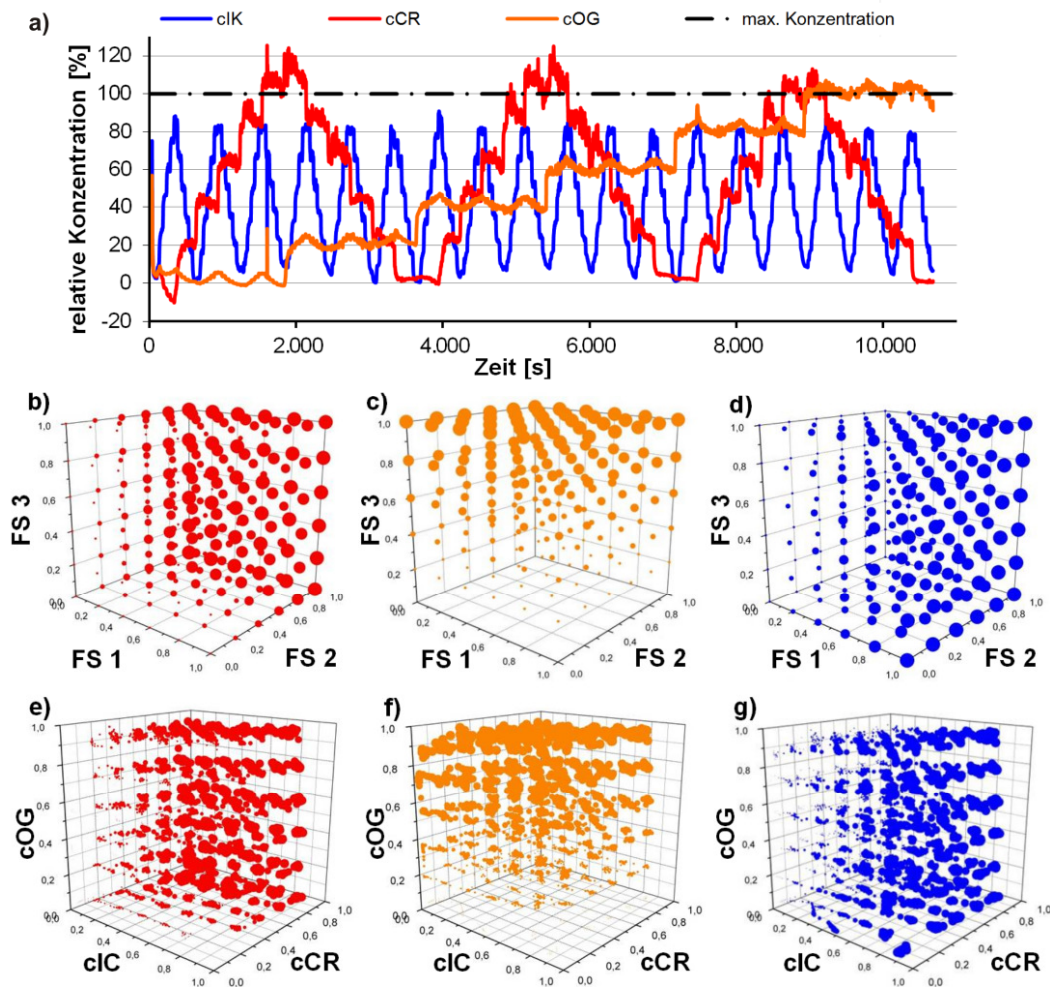


Abbildung 4.7: 3D-Farbstoffverifikation des Laboraufbaus (Cetoni neMESYS) mit einer Segmentsequenz von 5.000 Segmenten. a) Segmentinterne Farbstoffkonzentration in eindimensionaler Darstellung, (b-d) Segmentinterne Farbstoffkonzentration in dreidimensionaler Darstellung mit Sollwert. (e-g) Dreidimensionaler Darstellung mit tatsächlich ermittelten Werten

Die nominalen Konzentrationen der Farbstoffe sind in Abbildung 4.7 b-d proportional zur Punktgröße. Die Position der 216 Kombinationen kann durch die drei Achsen bestimmt werden. Die tatsächlichen Werte der Konzentrationen weichen leicht mit  $\pm 5\%$  von den Nominalwerten ab (Abbildung 4.7 e-g).

### Fünfdimensionale Konzentrationsräume

Das Experiment zur Simulation eines fünfdimensionalen Konzentrationsraumes wurde mit fünf Farbstoffen durchgeführt. In Abbildung 4.8 sind die Versuchsergebnisse für die Adressierung von fünfdimensionalen Räumen mit den Farbstoffen Titangelb (414 nm), Orange G (470 nm), Säurefuchsin (562 nm), Bromphenolblau (604 nm) und Patentblau (625 nm) visualisiert. Aufgrund begrenzter Spritzenvolumina musste die Konzentrationsauflösung bei den Segmentsequenzen mit zunehmender Anzahl der Dimensionen reduziert werden. Somit verschiebt sich die qualitative Aussage der Dosis-Wirkungs-Beziehung zur semiquantitativ oder quantitativen Aussage (siehe Tabelle 3.6).

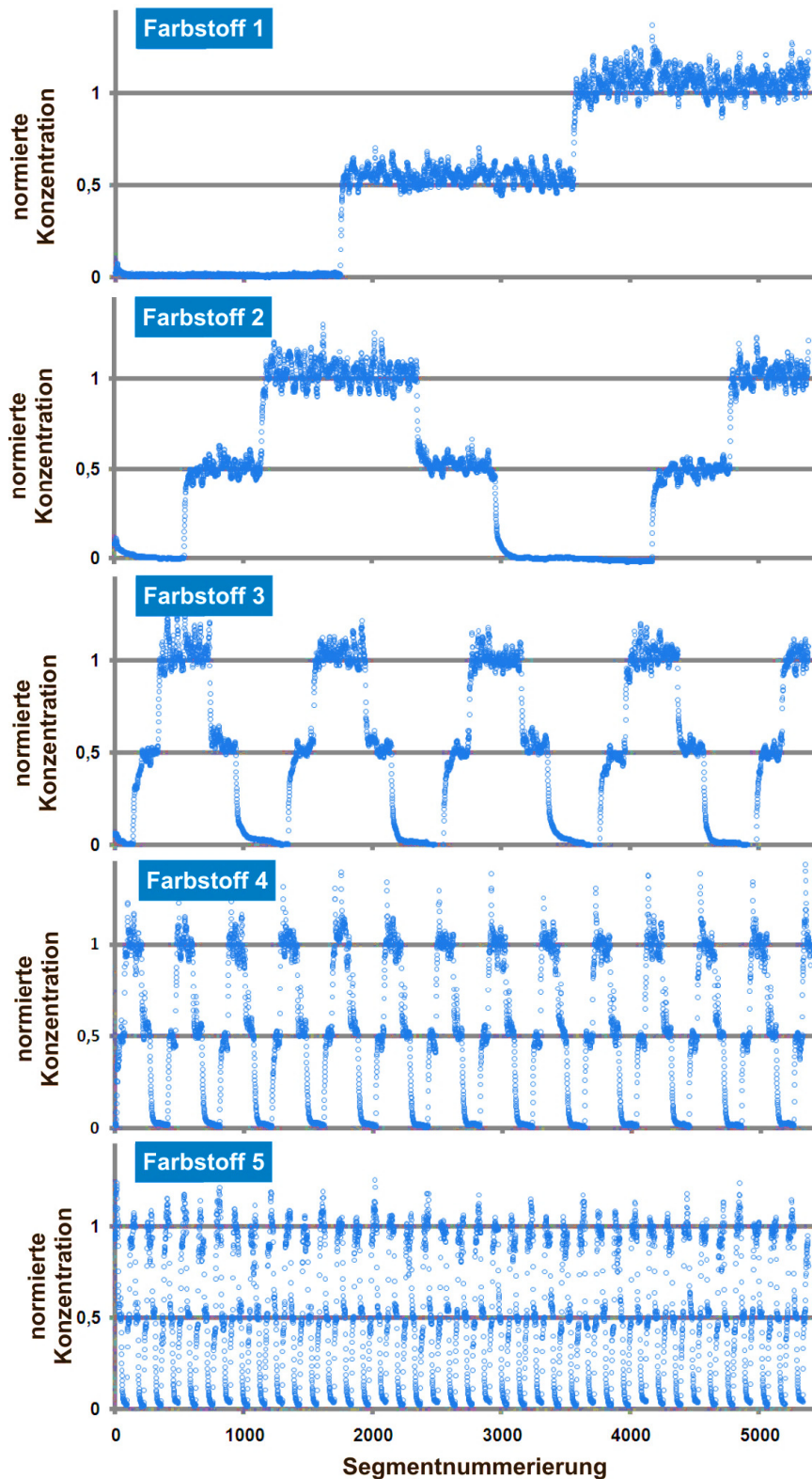


Abbildung 4.8: Realisierung eines fünfdimensionalen Konzentrationsraumes mit Segmentsequenzen von 5.400 Segmenten, fünf Farbstoffen in drei Konzentrationsstufen (0, 50 und 100%) entspricht 243 Konzentrationskombinationen. Die normierten Konzentrationswerte wurden unter Zuhilfenahme der gemessenen Absorptionswerte berechnet.



Im Prinzip gleicht der Pumpenverlauf für ein fünfdimensionales Screening dem des dreidimensionalen Experiments mit der Ausnahme, dass nun drei statt den vorher benutzten sechs Konzentrationsstufen (0%, 50% und 100%) angewendet werden. Dies führte zu  $3^5=243$  unterschiedlichen Konzentrationskombinationen. Die Berechnung ist im Kapitel 3.2.3 erklärt. Für jede Konzentrationskombination wurde ein Block von 22-23 Segmenten erzeugt, so dass insgesamt ca. 5.400 Segmente für insgesamt 243 Konzentrationsadressierungen erzeugt wurden.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das verwendete Mikrofluidsystem (Cetoni-neMESYS) bei der Erzeugung fünfdimensionaler Konzentrationsräume ausreichende Aussagen für die qualitative Bewertung wie beispielsweise "keine Inhibition", "inhibierende" und "totale Inhibition" lieferten.

### ***Systemcharakterisierung des Kompaktaufbaus***

Zur Charakterisierung der Kompaktanordnung (Tecan Centris) wurde ähnlich wie beim Laboraufbau mehrdimensionale Screenings mit Farbstoffen durchgeführt.

Ein zweidimensionaler Konzentrationsraum wurde mit komplementären Änderungen der periodisch variierten Farbstoffzusammensetzungen von zwei Farbstofflösungen Orange G (OG) und Cochenille Rot A (CR) in Mikrofluidsegmenten simuliert (Abbildung 4.9). Die segmentinterne Farbstoffkonzentration wurde mit zwei Mikrodurchflussphotometern bestimmt (OG 470 nm, CR 505 nm). Eine Segmentsequenz der gesamten Konzentrationskombinationen wurde durch eine kontinuierliche Flussratenänderung der Farbstofflösung OG und einer schnellen zyklischen Flussratenänderung der Farbstofflösung CR hergestellt. Abbildung 4.9 zeigt einen solchen Versuchslauf mit 16 Abstufungen bei einer Auflösung von 6,67% ( $16^2=256$  Konzentrationskombinationen). Dafür wurde eine Segmentreihe von ca. 800 Segmenten erzeugt, wobei jeder Punkt durch ein Mikrofluidsegment realisiert wurde. Dies entspricht ungefähr drei Segmenten pro Konzentrationskombination. Das Doppel-Konzentrationsdiagramm (Abbildung 4.9c) zeigt eine vollständige Abdeckung der beiden Konzentrationsbereiche und eine relativ homogene Verteilung der Konzentrationskombination.

Für dreidimensionale Screenings konnte der gleiche Pumpenverlauf wie in der vorherigen Laboranordnung (siehe Abbildung 4.6a) verwendet werden. Drei in Wasser gelöste Indikatorfarbstoffe Indigo Karmin (IK), Orange G (OG) und Cochenille Rot A (CR) wurden für die Experimente eingesetzt. Im vorliegenden Fall wurden 216 unterschiedliche Zusammensetzungen adressiert durch Konzentrationsvariationen der drei Substanzen in sechs Abstufungen im Bereich 0 bis 100% ( $6^3=216$ ). Das Volumen der einzelnen Segmente betrug dabei ungefähr 400 nL. Die Flussrate des Trägermediums PP9 wurde bei 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  gehalten und die Flussrate der drei Farbstoffe und des Wassers wurden auf 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  herabgesetzt. Insgesamt betrug die Flussrate 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Es wurde eine Segmentreihe von 1.600 Segmenten erzeugt. Dies entspricht ungefähr sieben Segmenten für jede Konzentrationskombination.

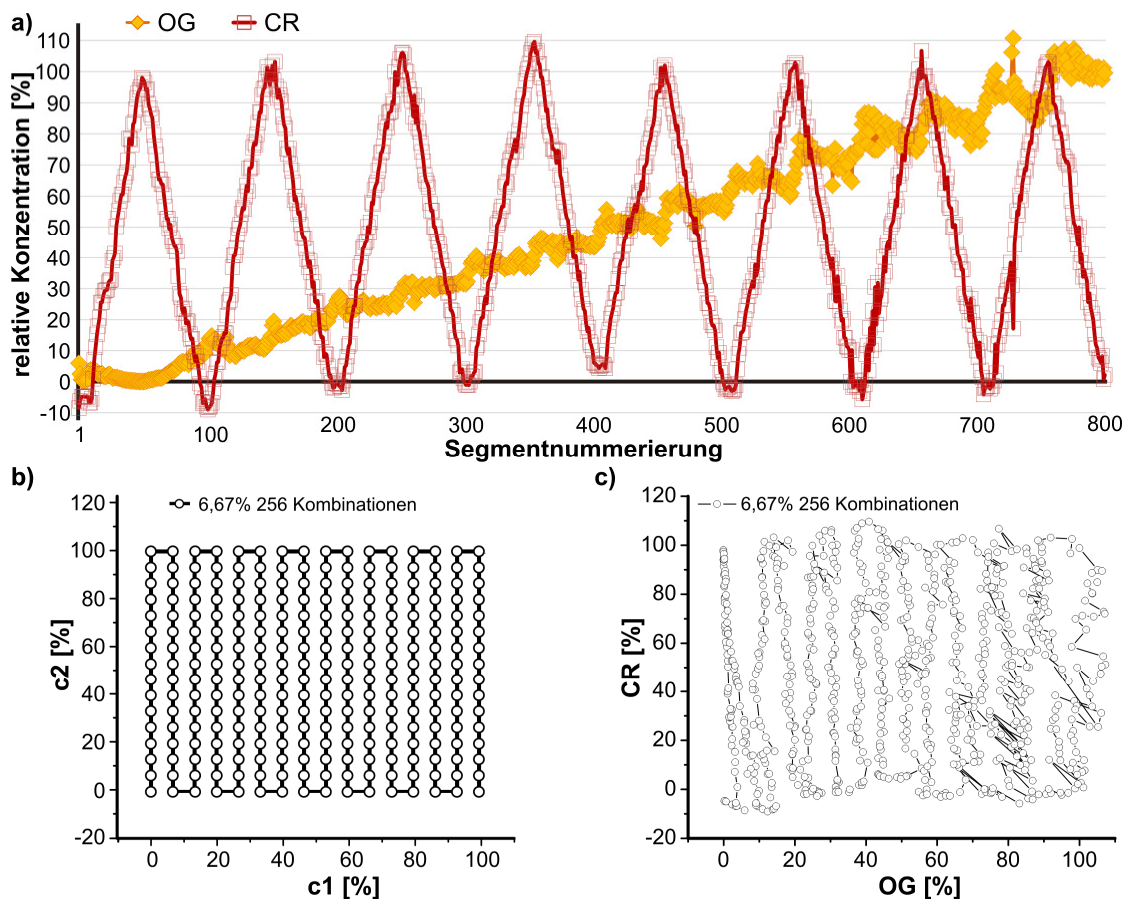


Abbildung 4.9: Realisierung zweidimensionaler Konzentrationsräume mit stufenweiser Änderung (6,67%) der Kompositionen von OG und CR. a) Ermittlung der relativen-Konzentrationen beider Farbstoffe mittels Mikrodurchflussphotometer. b) Sollwert c) Ist-Wert der Segmentverteilung der Konzentrationskombinationen.

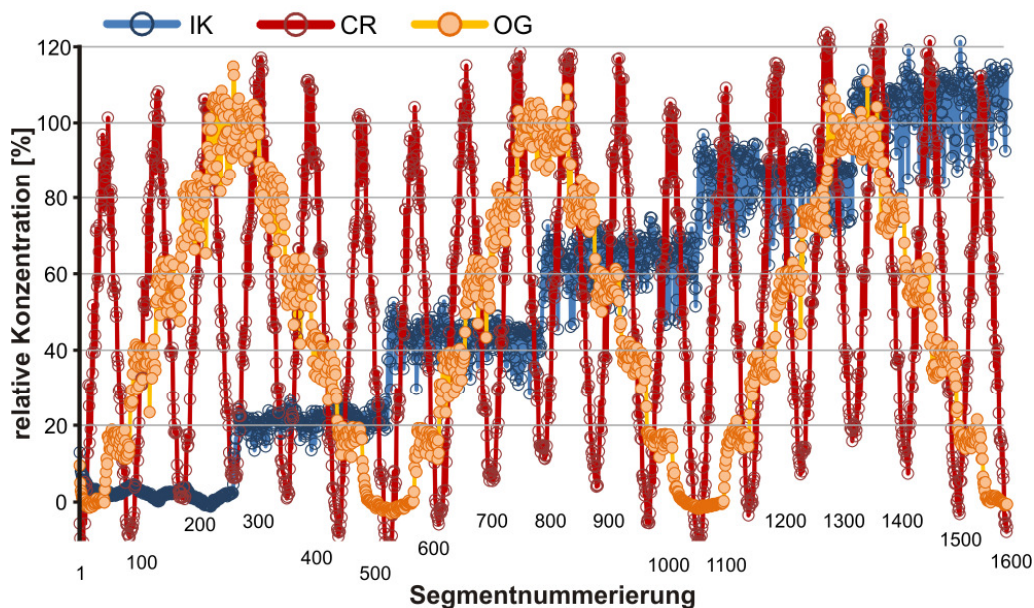


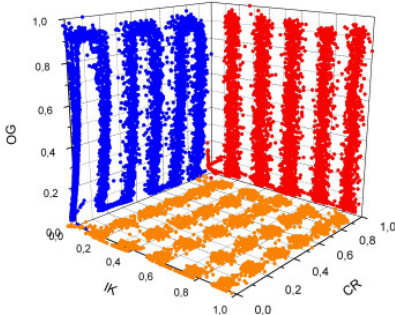
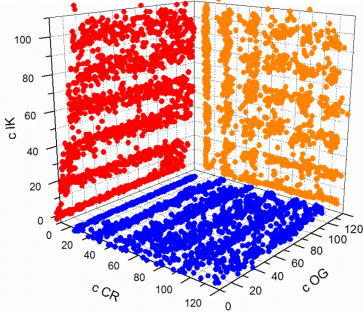


Abbildung 4.10: 3D-Farbstoffverifikation des Kompaktaufbaus (Tecan Centris) mit einer Segmentsequenz von 1.600 Segmenten (7-fach Redundanz).

Die nominalen segmentinternen Farbstoffkonzentrationen sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Die langsam zunehmende Flussrate von IK zeigte eine gute Übereinstimmung mit den Sollwerten (Abbildung 4.6a), wobei mit zunehmender Farbstoffkonzentration ein größerer Fehler zu beobachten ist. In Abbildung 4.10 konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Konzentrationswerte durch die schnellste, sich zyklisch ändernde Zufuhr des Farbstoffs CR von OG beeinflusst wurde. Insgesamt zeigten die gemessenen Nominalwerte der Farbstoffkonzentration im Segment eine  $\pm 10\%$ ige Abweichung bzw. Streuung um die eingestellten Sollwerte.

Im Vergleich zu den Ergebnissen mit der Laboranordnung für dreidimensionale Messungen (Abbildung 4.7b) ist die Kompaktanordnung für das dreidimensionale Screening weniger geeignet. Die Ursache hierfür liegt an der Unterschiedlichkeit der beiden Pumpensysteme. Die Spezifikationen der beiden Pumpensysteme wurden deshalb in Tabelle 4.1 verglichen und nachfolgend diskutiert.

Tabelle 4.1: Spezifikation der verwendeten Pumpensysteme

Pumpentyp	Cetoni neMESYS	Tecan Cavro Centris
Abbildung		
Abmessung [mm]	310x47x56	184,2x68,7x44,5
Gesamtanzahl der Inkrements	1.728.011	181.490
Min. Flussrate [Inkrements/s]	0,2	0,3
Max. Auflösung <sup>13</sup> [nl/min]	2,9	16,5
Kosten €/stück	ca. 4.000	ca. 1.200
Ermittelte rel. Konzentrationen von 3D-Screening (20% Auflösung, 6 Konzentrationsstufen und 216 Kombinationen)		

<sup>13</sup> bezogen auf 500 µl Spritze

Im Vergleich zum Laborsystem mit Cetoni-neMESYS-Spritzenpumpen bietet das Kompaktsystem mit Tecan Centris ähnliche Qualitätsaussagen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung für hochaufgelöste ein- und zweidimensionale Screenings. Aufgrund der hohen Inkrementanzahl (nahezu 10-fach größer als bei Tecan-Centris-Pumpen) und der damit verbundenen größeren Auflösung ist der Laboraufbau mit dem neMESYS-Pumpen besser geeignet für die Erzeugung dreidimensionaler Konzentrationsräume.

## 4.2 Toxizitätstests im Mikrofluidsegment mit IPC-81 Zellen

Im vorausgegangenen Kapitel wurde nachgewiesen, dass die entwickelten Labor- und Kompaktsysteme für hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Beziehung eingesetzt werden konnten. Die Einsetzbarkeit für die miniaturisierte toxikologische Screenings soll in nachfolgenden Abschnitten (Kap. 4.2-4.6) verifiziert werden.

### 4.2.1 Wachstumskinetik

Die Kultivierung von IPC-81-Zellen im Mikrofluidsegment (Segmentgröße: 250 nl) erfolgte im FEP-Schlauch (ID 0,4 mm und AD 0,8 mm) und PTFE-Schlauch (ID 0,5 mm und AD 1,6 mm). Die Ergebnisse wurden in der Abbildung 4.11a visualisiert. Im FEP-Schlauch wuchsen die Zellen über einen Zeitraum von 47 h während im PTFE-Schlauch aufgrund limitierter Gaspermeabilität des Schlauches kein Zellwachstum innerhalb von 70 h detektiert werden konnte.

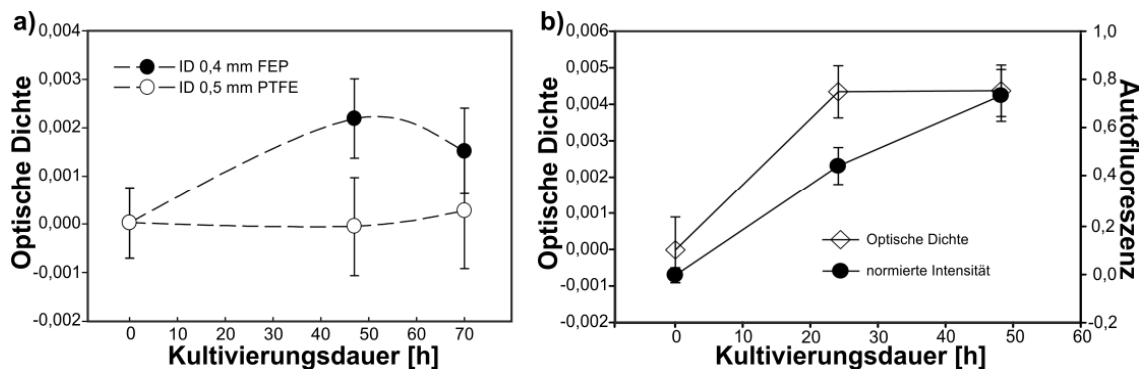


Abbildung 4.11: a) Ermittlung der Wachstumskinetik von IPC-81-Zellen kultiviert im FEP-Schlauch (ID 0,4 mm und AD 0,8 mm) und im PTFE-Schlauch (ID 0,5 mm und AD 1,6 mm). b) Entwicklung des Zellwachstums und der Autofluoreszenz von IPC-81 kultiviert im Segment.

Eine weitere Untersuchung von in Mikrosegmenten kultivierten IPC-81-Zellen mittels Mikrodurchflussphotometer und -fluorimeter wurde im FEP-Schlauch (ID 0,4 mm AD 0,8 mm) durchgeführt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 4.11b dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass über einen Zeitraum von 24 h ein kontinuierliches Wachstum von IPC-81 besteht. Dem gegenüber war die optische Dichte zwischen 24 h und 48 h annähernd konstant, während eine kontinuierliche Erhöhung der normierten Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 48 h nachgewiesen werden konnte.

Nach der erfolgreichen IPC-81-Zellkultivierung in Mikrofluidsegmenten wurden die Einzelwirkungen des Effektors Carbendazim und einer ionischen Flüssigkeit IM16 (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N untersucht.

## 4.2.2 Einzelwirkungsscreenings

### Untersuchung der Wirkung von IM16 auf IPC-81-Zellen

Unter dem Begriff „ionische Flüssigkeiten“ (engl. ionic liquids) versteht man Salze, die bei Temperaturen unter 100 °C flüssig sind, ohne dass das Salz dabei in einem Lösungsmittel gelöst ist. Anders als bei normalen Salzen sind bei der ionischen Flüssigkeiten die Bindungskräfte zwischen Kationen und Anionen schwach, sie sind nicht leicht entzündlich, sie sind elektrisch leitfähig, verdunsten nicht und besitzen gute Lösungseigenschaften für zahlreiche Stoffe. Wegen der Vielzahl an Variationsmöglichkeiten in der Grundstruktur und der Kombination unterschiedlicher Anionen und Kationen ist die Zahl der möglichen ionischen Flüssigkeiten unbegrenzt. Das wachsende Interesse an ionischen Flüssigkeiten in verschiedensten Anwendungsgebieten wie der chemische Verfahrenstechnik [200, 201], der chemische Reaktionstechnik [202], der Bioverfahrenstechnik [203, 204] und der Nanopartikelsynthese [205, 206] macht eine Untersuchung im Hinblick auf die ökologische- und toxikologische Bedenklichkeit notwendig.

Als Beispiel wurde die Wirkung von 1-hexyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) amide (Abk. IM16) auf das Wachstumsverhalten und die Entwicklung des endogenen Autofluoreszenzsignals auf IPC-81-Zellen im Mikrofluidsegment untersucht. Die simultane Messung von Trübungs- und Fluoreszenzsignal mittels Mikrodurchflussphotometer und -fluorimeter fand zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 h im Segment statt. In den Experimenten konnten ähnliche Kurvenverläufe bei Trübungs- und Intensitätsmessung beobachtet werden (Abbildung 4.12).

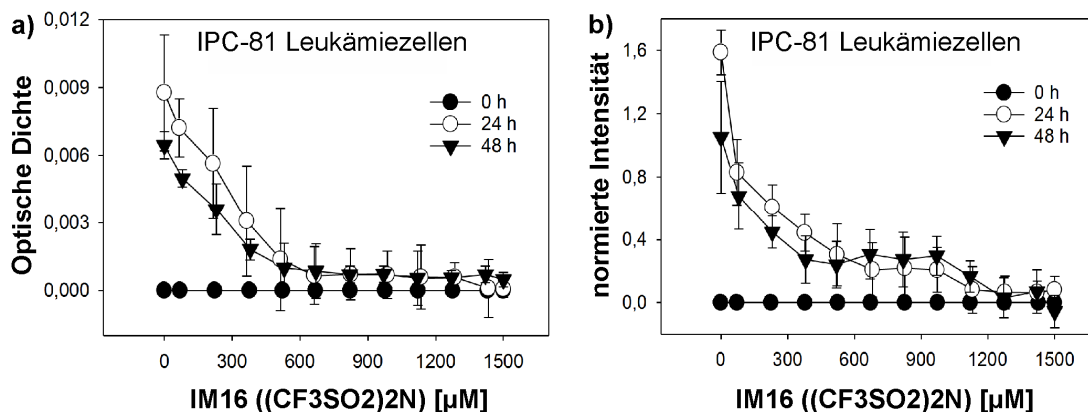


Abbildung 4.12: Wirkung von IM16 ((CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N) auf Wachstums- und Autofluoreszenzmessung von in Mikrofluidsegmenten kultivierten IPC-81-Zellen ermittelt zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten. a) Konzentrationsabhängige Änderung der Zelldichte. b) Konzentrationsabhängige Änderung der endogenen Autofluoreszenz.

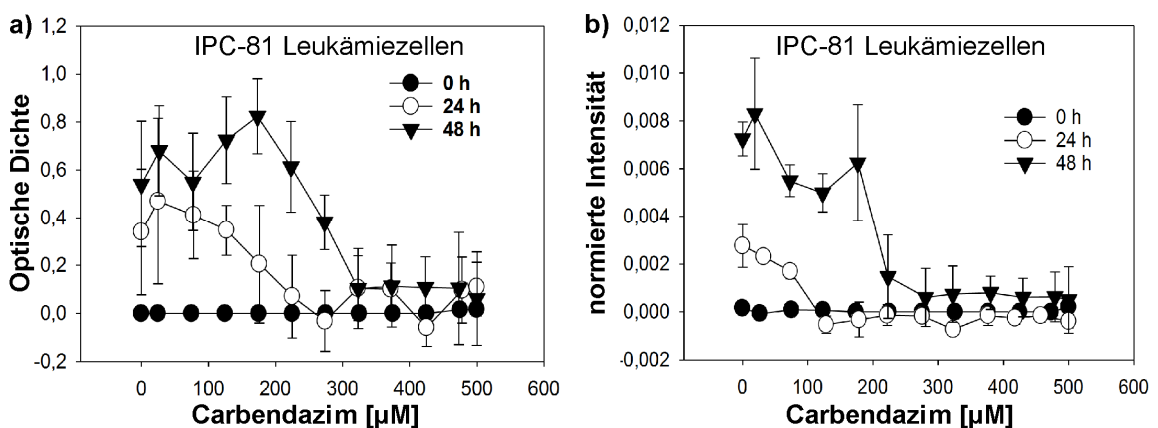
Nach 24 h Kultivierung zeigte sich, dass eine IM16-Konzentration bis zu 600 µM eine zunehmende Hemmung des Wachstums und der Stoffwechselaktivität in Bezug auf die Positivkontrolle verursachte. Zwischen 600 µM und 1.500 µM ließ sich eine starke Hemmung des Wachstums nachweisen. Dem gegenüber zeigte sich eine leichte Stoffwechselaktivität bei der IM16-Konzentration zwischen 600 µM und 1.000 µM. Erst bei der IM16-Konzentration ab

1.200  $\mu\text{M}$  fand eine totale Inhibierung statt, die auch durch die Intensitätsmessung bestätigt wird. In beiden Diagrammen ist eine große Standardabweichung zu beobachten. Die Ursache hierfür lag hauptsächlich in der Homogenität der Verteilung der Zellen beim Beimpfen.

### **Untersuchung der Wirkung von Carbendazim auf IPC-81-Zellen**

Carbendazim ist ein weltweit häufig benutztes Pflanzenschutzmittel (Fungizid) aus der Gruppe der Benzimidazol-Carbamate, welches gegen Pilzbefall bei einer Reihe von Früchten, Obst und Gemüsesorten eingesetzt wird.

Die Wirkung von Carbendazim auf das Wachstumsverhalten und die Entwicklung der endogenen Autofluoreszenz von IPC-81-Zellen wurde untersucht. Um detaillierte Informationen über die untersuchten toxikologischen Endpunkte zu erhalten, wurde ein breites Konzentrationsfeld abgerastert. Die simultane Messung von Trübungs- und Fluoreszenzsignalen mittels Mikrodurchflussphotometer und -fluorimeter fand zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten innerhalb der 48 h Kultivierungszeit von IPC-81-Zellen im Segment statt.



*Abbildung 4.13: Wirkung von Carbendazim auf das Wachstum und die Stoffwechselaktivität von in Mikrofluidsegmenten kultivierten IPC-81-Zellen ermittelt zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten. a) Konzentrationsabhängige Änderung der Zelldichte ermittelt durch photometrische Trübungsmessung. b) Konzentrationsabhängige Änderung der endogenen Autofluoreszenz ermittelt durch fluorimetrische Intensitätsmessung.*

In den Experimenten konnten gut reproduzierbare und hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Beziehungen gefunden werden. Nach 24 h Kultivierung konnte ein sigmoidaler Kurvenverlauf für die Endpunkte Wachstum und Autofluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 4.13). Es zeigte sich, dass nach 48 h Kultivierung geringe Carbendazim-Konzentrationen bis zu 200  $\mu\text{M}$  keine Hemmung des Wachstums und der Stoffwechselaktivität in Bezug auf die Positivkontrolle verursachten. Eine kontinuierliche Zunahme der Hemmung des Wachstums und der Stoffwechselaktivität zeigte sich für Carbendazim-Konzentrationen größer als 200  $\mu\text{M}$ , wobei es ab einer Konzentration von ca. 300  $\mu\text{M}$  zur totalen Inhibition kam.

### **4.3 Erfassung der Stoffwechselaktivität durch ins Mikrofluidsegment integrierte optische pO<sub>2</sub>-Sensorbeads**

Der Einsatz von Sensorbeads stellte eine neue Variante innerhalb alternativer nicht-invasiver Auslesetechniken dar. Da die Trübungsmessung bei niedriger Zelldichte oder inhomogener Zellverteilung eine eher ungenaue Methodik ist und die Autofluoreszenzmessung nicht für jede Art von Bakterien oder Zellen geeignet ist, wurde in den nachfolgenden Arbeiten neben der Trübungs- und Autofluoreszenzmessung mit der Bestimmung der weitaus sensitiveren Indikatoren pH und pO<sub>2</sub> gekoppelt. Zur Auslesung der Fluoreszenzintensität als Maß für eine pH-Wert Änderung hatte ich bereits im Rahmen der Diplomarbeit entwickelt [176]. Weiterhin hatte die Arbeitsgruppe erste toxikologische Untersuchungen mit dem Modellorganismus *E. coli* in Hinblick auf die pH-Wert Entwicklung durchgeführt [207].

#### **4.3.1 Wirkung von Schlauchgeometrie und Atmosphäre auf Lumineszenzintensität im Mikrofluidsegment mit Ps-PtTFPP Partikel**

In den initialen Experimentläufen wurde die Konzentration von PS-PtTFPP Partikel (S. 43) kontinuierlich variiert, um die Effekte der Schlauchgeometrie und der Atmosphäre auf die Lumineszenzintensität (Abbildung 4.14) zu überprüfen. Für diese Experimente wurden insgesamt etwa 600 Segmente mit einer Größe von 400-450 nl für zwei verschiedene Schlauchgeometrien erzeugt. PTFE-Schlauch mit den Wandstärken von 0,55 mm (AD 1,6 mm, ID 0,5 mm Abbildung 4.14a) und einer geringeren Wanddicke von 0,25 mm (AD 1.0 mm und ID 0,5 mm Abbildung 4.14b) zeigten eine lineare Zunahme der Lumineszenzintensität in Korrelation zur eingesetzten Bead-Konzentration zwischen 0 und 1 g/l. Ein ähnlicher linearer Anstieg der Intensität wurde mit beiden Schlauchtypen in Abhängigkeit von der Bead-Konzentration sowohl unter Luft als auch unter einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre beobachtet (Abbildung 4.14 schwarze und rote Linien). Nach 5 h Inkubationszeit unter 100% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre der Segmente mit Mikrobeads im PTFE-Schlauch mit 0,25 mm Wandstärke konnte eine stärkere Intensitätszunahme (maximale Intensität: 3,5) als im PTFE-Schlauch mit einer Wandstärke von 0,55 mm (max. Intensität: 2,5) nachgewiesen werden. Ursache könnte eine höhere Restsauerstoffmenge im Segment, die in den Schläuchen mit größerer Wandstärke vorlag, nach 5 h Inkubation unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre sein. Die dünnere Schlauchwand ermöglichte einen effizienteren Gasaustausch, was zu einer geringeren Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff führte.

Die Analysen bestätigten, dass es keinen signifikanten Unterschied für die PS-PtTFPP-Phosphoreszenzintensität zwischen beiden PTFE-Schlauchgeometrien unter Luftatmosphäre gab. Die Verringerung des Sauerstoffgehalts durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien sollte zu einer Zunahme der Phosphoreszenzintensität führen.



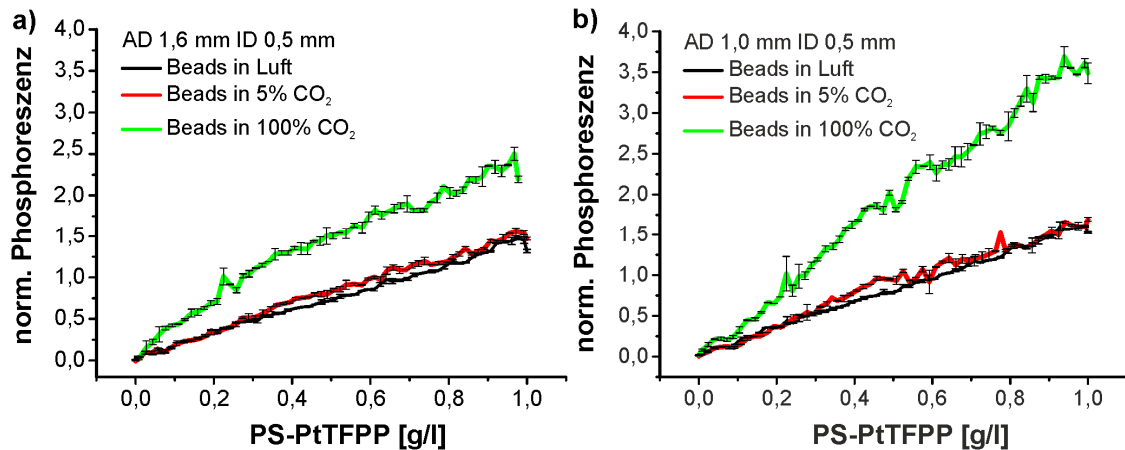


Abbildung 4.14: Auswirkungen von Schlauchgeometrie und Gaszusammensetzung auf die Phosphoreszenzintensität von PS-PtTFPP im Mikrofluidsegment. a) PTFE-Schlauch mit AD 1,6 mm und ID 0,5 mm, b) PTFE-Schlauch mit AD 1,0 mm und ID 0,5 mm.

#### 4.3.2 Segmentinterne $pO_2$ -Erfassung in verschiedenen Wachstumsstudien

In den nachfolgenden Abschnitten wurden die segmentinterne  $pO_2$ -Änderung während *E. coli* und *Str. acidiscabies* E13-Kultivierung mit dem Einsatz von Sensorpartikeln PS-PtTFPP und PS-PtTPBP untersucht.

##### Wachstumsstudien von *E. coli* mittels PS-PtTFPP

In den nachfolgend durchgeführten Versuchen sollte die  $pO_2$ -Intensitätsänderung während des *E. coli*-Wachstums im Einzelsegment durch den Einsatz von  $pO_2$ -sensitiven Polymerpartikeln PS-PtTFPP bestimmt werden. Für diese Experimente wurde eine Startzellendichte von  $10^5$  Zellen/ml gewählt und Segmente mit einem Volumen von 550 nl für den PTFE-Schlauch bzw. 450 nl für den FEP-Schlauch erzeugt.

Aus den erfassten Ergebnissen in Abbildung 4.15 lässt sich ableiten, dass im FEP-Schlauch mit einer Wandstärke von 0,2 mm die *E. coli* unter aeroben Bedingungen wuchsen. Während der exponentiellen Wachstumsphase im Mikrofluidsegment wurde der meiste Sauerstoff verbraucht. Dem gegenüber wurde bei der stationären- und Absterbephase kein Sauerstoff verbraucht. Im Segment bildete sich ein Gleichgewicht von  $O_2$  innerhalb und außerhalb des Schlauches. Im Gegensatz zum FEP-Schlauch wuchsen die *E. coli* Bakterien während der exponentiellen Wachstumsphase im PTFE-Schlauch mit einer Wanddicken von 0,55 mm wie unter anaeroben Bedingungen. Dadurch wurde hier während der exponentiellen Wachstumsphase kein Sauerstoff verbraucht.

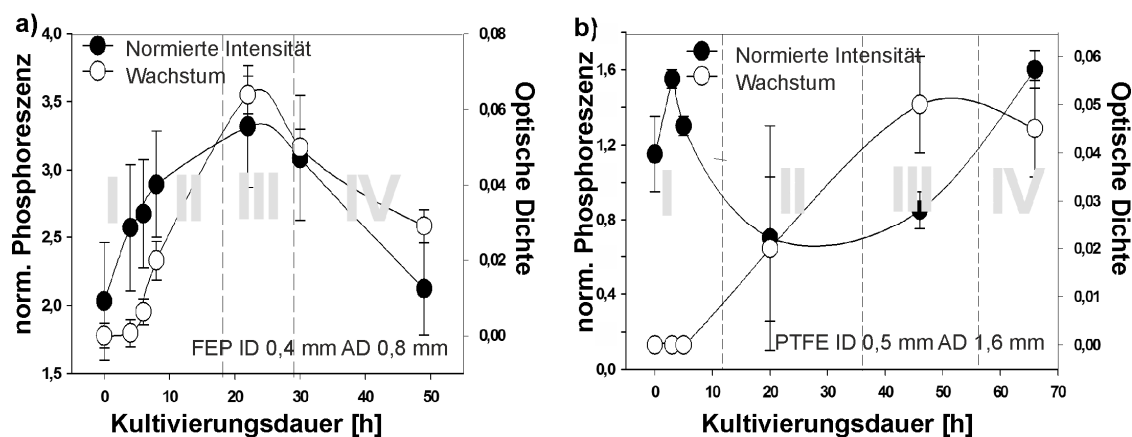


Abbildung 4.15: Sauerstoffverbrauch während des *E. coli* Wachstums im Mikrofluidsegment a) *E. coli* kultiviert im FEP-Schlauch mit ID 0,4 mm und AD 0,8 mm, b) *E. coli* kultiviert im PTFE-Schlauch mit ID 0,5 mm und AD 1,6 mm

Der theoretisch überschlagene Sauerstoffverbrauch während der exponentiellen Wachstumsphase wurde nach Martin et al. mit 3,8 ng nach 3,3 h Kultivierungszeit ermittelt, was einen vollständigen Sauerstoffverbrauch im Mikrofluidsegment bei einer Löslichkeit von 7 mg/l O<sub>2</sub> bei 37 °C impliziert [208]. Da die Bakterienzellen in diesem Wachstumsstadium mehr Sauerstoff verbrauchten, als der Maximalwert von Sauerstoff, der durch den Schlauch nach innen diffundieren kann, ist es wahrscheinlich, dass es nach 3,5 Stunden bereits zur Sauerstofflimitierung im Mikrofluidsegment kommt. Es spricht dafür, dass bereits in den ersten fünf Stunden der Kultivierung ein Wechsel vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel bei den *E. coli* bewirkt wird, was durch die Messergebnisse in Abbildung 4.15b nachvollzogen werden kann.

Im Vergleich zu PS-PtTFPP Sensorpartikeln, die sich teilweise mit dem Autofluoreszenzsignal überschneiden, ermöglichten die PS-PtTPBP Nanobeads aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften (NIR-Emission) eine totale Entkopplung des pO<sub>2</sub>-Signals vom Autofluoreszenzsignal. Aufgrund dieser Feststellung wurden ausschließlich PS-PtTPBP Nanobeads für spätere Untersuchung der metabolischen Aktivität verschiedener Bakterien eingesetzt.

### Wachstumsstudien von *Str. acidiscabies* E13 mittels PS-PtTPBP

Mit der Integration der Nanobeads PS-PtTPBP (S.44) in die Mikrofluidsegmente konnte die segmentinterne Analyse vom pO<sub>2</sub>-Wert während des Wachstums von *Str. acidiscabies* E13 umgesetzt werden. Für die Experimente mit *Str. acidiscabies* E13 wurden insgesamt etwa 200 Segmente mit einer Ausgangssporendichte von 2.000 Sporen/Segment erzeugt. Das Wachstum und der Sauerstoffverbrauch im Segment wurden durch Bestimmung der Autofluoreszenz bei 470 nm Anregungswellenlänge (Emission bei >510 nm) und einer Phosphoreszenzintensität bei 405 nm Anregung (Emission bei >650 nm) ermittelt. Das Wachstum wurde jeweils 20, 32, 45 und 67 h nach dem Beginn der Inkubation beobachtet (Abbildung 4.16a). Der kontinuierliche Anstieg der Fluoreszenzintensität mit einer Anregung bei 470 nm über 70 h Inkubationszeit spiegelte das Wachstum von *Str. acidiscabies* E13 wider.

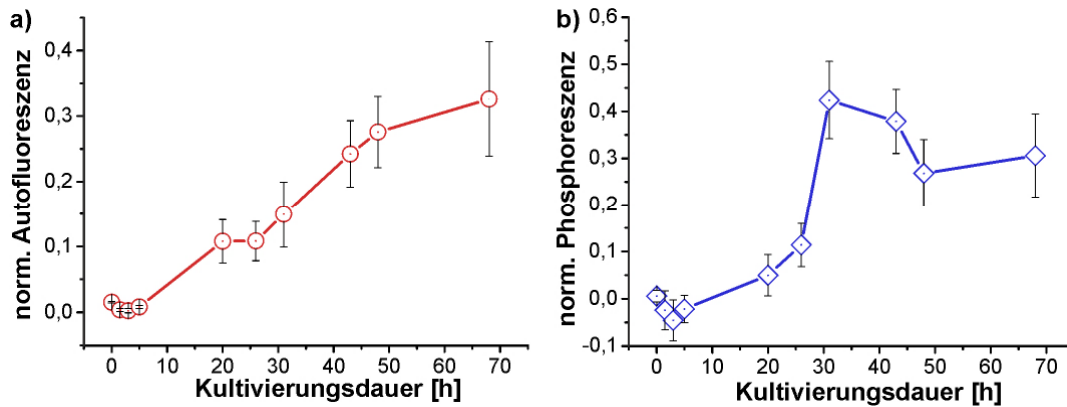


Abbildung 4.16: Ermittlung des Wachstums und des  $pO_2$ -Werts mittels Sensorbeads bei der Kultivierung von *Str. acidiscabies* E13 im Mikrofluidsegment. a) Messung der Autofluoreszenzintensität mittels in-situ Mikrodurchflussfluorimeter (Anregung 470 nm, Emission:  $>510$  nm). b) Messung der segmentinternen  $pO_2$ -Änderung durch den Einsatz von Sauerstoffsensorenpartikeln Ps-PtTPTBP.

Es gab nahezu keine Emissionssignale im Sauerstoffkanal (Emission bei  $>650$  nm) bei der Abwesenheit von Sensorpartikeln. Mit Zugabe von 250 mg/l PS-PtTPTBP Sauerstoffsensorenpartikeln in das Kultivierungsmedium konnte ein Anstieg der Phosphoreszenzintensität innerhalb von 24 h Inkubationszeit verzeichnet werden (Abbildung 4.16b). Den Anstieg der Intensität verlief proportional zum Sauerstoffverbrauch und wurde durch das Bakterienwachstum und die damit zusammenhängende aerobe Stoffwechselaktivität verursacht. Ein stärkerer Anstieg der Phosphoreszenzintensität nach 24 h Inkubationszeit zeigte eine deutliche Steigerung der Stoffwechselaktivität. Die hohe Phosphoreszenzintensität entsprach einer drastischen Verringerung der Sauerstoffkonzentration bedingt durch die erhöhte Zellzahl und den hohen Sauerstoffverbrauch. Nach 48 h Inkubationszeit verringerte sich der Sauerstoffverbrauch von 100% auf 70%. Diese Beobachtung könnte an der teilweisen Kompensation des verbrauchten Sauerstoffs im Fluidsegment durch die langsame Diffusion von außen durch die Schlauchwände bei gleichzeitiger Verringerung der aeroben metabolischen Aktivität liegen.

### Wachstumsstudien von *psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1

Für die Untersuchung der Wachstumskinetik von UrPLO1 wurden ca. 600 Mikrofluidsegmente mit einem Volumen von 400-450 nl/Segment erzeugt. Die Ausgangszellzahl betrug 2.000 Zellen/Segment. Es wurden Messungen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten durchgeführt. Als Endpunkte zählten Zelldichte, Autofluoreszenzintensität und Phosphoreszenzintensität, die unter Zuhilfenahme von PS-PtTPBP mit den bekannten Mikrodurchflussphotometern und -fluorimetern gemessen wurden.

In Abbildung 4.17 ist die zeitabhängige Wachstumsentwicklung bei der Kultivierung von UrPLO1 im Segment dargestellt. In den ersten 20 Stunden reflektierten alle drei Sensorsignale das schnelle Wachstum. Jedoch konnten zwischen den verschiedenen optischen Kanälen Unterschiede beobachtet werden. Bei der Messung der optischen Dichte erfolgte nach 20 h eine moderate aber kontinuierliche Abnahme der Intensität bis hin zu 70 h. Es schien hier wahrscheinlich, dass der Stamm UrPLO1 bereits nach 20 h Inkubationszeit eine stationäre Phase erreicht hatte.

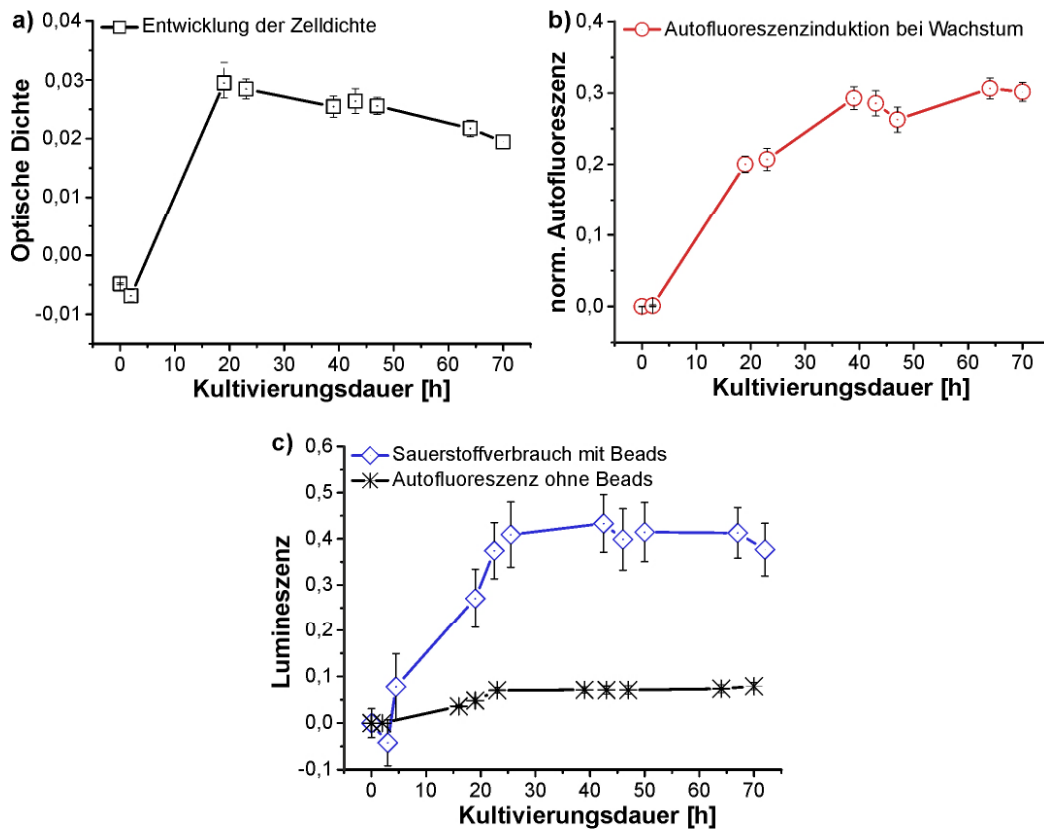


Abbildung 4.17: Überwachung von Wachstum und Stoffwechselaktivität zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten von *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1-kultiviert im Mikrofluidsegment a) Zelldichte gemessen mittels *in situ*-Mikrodurchflussphotometer (Quadrate: 470 nm) b) Autofluoreszenzintensität mittels *in situ*-Mikrodurchflussfluorimeter (Kreise: Anregung: 470 nm, Emission: >510 nm) c) Segment interner pO<sub>2</sub>-Verbrauch ermittelt mittels Mikrodurchflussfluorimeter (Anregung 405 nm, Emission: >650 nm) unter Einsatz der Sensorpartikel PS-PtTPBP (Diamanten) und das Signal ohne Einsatz von Sensorbeads (Sterne).

Das Autofluoreszenzsignal in Abbildung 4.17b bestätigte die starke Zunahme der Zelldichte und die metabolische Aktivität der wachsenden Bakterien während der ersten Tage. Im Gegensatz zum photometrischen Signal zeigte sich am zweiten Tag eine weitere Steigerung des Autofluoreszenzsignals. Dieses Verhalten kann durch die fortlaufende Steigerung der Stoffwechselaktivität mit der Herstellung von fluoreszierenden Spezies nach Erreichen der höchsten Zelldichte erklärt werden. Bei der Beobachtung des Autofluoreszenzsignals der Bakterienkultur in Abwesenheit von Sensorpartikeln konnte nur eine minimale Zunahme der Fluoreszenzintensität während des Zellwachstums beobachtet werden (Abbildung 4.17c, Sterne). Dem hingegen konnte bei Segmenten mit eingesetzten 250 mg/l PS-PtTPBP Sensorpartikeln eine kontinuierlich zunehmende Stoffwechselaktivität durch Messung der Phosphoreszenzintensität bestätigt werden (Abbildung 4.17c Diamant). Je höher die Phosphoreszenzintensität war, desto geringer ergab sich auch der Sauerstoffgehalt im Segment. Die Auswertung zeigte einen hohen Sauerstoffverbrauch durch Bakterienwachstum am zweiten und dritten Tag.

### 4.3.3 Charakterisierung der Wirkung von $\text{Cu}^{2+}$ auf schwermetalltoleranten Stamm *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1

Sensorpartikel PS-PtTPBP wurden nun für mikrottoxikologische Screenings der Wirkung von  $\text{Cu}^{2+}$  auf schwermetalltolerante UrPLO1 im Nanolitersegment eingesetzt. Dafür wurden lineare Rampenprogramme mit einer kontinuierlichen Zunahme der Testsubstanz  $\text{CuSO}_4$  in Konzentrationen von 0-1 mM verwendet. Hierfür wurden fast 600 Mikrofluidsegmente mit einer Startzelldichte von 2.000 Zellen/Segment (Segmentgröße: 400 nl) erzeugt. Die Auswertung der Segmentsequenzen erfolgte direkt nach der Erzeugung (0 h) und nach 48 h Inkubation mittels Mikrodurchflussphotometer und -fluorimeter. Somit konnten die Zelldichte, die Autofluoreszenz und die  $\text{pO}_2$ -Änderung gleichzeitig ermittelt werden.

Auf den ersten Blick spiegelten alle drei Signale in Abbildung 4.18a-b den gleichen toxischen Effekt von  $\text{Cu}^{2+}$  auf die Bakterien wider. Eine genauere Analyse der Übergangsbereiche zwischen normalen Bakterienwachstum unter 0,3 mM  $\text{Cu}^{2+}$  und der totalen Wachstumshemmung bei über 0,7 mM  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen ergab jedoch Hinweise darauf, dass die drei Sensorsignale verschiedene Informationen zu diesem Übergangsbereich liefern.

Die erhaltenen Dosis-Wirkungs-Funktionen des Autofluoreszenzsignals markierten ein intensives Wachstum in allen Segmenten bis zu einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von 0,5 mM. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert lag bei etwa 0,55 mM  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration (Abbildung 4.18a Kreise). Bei der Trübungsmessung wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 0,40 mM festgestellt (Abbildung 4.18a Quadrate). Die Autofluoreszenzintensität zeigte ein stärkeres Signal im Vergleich zum Streusignal im Übergangsbereich (0,3-0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Bakterien in dieser Region zwar langsamer wuchsen, aber die Zellen eine viel höhere Stoffwechselaktivität vorwiesen. Dies konnte durch die Zunahme fluoreszierender Primärmetaboliten begründet sein oder auch ein Anzeichen für die erhöhte Induktion von fluoreszierenden sekundären Metaboliten im kritischen Konzentrationsbereich sein. Der unterschiedliche Charakter von Streu- und Autofluoreszenzsignal führte zu einer parallelen Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von ca. 0,40 mM bis etwa 0,55 mM. Während die Übergänge zwischen normalen Wachstum und totaler Inhibition bei photometrischen und Autofluoreszenzsignal ähnlich sind, wies der  $\text{pO}_2$ -Sensor einen viel steileren Abfall (Abbildung 4.18b, Diamanten) in einem sehr schmalen Konzentrationsintervall zwischen 0,46 und 0,48 mM  $\text{Cu}^{2+}$  auf.

Abbildung 4.18c zeigte, dass aus dem Vergleich von photometrischen Signal (schwarze Kurve), dem Verhältnis von Autofluoreszenz- zu photometrischem Signal (rote Kurve) und dem Verhältnis von Phosphoreszenz- zu photometrischem Signal (grüne Kurve) verschiedene Antwortverhalten der *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 in Abhängigkeit zur  $\text{CuCl}_2$ -Konzentration festgestellt werden konnten:

- A) hohes Wachstum
- B) reduzierte Streuung bei hoher Stoffwechselaktivität und Autofluoreszenz
- C) verminderte Stoffwechselaktivität bei hoher Autofluoreszenz
- D) starker Abfall der Autofluoreszenz
- E) unterdrücktes Wachstum

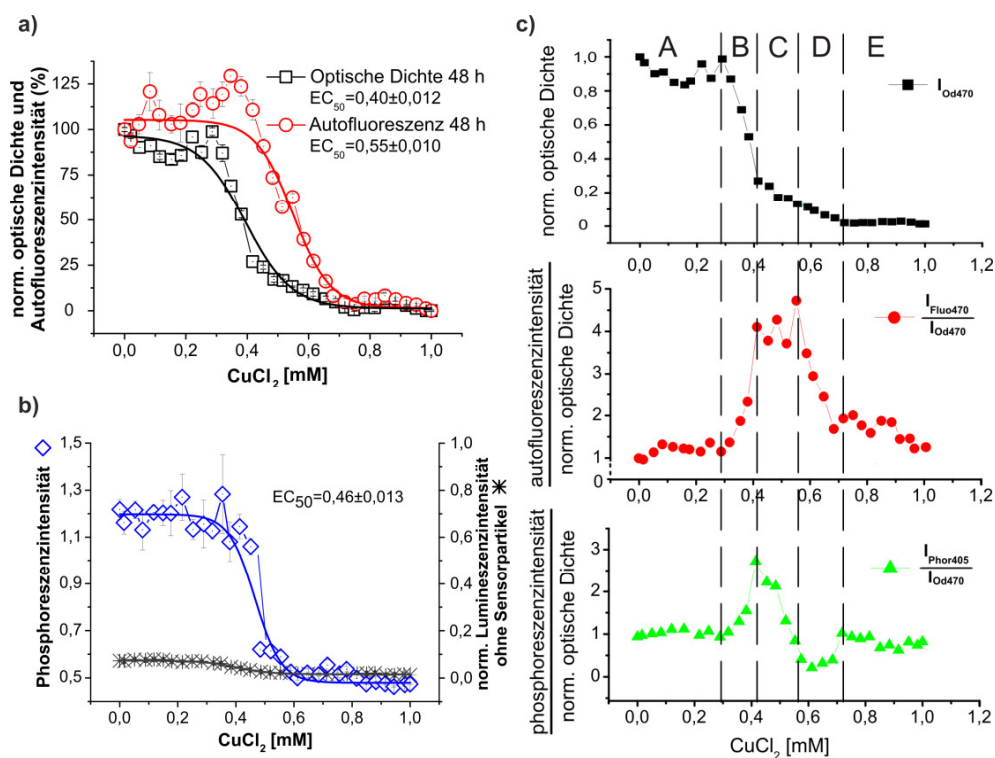


Abbildung 4.18: Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Kurven von  $\text{CuCl}_2$  auf *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 im Mikrofluidsegment nach 48 h Inkubation. a) Kreise: Autofluoreszenzintensität mittels Mikrodurchflussfluorimeter. Quadrate: Zelldichte mittels Mikrodurchflussphotometer. b) Überwachung des Sauerstoffverbrauchs in den Segmenten unter Verwendung von Sauerstoff-Sensorpartikeln PtTPTBP (Diamanten) und Bestimmung der Fluoreszenzintensität in Abwesenheit der Sensorpartikel (Sterne). c) Verhältnisse von fluorimetrischen- zu photometrischen Signalen.

Es konnte daraus geschlossen werden, dass ein erhöhter Sauerstoffverbrauch bei *Psychrobacillus psychrodurans* UrPLO1 im subletalen Bereich zwischen etwa 0,3 und 0,4 mM  $\text{Cu}^{2+}$  auftrat und dieser mit der Zunahme der Autofluoreszenz korreliert (Abbildung 4.18c Zone B). Bei einer  $\text{Cu}^{2+}$  Konzentration zwischen 0,4 und 0,55 mM wurde das Bakterienwachstum signifikant reduziert, jedoch nicht vollständig inhibiert. In diesem Bereich wurde der Sauerstoffverbrauch ebenso stark reduziert, wobei die Autofluoreszenz pro Zelle auf einem hohen Niveau blieb (Abbildung 4.18c Zone C). Letzteres deutete auf eine Stimulierung der Produktion von fluoreszierenden Spezies durch die Bakterien in diesem Konzentrationsbereich hin. Die Ergebnisse zeigten die Vorteile der Multiendpunkt-Analyse in der Kombination mit hochaufgelöstem Dosiswirkungsscreening.

Die vorausgegangenen Untersuchungen ergaben, dass die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs in Mikrofluidsegmenten mittels Phosphoreszenz- Intensitätsmessung unter Einsatz von Sauerstoffsensorenpartikeln erfolgreich realisierbar war. Im Vergleich zu anderen etablierten optischen Sauerstoff-Erkennungssystemen bietet die Mikrofluidtechnik zur Überwachung des bakteriellen Wachstums und des toxikologischen Screenings mittels Sensorbeads ein attraktives Verfahren mit Raum für Weiterentwicklungen. In naher Zukunft wäre hier der Einsatz eines miniaturisierten Lumineszenz-Lebensdauer-basierten Mikrodurchflussfluorimeter für die  $\text{pO}_2$ -Bestimmung denkbar.

## 4.4 Toxizitätstests im Mikrofluidsegment an schwermetall-resistente Streptomyceten

In diesem Kapitel wurden zuerst die Kultivierbarkeit Schwermetall-resistenter Bakterien in Mikrofluidsegmenten untersucht. Nachfolgend wurden Toxizitätsscreenings durchgeführt und die Ergebnisse mit Literaturreferenzen verglichen. Anschließend wurde die Kombinationswirkung von Zink und Kupfer auf Streptomyceten untersucht.

### 4.4.1 Wachstumskinetik

Nach vorausgegangenem Kultivierungsexperimenten mit Bakterien in Mikrofluidsegmenten von Martin et al. [129], konnten die Streptomyceten-Stämme *Str. acidiscabies* E13 und *Str. tendae* F4 erfolgreich im Mikrofluidsegment kultiviert werden. Ein Wachstum wurde 22 h nach Beginn der Inkubation (28 C) und ein weiterer Anstieg des Wachstums nach 45 h beobachtet. Die Anzahl der Sporen pro Segment wurde variiert, um den Effekt der Myzel-Entwicklung auf das Fluoreszenzsignal zu überprüfen. Beide Stämme zeigten die erwartete Zunahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Anzahl in einem Bereich zwischen 10 und etwa 1.000 Sporen/ $\mu\text{l}$ , entsprechend etwa 5-500 Sporen pro Segment (Abbildung 4.19). Die Experimente bestätigten die Kultivierbarkeit der beiden metalltoleranten Stämme in den Mikrofluidsegmenten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mittels Mikrodurchflussfluorimeter eine Schätzung der Gesamtzellzahl bzw. Entwicklung der Filamente während der Wachstumsphase von *Str. acidiscabies* E13 und *Str. tendae* F4 innerhalb eines Segments möglich ist.

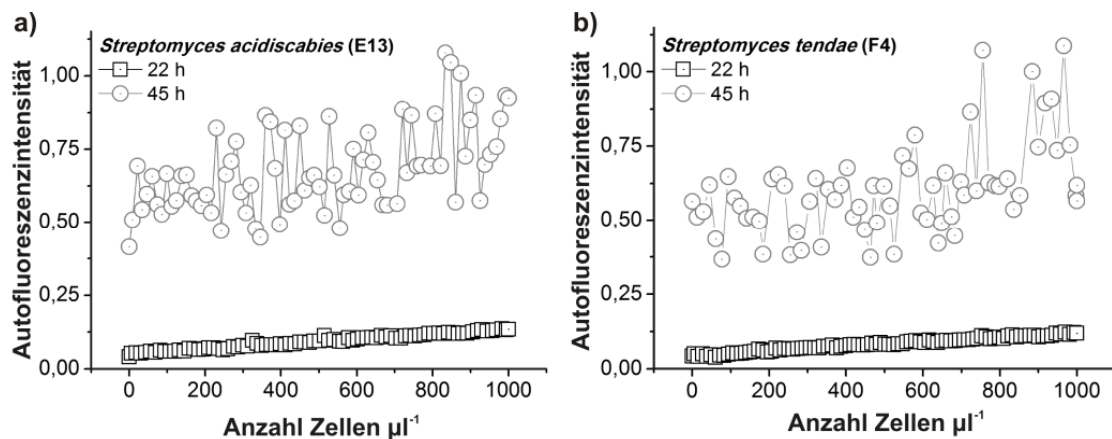


Abbildung 4.19: Fluorimetrisches Signal von einzelnen Fluidsegmenten mit unterschiedlicher Anzahl von Sporen ermittelt durch in-situ-Durchflussfluorimeter (Anregung: 455 nm und Emission 510 nm) a) *Str. acidiscabies* E13, b) *Str. tendae* F4.

#### 4.4.2 Hocho aufgelöste Dosis-Wirkungsbeziehung für $\text{Cu}^{2+}$ und $\text{Zn}^{2+}$ Ionen am *Str. acidiscabies* E13 und *Str. tendae* F4

Schwermetalle liegen im Boden entweder komplexiert oder ionisch vor [209]. Viele Schwermetalle (Zn, Fe, Co, Ni, Mo, Cu etc.) sind essentielle Spurenelemente für Lebewesen und Schwermetall-Ionen erlauben der Zelle eine Vielzahl komplexer chemischer, enzymatischer Reaktionen. Um die kontinuierliche Versorgung mit essentiellen Schwermetallen in physiologischen Konzentrationen zu gewährleisten haben die Organismen ein komplexes, homöostatisches Netzwerk entwickelt. Hier wurde die toxische Wirkung von Cu-Ionen und Zn-Ionen auf *Str. acidiscabies* E13 und *Str. tendae* mit dem Verfahren der kontinuierlichen Segmenterzeugung untersucht.

Zink spielt eine wichtige Rolle als Metall-Cofaktor u.a. in der Carboanhydrase, Carboxypeptidasen und Alkohol-Dehydrogenase aufgrund seiner hohen Ladungsdichte und der damit verbundenen Fähigkeit zur Katalyse nukleophiler Reaktionen [210]. Daneben sind  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen Bestandteil von Transkriptionsfaktoren, DNA- und RNA-Polymerasen, ribosomalen sowie Lipid-bindenden Proteinen [211].  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen katalysieren Elektronentransferreaktionen u. a. in der Atmungskette. Dabei dient  $\text{Cu}^{2+}$  als Elektronendonator und ist in der Lage,  $\text{O}_2$  direkt zu binden und anschließend zu  $\text{H}_2\text{O}$  zu reduzieren. Cu-Enzyme wie z.B. die Superoxid-Dismutase sind an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt [212]. Neben den beschriebenen essentiellen Funktionen sind die beiden Schwermetalle für die Organismen ab einer bestimmten Konzentration toxisch.

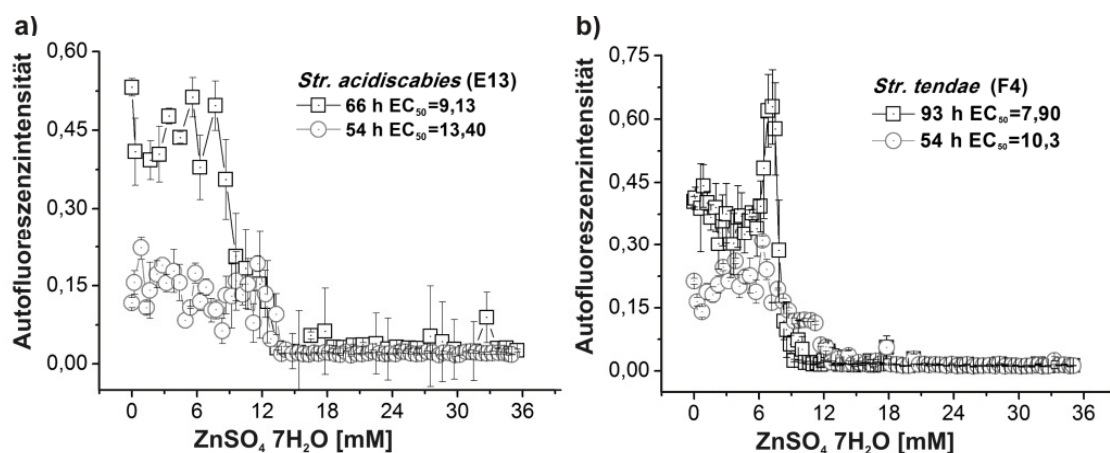


Abbildung 4.20: Hocho aufgelöste Dosis-Wirkungs-Kurven für  $\text{ZnSO}_4$  am a) *S. acidiscabies* E13 und b) *S. tendae* F4 kultiviert in Mikrofluidsegmentsequenzen. Kreise: Messung nach 54 h Inkubationszeit; Quadrate: nach 66 h/93 h Inkubationszeit.

Im Falle von *Str. acidiscabies* E13 auf Zinksulfat wurde ein scharfer Übergang zwischen Wachstum und Wachstumshemmung nach einer Inkubationszeit von 54 h festgestellt (Abbildung 4.20a). Kein Wachstum wurde oberhalb einer Zinksulfat-Konzentration von 14 mM beobachtet. Die erhaltene, hocho aufgelöste Dosis-Wirkungs-Antwort der Autofluoreszenz wies ein signifikantes Wachstum in allen Segmenten, bis hin zu einer Zink-Konzentration von 12 mM auf. Nach 54 h Inkubationszeit wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 13,4 mM ermittelt (Abbildung 4.20a Kreis). In einem zweiten Versuchslauf mit etwa 250 Fluidsegmenten wurde eine mittlere effektive Konzentration von 9,13 mM nach 66 h Inkubationszeit gefunden (Abbildung 4.20a



Quadrat). In diesem Experiment zeigte die Autofluoreszenz bis zu dreifach höhere Werte bei einer  $\text{ZnSO}_4$ -Konzentration unterhalb von 7,5 mM. Die im Mikrofluidsegment ermittelten Werte stimmen größenordnungsmäßig überein mit den Ergebnissen von konventionellen Testmethoden (10 mM Toleranz für Zn am *Str. acidiscabies* E13) [213].

*Str. tendae* F4 zeigte ein ähnliches, aber nicht identisches Wachstumsverhalten. Die hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Beziehung ergab  $\text{EC}_{50}$ -Werte von etwa 10 mM für eine Kultivierungszeit von 54 h (Abbildung 4.20b Kreis) und etwa 8 mM für eine Kultivierungszeit von 93 h (Abbildung 4.20b, Quadrat). Erneut wurde eine minimale Verringerung der Toleranz gegenüber Zinksulfat mit zunehmender Kultivierungszeit beobachtet. Die Autofluoreszenzintensität wuchs auf etwa 250% für 94 h der Kultivierung im Vergleich zu 54 h. Im Gegensatz zu *Str. acidiscabies* E13, zeigte *Str. tendae* F4 einen ausgeprägten Stimulationseffekt bei subletalen Dosen von Zinksulfat. Die hohe Auflösung ergab einen extrem scharfen Übergang zwischen hoher Stimulation und vollständiger Unterdrückung bei einer  $\text{ZnSO}_4$  Konzentrationen von 9 mM.

Viel niedrigere Metalltoleranzen wurden mit beiden Stämmen beim Einsatz von  $\text{CuSO}_4$  nachgewiesen. In der hochaufgelösten Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden drei verschiedene Antwortverhalten in Bezug auf unterschiedliche Konzentrationsbereiche gefunden. Im Falle von *Str. acidiscabies* E13 wurde für geringere  $\text{CuSO}_4$ -Konzentrationen von bis zu 0,25 mM keine Hemmung des Wachstums in Bezug auf die Positivkontrolle gefunden. Bei einer Kultivierungszeit von 40 h zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Inhibierung des Wachstums für  $\text{CuSO}_4$ -Konzentrationen größer als 0,25 mM, wobei es ab einer  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration von 1,25 mM zur totalen Hemmung kam (Abbildung 4.21a Kreis). Mit einer Inkubationszeit von 66 h wurde ein stark erhöhtes Wachstum bis zu einer  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration von 0,25 mM beobachtet. In diesem Fall war die Autofluoreszenzintensität mehr als fünfmal höher als die Autofluoreszenzintensität nach 40 h Kultivierungsdauer. Es konnte ein extrem scharfer Übergang zwischen hoher Stimulation und moderatem Wachstum um 0,25 mM  $\text{CuSO}_4$ -Konzentrationen verzeichnet werden. Bei Konzentrationen oberhalb von 1,3 mM  $\text{CuSO}_4$  trat eine starke Hemmwirkung bei *Str. acidiscabies* E13 auf.

Ein ähnliches Verhalten wurde für die Reaktion von *Str. tendae* F4 auf Kupfersulfat nachgewiesen. Ein steiler Übergang zwischen normalem- und moderatem Wachstum wurde bei 0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  nach einer Kultivierungszeit von 54 h (Abbildung 4.21b Kreis) gefunden. Eine vollständige Unterdrückung des Wachstums erfolgte oberhalb von 1,25 mM  $\text{CuSO}_4$ . Ein weiterer Anstieg der Autofluoreszenzintensität wurde bei subletalen Dosen von  $\text{CuSO}_4$  (0-0,7 mM) mit einer längeren Inkubationszeit von 93 h beobachtet (Abbildung 4.21b Quadrat).

Die mikrofluidische Untersuchung von *Str. acidiscabies* E13 und *Str. tendae* F4 bestätigte die höhere Toleranz gegen Zink im Vergleich zu Kupfer. In der Ökotoxikologie ist bereits bekannt, dass Zink weniger toxisch ist im Vergleich zu anderen Metallen wie beispielsweise Nickel oder Kupfer. Die Metallresistenzprofile unterscheiden sich zwischen den beiden Bakterienstämmen. Während sich *Str. acidiscabies* E13 als Multi-Metall-resistent mit der höchsten Toleranz gegenüber Nickel präsentierte, tolerierte *Str. tendae* F4 besonders das Cadmium, während andere Metalle nur innerhalb begrenzter Konzentrationsbereiche toleriert wurden [213].

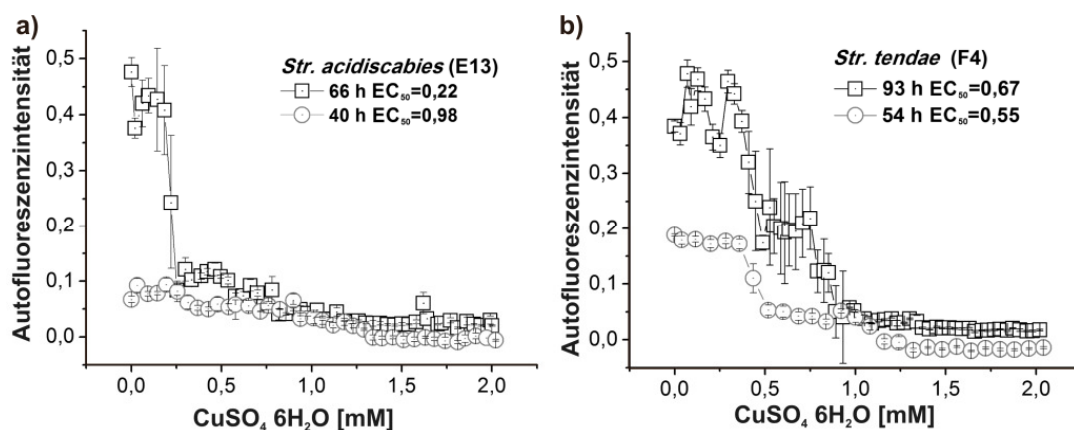


Abbildung 4.21: Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Kurven von a) *Str. acidiscabies* E13 und b) *Str. tendae* F4 gegen  $\text{CuSO}_4$  bei Kultivierung in Mikrofluidsegmentsequenzen. Kreise: Messung nach 40/54 h Inkubationszeit; Quadrate: nach 66/93 h Inkubationszeit.

Während Zink essentiell für viele verschiedene Enzyme ist (z.B. Superoxiddismutase), ist Kupfer nur für die Funktion von einer begrenzten Anzahl von Enzymen notwendig. Dies führt zu einer höheren Empfindlichkeit und einem weniger entwickelten Homöostase und Speichereigenschaft für dieses Metall [214, 215]. Es wurde gezeigt, dass im Falle von  $\text{Cu(II)}$  für beide Stämme ein reduziertes Wachstum bei den Kupferkonzentrationen zwischen 0,25-1,25 mM auftritt. Dieses moderate Wachstum lag deutlich zwischen maximalem Wachstum bei niedrigen Konzentrationen und der totalen Hemmung bei höheren Metallkonzentrationen. Durch die Erzeugung hochaufgelöster Dosis-Wirkungs-Screening konnten die signifikanten und steilen Übergänge zwischen normalem und reduziertem Wachstum visualisiert und somit nachgewiesen werden.

#### 4.4.3 Kombinationsscreenings binärer Gemische mit *Str. tendae* F4

Das zweidimensionale Screening-Experiment am *Str. tendae* F4 wurde mit einer Inkubationszeit von 93 h durchgeführt. Hier wurde auch die höhere Zink-Toleranz (ca. 5-6 mM) im Vergleich zu der Kupfer-Toleranz (ca. 0,7 mM) bestätigt.

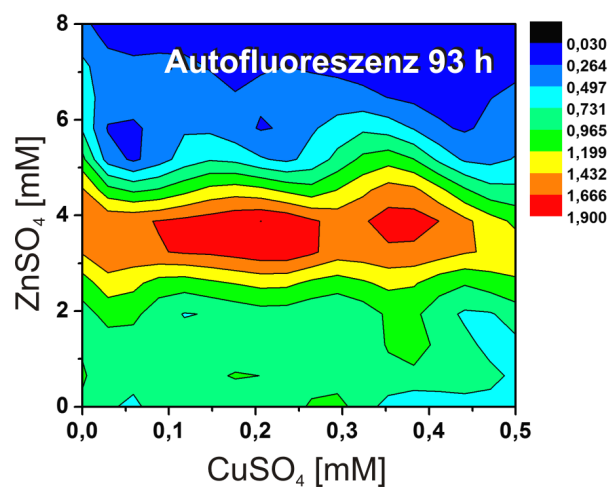


Abbildung 4.22: Kombinatorischer Effekt von  $\text{CuSO}_4$  und  $\text{ZnSO}_4$  auf *Str. tendae* F4 nach einer Kultivierungszeit von 93 h.

Die Experimente zeigten die stimulierende Wirkung von Zn bei subletalen Dosen. Das zweidimensionale Isobologramm stellte das höchste Bakterienwachstum in der Nähe der letalen Dosis von  $\text{CuSO}_4$  in Kombination mit  $\text{ZnSO}_4$  dar (Abbildung 4.22).

Die starke Steigerung des Bakterienwachstums in Anwesenheit beider Substanzen wurde wieder für ein eindimensionales, hochauflösendes Experiment bei 0, 0,25 und 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  mit kontinuierlich variierenden  $\text{ZnSO}_4$ -Konzentrationen verifiziert. Ein moderates Wachstum wurde in Abwesenheit und bei niedrigen  $\text{ZnSO}_4$  Konzentrationen gefunden. Minimales Wachstum wurde in den Bereichen zwischen 1,5 mM und 3,5 mM  $\text{ZnSO}_4$ -Konzentrationen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde eine höhere Autofluoreszenzintensität aus allen Segmenten, zwischen 4 mM und 6 mM  $\text{ZnSO}_4$  gemessen (Abbildung 4.23). Dieser starke Anstieg der Autofluoreszenz von bakteriellen Kulturen spiegelte die starke Stimulierung des Wachstums oder eine stark erhöhte Produktion von fluoreszierten Stoffen bei einer subletalen Dosis von Zinksulfat in Gegenwart von Kupfer wider.

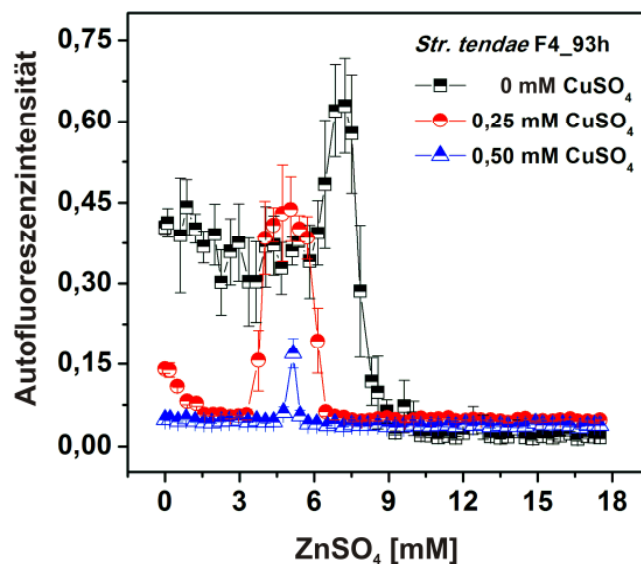


Abbildung 4.23: Hochaufgelöste eindimensionale Dosis-Wirkungs-Kurven für  $\text{ZnSO}_4$  bei konstanter  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration von 0, 0,25 und 0,5 mM.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Wirkung von mehr giftigem Schwermetall durch Co-Inkubation mit niedrigen, subletalen Konzentrationen von weniger toxischem Schwermetall kompensiert wurde. Die Ursache dafür könnte entweder bei der Induktion von Schutzmaßnahmen wie Metallothionein und Metallohistins [216, 217] liegen, oder bei anderen Möglichkeiten wie z.B. Efflux-Systemen um die Schwermetall-Homöostase aufrecht zu erhalten [218]. Auf der anderen Seite könnten sich hinter diesem Phänomen die freien Kapazitäten eines Transporters für Zink verbergen, welcher die Abgabe der Kupfer-Ionen aufgrund der nicht ausreichenden Mengen an der präferierter Substanz wie beispielsweise Zink-Ionen nach außen ermöglichte.

Das intensive Bakterienwachstum bei optimalen subletalen Konzentrationen beider eingesetzter Metallionen kann in zukünftigen Studien genutzt werden, um optimale Wachstumsbedingungen in den biologischen Sanierungsansätzen zu erzielen.

## 4.5 Toxizitätstests im Mikrofluidsegment mit Umweltorganismus *Chlorella vulgaris*

### 4.5.1 Einzelwirkungsscreening

Mit dem Verfahren der kontinuierlichen Segmenterzeugung konnten hochaufgelöste und gut reproduzierbare Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Testsubstanzen Atrazin, Alachlor,  $\text{CuCl}_2$ , Metallnanopartikeln an *Chlorella vulgaris* gefunden werden.

Herbizide wurden in der Landwirtschaft weltweit eingesetzt. Somit gelangen die meisten Rückstände ins Oberflächengewässer. Die daraus resultierenden negativen Auswirkungen in den Flüssen und Seen sind ein globales Problem [219]. Algen sind besonders anfällige aquatische Organismen für Herbizidverschmutzung im Wasser. Daher stehen für die nachfolgenden Experimente die zwei weitverbreiteten Herbizide Atrazin und Alachlor im Fokus.

Atrazin ist ein Triazinherbizid und verhindert die Photosynthese von Pflanzen indem es sich mit der  $\text{Q}_\text{B}$ -Bindenische des D1-Proteins (Herbizidbindeprotein) im Photosystem II bindet [194]. Für Atrazin wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 0,55  $\mu\text{g/ml}$  im Mikrofluidsegment ermittelt (Abbildung 4.24a). Eine große Anzahl von Studien haben die Atrazin-Toxizität auf Süßwasseralgen untersucht [194, 220-223]. Fairchild et al. haben einen  $\text{EC}_{50}$ -Wert von ca. 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt, bei der Inkubation von *C. vulgaris* 96 h mit Atrazin [194]. Von Stratton et al. wies ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert zwischen 0,2-1 mg/l von Atrazin für verschiedene Typen von Grünalgen nach 14-tägiger Inkubation nach [195], welche in Übereinstimmung mit dem im Mikrofluidsegment ermittelten Wert steht.

Alachlor zählt zur Klasse der Acetanilidherbizide. Obwohl die Wirkweise von Acetanilidherbiziden noch nicht vollständig aufgeklärt ist, greifen die Acetanilidherbiziden offensichtlich in verschiedene physiologische Prozesse wie die Biosynthese von Lipiden, Proteinen und Flavonoide ein [194]. Für Alachlor wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von ca. 5 mg/l im Segment ermittelt (Abbildung 4.24b). In Yang et al. wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 5,54 mg/l von Alachlor für *C. vulgaris* nach einer Inkubationsdauer von 96 h gefunden [196]. Auch hier stimmten die Effektkonzentrationen mit denen aus den Versuchen in Segmenten nahezu überein.

Kupfer wird als Metall, in Legierungen, in Farben und als Pflanzenschutzmittel eingesetzt und es wirkt besonderes auf Algen toxisch. Die Toxizität von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu *C. vulgaris* wurde von vielen Studien untersucht [224-226]. Kupfer ist ein redox-aktives Übergangsmetall, welches bei Defizit zu Mangelserscheinungen und in zu hohen Konzentrationen zur Zellschädigung führen kann. Die Toxizität von Kupfer liegt vor allem in seiner Fähigkeit aus den wenigen reaktiven Sauerstoffspezies (Abk. ROS, engl. reactive oxygen species), die während der oxidativen Phosphorylierung entstehen, die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals zu begünstigen [226, 227]. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für  $\text{CuCl}_2$  wurde aus den Versuchen in Mikrofluidsegmenten mit 40 mg/l ermittelt (Abbildung 4.24c) [130]. Die für diese Arbeit im Mikrofluidsegment ermittelten  $\text{EC}_{50}$ -Werte lagen in der Nähe der  $\text{EC}_{50}$ -Werte die in den ökologischen Standardtests ermittelt wurden (7  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>14</sup>.

---

<sup>14</sup> Informationssystem für Ökotoxikologie und Umweltqualitätsziele (ETOX Deutschland).

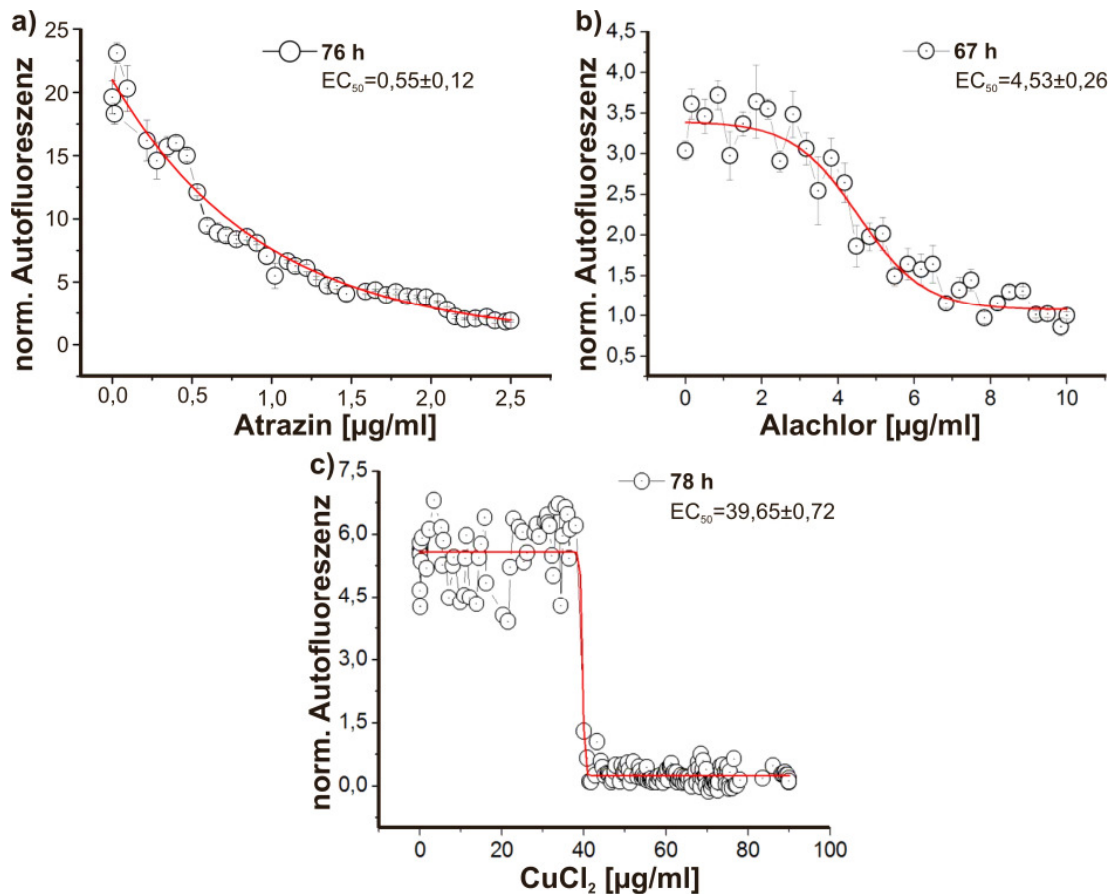


Abbildung 4.24: In Mikrofluidsegmenten ermittelte Dosis-Wirkungsbeziehung für drei verschiedene Testsubstanzen am *Chlorella vulgaris* nach drei Tagen Inkubationszeit. a) Effekte von Atrazin, b) Effekte von Alachlor, c) Effekte von CuCl<sub>2</sub>

Die Herstellung von Nanopartikeln gilt als eine Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts. Die Anwendungsgebiete sind sehr breit gefächert. Dabei finden Nanopartikel Verwendung in der Pharma- und Kosmetikindustrie, in der Optoelektronik oder der Biomedizin. Auch im Alltag finden sich zahlreiche Anwendungen von Nanomaterialien wieder, wie beispielsweise Zinkoxid als UV-Schutz in Farben, Titandioxid als Sonnenschutzmittel<sup>15</sup>, Nanosilber als antimikrobieller Zusatz in Textilien und Lebensmittelverpackungen<sup>16</sup>, Siliziumdioxid in Lebensmitteln als Rieselhilfe E551<sup>17</sup> sowie in Autoreifen als Füllstoff zur Reduktion des Rollwiderstandes<sup>18</sup>, Carbon Nanotubes in Tennisschlägern usw.<sup>19</sup>. Diese Materialien wurden in großen Mengen industriell hergestellt und gelangen somit auch in unser Ökosystem. Mit den besonderen physikalisch-chemischen Eigenschaften von Nanomaterialien können veränderte

<sup>15</sup> Zinkoxid DaNa 2012, [http://www.zentrum-der-gesundheit.de/pdf/sonnencreme-risiko-ia\\_08.pdf](http://www.zentrum-der-gesundheit.de/pdf/sonnencreme-risiko-ia_08.pdf)

<sup>16</sup> Nanosilber BfR 2010  
[http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2010/08/nanosilber\\_gehoert\\_nicht\\_in\\_lebensmittel\\_\\_t\\_extilien\\_und\\_kosmetika-50963.html](http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2010/08/nanosilber_gehoert_nicht_in_lebensmittel__t_extilien_und_kosmetika-50963.html)

<sup>17</sup> Siliziumdioxid, 2010, [http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/235.e551\\_siliziumdioxid.html](http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/235.e551_siliziumdioxid.html)

<sup>18</sup> Siliziumdioxid, DaNa 2010, [www.nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/siliziumdioxid/materialinfo-siliziumdioxid](http://www.nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/siliziumdioxid/materialinfo-siliziumdioxid)

<sup>19</sup> Carbon Nanotubes NNIN, 2006, <http://www.nnin.org/sites/default/files/files/NNIN1014.pdf>

toxikologische Eigenschaften und somit besondere Gesundheitsgefahren verbunden sein. So könnte es, bedingt durch deren nanoskalige Größe, möglich sein, dass sie besser in den Organismus aufgenommen werden können. Es konnten zahlreiche Referenzen in der Literatur zum Thema Silbernanopartikel (Abk: AgNP)-Toxizitätstests an Algen gefunden werden [191-193, 228-231]. Jedoch waren die Wirkung und das Verhalten von Silber- und Goldnanopartikeln (AuNP) in Kombination mit Atrazin auf *Chlorella vulgaris* zum Zeitpunkt dieser Dissertation nicht erforscht. Deshalb ist die Motivation besonders groß die Kombinationswirkung von Nanopartikeln auf den Umweltorganismus *C. vulgaris* zu untersuchen.

Das Herstellungsprotokoll<sup>20</sup> von AuNP und AgNP ist im Anhang 7.4.1 und 7.4.2 aufgelistet. Bei der Herstellung der Silbernanopartikel wurden 0,1% Tween 20 hinzugefügt. Dadurch wurde die Aggregationen von AgNP mit der Zeit hemmt. Die Größenverteilung der Metallnanopartikel wurde durch eine DCS-Messung ermittelt und ist im Anhang 7.4.3 dargestellt. Die Partikelgrößen mit dem höchsten Masseanteil waren bei 6,7 nm für Silbernanopartikel und 5,2 nm für Goldnanopartikel. Die Partikelgröße mit dem größten Massenanteil wurde für die Konzentrationsberechnung (bezogen auf Ag-Atome) der Stammlösungen von Nanopartikeln eingesetzt (siehe Anhang 7.4.4).

Die Interaktionen zwischen Bold's Basal Medium (BBM, siehe Tabelle 3.2) und Nanopartikeln ohne Anwesenheit von *C. vulgaris* wurden zuerst untersucht. Eine kolloidale Lösung mit AgNP (Partikeldurchmesser 6,7 nm) weist ein Absorptionsmaximum bei 410 nm auf und besitzt ein schmales Band, das durch die typische Plasmonenabsorption der Metallnanopartikel verursacht wurde. Unsere frühere Arbeit von A. Funfak zeigte, dass die AgNP sich in Nährmedium schnell aggregieren [27]. Deshalb wurden bei der AgNP-Synthese Tenside hinzugefügt (0,1% Tween 20). Die in Abbildung 4.25 dargestellte Dosis-Wirkungs-Kurve deutete darauf hin, dass bis zu einer Tween 20-Konzentration von 0,6% keine Hemmwirkung an der *C. vulgaris* auftrat (Abbildung 4.25).

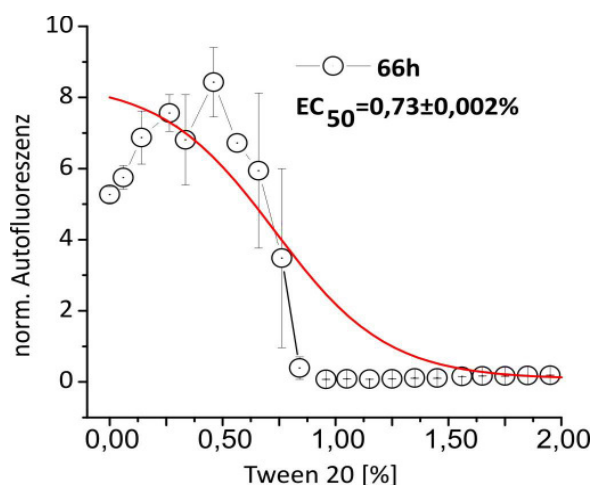


Abbildung 4.25: Dosis-Wirkungsbeziehung von Tween 20 nach 66 h Kultivierung von *C. vulgaris* im Segment.

<sup>20</sup> Nanopartikel Herstellungsvorlage von A. Knauer, FG Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau

Das UV/VIS Absorptionsspektrum bestätigte die Langzeitstabilität von AgNP mit Tween 20 im BBM-Medium (Abbildung 4.26a).

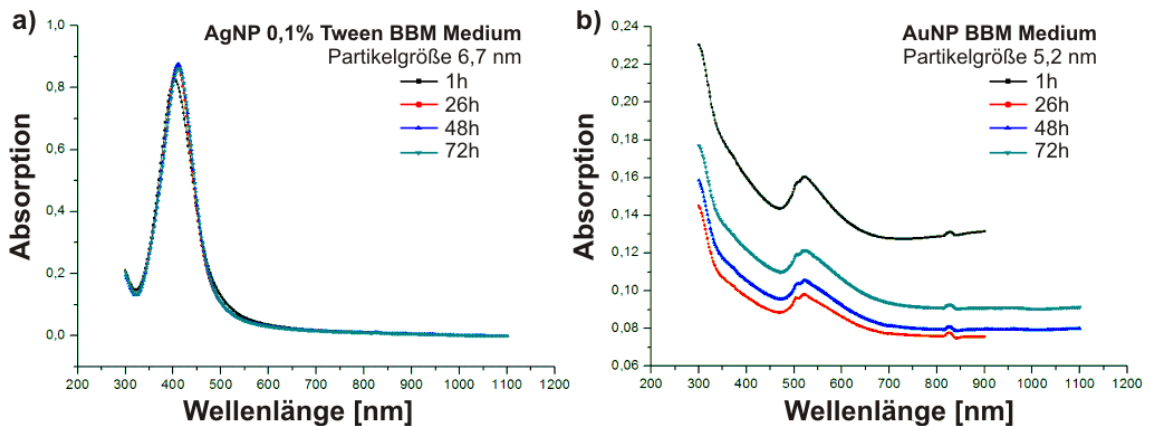


Abbildung 4.26: UV/VIS Absorptionsspektrum von a) AgNP in BBM Medium. b) AuNP in BBM Medium während der Inkubation für 0-72 h bei 25 °C.

Das Absorptionsmaximum lag bei der kolloidalen Lösung mit AuNP (Partikeldurchmesser 5,2 nm) bei 530 nm. Die Absorptionsbande der AuNP-Lösung zeigte einen Abfall der Absorption nach 24 h und einen minimalen Anstieg nach 48 und 72 h Inkubationszeit im BBM-Medium. Es konnte aber keine Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachtet werden (Abbildung 4.26b).

Die Untersuchungen zeigten, dass die Mischung von AgNP mit dem BBM-Medium keine Größenänderung der Partikel hervorruft, während bei einer Mischung von AuNP mit dem BBM-Medium der umgekehrte Fall eintrat.

Weiterhin wurden die maximalen Konzentrationen von Testsubstanzen (AgNP, AuNP und Atrazin) mit dem BBM-Medium gemischt und es wurde nach 24, 48 und 72 h der pH-Wert ermittelt. Es konnten aber keine starken pH-Wertänderungen im BBM-Medium für die Nanopartikel sowie Atrazin gefunden werden. Die Ergebnisse lagen zwischen pH 7 und pH 7,2.

Die Einzelwirkung der AuNP wurde an *C. vulgaris* getestet. Gold ist ein hohe Leitfähigkeit-besitzendes Metall mit sehr hoher Elektronegativität (2,54). Gold wird von gewöhnlichen Säuren nicht angegriffen und ist resistent gegen Rost, Korrosion, Zersetzung und wurde in der Literatur oft als biokompatibel angesehen. Es konnten nur wenige Studien über die Toxizitätstests von AuNP auf Algen gefunden werden [190]. Hartmann et al. berichtet einen  $EC_{50}$ -Wert von 38 mg/l von AuNP (Partikeldurchmesser: 25 nm) auf die Algen *Pseudokirchneriella subcapitata* nach 72 h Inkubation.

Die hochaufgelöste Dosis-Wirkungskurve von AuNP ist in Abbildung 4.27a dargestellt. Das Screening der kolloidalen Lösung von Goldnanopartikeln mit einem Partikeldurchmesser von 5,2 nm zeigte eine untoxische Wirkung auf die Autofluoreszenz von *C. vulgaris* für die im Versuch eingesetzten Partikelkonzentrationen bis zu 3 nM.

Einzelwirkungsscreenings an Nanopartikeln aus metallischem Silber bei einer mittleren Größe von 6,7 nm zeigten einen scharfen Übergang zwischen dem maximalen Wachstum (0-0,45 nM AgNP-Konzentration) und der totalen Inhibition der *C. vulgaris* bereits ab einer Konzentration von 0,5 nM Silberionen (Abbildung 4.27b). Die Photosynthese bei Algen wurde durch AgNP

gehemmt. Als Hauptursache für die AgNP-Toxizität wird das Freisetzen von Silberionen benannt, welche durch die Zellmembran diffundieren können und dort für die Bildung von ROS verantwortlich sind [229].

In der Literatur konnten sehr unterschiedliche  $EC_{50}$ -Werte für die Wirkung von AgNP auf *Chlorella vulgaris* gefunden werden. Oukarroum et al. konnte einen  $EC_{50}$ -Wert von 5 mg/l mit AgNP (50 nm) auf *C. vulgaris* nachweisen [229]. Matzke et al. zeigte, dass beim Algen-Test  $AgNO_3$  (Effekte >150 nM) toxischer wirken als AgNP (20 nm)(Effekte >300 nM) [232]. Navarro et al. hat die Auswirkungen von AgNP (25 nm) und  $AgNO_3$  auf die Alge *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht und es konnte eine höhere Toxizität der AgNP als die der Silberionen nachgewiesen werden [233]. Unsere früheren Untersuchungen an zwei verschiedenen Silbernanopartikel mit ähnlichem Durchmesser (ca. 20 nm) zeigten große Wirkungsunterschiede zwischen beiden Partikeln auf *E. coli*, der Partikel\_braun ( $EC_{50}=0,09$  pM) wirkt auf *E. coli* 255-fach mehr toxisch als der Partikel\_gelb ( $EC_{50}=23$  pM) [165].

Der Grund für die große Differenz lag sehr wahrscheinlich an der unterschiedlichen Partikelherstellung, den Partikelgrößen, -formen und Agglomerationsarten sowie den spezifischen Oberflächen der Partikel. Weiterhin zeigte eine aktuelle Studien von Sorensen und Baun, dass das Ergebnis des Algentoxizitätstests von AgNP nicht nur von der Versuchsdauer, sondern auch von dem Zeitpunkt der Zugabe des AgNP in das Testmedium abhängig ist. Daher sollte in der Zukunft ein Protokoll für die Ökotoxizitätstests entwickelt werden, das auch die Zeitabhängigkeit berücksichtigt [234].

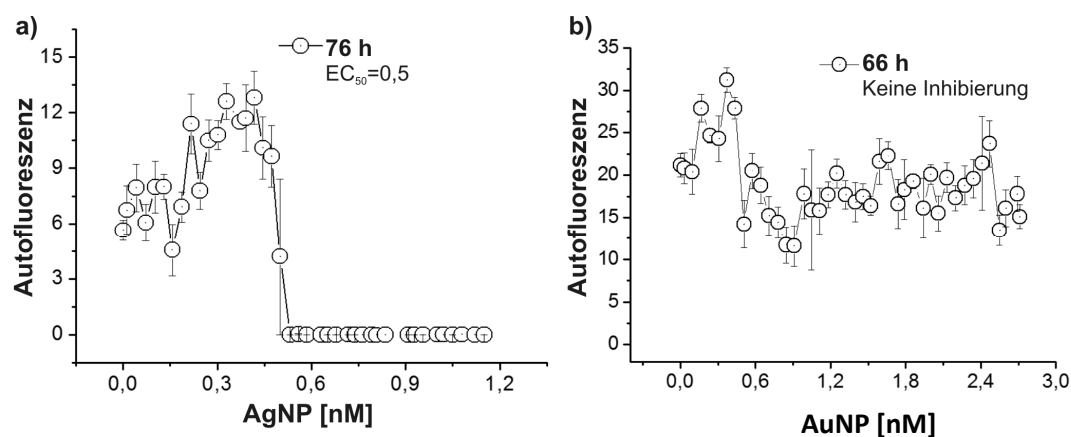


Abbildung 4.27: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Silbernanopartikel und Goldnanopartikel auf die Stoffwechselaktivität von *C. vulgaris* nach 76 h Kultivierung im Segment. a) Dosis-Wirkungskurve von AgNP, b) Dosis-Wirkungskurve von AuNP (Konzentration bezogen auf Ag-Atome).

In dem nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Untersuchungen der Kombinationswirkungen der binären Gemische von Au-Nanopartikeln mit Atrazin, Ag-Nanopartikeln mit Atrazin und AgNP mit AuNP diskutiert. Die Wirkung sowohl von AuNP als auch von AgNP ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Das Ziel dieser Untersuchung liegt darin, Aussagen über die Interaktion von AgNP und AuNP mit Atrazin zu treffen und die Wirkweisen untereinander zu vergleichen. Wirkmechanismen können bei diesen Versuchen jedoch nicht aufgeklärt werden.



#### 4.5.2 Binäre Gemische von Metallnanopartikeln und Atrazin

Für die zweidimensionale Darstellung wurden Isobologramme eingesetzt. Die Isobole wurde mit Hilfe der Origin-Software gewonnen und in Form einer Kontur-Farbabbildung dargestellt. Für alle Isobole entspricht der rote Farbbereich einem großen Wachstum bzw. hoher Fluoreszenzintensität der Organismen, während die dunkelblaue Färbung mit der totalen Inhibierung in Verbindung zu bringen ist.

In Abbildung 4.28 ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung des binären Gemisches von Atrazin und AuNP auf *C. vulgaris* nach 76 h Kultivierung in Mikrofluidsegmenten dargestellt. Die zweidimensionalen Screenings erlauben die simultane Bestimmung eines kompletten Datensets an  $EC_{50}$ -Werten für Atrazin innerhalb des gesamten untersuchten Konzentrationsbereiches der Goldnanopartikel. In den Isobologrammen konnte eine unabhängige Wirkung bzw. keine Wechselwirkung beider Substanzen auf *C. vulgaris* beobachtet werden. Die in der Einzeluntersuchung nicht toxische wirkende AuNP zeigte bei dem zweidimensionalen Screenings mit Atrazin den gleichen Effekt. Mit zunehmender AuNP-Konzentration bis 1,25 nM wurde die Wirkung von Atrazin nicht beeinflusst, wobei die Hemmung der *C. vulgaris*-Kultur nur von der Atrazin-Konzentration abhängig war.

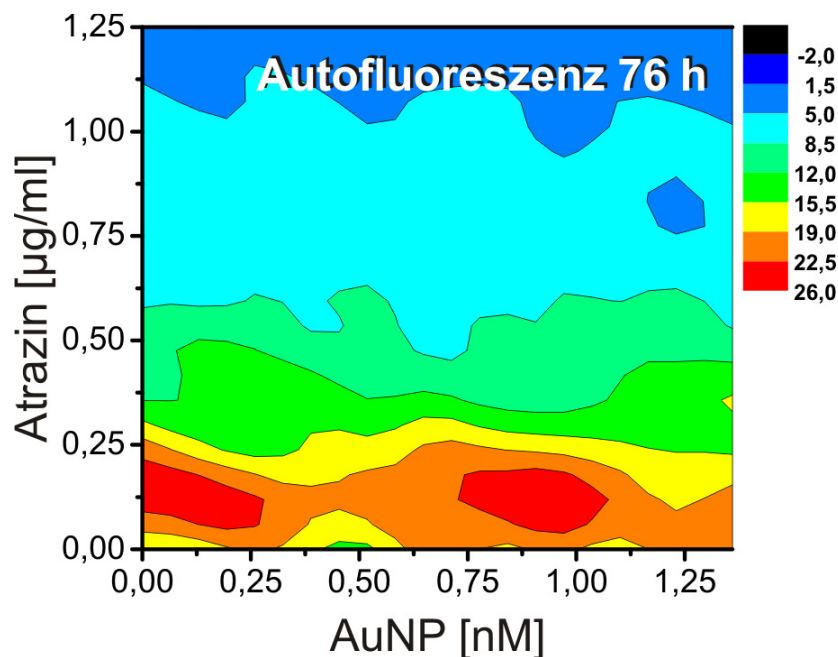


Abbildung 4.28: Dosis-Wirkungs-Beziehungen des binären Gemisches AuNP und Atrazin für den Parameter Autofluoreszenz einer in Mikrofluidsegmenten kultivierten *C. vulgaris*-Kultur.

Die Ergebnisse des zweidimensionalen Screenings für das binäre Gemisch AuNP und AgNP zeigten deutliche Wirkungsunterschiede zu den untersuchten AuNP in Kombination mit Atrazin. Der Einsatz von Goldnanopartikeln führte zu einer starken Verringerung der kritischen AgNP-Konzentrationen. Es konnte ein starker synergistischer Effekt für die Kombination von AgNP und AuNP gefunden werden (Abbildung 4.29). Das im Einzelwirkungsscreenings nicht toxisch wirkende AuNP ist in Kombination mit AgNP sehr toxisch. Die Isobologramme zeigten eine starke Reduzierung der letalen AuNP-Konzentration bei niedriger AgNP-Konzentration.

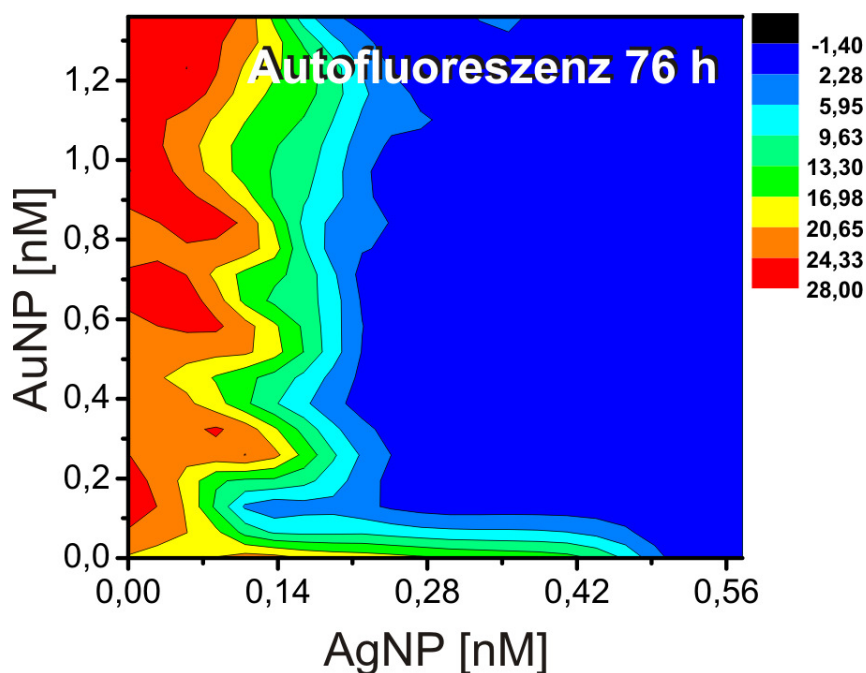


Abbildung 4.29: 2D-Plot des binären Gemisches AuNP und AgNP an der Grünalge *C. vulgaris* kultiviert in Mikrofluidsegmenten.

Die ungleichmäßige Wellenform in der Abbildung 4.29 ist auf das nicht immer präzise funktionierende Pumpensystem unter hohem Druck zurückzuführen, spielt aber bei der Beurteilung der Kombinationswirkung keine große Rolle. Es deutete darauf hin, dass bei der Segmentgenerierung und –speicherung eine weitere Entwicklung nötig ist, um das Auftreten von größerer Drücke zu vermeiden. Das Problem können z.B. mit einem automatischen Schaltventil gelöst werden, um bei großer Segmentanzahl die Segmente in mehrere Spulen zu verteilen.

Im Abbildung 4.30 ist das Ergebnis der Wirkung des binären Gemisches Atrazin und AgNP auf *Chlorella vulgaris* im Mikrosegment dargestellt. Eine Verringerung der Atrazin-Konzentration von 1,2 mg/l auf 0,4 mg/l konnte bei einer Atrazin-Konzentration von 0,1 nM gefunden werden, was weniger als 20% von der letalen Dosis an Silbernanopartikel entspricht. Höhere AgNP-Konzentrationen (0,15 nM) führten zu einer weiteren Verringerung des Grenzwertes von Atrazin auf 0,1 mg/l, was ca. 0,8% der letalen Dosis von reinem Atrazin entspricht. Die Untersuchung zeigte eine starke Beeinflussung der toxischen Effekte von AgNP durch Atrazin und umgekehrt eine Verstärkung der Effekte von Atrazin durch die kolloidale Silbernanopartikellösung. Die Isobolen deutete auf einen synergistischen Effekt bei den binären Gemischen hin.

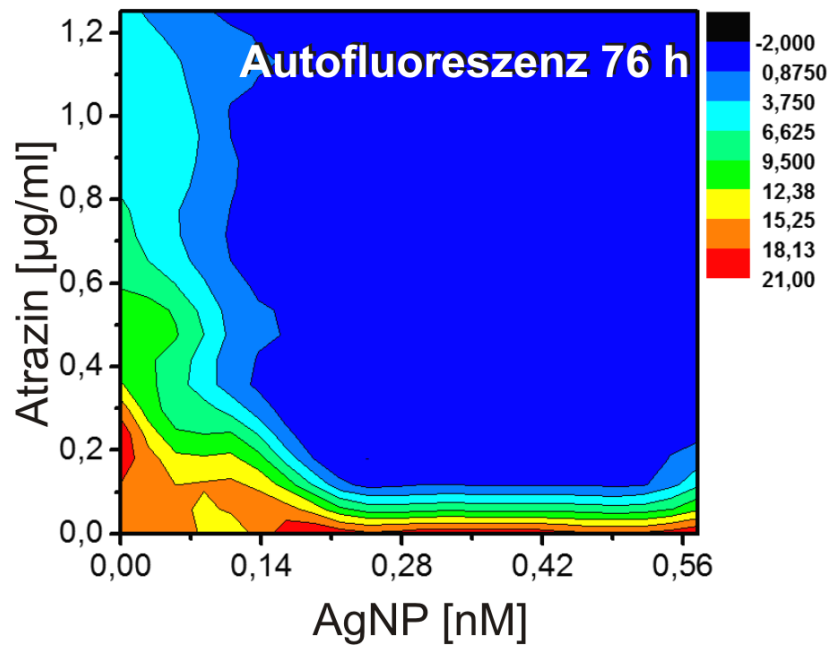


Abbildung 4.30: 2D-Plot des binären Gemisches AgNP und Atrazin an der Grünalge *C. vulgaris* kultiviert in Mikrofluidsegmenten.

#### **4.6 Kombinations screenings binärer und ternärer Gemische im Mikrofluidsegment am Modellorganismus *E. coli***

Antibiotika sind Naturstoffe, die z.B. von Bakterien zur „Selbstverteidigung“ gebildet werden. Sie haben spezifische Angriffspunkte an den Zellstrukturen der Zielbakterien, wobei die Zerstörung der Proteinbiosynthese von Zellen im Vordergrund steht. Antibiotika sind das wichtigste Instrument zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier.

Die Wirkmechanismen beim Einsatz von Antibiotika sind gut untersucht, aber es gibt einen Mangel an Informationen über die Interferenz zwischen verschiedenen antibakteriellen Substanzen. Auch Medikamente wie Captopril und Lovastatin, der gegen Bluthochdruck wirkende ACE-Hemmer und Cholesterin-senkende Arzneistoffe, finden vermehrt in der älteren Generation ihren Einsatz und werden unter Umständen auch gleichzeitig mit Antibiotika, Coffein und/oder Alkohol eingenommen.

Coffein gehört zur Gruppe der Methylxanthine, die in der Natur weit verbreitet vorkommen. Es ist ein wesentlicher Inhaltsstoff in Kaffee-, Tee-, Cola- und Energiegetränken. Somit zählt das Coffein zu der am häufigsten konsumierten pharmakologisch aktiven Substanz weltweit [235, 236]. Es konnten verschiedene pharmakologische Effekte für Coffein in zahlreichen Studien beobachtet werden, wie beispielsweise die antagonistische Wirkung auf Adenosinrezeptoren [237], die Stimulation der Muskelkontraktion [238], eine Hemmung der Phosphodiesterase [239] und der Einfluss auf den Glukose-Metabolismus [240]. Auch eine Reihe von Medikamenten–Coffein Wechselwirkungen wurden dokumentiert [241-244].

Die Wirkungen von Nahrungsmittelbestandteilen auf die Aktivität von Wirkstoffen sind insbesondere interessant im Falle von Antibiotika. Es ist von Interesse, wie die Nahrungsmittelkomponenten die Wirkung von Antibiotika beeinflussen, die für die Behandlung von Infektionskrankheiten wichtig sind.

Für den Modellorganismus *E. coli* sind zum Zeitpunkt des Erscheinens dieser Arbeit keine Studien bekannt, in welchen die Kombinationswirkung von Antibiotika, Alkohol, dem ACE-Hemmer Captopril, dem CSE-Hemmer Lovastatin und Coffein untersucht wurden. Umso dringlicher schien es für mich, diese Untersuchungen in meiner Arbeiten anzugehen.

Mit dieser Motivation wurden der Einfluss von Coffein, Alkohol, Captopril bzw. Lovastatin und die Wirkung bestimmter Antibiotika auf das Darmbakterium *E. coli* untersucht. Als Vertreter der Antibiotika wurden die Breitbandantibiotika Tetracyclin, Ampicillin und Chloramphenicol ausgewählt.

#### 4.6.1 Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Beziehung auf einzelne Substanzen

In der Tabelle 4.2 sind übersichtsweise die durchgeführten Einzelwirkungsscreenings gelistet und dazu die durch Photometer und Fluorimeter ermittelten effektiven Konzentrationen, bei der 50% der Organismen innerhalb eines bestimmten Zeitraums einen Effekt zeigen. Während die fotometrischen Messungen eine Aussage zur Zelldichte liefern, welche sowohl lebende als auch tote Bakterien umfasst, zeigt die Autofluoreszenz der Mikroorganismen deren Stoffwechselaktivität an und ist folglich nur von der Anzahl lebender Zellen abhängig. Da die Autofluoreszenz mit dem Wachstum zunimmt, weist die endogene zelluläre Fluoreszenz eine enge Verbindung zur Vitalität der Bakterien auf. Tabelle 4.2 zeigte, dass die  $EC_{50}$ -Werte der Autofluoreszenz mit den Werten der optischen Dichte übereinstimmen. Die ermittelten Werte stehen auch in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur gefundenen Größenordnungen.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der ermittelten  $EC_{50}$ -Werte für einzelne Substanzen am *E. coli* kultiviert im Segment

Substanz	$EC_{50}$ aus Mikrofluidsegmentmethode		$EC_{50}$ aus Standardmethode /Ref.
	Autofluoreszenz	Optische Dichte	
Chloramphenicol	3,10±0,07 µg/ml		1,25 mg/l [245]
	2,05±0,03 µg/ml	2,04±0,04 mg/l	5 mg/l [246]
	3,31±0,08 µg/ml	3,16±0,03 mg/l	0,7 mg/l [164]
Ampicillin	0,70±0,02 µg/ml	0,66±0,01 mg/l	0,74 mg/l [245]
	1,33±0,01 µg/ml	1,35±0,03 mg/l	3 mg/l [164]
	0,90±0,03 µg/ml	0,94±0,06 mg/l	
Tetracyclin	1,32±0,15 µg/ml	1,42±0,05 mg/l	1-100 mg/l [247]
	1,16±0,01 µg/ml	1,18±0,08 mg/l	(28 <i>E. coli</i> -Stämme)
	0,92±0,02 µg/ml	0,97±0,03 mg/l	ca. 0,5 mg/l [248]
	0,37±0,01 µg/ml		ca. 0,22 mg/l [164]
Coffein	11,79±0,19 mM	10,40±0,38 mM	10-20 mM [249]
	16,01±3,10 mM	14,63±2,84 mM	7 mM [27]
Ethanol	2,23±0,07%	2,76±0,06%	ca. 2% [250]
	4,29±0,04%	3,05±0,03%	
2,4-DNP	607±1,7 µM	601±2,1 µM	ca. 500 µM [251]
Lovastatin	Bis 0,5 g/l keine Hemmung	Bis 500 mg/l keine Hemmung	-
Captopril	Bis 1 g/l keine Hemmung	Bis 1.000 mg/l keine Hemmung	-

Weiterhin weisen alle gefundenen  $EC_{50}$ -Werte innerhalb einer Versuchsreihe viel kleinere Standardabweichungen auf, als es bei herkömmlichen Standardmethoden der Fall ist, was ein großer Vorteil der mikrofluidischen Segmentierung darstellt. Die Wiederholungsversuche ergaben gute Reproduzierbarkeiten mit gewissen Abweichungen, welche mit hoher

Wahrscheinlichkeit auf die natürlichen Schwankungen biologischer Systeme zurückgeführt werden können.

Durch das Screening eines breiten Konzentrationsfelds konnten detaillierte Informationen über die untersuchten toxikologischen Endpunkte gewonnen werden. Als Beispiel dazu sind zwei Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 4.31 visualisiert.

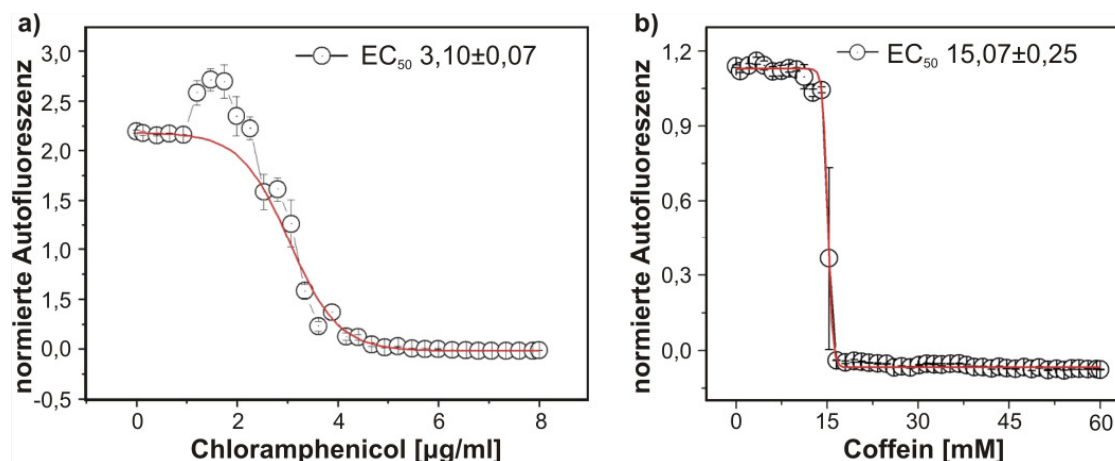


Abbildung 4.31: Dosis-Wirkungskurven für die Autofluoreszenz von *E. coli* kultiviert im Segment in Abhängigkeit von der a) Chloramphenicol- und b) Coffein-Konzentration.

Während Coffein einen scharfen Übergang zwischen starkem Wachstum und totaler Inhibition präsentierte, zeigte das Chloramphenicol einen weichen Übergang zwischen Wachstum und Hemmung. Bei Chloramphenicol in subletalen Konzentrationen (0,5-1,0 µg/ml) konnte eine starke Stimulation des *E. coli*-Wachstums oder Anstieg der Fluorophor-Produktion beobachtet werden. Dieses bereits bekannte Phänomen ist auf die höhere Transkriptionsrate beteiligter Gene für die Enzymsynthese und die Reaktion auf die Fehlfunktion der transkriptionellen Co-Repressoren durch die moderate Hemmung der Proteinsynthese zurückzuführen [252].

#### 4.6.2 Kombinationscreenings binärer Gemische

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss von Lovastatin auf Chloramphenicol (CMP) und Coffein untersucht (Abbildung 4.32). Lovastatin gehört zur Wirkstoffgruppe der Statine und dient der Senkung des Blutfettspiegels. Wie sich durch die Messungen herausstellte ist Lovastatin nicht toxisch für Bakterien, und es in hohen Konzentrationen bis 0,5 g/l das Wachstum der *E. coli* nicht inhibiert (siehe Tabelle 4.2). Der  $EC_{50}$ -Wert für CMP und Coffein im zweidimensionalen Screening lässt sich im hellgrünen Bereich ablesen und beträgt demnach 2,5  $\mu\text{g/ml}$  für CMP und 15 mM für Coffein, was beinahe identische  $EC_{50}$  Werte im Vergleich zu den Ergebnissen von den Einzelwirkungsscreenings mit CMP (2-3  $\mu\text{g/ml}$ ) und Coffein (15-18 mM) ergab [198]. Für die Kombination von Lovastatin bis zu einer Konzentration von 125  $\mu\text{g/ml}$  und CMP konnten nahezu unabhängige Wirkungen beider Substanzen bei der Trübungsmessung gefunden werden (Abbildung 4.32a). Auch die Untersuchung mit Coffein zeigte ebenso eine unabhängige Wirkung beider Substanzen (Abbildung 4.32b). Die hier gewonnenen Ergebnisse ließen sich so zusammenfassen, dass Lovastatin keinen Einfluss auf Chloramphenicol und Coffein für das Bakterium *E. coli* hatte.

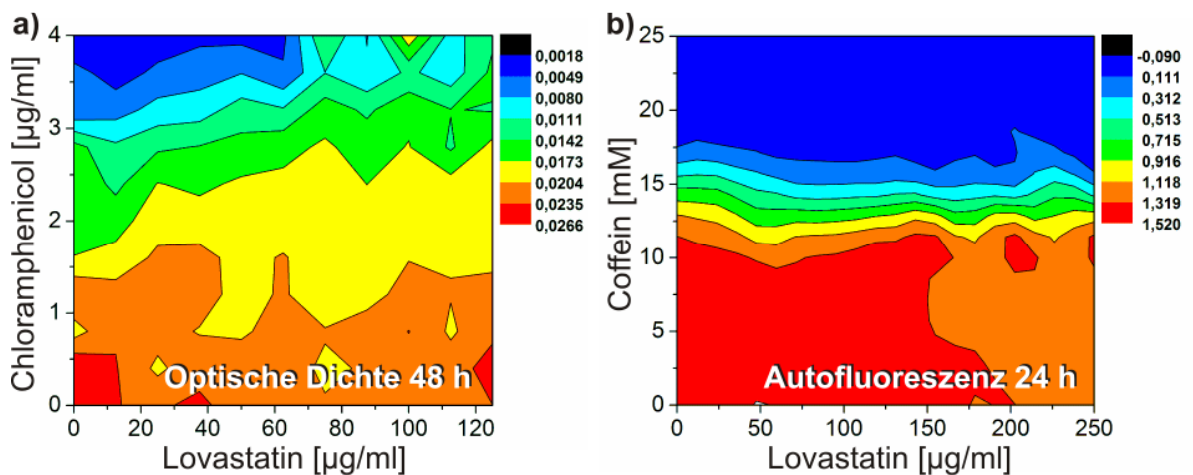


Abbildung 4.32: 2D-Plots binärer Gemische für den Modellorganismus *E. coli* kultiviert in Mikrofluidsegmenten. a) Chloramphenicol+Lovastatin: Isobolen für den Parameter Wachstum (optische Dichte), b) Coffein+Lovastatin: Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz.

In Abbildung 4.33 sind die Isobologramme der Endpunkte Autofluoreszenz der binären Gemische Coffein mit Tetracyclin und Coffein mit CMP am *E. coli* dargestellt. Die zweidimensionalen Screenings erlaubten die simultane Bestimmung eines kompletten Datensets an  $EC_{50}$ -Werten für Coffein innerhalb des gesamten untersuchten Konzentrationsbereiches beider Antibiotika. Die Ergebnisse spiegelten eine subadditive Wirkung von Coffein und Tetracyclin wider. Außerdem wurde eine stimulierende Wirkung von Coffein bei einer Konzentration von 5 bis 12 mM bei sub-letaler Tetracyclin-Konzentration gefunden (Abbildung 4.33a). Bei geringen Tetracyclin-Konzentrationen von bis zu 0,6  $\mu\text{g/ml}$  wirkten die beiden Substanzen eher unabhängig.

Für den Fall Coffein und Chloramphenicol zeigte sich eine unabhängige Wirkung beider Substanzen. Die stimulierende Wirkung von Coffein konnte hier nicht bestätigt werden. Im

Gegensatz dazu wurde eine Stimulation bei einer Chloramphenicol-Konzentration von 1-2  $\mu\text{g/ml}$  gefunden (Abbildung 4.33b).

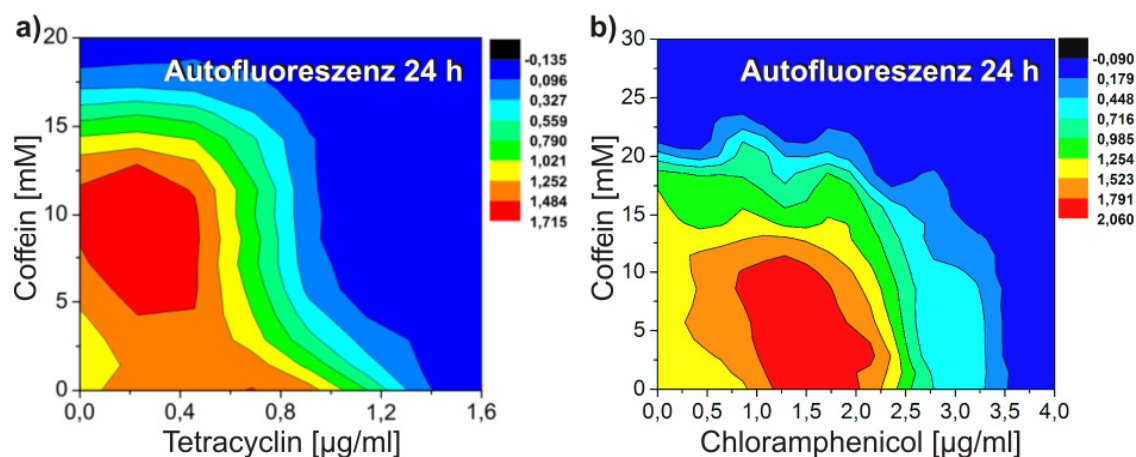


Abbildung 4.33: Dosis-Wirkungs-Beziehungen binärer Gemische verschiedener Antibiotika und Coffein für die Konzentrationsabhängigkeit der Parameter Autofluoreszenz einer in Mikrofluidsegmenten 24 h kultivierten *E. coli*-Kultur. a) Coffein+Tetracyclin, b) Coffein+Chloramphenicol.

Für die Untersuchung möglicher Effekte von Ethanol auf die Wirkung von Ampicillin wurde letzteres mit einer Konzentration von 0-2,5  $\mu\text{g/ml}$  und Ethanol mit 0-5% eingesetzt (Abbildung 4.34). Dabei konnte ein antagonistischer Effekt beobachtet werden. Somit wurde durch die Zufuhr von EtOH dem Effekt von Ampicillin entgegengewirkt. Wie in Abbildung 4.34 dargestellt, konnte eine Verschiebung des  $\text{EC}_{50}$ -Wertes beobachtet werden. Der  $\text{EC}_{50}$  bei Ampicillin ohne EtOH-Einfluss betrug 1,5  $\mu\text{g/ml}$  und beim  $\text{EC}_{50}$  von Ampicillin mit 3% EtOH 2,0  $\mu\text{g/ml}$ .

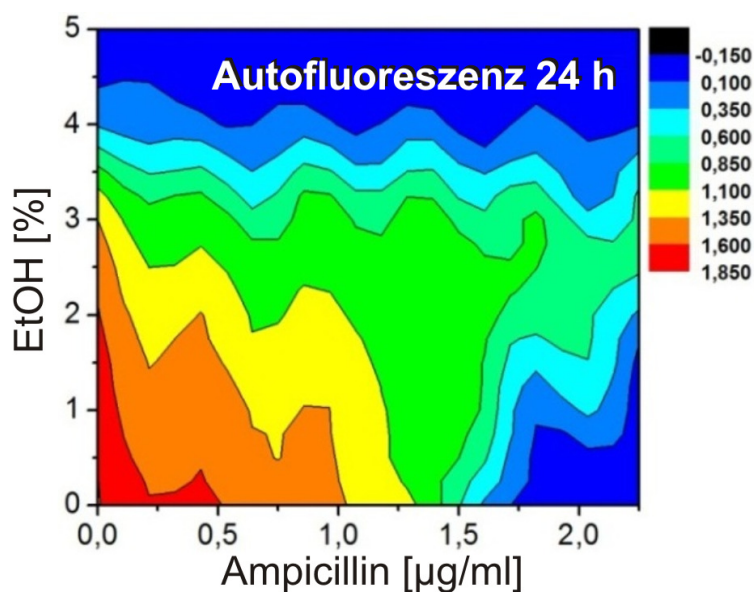


Abbildung 4.34: Dosis-Wirkungs-Beziehungen des binären Gemisches Ampicillin und Ethanol



Weiterhin wurde die Wechselwirkung zwischen dem Antibiotika Tetracyclin und Chloramphenicol untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.35 dargestellt. Chloramphenicol und Tetracyclin sind bakteriostatische Antibiotika. Chloramphenicol ist ein Translationshemmer, wirkt blockierend auf die Knüpfung der Peptidbindung und wirkt somit hemmend auf die Peptidyltransferaseaktivität [253]. Tetracyclin verhindert die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA an die rRNA in der 30-S-Untereinheit des Bakterien-Ribosoms. Dadurch wird die Translation und letztlich die Proteinbiosynthese gestoppt [254]. Die Ergebnisse spiegeln ein annähernd lineares (additives) Antwortverhalten des binären Gemisches CMP und Tetracyclin wider (Abbildung 4.35). Die Arbeit von Churski et al. bestätigte das additive Verhalten von CMP und Tetracyclin am *E. coli* [164].

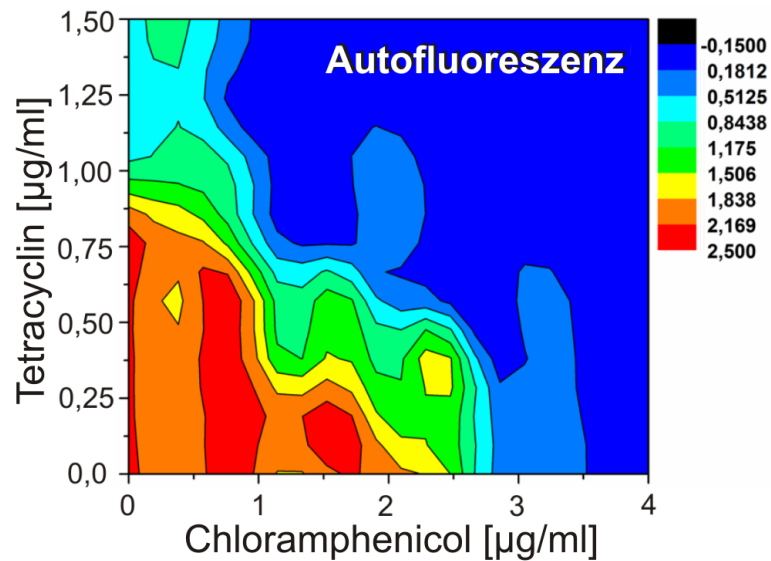


Abbildung 4.35: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Chloramphenicol und Tetracyclin

### 4.6.3 Kombinationscreenings ternärer Gemische

In diesem Kapitel werden die Einsetzbarkeit des entwickelten mikrofluidischen Systems für Untersuchung der Effekten von ternären Gemischen anhand von drei Beispielen von 1) Coffein, Chloramphenicol und 2,4-DNP, 2) Ampicillin, Chloramphenicol und Silbernanopartikeln, 3) Coffein, Ampicillin und Captopril demonstriert.

Für das dreidimensionale Screening wurden die Konzentrationen aller drei Effektoren in sechs Schritten (0, 20, 40, 60, 80 und 100% der maximalen Konzentrationen) variiert. Die Anwendbarkeit dieser Strategie wurde mit komplementärer Variation der Volumenströme von drei Farbstofflösungen, wie bereits im Kapitel 4.1.3 beschrieben, getestet. Die Abweichungen des realen Wertes vom Erwartungswert in den dreidimensionalen Räumen der Konzentrationen waren durchgängig kleiner als  $\pm 5\%$ . In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse von drei verschiedenen ternären Gemischen diskutiert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über angepasste LabView-Programme. Die Darstellung der dreidimensionalen Diagramme wurde durch die Erzeugung mehrerer XYZ Matrizen (Origin) ermöglicht und in mehreren Isobologrammen dargestellt.

#### ***Untersuchung der ternären Gemische von Coffein, Chloramphenicol und 2,4-DNP***

Die maximalen Konzentrationen von Chloramphenicol, Coffein und 2,4-DNP wurden auf 4  $\mu\text{g/ml}$ , 20 mM und 1 mM eingestellt. In den Experimenten variiert die Konzentration von DNP schnell (18 Zyklen), die Konzentration von Chloramphenicol variiert langsamer (3 Zyklen) und die Konzentrationen des Coffeins wurde langsam in kontinuierlicher Weise gesteigert (Abbildung 4.36a).

Das Bakterienwachstum und die endogene Autofluoreszenz in Abhängigkeit von verschiedenen Mischungen von Effektoren sind in Abbildung 4.36b-c dargestellt. Jeder Datenpunkt zeigte die Antwort des Zellwachstums (Abbildung 4.36b) und die Autofluoreszenz (Abbildung 4.36c) auf die jeweilige Konzentrationskombination für eine in einem 500 nl-Segment kultivierte *E. coli*-Population. Gemäß dem Ablaufprogramm ergaben sich starke Wachstums- sowie Autofluoreszenz-hemmungen für das Gemisch mit der höchsten Konzentration von allen drei Effektoren. Bei der Kombination zwischen der minimalen und maximalen Konzentration aller Effektoren zeigte sich ein nicht-monotones Verhalten.

Im Allgemeinen wurde gezeigt, dass die beiden optischen Kanäle ähnliche Informationen liefern. Wie erwartet, wurde das Bakterienwachstum bei hohen Konzentrationen von Chloramphenicol und DNP unterdrückt und ist bei hohen Konzentrationen von Coffein reduziert. Die Erhöhung der Coffein-Konzentration zeigte eine deutlichere Hemmung in der Trübungsmessung als in der Fluoreszenzmessung.

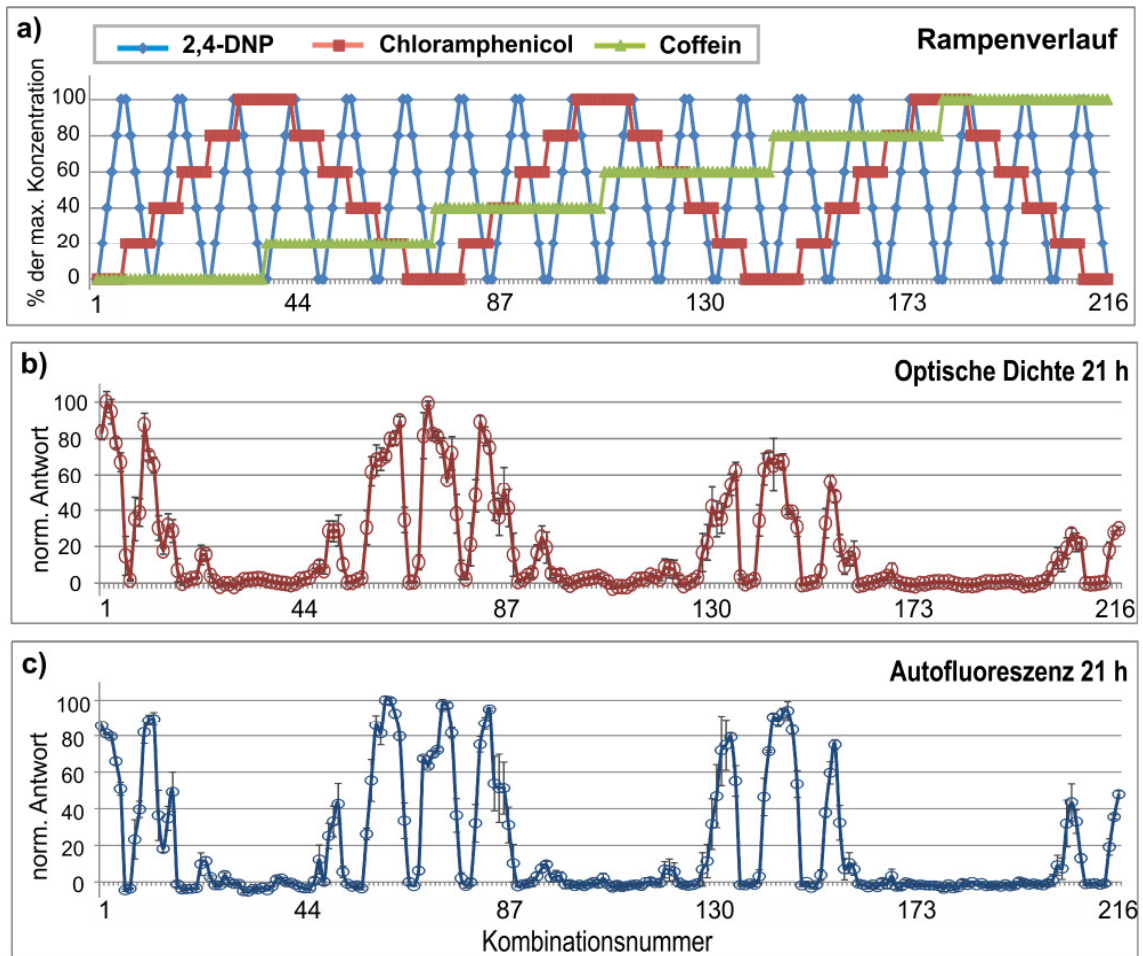


Abbildung 4.36: Ternäres Gemisch mit DNP, Chloramphenicol und Coffein von *E. coli* kultiviert im Mikrosegment a) LabView Programm zur Erzeugung von dreidimensionalen Parameterfeldern durch stufenweise Änderung der Zusammensetzungen (6 Stufen) von Chloramphenicol, Coffein und DNP in einer Segmentsequenz mit ca. 1.100 Segmenten. b) Dosis-Wirkungs-Beziehung des ternären Gemisches zum Wachstum. c) Reaktion auf Autofluoreszenzintensität mittels Mikrodurchflussfluorimeter.

In Abbildung 4.37 sind die Isobolen-Diagramme für die Kombinationswirkung von Coffein und Chloramphenicol für eine niedrige und eine hohe Konzentration von DNP gezeigt. Die Autofluoreszenz und die optische Dichte lieferten nahezu die gleichen Ergebnisse in beiden Fällen.

Die Isobolen-Diagramme repräsentierten den typischen Fall eines komplexen nicht-monotonen Verhaltens: Die kritischen Dosen für eine Substanz wurden wesentlich durch die zweite Substanz verschoben. Bei 20% DNP wurde eine starke Stimulation der bakteriellen Aktivität bei Chloramphenicol zwischen ca. 30% und 50% der maximalen Konzentrationen (Abbildung 4.37a und b) gefunden. Bei 60% DNP, war ein geringes Zellwachstum bei niedrigeren Konzentrationen von Coffein und Chloramphenicol nachweisbar. Das Wachstum wird bei hohen Konzentrationen von einem Effektor oder von Kombinationen von Effektoren vollständig unterdrückt. Aber im Fall von moderaten Konzentrationen beider zusätzlicher Effektoren wurde ein intensives Bakterienwachstum festgestellt (Abbildung 4.37c und d).

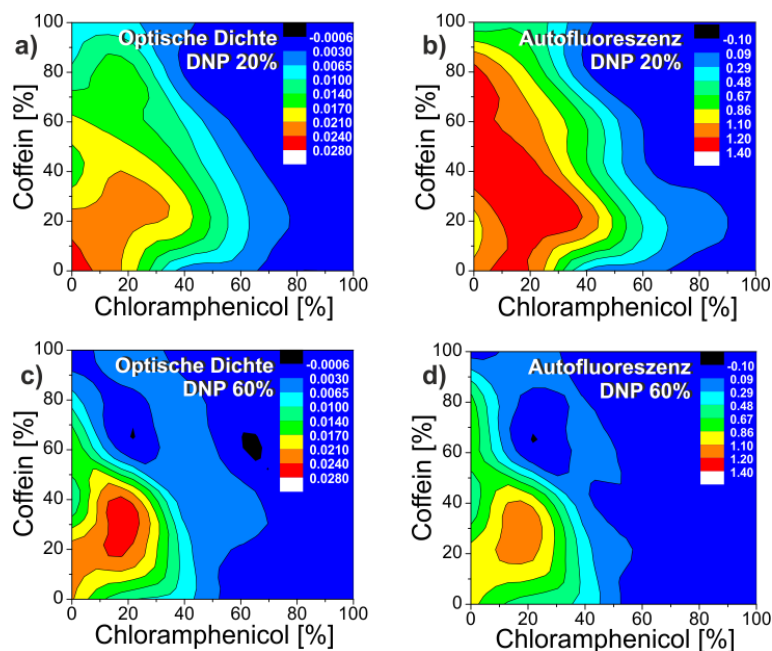


Abbildung 4.37: Vergleich der Endpunktbestimmung zwischen optischer Dichte und Fluoreszenzmessung. Isobologramme von Coffein und Chloramphenicol für a) 20% DNP aus der Trübungsmessung nach 21 h *E. coli*-Kultivierung im Segment. b) 20% DNP durch Fluoreszenzintensitätsmessung c) 60% DNP durch Trübungsmessung und d) 60% DNP durch Autofluoreszenzmessung.

Eine detaillierte Darstellung der zellulären Antwort auf die Variation der Konzentrationen von unterschiedlichen Mischungen in einem vollständigen dreidimensionalen Parameterfeld konnte durch sechs Isobologramme visualisiert werden (Abbildung 4.38).

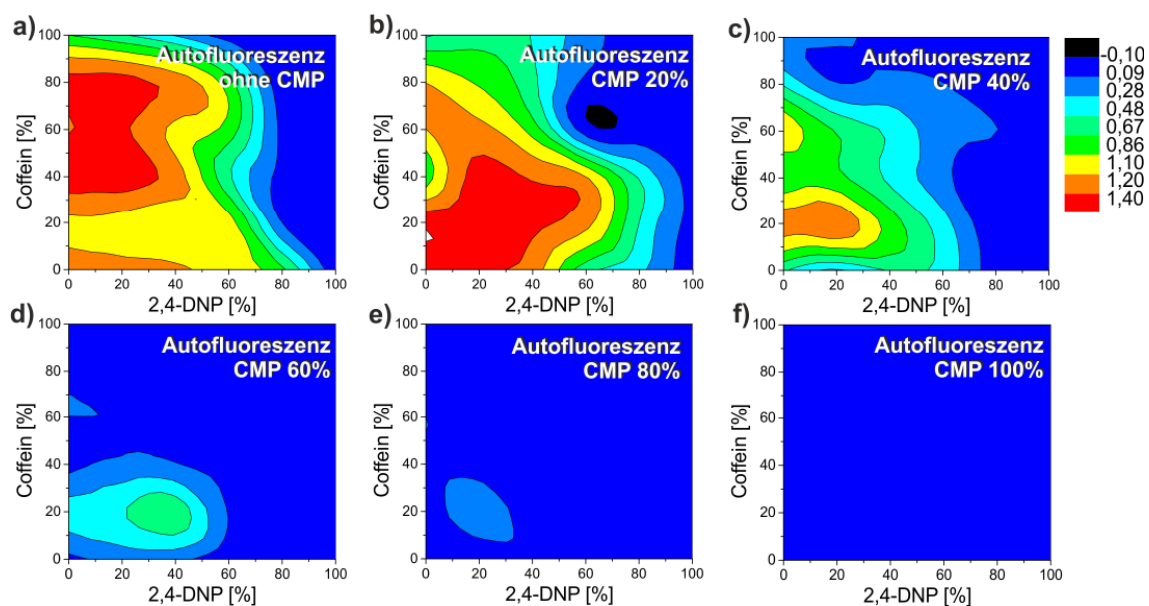


Abbildung 4.38: Dosis-Wirkungs-Beziehungen der ternären Mischung von Coffein, Chloramphenicol und 2,4-DNP mit der Autofluoreszenzintensität nach 24 h *E. coli*-Kultivierung im Segment durch sechs Isobolen-Diagramme dargestellt. a) ohne Chloramphenicol, b) 20%, c) 40%, d) 60% e) 80% und f) 100% Chloramphenicol.

Diese Diagramme zeigten sowohl die erwartete Unterdrückung von Bakterienwachstum bei hohen Konzentrationen von DNP und Chloramphenicol als auch detaillierte Informationen über die Verschiebung der letalen Dosis und eine Konzentrations-abhängige Stimulationswirkung. Die nicht monotone Antwort von Bakterien auf Coffein bei erhöhten Konzentrationen von DNP steht für Veränderungen der chemischen Wechselwirkungen oder physiologische Mechanismen in den Zellen. Die Bildung der Aktivitätsgipfel, wie zum Beispiel bei 40% (Abbildung 4.38c) und 60% (Abbildung 4.38d) Chloramphenicol in den Coffein- und DNP-Isobogrammen, wies auf die Empfindlichkeit der kritischen Dosen gegenüber kombinatorischen Effekten hin.

### ***Untersuchung von dreidimensionalen Konzentrationsfeldern für die Wirkstoffe Ampicillin, Chloramphenicol und Metallnanopartikeln am Modellorganismus E. coli***

In letzten Jahren wurden verschiedene Studien zur Kombinationswirkung eines binären Gemisches von Silbernanopartikeln und verschiedenen Antibiotika publiziert [255-258]. Fayaz et al. zeigten, dass AgNP eine wichtige Nanomedizin gegen multiresistente Bakterien ist. Die antibakteriellen Aktivitäten von Kanamycin, Erythromycin, Chloramphenicol und Ampicillin wurden in Kombination von AgNP sowohl auf gram-negative als auch auf gram-positive Bakterienstämme erhöht. Einige Studien über Wechselwirkung zwischen Antibiotika auf Algen konnten auch gefunden werden [259, 260]. Aber die Effekte zwischen Antibiotika und AgNP (ternäres Gemisch) konnten nach besten Wissen nicht gefunden werden. Daraus erfolgte die Zielsetzung dieses Experimentes darauf, Aussagen über die Interaktion von Silbernanopartikeln mit Chloramphenicol und Ampicillin zu treffen.

Für die Untersuchung der Kombinationswirkung von Ampicillin, Chloramphenicol und Silbernanopartikeln (Durchmesser: 43 nm) wurde ein ähnlicher wie in Abbildung 4.36a dargestellter Pumpenverlauf für das Screening von drei Wirkstoffen mit 20% Konzentrationsabstufungen, aber mit einem 4 s Gap zwischen jeder Komposition, verwendet. Die Flussrate des Trägermediums PP9 wurde bei 40 µl/min und die gesamte Flussrate aller drei Effektoren und Nähmedium wurde auf 5 µl/min gehalten. Die Flussrate der Zellsuspension (Inokulum: 10<sup>6</sup> Zellen/ml) betrug 5 µl/min. Insgesamt betrug die Flussrate 50 µl/min. Es wurde eine Segmentreihe von ca. 1.200 Segmenten erzeugt. Dafür wurden 216 Komposition à 5-6 Segmenten erzeugt. Die Größe der erzeugten Segmente lag bei ca. 600 nl und somit ergab sich eine durchschnittliche Anfangszelldichte von ca. 600 Zellen pro Segment.

Die Adressierung von 216 (6<sup>3</sup>=216) Konzentrationspunkten in einem dreidimensionalen Konzentrationsraum wurde analog den vorausgegangenen Experimenten mit den Farbstoffen durchgeführt (Kapitel 4.1.3). Der Effekt auf Bakterien in Segmenten nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde in Abbildung 4.39 als dreidimensionales Diagramm und in Abbildung 4.40 in sechs Isobolen dargestellt. Abbildung 4.39 beinhaltete sechs Kurven, die die Autofluoreszenz der *E. coli* zu jeweils unterschiedlichen Chloramphenicol Konzentrationen darstellte.

Die maximale Konzentration von Chloramphenicol betrug 2,5 µg/ml. Die Konzentrationsvariationen von Ampicillin und Silbernanopartikeln wurden in den letzten beiden Kurven visualisiert (Abbildung 4.39). Die maximale Konzentration lag bei Ampicillin bei 5 µg/ml und bei Silbernanopartikeln bei 0,5 µg/ml. Die Abbildung 4.39 verdeutlichte das starke Bakterienwachstum mit 20% und 40% der maximalen Konzentration von Chloramphenicol bei niedriger Ampicillin-Konzentration. Eine Steigerung der Ampicillin-Konzentration ließ den Wachstums-stimulierenden Effekt von Chloramphenicol verschwinden. Der Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen Wirkmechanismen der zwei Antibiotika liegen. Die Erhöhung der Silbernanopartikel-Konzentration bei 20% Chloramphenicol reduzierte ebenfalls den stimulierenden Effekt von Chloramphenicol und potenziert den Effekt von Ampicillin. Diese Potenzierung konnte auf die bakterizide Wirkung der Ag-Nanopartikel auf *E. coli* zurückzuführen. Dieselbe Effekte (Potenzierung der bakteriziden Wirkung durch AgNP) wurden auch von Fayaz et al. (2010), Allahverdiyev et al. (2011) und Kora et al. (2013) bestätigt [256-258].

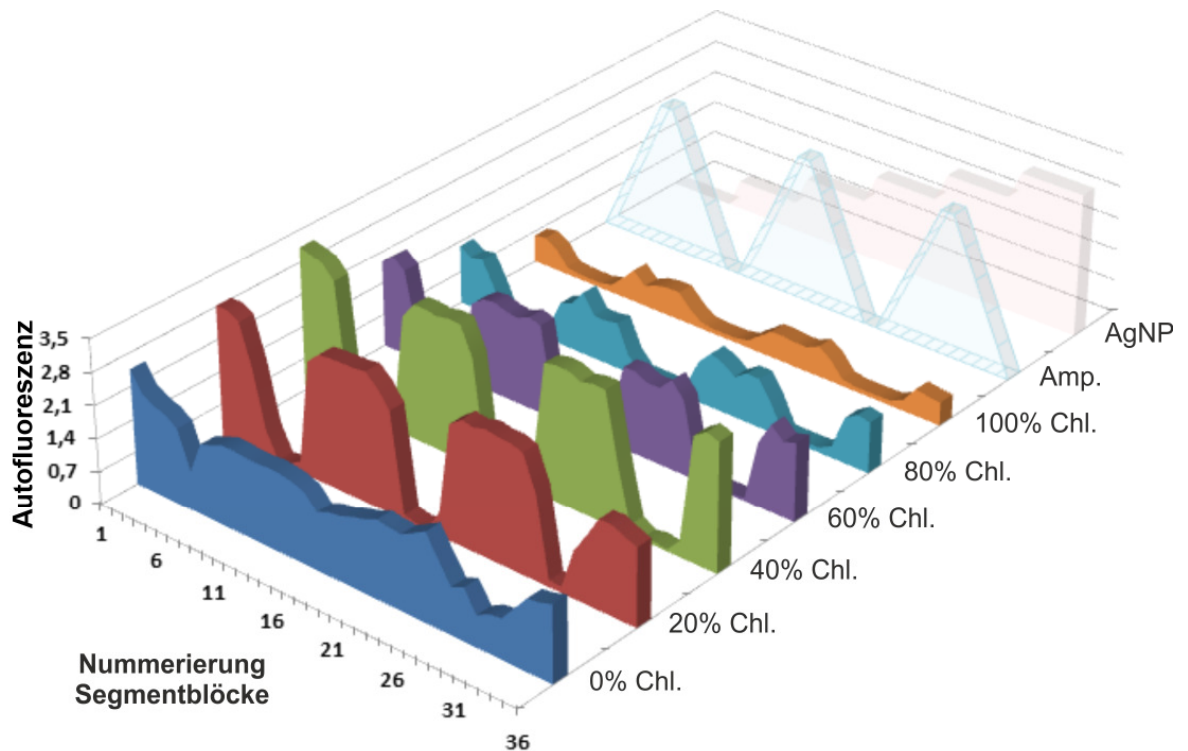


Abbildung 4.39: 3D-Plot des ternären Gemisches Ampicillin, Chloramphenicol und Silbernanopartikeln für den Parameter Autofluoreszenz nach 24 h *E. coli*-Kultivierung im Nanolitersegment

Die isobographische Abbildung 4.40a visualisierte die komplexe Wirkung zwischen Stimulation und Toxizität von Chloramphenicol und Ampicillin ohne den Einfluss von Silbernanopartikeln. Im Fall von Ampicillin wurde eine Endkonzentration von  $5,6 \mu\text{g/ml}$  selektiert, welche vor dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $5,6 \mu\text{g/ml}$  lag. Die Stimulation des Wachstums bei einer subletalen Dosis von Chloramphenicol hingte von der Ampicillin Konzentration ab. Die größte Stimulation wurde bei einer Chloramphenicol-Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  und ohne Ampicillin gefunden. Das Wachstum nahm mit steigender Ampicillin-Konzentration ab. Bei einer subletalen Dosis von Ampicillin fand durch Chloramphenicol keine stimulierende Wirkung statt.

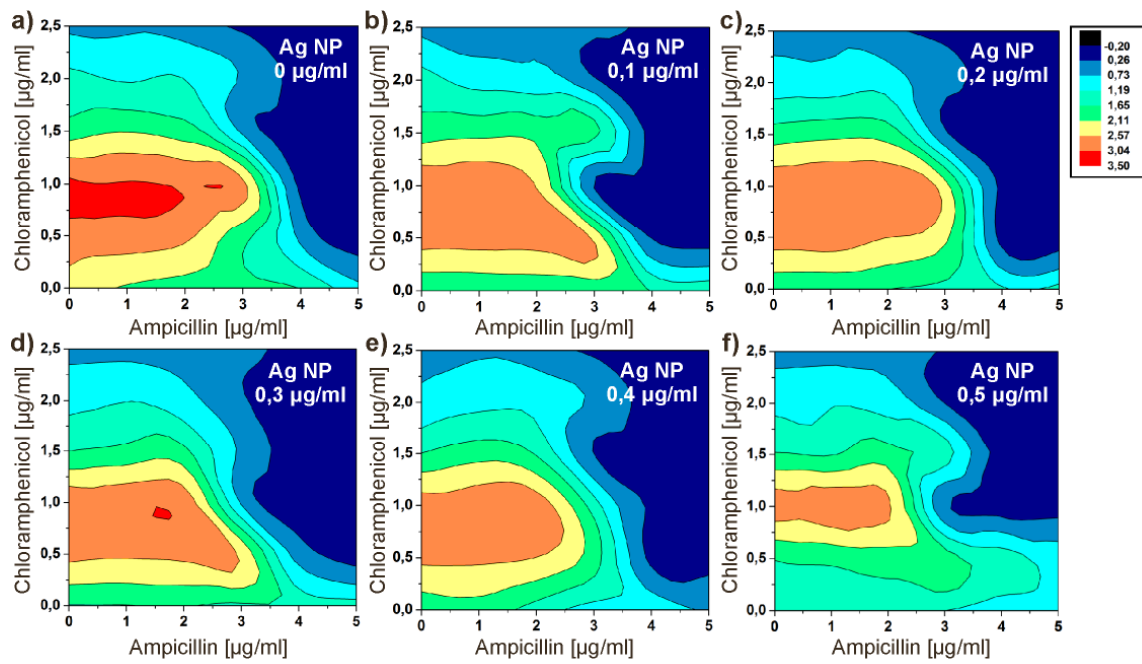
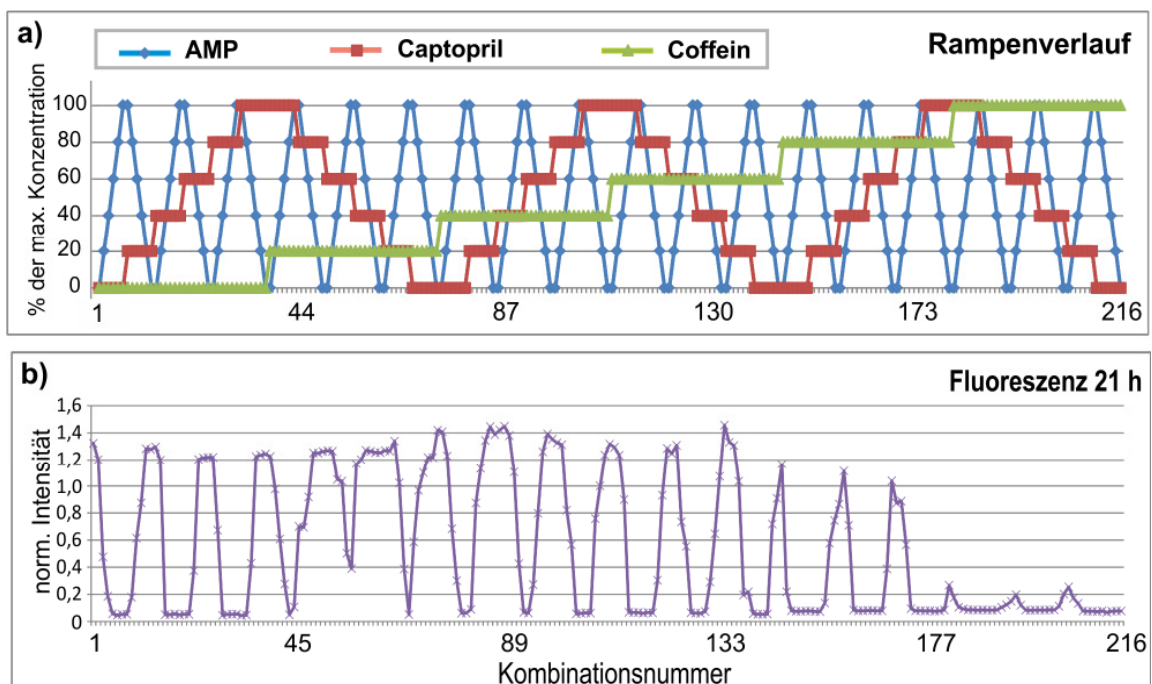


Abbildung 4.40: Dosis-Wirkungs-Beziehungen des ternären Gemisches bestehen aus Ampicillin, Chloramphenicol und Ag-Nanopartikeln für die Konzentrationsabhängigkeit der Parameter Autofluoreszenz einer in Mikrofluidsegmenten 24 h kultivierten *E. coli*-Kultur a) 2D-Plot des binären Gemisches Ampicillin und Chloramphenicol, b)-f) 2D-Plot von Ampicillin und Chloramphenicol in Abhängigkeit der zunehmenden Ag-Nanopartikel Konzentration.



### ***Untersuchung der ternären Mischung von Coffein, Ampicillin und Captopril***

Für die Untersuchung der Kombinationswirkung von Coffein und Ampicillin bei der Anwesenheit von Captopril wurde der in Abbildung 4.41 dargestellte Pumpenverlauf für das Screening von ternären Gemischen mit 20% Konzentrationsabstufungen und daraus resultierten 216 Kombinationen, verwendet. Die jeweiligen Konzentrationsänderungen erfolgten in unterschiedlicher Geschwindigkeit, wobei sich Ampicillin am schnellsten und Coffein am langsamsten veränderten. War die Konzentration des Antibiotikums hoch, befand sich die Autofluoreszenz niedrig, da die Bakterien durch Ampicillin gehemmt wurden. Bei geringer Konzentration, seigte die Fluoreszenz wieder an. Die höchste Autofluoreszenz wurde erreicht, als Coffein in mittlerer Konzentration (entspricht etwa 8-12 mM) vorlag, was darauf hindeutete, dass es das Wachstum oder die Fluorophoren-Syntheseleistung der Bakterien im Beisein von Captopril stimulierte, denn im zweidimensionale Screening ohne Captopril zeigten Ampicillin und Coffein keine gegenseitige Beeinflussung. Erst ab Coffein-Konzentrationen, die über dem normalen  $EC_{50}$ -Wert von etwa 15 mM lag, nahm die Fluoreszenz kontinuierlich ab, bis schließlich kaum noch Wachstum der Bakterien stattfand. Zeigten die verwendeten Substanzen in den zuvor durchgeführten binären Kombinationscreenings noch unabhängige Wirkungen zueinander, schien bei den ternären Gemischen eine gegenseitige Beeinflussung vorzuliegen.



*Abbildung 4.41: Ternäre Gemische Ampicillin, Captopril und Coffein von E. coli kultiviert im Mikrosegment a) LabView Programm zur Erzeugung von dreidimensionalen Parameterfeldern durch stufenweise Änderung der Zusammensetzungen (6 Stufen) von Coffein, Ampicillin und Captopril in einer Segmentsequenz von ca. 1.100 Segmenten. b) Reaktion auf Autofluoreszenzintensität mittels Mikrodurchflussfluorimeter.*

Auch die mit Hilfe von Origin erzeugten isobologramme veranschaulichten die vermuteten Effekte. Abbildung 4.42a zeigte die konzentrationsunabhängige Beziehung zwischen Coffein und Captopril in Abwesenheit von Ampicillin. Eine starke Stimulation der bakteriellen Aktivität

wurde bei Coffein-Konzentrationen zwischen etwa 6 und 12 mM beobachtet. Bei zunehmender Captopril-Konzentration wurde die Wirkung von Coffein nicht beeinflusst. Mit 0,3 µg/ml Ampicillin, zeigte das Coffein-Captopril-Isobologramm eine minimale Abnahme des  $EC_{50}$  von Coffein. Der Stimulationseffekt durch Coffein wurde aber nicht beeinträchtigt (Abbildung 4.42b).

Einzelwirkungsscreening zeigten dass Ampicillin ab einer Konzentration von etwa 1,2 µg/ml total inhibierend auf *E. coli* wirkten [199], dabei jedoch durch die antagonistischen Effekte von Coffein und Captopril in Kombination in seiner Wirkung abgeschwächt wurde. Abbildung 4.42e-f zeigten eine antagonistische Wirkung von Ampicillin bei subletalen Dosen von Captopril und Coffein. Weiterhin konnte ein nicht-monotoner Verlauf und die Bildung von Aktivitätsgipfeln von Bakterien auf Coffein und Captopril bei erhöhten Ampicillin-Konzentrationen zwischen 0,6-1,5 µg/ml beobachtet werden (Abbildung 4.42c-f).

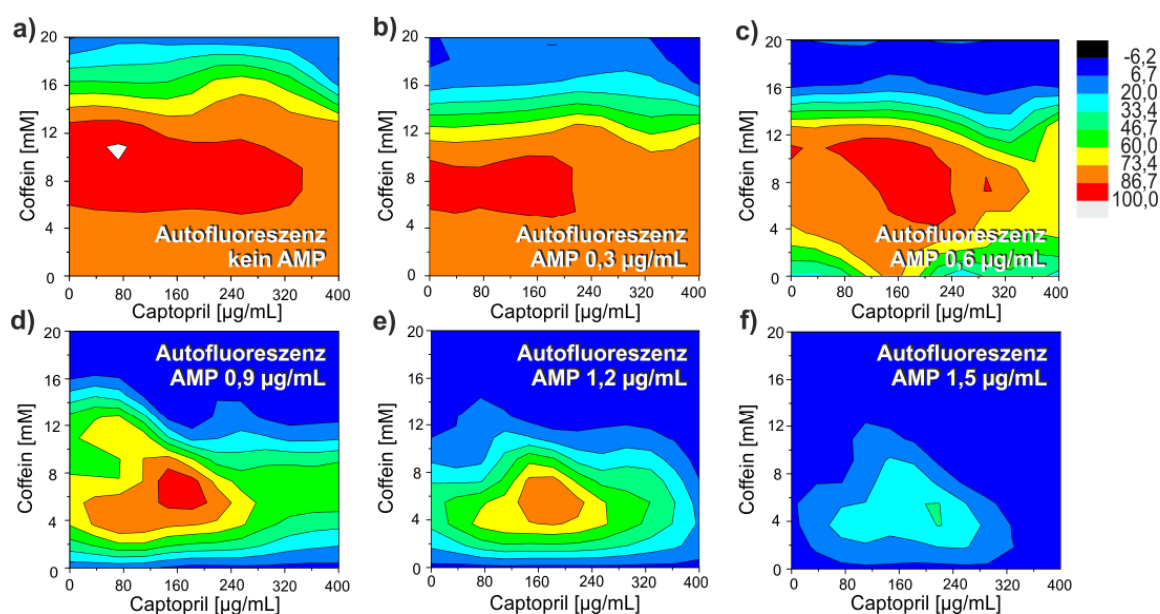


Abbildung 4.42: 3D-Plots des ternären Gemisches Ampicillin, Captopril und Coffein für den Parameter normierte Fluoreszenzintensität nach 24 h *E. coli*-Kultivierung im Segment.

Zudem wurde sichtbar, dass Captopril in Konzentrationen von etwa 160 µg/ml und Coffein-Konzentration von 8-12 mM regelrecht stimulierend auf das Wachstum der Bakterien wirkte, da bis zuletzt ein kleiner Bereich relativ hoher Fluoreszenz verblieben. Infolge dessen ließ sich feststellen, dass die gleichzeitige Einnahme von Ampicillin und Coffein bzw. Captopril zwar keinerlei negative Effekte auf die Hemmung der Bakterien hatte, eine Kombination aller drei Substanzen jedoch zu einer Abschwächung der Wirkung des Antibiotikums führte.

## 5 Schlussfolgerung

Die Arbeit lässt sich zu nachfolgenden Thesen der Dissertation zusammenfassen:

- Es wurde gezeigt, dass ein kompaktes, toxikologisches mikrofluidisches System mit erweiterter Multikanal-Sensorik für miniaturisierte Mehrparameter-Screenings von PC-gesteuerten Spritzenpumpen realisiert werden kann.
  - Durch die Integration eines 2-Kanal-Mikrodurchflussfluorimeters und eines 4-Kanal-Mikrodurchflussphotometers<sup>a</sup> konnte die simultane Messung und Charakterisierung der toxikologischen Endpunkte Wachstum und Autofluoreszenz von Zelle, Mikroorganismen und Algen sowie die Messung von segmentinternen pH- und pO<sub>2</sub>-Änderungen realisiert werden.
  - Mit im Rahmen dieses Projektes<sup>a</sup> entwickelten Flussratenalgorithmen konnten automatisierte Screeningabläufe für hochaufgelöste ein- bis fünfdimensionale Konzentrationsfelder implementiert werden.
  - Das mikrofluidische System ermöglicht die Durchführung von automatisierten Toxizitätsscreenings mit ternären Wirkstoffgemischen mit minimalem Chemikalieneinsatz im Nanoliterbereich.
  - Die In-situ-Messung des Stoffwechselfparameters pO<sub>2</sub> konnte durch die Integration von sensitiven Mikrobeads im Mikrosegment realisiert werden.
  
- Es wurde nachgewiesen, dass die Kultivierung von sehr verschiedenen Zellen in einer mikrofluidische Umgebung gut möglich ist.
  - Eukaryotischer Umwelt-Indikator:

Die Grünalge *Chorella vulgaris* konnte in 300 nl bis 600 nl Segmenten kultiviert werden<sup>b</sup>.
  - Bodenbakterien:

Die segmentinterne Kultivierung der schwermetall-toleranten Bodenbakterien *Streptomyces acidiscabies* E13, *Streptomyces tendae* F4 und *Psychrobacillus psychrodurans* Ur PLO1 wurden erfolgreich durchgeführt<sup>c</sup>. Der Sauerstofftransport durch den PTFE-Schlauch (I<sub>D</sub> 0,5 mm und A<sub>D</sub> 1,6 mm) erwies sich als ausreichend für die Entwicklung der Organismen.
  - Vertebraten-Zelllinien:

Die Kultivierung der promyelocytischen Leukämie-Zelllinie von Ratten (IPC-81) gelang in Segmenten in einem FEP-Schlauch mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm und einem Außendurchmesser von 0,8 mm.

---

<sup>a</sup>Optimi-Projekt, DBU-Projekt, erarbeitet mit S. Schneider

<sup>b</sup>Optimi-Projekt, erarbeitet mit D. Kürsten

<sup>c</sup>BactoCat-Projekt, erarbeitet mit D. Kürsten

- Die Einsetzbarkeit des entwickelten Systems für miniaturisierte Screenings und seine Eignung zur Ermittlung hochaufgelöster Dosis-Wirkungs-Beziehungen konnte durch zahlreiche Toxizitätstests, die vergleichbare Ergebnisse wie konventionelle, etablierten MTP-Tests zeigten, darüber hinaus aber wichtige Detailinformationen lieferten, bestätigt werden. Als Beispiele wurden folgende Toxizitätstests in dieser Arbeit gezeigt:
  - Toxizitätstests von Fungizid Carbendazim und ionische Flüssigkeit IM16 an der Leukämie-Zelllinie IPC-81.
  - Toxizitätstests mit  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen an den schwer-metalltolerante Bodenbakterien *Streptomyces acidiscabies* E13, *Streptomyces tendae* F4.
  - Toxizitätstest mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen am *Psychrobacillus psychrodurans* Ur PLO1.
  - Toxizitätstests mit den Herbiziden Atrazin, Alachlor und  $\text{CuCl}_2$  an der Grünalge *Chlorella vulgaris*.
  - Toxizitätstests mit Antibiotika, Coffein, Ethanol und Dinitrophenol an dem gramnegativen Prokaryoten *Escherichia coli*.
  
- Durch die Anwendung von hochaufgelösten Einzelwirkungs- und Kombinationsscreenings mit Nanopartikeln, Nahrungsbestandteilen, Antibiotika, Herbiziden, Fungiziden, Arzneistoffen, ionischen Flüssigkeiten und Schwermetallen an verschiedenen Organismenspezies konnten folgende neue Erkenntnisse gewonnen werden:
  - Hochaufgelöste Einzelwirkungsscreenings offenbarten ein sprunghaftes konzentrationsabhängiges Verhalten der *Str. acidiscabies* E13 und *Str. tendae* F4 in Abhängigkeit von der  $\text{Cu}^{2+}$ -ionen-Konzentration.
  - Die in den Einzelwirkungsscreenings mit dem Umweltorganismus *C. vulgaris* als nicht toxisch gefundene Au-Nanopartikel-Konzentration führte in der Kombination mit bakteriziden Ag-Nanopartikeln zu einer Verstärkung der toxischen Wirkung.
  - Isobolengrammen zeigten, dass die bakterizide Wirkung von Antibiotika auf den Prokaryoten *E. coli* durch die Zugabe von Ag-Nanopartikeln verstärkt wurde.
  - Zweidimensionale Screenings mit Schwermetallen konnten eine starke Wachstumsstimulation von *Streptomyces tendae* F4 durch Zinksulfat in Gegenwart einer subletalen Cu-Konzentration aufzeigen.
  - Die Kombination von Coffein und Ampicillin in Gegenwart von Captopril führte zu einer Hemmung der bakteriziden Wirkung von Ampicillin auf das Wachstum von *E. coli*.
  - Ein antagonistische Wirkung und ein komplexes Antwortverhalten wurde beim Wachstum von *E. coli* in Mikrosegmenten unter Anwendung der Substanzgemische Ampicillin + Chloramphenicol + Ag-Nanopartikel sowie Coffein + Chloramphenicol + Dinitrophenol beobachtet.

Die Detektion von Wachstum, Stoffwechselaktivität und Toxizitätsparametern in Antwort auf Xenobiotika liefert eine Vielzahl von Informationen, die in konventionellen- und MTP-Systemen nur mit hohem Aufwand generiert werden müssen. Teure, aufwendige Laborverfahren können teilweise in diese Mikrofluidsysteme übertragen und damit schnelle und leistungsfähige Screenings mit geringen Proben- und Reagenzienbedarf auf kleinsten Raum durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz des kompakten Mikrofluidsystems mit integrierter Multisensorik sehr geeignet für Ermittlung der hochaufgelösten Dosis-Wirkungs-Beziehungen einzelner Substanz und binäre sowie ternärer Substanzgemische ist. Mikrottoxikologische Untersuchungen konnten additives, antagonistisches, synergistisches sowie komplexes Antwortverhalten von verschiedenen Substanzen am *E. coli* und an der *C. vulgaris* gezeigt werden. Deshalb ist es insbesondere wichtig, Effekte von Chemikalienmischungen baldmöglichst in die Risikoabschätzung von Umweltchemikalien mit einzubeziehen.



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Rudel, R. A. and Perovich, L. J., Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmos Environ* 2009, 43, 170-181.
- [2] Caliman, F. A. and Gavrilesco, M., Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *Clean-Soil Air Water* 2009, 37, 277-303.
- [3] Mertens P. W., Clauberg, J., Hennings, W. et al., Umweltstandards: Neuordnung der Verfahren zur Risikobewertung und Standardsetzung im Umweltund Gesundheitsschutz; Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), 2002.
- [4] Walter, H. and Wieser, J., Vegetation of the earth in relation to climate and the eco-physiological conditions, Springer Verlag, Heidelberg, New York, 1973.
- [5] Kienle, C., Kohler, H. R., Filser, J. and Gerhardt, A., Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. *Environ Pollut* 2008, 152, 612-620.
- [6] Holmstrup, M., Bindsbol, A. M., Oostingh, G. J., Duschl, A. et al., Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci Total Environ* 2010, 408, 3746-3762.
- [7] Osterauer, R. and Kohler, H. R., Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 2008, 86, 485-494.
- [8] Van der Geest, H. G., Soppe, W. J., Greve, G. D., Kroon, A. et al., Combined effects of lowered oxygen and toxicants (copper and diazinon) on the mayfly *Ephoron virgo*. *Environ Toxicol Chem* 2002, 21, 431-436.
- [9] Townsend, C. R., Uhlmann, S. S. and Matthaei, C. D., Individual and combined responses of stream ecosystems to multiple stressors. *J Appl Ecol* 2008, 45, 1810-1819.
- [10] Feron, V. J., Groten, J. P., Jonker, D., Cassee, F. R. et al., Toxicology of chemical mixtures: Challenges for today and the future. *Toxicology* 1995, 105, 415-427.
- [11] Mumtaz, M. M., Sipes, I. G., Clewell, H. J. and Yang, R. S. H., Risk Assessment of Chemical-Mixtures - Biologic and Toxicologic Issues. *Fundamental and Applied Toxicology* 1993, 21, 258-269.
- [12] Altenburger, R., Walter, H. and Grote, M., What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environ Sci Technol* 2004, 38, 6353-6362.
- [13] Cassee, F. R., Groten, J. P., van Bladeren, P. J. and Feron, V. J., Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit Rev Toxicol* 1998, 28, 73-101.
- [14] Groten, J. P., Heijne, W. H. M., Stierum, R. H., Freidig, A. P. et al., Toxicology of chemical mixtures: a challenging quest along empirical sciences. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2004, 18, 185-192.
- [15] Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S. et al., An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reprod Toxicol* 2007, 24, 225-239.
- [16] Williams, E. S., Panko, J. and Paustenbach, D. J., The European Union's REACH regulation: a review of its history and requirements. *Crit Rev Toxicol* 2009, 39, 553-575.
- [17] Hertzberg, R. P. and Pope, A. J., High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr Opin Chem Biol* 2000, 4, 445-451.

- [18] White, R. E., High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery. *Annu Rev Pharmacol* 2000, 40, 133-157.
- [19] Wunder, F., Kalthof, B., Muller, T. and Huser, J., Functional cell-based assays in microliter volumes for ultra-high throughput screening. *Comb Chem High T Scr* 2008, 11, 495-504.
- [20] Kensy, F., John, G. T., Hofmann, B. and Buchs, J., Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2005, 28, 75-81.
- [21] Eisentraeger, A., Dott, W., Klein, J. and Hahn, S., Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotox Environ Safe* 2003, 54, 346-354.
- [22] Kocincova, A. S., Nagl, S., Arain, S., Krause, C. et al., Multiplex bacterial growth monitoring in 24-well microplates using a dual optical sensor for dissolved oxygen and pH. *Biotechnol Bioeng* 2008, 100, 430-438.
- [23] Ma, H. C., Horiuchi, K. Y., Wang, Y., Kucharewicz, S. A. et al., Nanoliter homogenous ultra-high throughput screening microarray for lead discoveries and IC50 profiling. *Assay Drug Dev Techn* 2005, 3, 177-187.
- [24] Song, H., Chen, D. L. and Ismagilov, R. F., Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew Chem Int Edit* 2006, 45, 7336-7356.
- [25] Seemann, R., Brinkmann, M., Pfohl, T. and Herminghaus, S., Droplet based microfluidics. *Rep Prog Phys* 2012, 75, 016601.
- [26] Kohler, J. M., Henkel, T., Grodrian, A., Kirner, T. et al., Digital reaction technology by micro segmented flow - components, concepts and applications. *Chem Eng J* 2004, 101, 201-216.
- [27] Funfak, A., Dissertation: Erschließung der Mikrofluidsegmenttechnik für die umwelttoxikologische Untersuchung der synergistischen Wirkung potentieller Schadstoffkombinationen auf Mikro- und Kleinstorganismen, Ilmenau University of Technology, Ilmenau, 2010.
- [28] Agresti, J. J., Antipov, E., Abate, A. R., Ahn, K. et al., Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *P Natl Acad Sci USA* 2010, 107, 4004-4009.
- [29] Dittrich, P. S. and Manz, A., Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006, 5, 210-218.
- [30] Madou, M., Zoval, J., Jia, G. Y., Kido, H. et al., Lab on a CD. *Annu Rev Biomed Eng* 2006, 8, 601-628.
- [31] Markey, A. L., Mohr, S. and Day, P. J. R., High-throughput droplet PCR. *Methods* 2010, 50, 277-281.
- [32] Tran, T. M., Lan, F., Thompson, C. S. and Abate, A. R., From tubes to drops: droplet-based microfluidics for ultrahigh-throughput biology. *J Phys D Appl Phys* 2013, 46, 114004.
- [33] Niggemann, M., Ehrfeld, W., Weber, L., Gunther, R. et al., Miniaturized plastic micro plates for applications in HTS. *Microsyst Technol* 1999, 6, 48-53.
- [34] Fent, K., Ökotoxikologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2007.
- [35] Theophrast Paracelsus: Werke., Darmstadt, 1965, 508-513.
- [36] Connell, D. W. and Miller, G. J., Chemistry and Ecotoxicology of Pollution, John Wiley & Sons, 1984, 464.



- [37] Funfak, A., Hartung, R., Cao, J. L., Martin, K. et al., Highly resolved dose-response functions for drug-modulated bacteria cultivation obtained by fluorometric and photometric flow-through sensing in microsegmented flow. *Sensor Actuat B-Chem* 2009, 142, 66-72.
- [38] Kuersten, D., Cao, J., Funfak, A., Mueller, P. et al., Cultivation of *Chlorella vulgaris* in microfluid segments and microtoxicological determination of their sensitivity against  $\text{CuCl}_2$  in the nanoliter range. *Eng Life Sci* 2011, 11, 1-8.
- [39] Porstmann, T. and Kiessig, S. T., Enzyme-Immunoassay Techniques - an Overview. *J Immunol Methods* 1992, 150, 5-21.
- [40] Lequin, R. M., Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem* 2005, 51, 2415-2418.
- [41] Berridge, M. V. and Tan, A. S., Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Mtt) - Subcellular-Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron-Transport in Mtt Reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993, 303, 474-482.
- [42] Borenfreund, E. and Puerner, J. A., Toxicity Determined In Vitro by Morphological Alterations and Neutral Red Absorption. *Toxicol Lett* 1985, 24, 119-124.
- [43] Gillies, R. J., Didier, N. and Denton, M., Determination of Cell Number in Monolayer-Cultures. *Anal Biochem* 1986, 159, 109-113.
- [44] Nachlas, M. M., Margulies, S. I., Goldberg, J. D. and Seligman, A. M., The Determination of Lactic Dehydrogenase with a Tetrazolium Salt. *Anal Biochem* 1960, 1, 317-326.
- [45] BLISS, C. I., THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY. *Annals of Applied Biology* 1939, 26, 585-615.
- [46] Loewe: s and Muischnek, H., Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1926, 114, 313-326.
- [47] Loewe, S., The Problem of Synergism and Antagonism of Combined Drugs. *Arzneimittel-Forsch* 1953, 3, 285-290.
- [48] Yeh, P. J., Hegreness, M. J., Aiden, A. P. and Kishony, R., SYSTEMS MICROBIOLOGY - OPINION Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2009, 7, 460-466.
- [49] Grimme, H., Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W. et al., Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen: multiple Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen in niedrigen Konzentrationen, Umweltforschungszentrum Leipzig, 1998.
- [50] Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M. et al., Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ Toxicol Chem* 2000, 19, 2341-2347.
- [51] Groten, J. P., Mixtures and interactions. *Food and Chemical Toxicology* 2000, 38, 65-71.
- [52] Walter, H.-A., Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien, Zur Analyse der milieuhängigen Mischungstoxizität von Kontaminanten mit unbekanntem Wirkungsmechanismus in umweltrelevanten Konzentrationen, Halle (Saale), 2002.
- [53] Grimme, L. H., Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T. et al., Predictive assessment of the aquatic toxicity of multiple chemical mixtures. *Journal of Environmental Quality* 2000, 29, 1063-1068.

- [54] Berenbaum, M. C., The Expected Effect of a Combination of Agents - the General-Solution. *J Theor Biol* 1985, 114, 413-431.
- [55] Belden, J. B., Gilliom, R. J. and Lydy, M. J., How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr Environ Assess Manag* 2007, 3, 364-372.
- [56] Grimme, H., Altenburger, A., Boedeker, W. and Faust, M., Kombinationswirkungen in der aquatischen Toxikologie. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 1996, 8, 150-158.
- [57] Emig, G. and Klemm, E., *Technische Chemie: Einführung in die chemische Reaktionstechnik*, Springer, Berlin, 2005.
- [58] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006, 442, 368-373.
- [59] Squires, T. M. and Quake, S. R., Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev Mod Phys* 2005, 77, 977-1026.
- [60] Le, H. P., Progress and trends in ink-jet printing technology. *J Imaging Sci Techn* 1998, 42, 49-62.
- [61] Terry, S. C., Jerman, J. H. and Angell, J. B., Gas-Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon-Wafer. *Ieee T Electron Dev* 1979, 26, 1880-1886.
- [62] Shoji, S., Esashi, M. and Matsuo, T., Prototype Miniature Blood-Gas Analyzer Fabricated on a Silicon-Wafer. *Sensor Actuator* 1988, 14, 101-107.
- [63] Manz, A., Miyahara, Y., Miura, J., Watanabe, Y. et al., Design of an Open-Tubular Column Liquid Chromatograph Using Silicon Chip Technology. *Sensor Actuat B-Chem* 1990, 1, 249-255.
- [64] Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M. J., Fettingner, J. C. et al., Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation Techniques into Monitoring Systems - Capillary Electrophoresis on a Chip. *J Chromatogr* 1992, 593, 253-258.
- [65] Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z. H., Ludi, H. et al., Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip. *Anal Chem* 1992, 64, 1926-1932.
- [66] Woias, P., Micropumps - past, progress and future prospects. *Sensor Actuat B-Chem* 2005, 105, 28-38.
- [67] Nisar, A., Aftulpurkar, N., Mahaisavariya, B. and Tuantranont, A., MEMS-based micropumps in drug delivery and biomedical applications. *Sensor Actuat B-Chem* 2008, 130, 917-942.
- [68] Gensler, H., Sheybani, R., Li, P. Y., Lo Mann, R. et al., An implantable MEMS micropump system for drug delivery in small animals. *Biomed Microdevices* 2012, 14, 483-496.
- [69] Oh, K. W. and Ahn, C. H., A review of microvalves. *J Micromech Microeng* 2006, 16, R13-R39.
- [70] Jensen, E. C., Stockton, A. M., Chiesl, T. N., Kim, J. et al., Digitally programmable microfluidic automaton for multiscale combinatorial mixing and sample processing. *Lab Chip* 2013, 13, 288-296.
- [71] Hessel, V., Lowe, H. and Schonfeld, F., Micromixers - a review on passive and active mixing principles. *Chem Eng Sci* 2005, 60, 2479-2501.
- [72] Capretto, L., Cheng, W., Hill, M. and Zhang, X. L., Micromixing Within Microfluidic Devices. *Microfluidics: Technologies and Applications* 2011, 304, 27-68.

- [73] Haeberle, S. and Zengerle, R., Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* 2007, 7, 1094-1110.
- [74] Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F. et al., Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem Soc Rev* 2010, 39, 1153-1182.
- [75] Eijkel, J. C. T. and van den Berg, A., Young 4ever - the use of capillarity for passive flow handling in lab on a chip devices. *Lab Chip* 2006, 6, 1405-1408.
- [76] Thorsen, T., Maerkl, S. J. and Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science* 2002, 298, 580-584.
- [77] Lee, A. P., Teh, S. Y., Lin, R. and Hung, L. H., Droplet microfluidics. *Lab Chip* 2008, 8, 198-220.
- [78] Gorkin, R., Park, J., Siegrist, J., Amasia, M. et al., Centrifugal microfluidics for biomedical applications. *Lab Chip* 2010, 10, 1758-1773.
- [79] Ducree, J., Haeberle, S., Lutz, S., Pausch, S. et al., The centrifugal microfluidic bio-disk platform. *J Micromech Microeng* 2007, 17, S103-S115.
- [80] Mugele, F. and Baret, J. C., Electrowetting: From basics to applications. *J Phys-Condens Mat* 2005, 17, R705-R774.
- [81] Moon, H., Cho, S. K., Garrell, R. L. and Kim, C. J., Low voltage electrowetting-on-dielectric. *J Appl Phys* 2002, 92, 4080-4087.
- [82] Wong, P. K., Wang, T. H., Deval, J. H. and Ho, C. M., Electrokinetics in micro devices for biotechnology applications. *Ieee-Asme T Mech* 2004, 9, 366-376.
- [83] Beyssen, D., Le Brizoual, L., Elmazria, O. and Alnot, P., Microfluidic device based on surface acoustic wave. *Sensor Actuat B-Chem* 2006, 118, 380-385.
- [84] Gedge, M. and Hill, M., Acoustofluidics 17: Theory and applications of surface acoustic wave devices for particle manipulation. *Lab Chip* 2012, 12, 2998-3007.
- [85] Kreutzer, M. T., Kapteijn, F. and Moulijn, J. A., Monoliths as biocatalytic reactors: Smart gas-liquid contacting for process intensification. *Ind Eng Chem Res* 2005, 44, 9646-9652.
- [86] Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A. and Whitesides, G. M., Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - scaling and mechanism of break-up. *Lab Chip* 2006, 6, 437-446.
- [87] Glawdel, T., Elbuken, C. and Ren, C. L., Droplet formation in microfluidic T-junction generators operating in the transitional regime. I. Experimental observations. *Phys Rev E* 2012, 85, 016323.
- [88] Henkel, T., Bermig, T., Kielpinski, M., Grodrian, A. et al., Chip modules for generation and manipulation of fluid segments for micro serial flow processes. *Chem Eng J* 2004, 101, 439-445.
- [89] Christopher, G. F. and Anna, S. L., Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *J Phys D Appl Phys* 2007, 40, R319-R336.
- [90] Guillot, P. and Colin, A., Stability of parallel flows in a microchannel after a T junction. *Phys Rev E* 2005, 72,
- [91] Nisisako, T., Torii, T. and Higuchi, T., Droplet formation in a microchannel network. *Lab Chip* 2002, 2, 24-26.

- [92] Kohler, J. M. and Kirner, T., Nanoliter segment formation in micro fluid devices for chemical and biological micro serial flow processes in dependence on flow rate and viscosity. *Sensor Actuat a-Phys* 2005, 119, 19-27.
- [93] Malsch, D., Gleichmann, N., Kielpinski, M., Mayer, G. et al., Dynamics of droplet formation at T-shaped nozzles with elastic feed lines. *Microfluid Nanofluid* 2010, 8, 497-507.
- [94] Carrier, O., Funfschilling, D. and Li, H. Z., Effect of the fluid injection configuration on droplet size in a microfluidic T junction. *Phys Rev E* 2014, 89, 013003.
- [95] Abate, A. R., Poitzsch, A., Hwang, Y., Lee, J. et al., Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation. *Phys Rev E* 2009, 80, 026310.
- [96] Wehking, J. D., Gabany, M., Chew, L. and Kumar, R., Effects of viscosity, interfacial tension, and flow geometry on droplet formation in a microfluidic T-junction. *Microfluid Nanofluid* 2014, 16, 441-453.
- [97] Wang, K., Lu, Y. C., Xu, J. H. and Luo, G. S., Determination of Dynamic Interfacial Tension and Its Effect on Droplet Formation in the T-Shaped Microdispersion Process. *Langmuir* 2009, 25, 2153-2158.
- [98] Baret, J. C., Kleinschmidt, F., El Harrak, A. and Griffiths, A. D., Kinetic Aspects of Emulsion Stabilization by Surfactants: A Microfluidic Analysis. *Langmuir* 2009, 25, 6088-6093.
- [99] Thiam, A. R., Bremond, N. and Bibette, J., From Stability to Permeability of Adhesive Emulsion Bilayers. *Langmuir* 2012, 28, 6291-6298.
- [100] Ward, T., Faivre, M., Abkarian, M. and Stone, H. A., Microfluidic flow focusing: Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis* 2005, 26, 3716-3724.
- [101] Yobas, L., Martens, S., Ong, W. L. and Ranganathan, N., High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets. *Lab Chip* 2006, 6, 1073-1079.
- [102] Adamson, D. N., Mustafi, D., Zhang, J. X., Zheng, B. et al., Production of arrays of chemically distinct nanolitre plugs via repeated splitting in microfluidic devices. *Lab Chip* 2006, 6, 1178-1186.
- [103] Niu, X., Gulati, S., Edel, J. B. and deMello, A. J., Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits. *Lab Chip* 2008, 8, 1837-1841.
- [104] Niu, X., Gielen, F., Edel, J. B. and deMello, A. J., A microdroplet dilutor for high-throughput screening. *Nat Chem* 2011, 3, 437-442.
- [105] Malsch, D., Kielpinski, M., Merthan, R., Albert, J. et al.,  $\mu$ PIV - Analysis of Taylor flow in micro channels. *Chem Eng J* 2008, 135, 166-172.
- [106] Baroud, C. N., Gallaire, F. and Dangla, R., Dynamics of microfluidic droplets. *Lab Chip* 2010, 10, 2032-2045.
- [107] Baroud, C. N., Droplet Microfluidic in Two-Dimensional Channels, in: J. Köhler and B. Cahill (Eds.), *Micro-Segmented Flow: Applications in Chemistry and Biology*, Springer, Heidelberg-New York-Dortrecht-London 2014, 7-54.
- [108] Granieri, L., Baret, J. C., Griffiths, A. D. and Merten, C. A., High-Throughput Screening of Enzymes by Retroviral Display Using Droplet-Based Microfluidics. *Chem Biol* 2010, 17, 229-235.
- [109] Ahn, B., Lee, K., Panchapakesan, R. and Oh, K. W., On-demand electrostatic droplet charging and sorting. *Biomicrofluidics* 2011, 5(2), 024113.

- [110] Simon, M. G. and Lee, A. P., Microfluidic Droplet Manipulations and Their Applications, in: P. Day, A. Manz and Y. Zhang (Eds.), *Microdroplet Technology - Principles and Emerging Applications in Biology and Chemistry*, Springer New York, New York 2012, 23-50.
- [111] Budden, M., Schneider, S., Groß, A. and Kohler, J. M., Microfluidic encoding: generation of arbitrary droplet sequences by electrical switching in microchannels. *Sensor Actuat a-Phys* 2013, 189, 288-297.
- [112] Panizza, P., Engl, W., Tachibana, M. and Colin, A., A droplet-based high-throughput tubular platform to extract rate constants of slow chemical reactions. *Chem Eng Sci* 2008, 63, 1692-1695.
- [113] Demirkol, D. O., Dornbusch, K., Feller, K. H. and Timur, S., Microfluidic devices and true-color sensor as platform for glucose oxidase and laccase assays. *Eng Life Sci* 2011, 11, 182-188.
- [114] Wagner, J. and Kohler, J. M., Continuous synthesis of gold nanoparticles in a microreactor. *Nano Lett* 2005, 5, 685-691.
- [115] Duraiswamy, S. and Khan, S. A., Droplet-Based Microfluidic Synthesis of Anisotropic Metal Nanocrystals. *Small* 2009, 5, 2828-2834.
- [116] Knauer, A., Csaki, A., Fritzsche, W., Serra, C. A. et al., Micro continuous flow-through synthesis of triangular silver nanoprisms and their incorporation in complexly composed polymer microparticles. *Chem Eng J* 2013, 227, 191-197.
- [117] Li, S. N., Knauer, A., Risch, K., Ritter, U. et al., Synthesis and characterization of ZnO/4-mercaptobenzoic acid/Au composite particles. *Mater Lett* 2013, 91, 103-106.
- [118] Gross, G. A., Hamann, C., Gunther, M. and Kohler, J. M., Formation of polymer and nanoparticle doped polymer minirods by use of the microsegmented flow principle. *Chem Eng Technol* 2007, 30, 341-346.
- [119] Kumacheva, E., Zhang, H., Tumarkin, E., Peerani, R. et al., Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology. *J Am Chem Soc* 2006, 128, 12205-12210.
- [120] Voicu, D., Scholl, C., Li, W., Jagadeesan, D. et al., Kinetics of Multicomponent Polymerization Reaction Studied in a Microfluidic Format. *Macromolecules* 2012, 45, 4469-4475.
- [121] Kumi, G., Yanez, C. O., Belfield, K. D. and Fourkas, J. T., High-speed multiphoton absorption polymerization: fabrication of microfluidic channels with arbitrary cross-sections and high aspect ratios. *Lab Chip* 2010, 10, 1057-1060.
- [122] Curcio, M. and Roeraade, J., Continuous segmented-flow polymerase chain reaction for high-throughput miniaturized DNA amplification. *Anal Chem* 2003, 75, 1-7.
- [123] Walsh, E. J., King, C., Grimes, R. and Gonzalez, A., Segmenting fluid effect on PCR reactions in microfluidic platforms. *Biomed Microdevices* 2005, 7, 269-272.
- [124] Hartung, R., Brosing, A., Sczcepankiewicz, G., Liebert, U. et al., Application of an asymmetric helical tube reactor for fast identification of gene transcripts of pathogenic viruses by micro flow-through PCR. *Biomed Microdevices* 2009, 11, 685-692.
- [125] Li, L., Mustafi, D., Fu, Q., Tereshko, V. et al., Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins. *P Natl Acad Sci USA* 2006, 103, 19243-19248.

- [126] Yamaguchi, H., Maeki, M., Yamashita, K., Nakamura, H. et al., Controlling one protein crystal growth by droplet-based microfluidic system. *J Biochem-Tokyo* 2013, 153, 339-346.
- [127] Chen, D. L., Gerdts, C. J. and Ismagilov, R. F., Using microfluidics to observe the effect of mixing on nucleation of protein crystals. *J Am Chem Soc* 2005, 127, 9672-9673.
- [128] Grodrian, A., Metze, J., Henkel, T., Martin, K. et al., Segmented flow generation by chip reactors for highly parallelized cell cultivation. *Biosens Bioelectron* 2004, 19, 1421-1428.
- [129] Martin, K., Henkel, T., Baier, V., Grodrian, A. et al., Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. *Lab Chip* 2003, 3, 202-207.
- [130] Kursten, D., Cao, J. L., Funfak, A., Muller, P. et al., Cultivation of *Chlorella vulgaris* in microfluid segments and microtoxicological determination of their sensitivity against CuCl<sub>2</sub> in the nanoliter range. *Eng Life Sci* 2011, 11, 580-587.
- [131] Funfak, A., Brosing, A., Brand, M. and Kohler, J. M., Micro fluid segment technique for screening and development studies on *Danio rerio* embryos. *Lab Chip* 2007, 7, 1132-1138.
- [132] Qin, J. H., Shi, W. W., Ye, N. N. and Lin, B. C., Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay. *Lab Chip* 2008, 8, 1432-1435.
- [133] Hwang, H. and Lu, H., Microfluidic tools for developmental studies of small model organisms - nematodes, fruit flies, and zebrafish. *Biotechnol J* 2013, 8, 192-205.
- [134] Huebner, A., Sharma, S., Srisa-Art, M., Hollfelder, F. et al., Microdroplets: A sea of applications? *Lab Chip* 2008, 8, 1244-1254.
- [135] Theberge, A. B., Courtois, F., Schaerli, Y., Fischlechner, M. et al., Microdroplets in Microfluidics: An Evolving Platform for Discoveries in Chemistry and Biology. *Angew Chem Int Edit* 2010, 49, 5846-5868.
- [136] Clausell-Tormos, J., Lieber, D., Baret, J. C., El-Harrak, A. et al., Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of mammalian cells and multicellular organisms. *Chem Biol* 2008, 15, 875-875.
- [137] Köhler, J. M. and Groß, A., Microphotometric characterization of fluid segment populations generated in different simple microfluidic networks. *Proc. ICNMM Limerick: 96172* 2006.
- [138] Köhler, J. M., Fluorescence-labelled polymer beads for chemical monitoring of nanoliter fluid segments. *Proc. AIChE Spring Natl. Meeting, Houston/Texas: 121c* 2007.
- [139] Strehle, K. R., Cialla, D., Rosch, P., Henkel, T. et al., A reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy approach. Online SERS measurements in a segmented microfluidic system. *Anal Chem* 2007, 79, 1542-1547.
- [140] Marz, A., Henkel, T., Cialla, D., Schmitt, M. et al., Droplet formation via flow-through microdevices in Raman and surface enhanced Raman spectroscopy-concepts and applications. *Lab Chip* 2011, 11, 3584-3592.
- [141] Günther, P. M. and Köhler, J.M., Addressing of multidimensional concentration spaces by micro segmented flow technique. *Proc. MikrosystemTechnology Congress Darmstadt* 2011, 10, 945-947.
- [142] White, A. K., VanInsberghe, M., Petriv, O. I., Hamidi, M. et al., High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR. *P Natl Acad Sci USA* 2011, 108, 13999-14004.

- [143] Kopp, M. U., de Mello, A. J. and Manz, A., Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip. *Science* 1998, 280, 1046-1048.
- [144] White, A. K., Heyries, K. A., Doolin, C., VanInsberghe, M. et al., High-Throughput Microfluidic Single-Cell Digital Polymerase Chain Reaction. *Anal Chem* 2013, 85, 7182-7190.
- [145] Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A. et al., Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc* 2013, 8, 870-891.
- [146] Leung, K., Quiring, A. and Hansen, C., Microfluidic single-cell whole-genome amplification in nanolitre-volume droplets with the lowest representational bias reported to date. *Genome* 2012, 55, 730-730.
- [147] Roth, M., Martin, K. and Henkel, T., Wirkstoffsuche mit tropfenbasierten zellulären Assays. Proc. 14. Heiligenstädter Kolloquium 2008, 177-180.
- [148] Hansen, C. L., Classen, S., Berger, J. M. and Quake, S. R., A microfluidic device for kinetic optimization of protein crystallization and in situ structure determination. *J Am Chem Soc* 2006, 128, 3142-3143.
- [149] Frenz, L., Blank, K., Brouzes, E. and Griffiths, A. D., Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines. *Lab Chip* 2009, 9, 1344-1348.
- [150] Pompano, R. R., Liu, W. S., Du, W. B. and Ismagilov, R. F., Microfluidics Using Spatially Defined Arrays of Droplets in One, Two, and Three Dimensions. *Annu Rev Anal Chem* 2011, 4, 59-81.
- [151] Baroud, C. N., de Saint Vincent, M. R. and Delville, J. P., An optical toolbox for total control of droplet microfluidics. *Lab Chip* 2007, 7, 1029-1033.
- [152] Lindstrom, S. and Andersson-Svahn, H., Overview of single-cell analyses: microdevices and applications. *Lab Chip* 2010, 10, 3363-3372.
- [153] Gunther, P. M., Schneider, S., Groß, G. A. and Kohler, J. M., Addressing of multidimensional concentration spaces by micro segmented flow technique. Proc. MikrosystemTechnology Congress Darmstadt 2011, 10, 945-947.
- [154] Trivedi, V., Doshi, A., Kurup, G. K., Ereifej, E. et al., A modular approach for the generation, storage, mixing, and detection of droplet libraries for high throughput screening. *Lab Chip* 2010, 10, 2433-2442.
- [155] Du, W. B., Sun, M., Gu, S. Q., Zhu, Y. et al., Automated Microfluidic Screening Assay Platform Based on Drop Lab. *Anal Chem* 2010, 82, 9941-9947.
- [156] Cao, J., Schneider, S., Schultheiß, R., Schober, A. et al., From microtiter plates to droplets" tools for micro-fluidic droplet processing. *Microsyst Technol* 2013, doi: 10.1007/s00542-00013-01981-y.
- [157] Clausell-Tormos, J. and Merten, C. A., Micro segmented-flow in biochemical and cell-based assays. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012, 4, 1768-1779.
- [158] Cai, L. F., Zhu, Y., Du, G. S. and Fang, Q., Droplet-Based Microfluidic Flow Injection System with Large-Scale Concentration Gradient by a Single Nanoliter-Scale Injection for Enzyme Inhibition Assay. *Anal Chem* 2012, 84, 446-452.
- [159] Cao, J., Kursten, D., Schneider, S., Knauer, A. et al., Uncovering toxicological complexity by multi-dimensional screenings in microsegmented flow: modulation of antibiotic interference by nanoparticles. *Lab Chip* 2012, 12, 474-484.
- [160] Sivasamy, J., Chim, Y. C., Wong, T. N., Nguyen, N. T. et al., Reliable addition of reagents into microfluidic droplets. *Microfluid Nanofluid* 2010, 8, 409-416.

- [161] Wegrzyn, J., Samborski, A., Reissig, L., Korczyk, P. M. et al., Microfluidic architectures for efficient generation of chemistry gradations in droplets. *Microfluid Nanofluid* 2013, 14, 235-245.
- [162] Gu, S. Q., Lu, Y. L., Ding, Y. P., Li, L. et al., Droplet-based microfluidics for dose-response assay of enzyme inhibitors by electrochemical method. *Anal Chim Acta* 2013, 796, 68-74.
- [163] Miller, O. J., El Harrak, A., Mangeat, T., Baret, J. C. et al., High-resolution dose-response screening using droplet-based microfluidics. *P Natl Acad Sci USA* 2012, 109, 378-383.
- [164] Churski, K., Kaminski, T. S., Jakiela, S., Kamysz, W. et al., Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated microdroplet system. *Lab Chip* 2012, 12, 1629-1637.
- [165] Funfak, A., Cao, J. L., Knauer, A., Martin, K. et al., Synergistic effects of metal nanoparticles and a phenolic uncoupler using microdroplet-based two-dimensional approach. *J Environ Monitor* 2011, 13, 410-415.
- [166] Shi, W. W., Qin, J. H., Ye, N. N. and Lin, B. C., Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay. *Lab Chip* 2008, 8, 1432-1435.
- [167] Hufnagel, H., Huebner, A., Gulch, C., Guse, K. et al., An integrated cell culture lab on a chip: modular microdevices for cultivation of mammalian cells and delivery into microfluidic microdroplets. *Lab Chip* 2009, 9, 1576-1582.
- [168] Barbulovic-Nad, I., Yang, H., Park, P. S. and Wheeler, A. R., Digital microfluidics for cell-based assays. *Lab Chip* 2008, 8, 519-526.
- [169] Du, G. S., Pan, J. Z., Zhao, S. P., Zhu, Y. et al., Cell-Based Drug Combination Screening with a Microfluidic Droplet Array System. *Anal Chem* 2013, 85, 6740-6747.
- [170] Shi, W. W., Wen, H., Lu, Y., Shi, Y. et al., Droplet microfluidics for characterizing the neurotoxin-induced responses in individual *Caenorhabditis elegans*. *Lab Chip* 2010, 10, 2855-2863.
- [171] Tirella, A., Marano, M., Vozzi, F. and Ahluwalia, A., A microfluidic gradient maker for toxicity testing of bupivacaine and lidocaine. *Toxicol in Vitro* 2008, 22, 1957-1964.
- [172] Brouzes, E., Medkova, M., Savenelli, N., Marran, D. et al., Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *P Natl Acad Sci USA* 2009, 106, 14195-14200.
- [173] Baraban, L., Bertholle, F., Salverda, M. L. M., Bremond, N. et al., Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab Chip* 2011, 11, 4057-4062.
- [174] Ramanujam, N., Fluorescence Spectroscopy In Vivo, in: R. A. Meyers Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, 20-56.
- [175] Monici, M., Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 2005, 11, 227-256.
- [176] Cao, J., Diplomarbeit: Nanodiagnostik in Fluidsystemen: Optische pH-Auslesung in Nanoliterfluidsegmenten, TU Ilmenau, 2008.
- [177] Di Corato, R., Piacenza, P., Musaro, M., Buonsanti, R. et al., Magnetic-Fluorescent Colloidal Nanobeads: Preparation and Exploitation in Cell Separation Experiments. *Macromolecular Bioscience* 2009, 9, 952-958.
- [178] Nagl, S. and Wolfbeis, O. S., Optical multiple chemical sensing: status and current challenges. *Analyst* 2007, 132, 507-511.
- [179] Stich, M. I. J., Fischer, L. H. and Wolfbeis, O. S., Multiple fluorescent chemical sensing and imaging. *Chem Soc Rev* 2010, 39, 3102-3114.



- [180] Wang, X. D. and Wolfbeis, O. S., Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications. *Chem Soc Rev* 2014, 43, 3666-3761.
- [181] Funfak A. , Cao J. , Li S. , Knauer A. et al., Datentransfer aus fluidischen Mikrokompartimenten: Mikro- und Nanopartikel als optochemische Primärtransducer in der miniaturisierten Biotechnologie, 15. Heiligenstädter Kolloquium, Heilbad Heiligenstadt, 2010, 273-284.
- [182] Borisov, S. M., Nuss, G. and Klimant, I., Red Light-Excitable Oxygen Sensing Materials Based on Platinum(II) and Palladium(II) Benzoporphyrins. *Anal Chem* 2008, 80, 9435-9442.
- [183] Lee, S. K. and Okura, I., Photostable optical oxygen sensing material: Platinum tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin immobilized in polystyrene. *Analytical Communications* 1997, 34, 185-188.
- [184] Baleizao, C., Nagl, S., Schaferling, M., Berberan-Santos, M. N. et al., Dual fluorescence sensor for trace oxygen and temperature with unmatched range and sensitivity. *Anal Chem* 2008, 80, 6449-6457.
- [185] Wolfbeis, O. S., Fischer, L. H., Borisov, S. M., Schaeferling, M. et al., Dual sensing of pO<sub>2</sub> and temperature using a water-based and sprayable fluorescent paint. *Analyst* 2010, 135, 1224-1229.
- [186] Lacaze, N., Gombaudo, G. and Lanotte, M., Conditions Controlling Long-Term Proliferation of Brown Norway Rat Promyelocytic Leukemia In Vitro - Primary Growth-Stimulation by Microenvironment and Establishment of an Autonomous Brown Norway Leukemic Stem-Cell Line. *Leukemia Research* 1983, 7, 145-154.
- [187] Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L. and Wosten, H. A. B., Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* 2006, 14, 313-319.
- [188] Langella, F., Grawunder, A., Stark, R., Weist, A. et al., Microbially assisted phytoremediation approaches for two multi-element contaminated sites. *Environ Sci Pollut R* 2014, 21, 6845-6858.
- [189] Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E. et al., Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotox Environ Safe* 2008, 71, 1-15.
- [190] Hartmann, N. B., Engelbrekt, C., Zhang, J., Ulstrup, J. et al., The challenges of testing metal and metal oxide nanoparticles in algal bioassays: titanium dioxide and gold nanoparticles as case studies. *Nanotoxicology* 2013, 7, 1082-1094.
- [191] Chen, Z. Z., Porcher, C., Campbell, P. G. C. and Fortin, C., Influence of Humic Acid on Algal Uptake and Toxicity of Ionic Silver. *Environ Sci Technol* 2013, 47, 8835-8842.
- [192] He, D., Dorantes-Aranda, J. J. and Waite, T. D., Silver Nanoparticle-Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects. *Environ Sci Technol* 2012, 46, 8731-8738.
- [193] Hazani, A. A., Ibrahim, M. M., Shehata, A. I., El-Gaaly, G. A. et al., Ecotoxicity of Ag-Nanoparticles on Two Microalgae, *Chlorella Vulgaris* and *Dunaliella Tertiolecta*. *Arch Biol Sci* 2013, 65, 1447-1457.
- [194] Fairchild, J. F., Ruessler, D. S. and Carlson, A. R., Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ Toxicol Chem* 1998, 17, 1830-1834.
- [195] Stratton, G. W., *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1984, 13, 35-42.

- [196] Yang, Z., Dong, B. and Wu, J., Sensitivity of *Chlorella vulgaris* to metribuzin, puma andalachlor. *The journal of applied ecology* 2004, 15, 1621-1625.
- [197] Schmid, R. D., *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*, WILEY-VCH Verlag, 2002.
- [198] Cao, J. L., Kursten, D., Schneider, S. and Kohler, J. M., Stimulation and Inhibition of Bacterial Growth by Caffeine Dependent on Chloramphenicol and a Phenolic Uncoupler- A Ternary Toxicity Study Using Microfluid Segment Technique. *J Biomed Nanotechnol* 2012, 8, 770-778.
- [199] Cao, J. L., Goldhan, J., Martin, K. and Kohler, J. M., Investigation of mixture toxicity of widely used drugs caffeine and ampicillin in the presence of an ACE inhibitor on bacterial growth using droplet-based microfluidic technique. *Green Process Synth* 2013, 2, 591-601.
- [200] Sowmiah, S., Srinivasadesikan, V., Tseng, M. C. and Chu, Y. H., On the Chemical Stabilities of Ionic Liquids. *Molecules* 2009, 14, 3780-3813.
- [201] Ho, T. D., Zhang, C., Hantao, L. W. and Anderson, J. L., Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. *Anal Chem* 2014, 86, 262-285.
- [202] Muginova, S. V., Galimova, A. Z., Polyakov, A. E. and Shekhovtsova, T. N., Ionic liquids in enzymatic catalysis and biochemical methods of analysis: Capabilities and prospects. *J Anal Chem* 2010, 65, 331-351.
- [203] van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A., Biocatalysis in Ionic Liquids. *Chemical Reviews* 2007, 107, 2757-2785.
- [204] Roosen, C., Müller, P. and Greiner, L., Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Appl Microbiol Biot* 2008, 81, 607-614.
- [205] Vollmer, C. and Janiak, C., Naked metal nanoparticles from metal carbonyls in ionic liquids: Easy synthesis and stabilization. *Coordin Chem Rev* 2011, 255, 2039-2057.
- [206] Linhardt, R., Kainz, Q. M., Grass, R. N., Stark, W. J. et al., Palladium nanoparticles supported on ionic liquid modified, magnetic nanobeads - recyclable, high-capacity catalysts for alkene hydrogenation. *Rsc Adv* 2014, 4, 8541-8549.
- [207] Funfak, A., Cao, J. L., Wolfbeis, O., Martin, K. et al., Monitoring cell cultivation in microfluidic segments by optical pH sensing with a micro flow-through fluorometer using dye-doped polymer particles. *Microchim Acta* 2009, 164, 279-286.
- [208] Martin, D. S., The Oxygen Consumption of *Escherichia Coli* during the Lag and Logarithmic Phases of Growth. *The Journal of general physiology* 1932, 15, 691-708.
- [209] Ernst, W., *Schwermetallvegetation der Erde*, Stuttgart Fischer, Stuttgart, 1974.
- [210] Coleman, J. E., Zinc Proteins - Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins. *Annu Rev Biochem* 1992, 61, 897-946.
- [211] Laity, J. H., Lee, B. M. and Wright, P. E., Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struc Biol* 2001, 11, 39-46.
- [212] Culotta, V. C., Strain, J., Klomp, L. W. J., Casareno, R. L. B. et al., The copper chaperone for superoxide dismutase. *Mol Biol Cell* 1997, 8, 574-574.
- [213] Schmidt, A., Haferburg, G., Sineriz, M., Merten, D. et al., Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Chemie Der Erde-Geochemistry* 2005, 65, 131-144.
- [214] Rademacher, C. and Masepohl, B., Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology-Sgm* 2012, 158, 2451-2464.

- [215] Costa, J. S. D., Kothe, E., Abate, C. M. and Amoroso, M. J., Unraveling the *Amycolatopsis tucumanensis* copper-resistome. *Biometals* 2012, 25, 905-917.
- [216] Schmidt, A., Rzanny, M., Schmidt, A., Hagen, M. et al., GC content-independent amino acid patterns in Bacteria and Archaea. *Journal of Basic Microbiology* 2012, 52, 195-205.
- [217] Haferburg, G. and Kothe, E., Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation. *Appl Microbiol Biot* 2010, 87, 1271-1280.
- [218] Nies, A. T., Damme, K., Schaeffeler, E. and Schwab, M., Multidrug and toxin extrusion proteins as transporters of antimicrobial drugs. *Expert Opin Drug Met* 2012, 8, 1565-1577.
- [219] Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B. et al., The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 2006, 313, 1072-1077.
- [220] Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, D. R. et al., Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 1996, 15, 31-74.
- [221] Lockert, C. K., Hoagland, K. D. and Siegfried, B. D., Comparative sensitivity of freshwater algae to atrazine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2006, 76, 73-79.
- [222] Ashton, F. M., Bisalput.T and Risley, E. B., Effect of Atrazine on *Chlorella Vulgaris*. *American journal of botany* 1966, 53, 217-219.
- [223] Tang, J. X., Hoagland, K. D. and Siegfried, B. D., Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1997, 59, 631-637.
- [224] Hassall, K. A., Uptake of Copper and Its Physiological Effects on *Chlorella Vulgaris*. *Physiol Plantarum* 1963, 16, 323-332.
- [225] Bajguz, A., Suppression of *Chlorella vulgaris* Growth by Cadmium, Lead, and Copper Stress and Its Restoration by Endogenous Brassinolide. *Arch Environ Con Tox* 2011, 60, 406-416.
- [226] Mehta, S. K. and Gaur, J. P., Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol* 1999, 143, 253-259.
- [227] Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K. et al., Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 2003, 39, 1008-1018.
- [228] Scragg, A. H. and Bonnett, C., Inhibition of microalgal growth by silver nitrate. *Biotechnology Letters* 2002, 24, 169-172.
- [229] Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. and Popovic, R., Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotox Environ Safe* 2012, 78, 80-85.
- [230] Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B. et al., Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 2008, 17, 372-386.
- [231] Matorin, D. N., Todorenko, D. A., Seifullina, N. K., Zayadan, B. K. et al., Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P-700 reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology*, 2013, 82, 809-814.
- [232] Matzke, M., Gallego, J., Hassellöv, M., Jurkschat, K. et al., Effects of selected silver nanoparticles on freshwater microbial communities, in: *Effects of selected silver nanoparticles on freshwater microbial communities*, Banff, Canada, 2012.

- [233] Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F. et al., Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* 2008, 42, 8959-8964.
- [234] Sorensen, S. N. and Baun, A., Controlling silver nanoparticle exposure in algal toxicity testing - A matter of timing. *Nanotoxicology* 2014, 1-9.
- [235] Eintrag zu Coffein im Römpf Online. Georg Thieme Verlag, abgerufen am 06. Juni 2012.
- [236] Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. et al., Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999, 51, 83-133.
- [237] Degubare.T and Sleator, W., Effects of Caffeine on Mammalian Atrial Muscle and Its Interaction with Adenosine and Calcium. *J Pharmacol Exp Ther* 1965, 148, 202-214.
- [238] Willett, W. C., Sampson, L., Stampfer, M. J., Rosner, B. et al., Reproducibility and Validity of a Semiquantitative Food Frequency Questionnaire. *Am J Epidemiol* 1985, 122, 51-65.
- [239] Tesarik, J., Mendoza, C. and Carreras, A., Effects of Phosphodiesterase Inhibitors Caffeine and Pentoxifylline on Spontaneous and Stimulus-Induced Acrosome Reactions in Human Sperm. *Fertil Steril* 1992, 58, 1185-1190.
- [240] Greer, F., Hudson, R., Ross, R. and Graham, T., Caffeine ingestion decreases glucose disposal during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in sedentary humans. *Diabetes* 2001, 50, 2349-2354.
- [241] Roberts, J. J., Mechanism of potentiation by caffeine of genotoxic damage induced by physical and chemical agents. *Nucleic Acids Symp Ser* 1984, 193-215.
- [242] Selby, C. P. and Sancar, A., Mechanisms of caffeine inhibition of DNA repair in *E. coli*. *Prog Clin Biol Res* 1990, 340A, 179-193.
- [243] Sandlie, I., Solberg, K. and Kleppe, K., The effect of caffeine on cell growth and metabolism of thymidine in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1980, 73, 29-41.
- [244] Bazzaz, B. S., Lavaei, S. and Hosseinzadeh, H., Interaction of methylxanthines and gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: role of phosphodiesterase inhibition. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2012, 59, 13-20.
- [245] Bergan, T. and Carlsen, I. B., Effect of Antibiotics Eliminated by 1st Order Kinetics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1985, 15, 147-152.
- [246] Wiseman, C. L., Smadel, J. E., Hahn, F. E. and Hopps, H. E., Mode of Action of Chloramphenicol .1. Action of Chloramphenicol on Assimilation of Ammonia and on Synthesis of Proteins and Nucleic Acids in *Escherichia-Coli*. *J Bacteriol* 1954, 67, 662-673.
- [247] Chalmers, G., Kozak, G. K., Hillyer, E., Reid-Smith, R. J. et al., Low minimum inhibitory concentrations associated with the tetracycline-resistance gene *tet(C)* in *Escherichia coli*. *Can J Vet Res* 2010, 74, 145-148.
- [248] Wood, K. B. and Cluzel, P., Trade-offs between drug toxicity and benefit in the multi-antibiotic resistance system underlie optimal growth of *E. coli*. *Bmc Syst Biol* 2012, 6, 48.
- [249] Sandlie, I., Solberg, K. and Kleppe, K., The Effect of Caffeine on Cell-Growth and Metabolism of Thymidine in *Escherichia-Coli*. *Mutat Res* 1980, 73, 29-41.
- [250] Ingram, L. O. and Vreeland, N. S., Differential effects of ethanol and hexanol on the *Escherichia coli* cell envelope. *J Bacteriol* 1980, 144, 481-488.
- [251] Gage, D. J. and Neidhardt, F. C., Adaptation of *Escherichia-Coli* to the Uncoupler of Oxidative-Phosphorylation 2,4-Dinitrophenol. *J Bacteriol* 1993, 175, 7105-7108.

- 
- [252] Ford, S. R. and Switzer, R. L., Stimulation of Derepressed Enzyme-Synthesis in Bacteria by Growth on Sublethal Concentrations of Chloramphenicol. *Antimicrob Agents Ch* 1975, 7, 555-563.
- [253] Weide, H. and Aurich, H., *Allgemeine Mikrobiologie*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1979.
- [254] onmeda, *Wirkstoffbeschreibung von Tetracyclin*, 2007.
- [255] Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R. and Minaian, S., Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 2007, 3, 168-171.
- [256] Allahverdiyev, A. M., Kon, K. V., Abamor, E. S., Bagirova, M. et al., Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Rev Anti-Infe* 2011, 9, 1035-1052.
- [257] Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R. et al., Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2010, 6, 103-109.
- [258] Kora, A. J. and Rastogi, L., Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorg Chem Appl* 2013, 2013, 871097.
- [259] Hagenbuch, I. M. and Pinckney, J. L., Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Res* 2012, 46, 5028-5036.
- [260] Liu, Y., Zhang, J., Gao, B. and Feng, S., Combined effects of two antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa*. *J Hazard Mater* 2014, 279, 148-155.



## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AMP	Ampicillin
BBM	Bold`s Basal Medium
Bpb	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
CA	Konzentrationsadditivität
CMP	Chloramphenicol
CR	Cochenille Rot A
u. a.	unter anderem
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
EC <sub>50</sub>	50% Effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FDA	Flavinadenindinukleotid
FEP	Fluorethylenpropylen
FKS	Fötales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IA	unabhängigen Wirkung (independent action)
IK	Indigokarmin
IM16	1-hexyl-3-methylimidazolium bis (trifluoro-methyl-sulfonyl) amide
LB	lysogeny broth
LoC	Lab on a Chip
MIC	minimale Hemmkonzentration
MST	micro systems technology
μTAS	micro Total Analysis System

NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NOEC	No Observed Effect Concentration
OD	Optische Dichte
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OG	Orange G
PB	Patentblau
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEEK	Polyetheretherketone
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
QSAR	quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute
SF	Säurefuchsin
TET	Tetracyclin
TG	Titangelb
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Mischung Volumen zu Volumen
w/w	Mischung Gewicht zu Gewicht



## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Dosis Wirkungs-Beziehungen nach Connell and Miller.....	7
Abbildung 2.2	Konzept der Kombinationswirkungen.....	9
Abbildung 2.3	Darstellung binärer Mischungen.....	11
Abbildung 2.4	Zwei Typen von segmentiertem Fluss im Mikrokanal.....	13
Abbildung 2.5	Strukturen für Tropfenerzeugung.....	14
Abbildung 2.6	Entkopplung von Mikrofluidkompartimenten.....	15
Abbildung 2.7	Grenzflächenspannung.....	16
Abbildung 2.8	Segmentinterne Transportprozesse.....	17
Abbildung 2.9	Schematische Darstellung der Generierung von Konzentrationsgradienten in segmentbasierten Mikrofluidsystemen.....	19
Abbildung 3.1	Labora Aufbau des Mikrofluidsystems für die Erzeugung und Charakterisierung von ein- bis dreidimensionalen Parameterfeldern.....	29
Abbildung 3.2	Kompaktes Mikrofluidsystems für die Erzeugung und Charakterisierung von Mikrofluidsegmenten.....	30
Abbildung 3.3	Pumpenverlauf für die kontinuierliche Erzeugung von Konzentrationsgradienten.....	35
Abbildung 3.4	Pumpenverlauf für das Screening von drei Wirkstoffen mit 20% Konzentrationsabstufungen.....	35
Abbildung 3.5	Flussdiagramm zur Datenverarbeitung der Segmentsequenzen.....	36
Abbildung 3.6	Mikrodurchflussphotometer zur schnellen optischen Charakterisierung von mikrofluidischen Segmentsequenzen.....	39
Abbildung 3.7	Mikrodurchflussfluorimeter zur schnellen optischen Charakterisierung für mikrofluidische Segmentsequenzen.....	41
Abbildung 3.8	Kontaktlose Monitoring auf mikrobiotechnische Prozesse im Mikrofluidsegment mittels Sensorpartikel.....	42
Abbildung 3.9	Optische Spektren von PS-ptTFPP-Beads.....	43
Abbildung 3.10	Optische Spektren von PS-PtTPTBP-Beads.....	44
Abbildung 3.11	Allgemeine Versuchsanordnung für Experimente mit IPC-81.....	45
Abbildung 3.12	Mikrofluidische Versuchsanordnung für <i>Str. acidiscabies</i> E13 und <i>Str. tendae</i> F4.....	48
Abbildung 3.13	Pumpenverlauf zur Erzeugung eines 2D-Konzentrationsraumes mit 81 Konzentrationskombinationen.....	49
Abbildung 3.14	Pumpenverlauf zur Erzeugung eines 2D-Konzentrationsraumes mit 121 Konzentrationskombinationen.....	51
Abbildung 4.1	Untersuchung der Abhängigkeit des Singal/Rausch-Verhältnisses von der Beschleunigungsspannung des Photomultipliers.....	55
Abbildung 4.2	Hochaufgelöste Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen.....	56
Abbildung 4.3	Aktuelle Anordnung des Kompaktaufbaus.....	57

---

Abbildung 4.4	Druckverlusttest von TECAN-Centris-Pumpen .....	58
Abbildung 4.5	Kontinuierliche Flussratenänderung der Farbstoffkonzentration Cochenille Rot A gemessen mit Mikrodurchflussphotometer .....	58
Abbildung 4.6	Pumpenverlauf für das Screening von drei Indikatorfarbstoffen.....	60
Abbildung 4.7	3D-Farbstoffverifikation des Laboraufbaus (Cetoni nemeSYS) mit einer Segmentsequenz von 5.000 Segmenten .....	61
Abbildung 4.8	Realisierung eines fünfdimensionalen Konzentrationsraumes.....	62
Abbildung 4.9	Realisierung zweidimensionaler Konzentrationsräume mit schrittweiser Flussratenänderung.....	64
Abbildung 4.10	3D-Farbstoffverifikation des Kompaktaufbaus.....	64
Abbildung 4.11	Ermittlung der Wachstumskinetik von IPC-81-Zellen.....	67
Abbildung 4.12	Wirkung von ionischen Flüssigkeiten IM16 an der IPC-81-Zellen .....	68
Abbildung 4.13	Wirkung von Carbendazim an der IPC-81-Zellen.....	69
Abbildung 4.14	Auswirkungen von Schlauchgeometrie und Gaszusammensetzung auf die Phosphoreszenzintensität von PS-PtTFPP im Mikrofluidsegment .....	71
Abbildung 4.15	Sauerstoffverbrauch während des <i>E. coli</i> Wachstums im Mikrofluidsegment .....	72
Abbildung 4.16	Ermittlung des Wachstums und des pO <sub>2</sub> -Werts mittels Sensorbeads bei der Kultivierung von <i>Str. acidiscabies</i> E13 im Mikrofluidsegment.....	73
Abbildung 4.17	Überwachung von Wachstum und Stoffwechselaktivität zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten von <i>Psychrobacillus</i> <i>psychrodurans</i> UrPLO1-kultiviert im Mikrofluidsegment.....	74
Abbildung 4.18	Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Kurven von CuCl <sub>2</sub> auf <i>Psychrobacillus</i> <i>psychrodurans</i> UrPLO1 im Mikrofluidsegment .....	76
Abbildung 4.19	Ermittlung der Wachstumskinetik von <i>Str. acidiscabies</i> E13 und <i>Str. tendae</i> F4.....	77
Abbildung 4.20	Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Kurven für ZnSO <sub>4</sub> am <i>Str. acidiscabies</i> E13 und <i>Str. tendae</i> F4.....	78
Abbildung 4.21	Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Kurven für CuSO <sub>4</sub> am <i>Str. acidiscabies</i> E13 und <i>Str. tendae</i> F4.....	80
Abbildung 4.22	Kombinatorischer Effekt von CuSO <sub>4</sub> und ZnSO <sub>4</sub> am <i>Str. tendae</i> F4.....	80
Abbildung 4.23	Hochaufgelöste eindimensionale Dosis-Wirkungs-Kurve für ZnSO <sub>4</sub> bei konstante CuSO <sub>4</sub> -Konzentration.....	81
Abbildung 4.24	Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Testsubstanzen Atrazin, Alachlor und CuCl <sub>2</sub> an der <i>Chlorella vulgaris</i> .....	83
Abbildung 4.25	Dosis-Wirkungs-Beziehung von Tween 20 an der <i>C. vulgaris</i> .....	84
Abbildung 4.26	UV/VIS Absorptionsspektrum von AgNP und AuNP in BBM Medium.....	85
Abbildung 4.27	Einzelwirkung von Silbernanopartikel und Goldnanopartikel auf die Stoffwechselaktivität von <i>C. vulgaris</i> .....	86
Abbildung 4.28	2D-Plot des binären Gemisches AuNP und Atrazin an der <i>C. vulgaris</i> .....	87
Abbildung 4.29	2D-Plot des binären Gemisches AuNP und AgNP an der <i>C. vulgaris</i> .....	88

---

Abbildung 4.30	2D-Plot des binären Gemisches AgNP und Atrazin an der <i>C. vulgaris</i> .....89
Abbildung 4.31	Dosis-Wirkungs-Kurven am <i>E. coli</i> in Abhängigkeit von der Chloramphenicol- und Coffein-Konzentration .....92
Abbildung 4.32	2D-Plots der binären Gemische Chloramphenicol+Lovastatin und Coffein+Lovastatin für den Modellorganismus <i>E. coli</i> .....93
Abbildung 4.33	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der binären Gemische Coffein+Tetracyclin und Coffein+Chloramphenicol am <i>E. coli</i> .....94
Abbildung 4.34	Dosis-Wirkungs-Beziehung des binären Gemisches Ampicillin und Ethanol am <i>E. coli</i> .....94
Abbildung 4.35	Dosis-Wirkungs-Beziehung von Chloramphenicol und Tetracyclin am <i>E. coli</i> .....95
Abbildung 4.36	Ternäre Gemische DNP, Chloramphenicol und Coffein von <i>E. coli</i> kultiviert im Mikrosegment .....97
Abbildung 4.37	Isobolen-Diagramme von Coffein und Chloramphenicol am <i>E. coli</i> und Vergleich der Endpunktbestimmung zwischen optischer Dichte und Fluoreszenzmessung .....98
Abbildung 4.38	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der ternären Mischung von Coffein, Chloramphenicol und DNP für den Modellorganismus <i>E. coli</i> .....98
Abbildung 4.39	3D-Plot des ternären Gemisches Ampicillin, Chloramphenicol und Silbernanopartikel für den Parameter Autofluoreszenz am <i>E. coli</i> .....101
Abbildung 4.40	Dosis-Wirkungs-Beziehungen des ternären Gemisches Ampicillin, Chloramphenicol und Silbernanopartikel am <i>E. coli</i> .....102
Abbildung 4.41	Ternäre Gemische Ampicillin, Captopril und Coffein von <i>E. coli</i> kultiviert im Segment .....103
Abbildung 4.42	3D-Plot des ternären Gemisches Ampicillin, Captopril und Coffein nach 24 h <i>E. coli</i> -Kultivierung im Segment.....104

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Mikrotoxikologische Studien in Mikrofluidsegmenten .....	20
Tabelle 3.1	Chemikalien .....	21
Tabelle 3.2	Lösungen.....	26
Tabelle 3.3	Geräte .....	27
Tabelle 3.4	Verbindungselemente für Erzeugung von Mikrofluidsegmenten .....	28
Tabelle 3.5	Auflistung aller Komponenten des Kompaktaufbaus.....	31
Tabelle 3.6	Beispiele von Konzentrationsräumen.....	34
Tabelle 3.7	Zwei-Punkt-Kalibrierung von PS-PtTPTBP für 0% und 100% Luftsättigung.....	44
Tabelle 3.8	Übersicht der durchgeführten toxikologischen Screenings an <i>C. vulgaris</i> ...	51
Tabelle 3.9	Übersicht der Kombinations screenings am <i>E. coli</i> im Segment .....	53
Tabelle 4.1	Spezifikation der verwendeten Pumpensysteme.....	65
Tabelle 4.2	Zusammenfassung der ermittelten EC <sub>50</sub> -Werte für einzelne Substanzen am <i>E. coli</i> kultiviert im Segment .....	91

## 7.4 Experimentelles

### 7.4.1 Herstellungsvorschrift von Goldnanopartikel<sup>21</sup>

Folgende Chemikalien wurden für die Herstellung eingesetzt:

$K_2CO_3$  (Kaliumcarbonat)  $M=138,21$  g/mol  
 $HAuCl_4$  (Tetrachloridgoldsäure)  $M=339,785$  g/mol  
Reduktionsmittel  $NaBH_4$  (Natriumborhydrid)  $M=37,83$  g/mol

Herstellungsschritte:

Lösungsherstellung: 4%  $HAuCl_4$ ,  
10 ml 200 mM  $K_2CO_3$  (Kühlschrank)  
10 ml 10 mM  $NaBH_4$  (mit **kaltes dd.  $H_2O$**  herstellen und im  
Kühlschrank lagern)

Zusammensetzung (52,5 ml Lösung): 50 ml und 100 ml Reagenzflasche vorbereiten,  
davon die 100 ml Reagenzflasche mit **Magnetprüher** soll im **EISBAD** stehen lassen.

- 1 187,5  $\mu$ l 4%tige Lösung von  $HAuCl_4$
- 2 250  $\mu$ l 200 mM  $K_2CO_3$
- 3 mit **kaltes dd.  $H_2O$**  auf 50 ml auffüllen
- 4 gleich danach vorsichtig auf 100 ml Reagenzflasche mit  
Magnetprüher (steht im Eisbad) überführen
- 5 direkt nach der Überführung wurde **5 x 500  $\mu$ l** 10 mM  $NaBH_4$  je  
**45-60s** zugegeben.
- 6 Anschließende wurde die Lösung **60 min** im **EISBAD**  
**lichtgeschützt** gerührt.

Nach der Herstellung wurde die AuNP im Zimmertemperatur und lichtgeschützt  
gelagert.

---

<sup>21</sup> Herstellungsvorlage von A. Knauer, TU Ilmenau

#### 7.4.2 Herstellungsvorschrift von Silbernanopartikel<sup>22</sup>

Folgende Chemikalien wurden für die Herstellung eingesetzt:

AgNO<sub>3</sub> M=169,87 g/mol

NatCit (tri-Natriumcitrat-Dihydrat) zum stabilisieren M=294,10 g/mol

Reduktionsmittel NaBH<sub>4</sub> M=37,83 g/mol

Herstellungsschritte:

Lösungsherstellung: 10ml 100 mM AgNO<sub>3</sub> (gleich lichtgeschützt im Kühlschrank),

10 ml 25 mM NatCit (Kühlschrank)

10 ml 10mM NaBH<sub>4</sub> (mit **kaltes dd. H<sub>2</sub>O** herstellen und im Kühlschrank)

Zusammensetzung (52,5 ml Lösung): mit 50 ml und 100 ml Reagenzflasche, davon die 100 ml Reagenzflasche mit **Magnetrührer** soll im **EISBAD** lassen und **Lichtgeschützt** sein.

- 1 187,5 µl 100 mM AgNO<sub>3</sub>
- 2 250 µl 25 mM NatCit
- 3 mit **kaltes dd. H<sub>2</sub>O** (die bereits 0,1% Tween 20 Endkonzentration enthalten) auf 50 ml auffüllen
- 4 gleich danach vorsichtig auf 100 ml Reagenzflasche mit Magnetrührer (steht im EISBAD) überführen
- 5 direkt nach der Überführung wurde **5x 500 µl** 10 mM NaBH<sub>4</sub> je **45-60s** zugegeben.
- 6 Anschließende wurden die Lösung **15-20 min** im **EISBAD lichtgeschützt** gerührt.

Nach der Herstellung wurde die AgNP im Kühlschrank und lichtgeschützt gelagert.

---

<sup>22</sup> Herstellungsvorlage von A. Knauer, TU Ilmenau

### 7.4.3 Größenverteilung Metallnanopartikel DCS-Messung

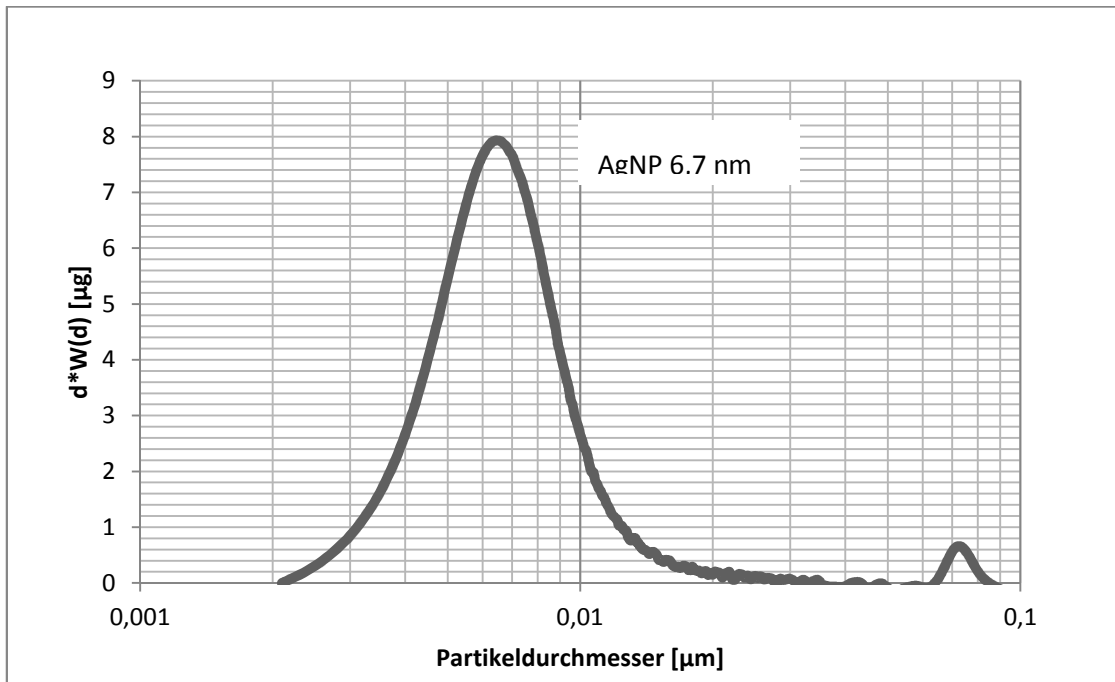


Abbildung 7.1: Gewichtsbezogene Größenverteilung von Silbernanopartikel mit 0,1% Tween20, DCS-Messung

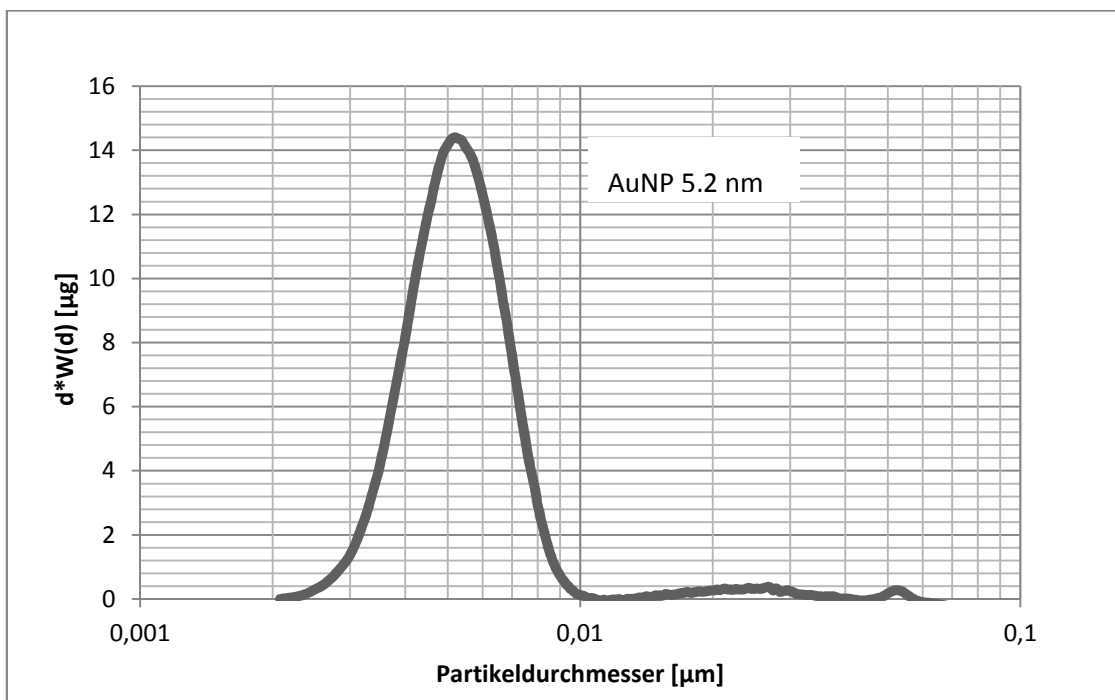


Abbildung 7.2: Gewichtsbezogene Größenverteilung von Goldnanopartikel, DCS-Messung

#### 7.4.4 Konzentrationsberechnung für Metallnanopartikel<sup>23</sup>

Folgende Berechnungsvorlage wurde von A. Knauer (FG Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau) zur Verfügung gestellt.

Annahme: Alle Metall-Ionen werden zu  $M_0$  reduziert.

Anzahl an Metall-Atome pro Liter:

$$N = n * N_A$$

$$N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

Anzahl der Metall-Atome in einem Metall-NP mit einem definierten Durchmesser

- für kugelförmige Partikel
- unter Berücksichtigung der Ausbildung eines kubisch flächenzentrierten Kristallgitters (kfz-Gitter) mit einer Raumerfüllung von 74% aufgrund der kubisch dichtesten Kugelpackung

$$R(\text{Au-Atom}) = 0,144 \text{ nm}$$

$$R(\text{Ag-Atom}) = 0,153 \text{ nm}$$

$R(\text{Metall-NP}) =$  Ergebnis CPS (Für die Berechnung wurde der NP-Durchmesser verwendet, in denen das meiste Material gebunden sind)

$$V(\text{Metall-Atom}) = \frac{4}{3} * \pi * R_{\text{Atom}}^3 \quad [m^3]$$

$$V(\text{Metall-NP}) = \frac{4}{3} * \pi * R_{\text{NP}}^3 \quad [m^3]$$

Anzahl an Metall-Atomen pro Metall-NP:

$$N = \frac{V(\text{Metall-NP})}{V(\text{Metall-Atom})} * 0.74$$

Anzahl an Metall-NP pro Liter:

$$A = \frac{N(\text{Metall-Atom/Liter})}{N(\text{Au-Atome/NP})} \quad \left[ \frac{\text{NP}}{\text{l}} \right]$$

Konzentration der Metallnanopartikel

$$n(\text{Metall-NP}) = \frac{A}{N_A} \quad \left[ \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]$$

<sup>23</sup> Berechnungsvorlage von A. Knauer, TU Ilmenau



## 7.5 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### 7.5.1 Buchbeiträge

**J. Cao**, D. Kürsten, A. Funfak, S. Schneider and J.M. Köhler, "Characterization of Combinatorial Effects of Toxic Substances by Cell Cultivation in Micro Segmented Flow" (Title of Book: Micro-Segmented Flow for Chemical and Biological Applications), Publisher: Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering Springer, 2013, 203-230, ISBN 978-3-642-38780-7

J.M. Köhler, A. Funfak, **J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, P.M. Günther, "Addressing of Concentration Spaces for Bioscreenings by Micro Segmented Flow with Microphotometric and Microfluorimetric Detection", (Title of Book: Optical Nan- and Microsystems for Bioanalytics), Publisher: Springer Berlin Heidelberg, 01/2012, 47-81, ISBN: 978-3-642-25497-0

### 7.5.2 Zeitschriftenbeiträge

**J. Cao**, J. M. Köhler, "Droplet-based Microfluidics for Microtoxicological Studie", Review, Eng. Life Sci., **2015**, DOI:10.1002/elsc.201400074

K. Wetzels, **J. Cao**, E. Kothe, J. M. Köhler, "Changing growth behavior of heavy-metal tolerant bacteria: Media optimization using droplet-based microfluidics", Eng. Life Sci., **2015**, DOI:10.1002/elsc.201400230

**J. Cao**, S. Nagl, E. Kothe and J.M. Köhler, "Application of oxygen sensor microparticles for monitoring bacterial growth and characterization of dose/response functions in microfluidic screenings", Microchim Acta, **2014**, 182(1), 385-394

**J. Cao**, R. Schultheiß, S. Schneider, A. Schober, J.M. Köhler and G.A. Groß "'DROP-BY-DROP' - TOOLS FOR DROPLET-BASED MICRO-FLUIDIC PROCESSING", Microsyst Technol., **2015**, 21, 539-548

**J. Cao**, J. Goldhan, K. Martin and J. M. Köhler, "Investigation of mixture toxicity of widely used drugs caffeine and ampicillin in the presence of an ACE inhibitor on bacterial growth using droplet-based microfluidic technique", Green Processing and Synthesis, **2013**, 2(6), 591-601

**J. Cao**, D. Kürsten, K. Krause, E. Kothe, K. Martin, M. Roth and J.M. Köhler, "Application of Micro-Segmented Flow for Two-dimensional Characterization of the Combinatorial Effect of Zinc and Copper Ions on Metal-tolerant *Streptomyces* Strains", Appl. Microbiol. Biotechnol., **2013**, 97(20), 8923-8930

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Steffen, A. Knauer, P.M. Günther, J.M. Köhler, "Uncovering toxicological complexity by multi-dimensional screenings in micro segmented flow: Modulation of antibiotic interference by nano particles", Lab Chip, **2012**, 12 (3), 474-484

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, and J.M. Köhler, "Stimulation and Inhibition of Bacterial Growth by Caffeine Dependent on Chloramphenicol and a Phenolic Uncoupler—A Ternary Toxicity Study Using a Microfluid Segment Technique", J. Biomed. Nanotechnol. **2012**, 8 (5), 770-778

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, A. Knauer, K. Martin and J.M. Köhler, "A ternary toxicity study using microfluid segment technique", Toxicol. Lett. **2012**, 211S, 148

D. Kürsten, **J. Cao**, A. Funfak, P. Müller, J.M. Köhler, "Cultivation of *Chlorella vulgaris* in micro fluid segments and micro toxicological determination of their sensitivity against  $\text{CuCl}_2$  in the nanoliter range", *Engineering in Life Science*, **2011**, 11(6), 580-587

J.M. Köhler, P.M. Günther, A. Funfak, **J. Cao**, A. Knauer, S. Li, S. Schneider and G.A. Gross, "From Droplets and Particles to Hierarchical Spatial Organization: Nanotechnology Challenges for Microfluidics", *Journal of Physical Science and Application*, **2011**, 1, 125-134

A. Funfak, **J. Cao**, A. Knauer, K. Martin, J.M. Köhler, "Synergistic effects of metal nanoparticles and a phenolic uncoupler using microdroplet-based two-dimensional approach", *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MONITORING*, **2011**, 13(2), 410-415

A. Funfak, **J. Cao**, S. Li, A. Knauer, O.S. Wolfbeis, Z. Chang, C. Serra und J.M. Köhler, "Datentransfer aus fluidischen Mikrokompartmenten: Mikro- und Nanopartikel als optochemische Primärtransducer in der miniaturisierten Biotechnologie", 15. Heiligenstädter Kolloquium, Heilbad Heiligenstadt, September 27-29, **2010**, Konferenzband ISBN: 978-3-00-032249-5, 273-284

**J. Cao**, A. Funfak, R. Meier, O. S. Wolfbeis, K. Martin, J.M. Köhler, "Mikrotoxikologische Screenings in Mikrofluidsegmenten mit Fluoreszenzmikrobeads", 9. Dresdner Sensor Symposium, Dresden, Dezember 7 - 9, **2009**, Dresdner Beiträge zur Sensorik, Konferenzband 39

**J. Cao**, A. Funfak, S. Schneider, K. Martin, O.S. Wolfbeis, J.M. Köhler, "Nicht-invasive Signaltransduktion mit Sensorbeads für das toxikologische Screening in der Mikrofluidsegment-Technik", Mikrosystemtechnik-Kongress 2009, Berlin, 12. - 14. Oktober **2009**, Konferenzband

A. Funfak, R. Hartung, **J. Cao**, K. Martin, K.-H. Wiesmüller, O.S. Wolfbeis and J.M. Köhler, "Highly resolved dose-response functions for drug-modulated bacteria cultivation obtained by fluorometric and photometric flow-through sensing in microsegmented flow", *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2009**, 142(1), 66-72

A. Funfak, **J. Cao**, Otto S. Wolfbeis, K. Martin, J.M. Köhler, "Monitoring cell cultivation in microfluidic segments by optical pH sensing with a micro flow-through fluorometer using dye-doped polymer particles", *Microchimica Acta*, **2009**, 164, 279 – 286

M. Amberg, A. Grewe, **J. Cao**, J.M. Köhler, S. Sinzinger, "Planar integrated free-space optical fluorescence detector for micro fluidic applications", *DGaO-Proceedings. - Erlangen-Nürnberg: Dt. Gesellschaft für angewandte Optik*, **2009**, 110, C25, ISSN 1614-8436

### 7.5.3 Vorträge

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, K. Martin and J.M. Köhler "Mikrofluidische Systeme mit integrierter Multisensorik für mehrdimensionale toxikologische Screening", 8. Deutsches BioSensor Symposium, Wildau, März 10-13, **2013** (Vortrag)

**J. Cao**, A. Knauer and J.M. Köhler "Independent, additive, synergistic and complex response behaviour of microorganisms on toxic mixtures characterized by micro fluid segment technique", 23<sup>rd</sup> SETAC Europe Annual Meeting, Glasgow, Mai 12-16, **2013** (Vortrag)

**J. Cao**, J. Goldhan, D. Kürsten, S. Schneider, K. Martin and J. M. Köhler "Microfluid Segment Technique for Toxicity Evaluation of Combinatorial Effects", 2nd International Conference IMPLEMENTATION OF MICROREACTOR TECHNOLOGY IN BIOTECHNOLOGY, Cavtat Kroatien, Mai 5-8, **2013** (Vortrag)

**J. Cao**, S. Schneider and J.M. Köhler "Mikrofluidische Kompaktanordnung für das mehrdimensionale umwelttoxikologische Screening", 117. Stipendiatenseminar der Deutschen Bundesstiftung Umwelt in der Internationalen Naturschutzakademie Vilm (INA), Mai 26-31, **2013** (Vortrag)

**J. Cao**, A. Funfak, D. Kürsten, A. Knauer and J.M. Köhler, "Charakterisierung von Kombinationswirkungen in Nanoliter-Fluidsegmenten und Anwendung auf die Bewertung toxischer Effekte durch Silber-Nanopartikel", 13<sup>th</sup> Leibniz conference of advanced science" – Nanoscience 2012-, Lichtenwalde (Sachsen), April 26-27, **2012** (VORTRAG)

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, A. Knauer, K. Martin and J.M. Köhler, " Stimulation and Inhibition of bacterial growth by caffeine dependent on antibiotics and silver nanoparticles – a ternary toxicity study using a microfluid segment technique", 6<sup>th</sup> SETAC world congress Berlin, Mai 20-24, **2012** (VORTRAG)

**J. Cao**, D. Kürsten, A. Funfak, S. Schneider, K. Martin, J.M. Köhler "Uncovering toxicological complexity by multi-dimensional screenings in micro segmented flow by using optical flow sensors", 3st international Workshop "Novel Developments and Applications in Sensor Technology", Coburg, September 14-16, **2011** (VORTRAG)

**J. Cao**, "Mikrofluidische Anordnung für das umwelttoxikologische Screening", 107. Stipendiatenseminar der Deutschen Bundesstiftung Umwelt in Bad Bederkesa/ Niedersachsen, August 29–September 02, **2011** (VORTRAG)

**J. Cao**, M. Günter, S. Schneider, F. Möller, K. Martin, J.M. Köhler "Erzeugung und Charakterisierung von Mikrofluidsegmenten für Zellkulturexperimente im unteren Nanoliterbereich", 5. Jahrestagung Arbeitskreis BioMST und Lifesciences e.V., München, Juni 23-24, **2009** (VORTRAG)

**J. Cao**, "Kompaktes mikrofluidisches Screeningsystem mit integrierter Multisensorik für multiple Endpunktbestimmung in der miniaturisierten Umwelttoxikologie" 94. Stipendiatenseminar der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) in Papenburg, August 31 – September 04, **2009** (VORTRAG)

**J. Cao**, A. Funfak, S. Schneider, K. Martin , R. Meier, O. S. Wolfbeis, J. M. Köhler "Bead-based optical sensing for toxicological screenings with microfluid segment sequences", 1<sup>st</sup> international Workshop "Novel Developments and Applications in Sensor Technology", Coburg, September 14-16, **2009** (VORTRAG)

**J. Cao**, A. Funfak, K. Martin , O. S. Wolfbeis, J. M. Köhler " One- and two-dimensional microtoxicological screenings in nanoliter-fluid segment sequences with fast micro photometric and bead-based fluorimetric read-out", 9<sup>th</sup> Leibniz conference of advanced science", Lichtenwalde (Sachsen), October 15-17, **2009** (VORTRAG)

**J. Cao**, A. Funfak, R. Meier, O. S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler "Mikrotoxikologische Screenings in Mikrofluidsegmenten mit Fluoreszenzmikrobeads", 9. Dresdner Sensor Symposium, Dresden, Dezember 7-9, **2009** (VORTRAG)

#### **7.5.4 Poster**

**J. Cao**, D. Kürsten and J. M. Köhler "Micro Fluid Segment Technique – Application in Microtoxicology and Potential for Investigation of Interaction of Microorganisms", 12<sup>th</sup> Symposium on Bacterial Genetics and Ecology BAGECO12", Ljubljana, Slovenia, Juni 9-13, **2013** (Poster)

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider and J. M. Köhler "Cultivation and micro toxicological screenings of *Chlorella vulgaris* in microfluid segments", 6th Workshop "Chemical and Biological Micro Laboratory Technology", Elgersburg, März 20-22, **2012** (Poster)

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, A. Knauer, K. Martin and J. M. Köhler, "A ternary toxicity study using microfluid segment technique", 48th EUROTOX Congress 2012, Stockholm Sweden, Juni 17-20, **2012** (Poster)

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider and J. M. Köhler "Analysis of Algal toxicity of Binary Combinations of Pesticides and CuCl<sub>2</sub> using Microdroplet-based Multidimensional Screening", 8. Jahrestagung BioMST, Ilmenau, Juni 19-21, **2012** (Poster)

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, A. Knauer and J. M. Köhler "Binary and Ternary Toxicity Study of Heavy metal ion, Atrazine and Silver nanoparticles using Microfluid Segment Technique", 1th Workshop -NanoMed- Safety of Nanoscale Materials in Medicine, Jena, Juni 26-27, **2012** (Poster)

**J. Cao**, J. Goldhan, S. Schneider, K. Martin and J. M. Köhler "Risk enhancement by caffeine-consumption: drug-caffeine interference detected by microcombinatorial screenings using micro fluid segment technique", 23<sup>th</sup> Micromechanics and Microsystems Europe Workshop Workshop, Ilmenau, September 9-12, **2012** (Poster)

**J. Cao**, D. Kürsten, S. Schneider, A. Knauer, C. Steinweg and J. M. Köhler "Estimation the toxicity of combinatorial substances using microfluid segment technique" 3<sup>th</sup> International Conference on Sustainable Pharmacy, Osnabrück, Nov. 19-20, **2012** (Poster)

**J. Cao**, A. Funfak, S. Schneider, O.S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler "Berührungsfreie pO<sub>2</sub>-Bestimmung in Mikrofluidsegmenten mittels Mikrosensorbeads für die Charakterisierung der Aktivität von Zellkulturen bei mikrotoxikologischen Untersuchungen", 7. Jahrestagung des Vereins "Arbeitskreis Mikrosysteme für Biotechnologie und Lifesciences e.V.", Hamm, Juni 21 - 22, **2011** (Poster)

**J. Cao**, A. Funfak, O.S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler "Bead-basiertes pH- und pO<sub>2</sub>-Monitoring für zeitaufgelöste mikrotoxikologische Screenings in Mikrofluidsegmenten", 5. Workshop chemische und biologische Mikrolabortechnik, Elgersburg, Februar 22-25, **2010** (Poster)

**J. Cao**, A. Funfak, O.S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler "Microtoxicological screenings in nanoliter-fluid segment sequence with fast micro photometric and beadbased fluorimetric read-out", 20th anniversary world congress on biosensors, Glasgow, UK, Mai 26-28, **2010** (Poster)

**J. Cao**, A. Funfak, S. Schneider, O.S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler "Berührungsfreie pO<sub>2</sub>-Bestimmung in Mikrofluidsegmenten mittels Mikrosensorbeads für die Charakterisierung der Aktivität von Zellkulturen bei mikrotoxikologischen Untersuchungen", 15. Heiligenstädter Kolloquium, Heilbad Heiligenstadt, September 27-29, **2010** (Poster)

**J. Cao**, A. Funfak, S. Schneider, K. Martin, O. S. Wolfbeis, J. M. Köhler " Nicht-invasive Signaltransduktion mit Sensorbeads für das toxikologische Screening in der Mikrofluidsegment-Technik", Mikrosystemtechnik-Kongress 2009, Berlin, October 12-14, **2009** (Poster)

## 7.6 Lebenslauf

### ZUR PERSON

Vor- und Zuname: Jialan Cao  
 Geburtsdatum und –ort: 12.02.1979/Shanghai, China  
 Staatsangehörigkeit: chinesisch  
 Familienstand: verheiratet, zwei Kinder  
 Anschrift: Goetheallee 2, 98693 Ilmenau  
 E-Mail: jialan.cao@gmx.de



### BERUFLICHER WERDEGANG

01/2010 – 10/2014 Doktorandin an der TU Ilmenau, FG physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik, (Stipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, AZ: 20009/009)  
 Thema: „*Kompaktes mikrofluidisches System für mehrdimensionale Screening in der miniaturisierten Umwelttoxikologie*“

02/2008 – 12/2009 TU Ilmenau, Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Projekt OptiMi/SERIZELL

07/2007 – 02/2008 Diplomarbeit: „*Nanodiagnostik in Fluidsystemen: optische pH-Auslesung in Nanoliterfluidsegmenten*“ (1,6)

05/2006 – 09/2006 Weiterbildungsveranstaltung im Strahlenschutz und Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz

10/2005 – 04/2006 Studienjahresarbeit: „*Dichtebestimmung am Computertomograph mittels Prüfphantom – Vergleich verschiedener Elektrodendichten an verschiedenen CT Geräten*“ (2,0)

10/2004 – 03/2005 Gemeinschaftspraxis für Strahlentherapie und Radioonkologie, Erfurt, Praktikant

10/2001 – 02/2008 Elektro- und Informationstechnikstudium an der TU Ilmenau, Fachrichtung: Biomedizintechnik

05/2000 – 09/2001 Deutsch Sprachkurs für den Hochschulzugang



# Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Dipl.-Ing. Steffen Schneider, TU Ilmenau

- Entwicklung eines Mehrkanalphotometer und Fluorimeter, Inbetriebnahme von Cetonipumpen und Tecanpumpen, Programmierung der Auswertungsprogramms für die Analyse in Mikrofluidsegmenten.

2. Dr. Stefan Nagl, pO<sub>2</sub>-Beads

- Die Aussagen und Diagramme über Beadseigenschaften wurden mit ihm gemeinsam entwickelt.

3. Dipl.-Phys. Andrea Knauer, TU Ilmenau

- Herstellung und CPS-Messung der Nanopartikel.

4. MSc. Juliane Goldhan, TU Ilmenau

- Untersuchung der Coffein-Kompatibilität bei der Anwendung von Antibiotika (im Rahmen der Bachelorarbeit im FG Physikalische Chemie/MRT, Betreuer: J. Cao, J.M. Köhler)

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalte der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich bin darauf hingewiesen worden, dass die Unrichtigkeit der vorstehenden Erklärung als Täuschungsversuch angesehen wird und gemäß § 7 Abs. 10 der Promotionsordnung den Abbruch des Promotionsverfahrens zu Folge hat.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)