



UPPSALA  
UNIVERSITET

UPTEC W1205

Examensarbete 30 hp  
November 2012

# Biosensorsystem för övervakning av vattenkvalitet

Biosensor system for monitoring of water  
quality

---

Alexandro Martini

# Referat

Biosensorsystem för övervakning av vattenkvalitet

*Alexandro Martini*

Sveriges dricksvattenkvalitet anses vara hög delvis tack vare högkvalitativt råvatten samt en välutvecklad VA-infrastruktur. Trots detta förekommer vattensmitta som skulle kunna förhindras genom installation av ett välutvecklat förvarningssystem. Några av de större aktörerna inom dricksvattenproduktion har redan investerat i olika typer av förvarningssystem för att garantera ett dricksvatten av hög kvalitet. Det finns olika former av förvarningssystem där automatisk övervakning av *E. Coli* är ett intressant alternativ. Idag finns teknik som möjliggör denna typ av mätning men den är ofta dyr och ibland långsam.

Detta arbete syftar till att undersöka om fenomenet Extraordinary Optical Transmission (EOT) kan principiellt användas som teknik i sensorer för realtidsmätning av indikatorer på fekalt förorenat vatten. EOT som mätprincip undersöks i laborationsmiljö för att se ifall detektion kan uppnås i vätskefas. EOT innebär en förhöjd transmission som uppkommer på grund av plasmonresonans. Undersökningen genomfördes genom att utföra verifierande mätningar genom spektrofotometri för att påvisa EOT. Efter detta genomfördes biomätningar för att principiellt visa att ytan av provet kan funktionaliseras för att i framtiden ge möjlighet att välja de analyter som skall detekteras.

De verifierande mätningarna visade att EOT kunde påvisas för ett av fem prov där hålstorleken var 400 nm och hålavståndet 600 nm. Detta kunde ske eftersom signalstyrkan var tillräckligt hög samtidigt som fenomenet inföll inom mätintervallet för mätinstrumenten. Proven betecknas sPa där s anger hålstorlek i nm och a hålavstånd i nm. Signalstyrkan för provet 140P600 samt 200P600 var för låg för att det skulle gå att avgöra om EOT inträffade. För proverna 400P1000 samt 600P1000 visade beräkningar att EOT inträffade utanför mätintervallet vilket innebar att EOT inte kunde mätas. Prov 400P600 valdes för att genomföra biomätningar där ytan funktionaliserades med Biotin Bovine Serum Albumin (B-BSA) för att senare binda fluidMAG Streptavidin. Både B-BSA och Streptavidin blev inbundet vilket visades genom kinetiskmätningar.

Nyckelord: Extraordinary transmission effect (EOT), plasmon, dricksvatten, realtidsmätning

# Abstract

Biosensor system for monitoring of water quality

*Alexandro Martini*

Sweden's drinking water quality is considered to be high partly due to a high quality of the raw water and a well developed sewage infrastructure. Despite this, there is water contamination that could be prevented by installation of a sophisticated early warning system. Some of the major players in the production of drinking water have already invested in different types of early warning systems to ensure drinking water of high quality. There are various forms of early warning systems where automatic monitoring of *E. Coli* is an interesting alternative. Today's technology allows for this type of measurement, but it is often expensive and sometimes slow.

This work aims to investigate whether the phenomenon of Extraordinary Optical Transmission (EOT) can be used as the technology of sensors for real-time measurement of indicators of fecal contaminated water. EOT is a transmissions peak which arises due to plasmon resonance. The study was conducted by performing verification measurements by spectrophotometry to detect the EOT. After this biomeasurements were done to show that the surface of the sample can be functionalized to provide the opportunity to choose which analytes should be detected.

The verifying measurements showed that EOT was detected for one of the five samples where the hole size was 400 nm and the hole spacing was 600 nm. This is due to the high signal strength and to the fact that the phenomenon occurred within the measurement range of the instruments. Samples were designated with the name sPa where s indicates hole size in nm and a hole spacing in nm. The signal strength of the sample 140P600 and 200P600 was too low to determine whether EOT occurred. For samples 400P1000 and 600P1000 calculations showed that EOT occurred outside the measurement range, which meant that EOT could not be measured. Sample 400P600 was chosen to implement bio-measurements wherein the surface was functionalized with biotin Bovine serum albumin (B-BSA) to later bind with fluidMAG Streptavidin. Both B-BSA and streptavidin was bound as shown by the kinetic measurements.

Keywords: Extraordinary transmission effect (EOT), plasmon, drinking water, real time measurement

# Förord

Detta examensarbete om 30 hp är den avslutande delen av civilingenjörsprogrammet miljö- och vattenteknik vid Uppsala universitet. Arbetet är genomfört hos Acreo AB.

Jag vill inleda med att tacka min handledare Linda Olofsson för all hjälp och vägledning under arbetet. Bengt Carlsson vid skall ha ett stort tack för vägledning och genomläsning av rapporten. Ett stort tack till Jan Wipernmyr samt Johan Stigwall för hjälpen jag fick i optiklabbet vid konstruktionen av spektrofotometern. Även Krozer Anatol skall ha ett stort tack för all hjälp jag fick i kemilabbet. Ilver Dag skall också ha ett stort tack för hjälpen som gavs för att odla och arbeta med bakteriekulturer även om de inte redovisas i rapporten.

Göteborg, 2012  
Alexandro Martini

Copyright © Alexandro Martini och Institutionen för informationsteknologi,  
Uppsala universitet.

UPTEC W 12 05, ISSN 1401-5765

Tryckt hos Institutionen för geovetenskaper, Geotryckeriet, Uppsala universitet,  
Uppsala, 2012.

# Populärvetenskaplig sammanfattning

Biosensorsystem för övervakning av vattenkvalitet

*Alexandro Martini*

Vattenburen smitta är något som förekommer relativt sällan i Sverige kan skapa stora problem för samhället. Ett sätt att minska risken för vattenburen smitta är att kontrollera råvattenkvaliteten hos det vatten som vattenverken använder. Denna kontroll skall med fördel vara automatisk och kontinuerlig och mäta indikatorer på fekal smitta som exempelvis *E. Coli*. Ett exempel på en dricksvattenproducent som genomför automatiska mätningar av *E. Coli* är Göteborg Vatten som använder instrumentet Colifast. Detta instrument genererar ett resultat på 12 timmar och idealet är naturligtvis att erhålla realtidsmätning.

Acreo vill idag utveckla en sensor som kan ge realtidsmätning av olika indikatorer på fekal smitta. För att uppnå detta mål kommer sensorerna baseras på ett fenomen vid namn Extraordinary Optical Transmission (EOT). Fenomenet uppstår när en guldyta med hålstrukturer belyses där hålen är av storleksordningen av några hundra nanometer. När ljuset träffar ytan samverkar fotonerna med guldets elektronmoln och en förhöjd transmissions erhålls vid en specifik ljusvåglängd.

Detektionen baseras på att våglängden för transmissionstoppen beror av brytningsindexet av det medium som omger guldytan. Detta betyder att omgivande medium kan bestämmas genom att mäta den förskjutning som uppstår. Eftersom målet är att mäta specifika ämnen kan ytan täckas med molekyllära receptorer som attraherar de molekyler som skall detekteras.

Fenomenet mäts genom att belysa gittret och mäta mängden ljus som kommer igenom. Under en provtagning belyses gittret med ljusets alla färger inom det synliga intervallet och ett värde på transmissionen erhålls för varje våglängd. Resultatet blir ett diagram där max- och minpunkter kan kontrolleras med beräkningar. Utseendet av diagrammet beror i sin tur på egenskaper hos gittret så som avstånd mellan hål och storlek på hålen. Proverna som användes hade både varierande hålstorlek och avstånd. För att undersöka om det är möjligt att välja de molekyler som skall fästa vid ytan lät vi ett protein binda till guldytan. När den molekyllära receptorn var bunden till ytan tillsattes ett protein som fäste till receptorn. Detta visade att guldytan gick att funktionalisera och det är möjligt att välja vilka molekyler som skall detekteras.

Resultaten från mätningarna visade att ett av fem prov hade max- och minpunkter som sammanföll med beräknade värden. Samma prov användes för inbindning av molekyler där mätningar visade att de molekyllära receptorerna bildade en lager på ytan varefter proteinet blev inbundet till lagret.

# Innehållsförteckning

Referat .....	1
Abstract .....	2
Förord .....	3
Populärvetenskaplig sammanfattning .....	4
1 Inledning .....	6
1.1 Syfte .....	6
1.2 Avgränsning .....	7
2 Bakgrund .....	8
2.1 Inledning .....	8
2.2 Tidiga varningssystem .....	8
2.2.1 Dagens teknikalternativ .....	8
2.2.2 Teknik som används i Sverige .....	9
2.2.3 Övriga teknikalternativ .....	9
2.4 Sensorteknik .....	11
2.4.2 Relativ permittivitet .....	11
2.4.3 Ytplasmonpolaritoner .....	12
2.4.4 Extraordinary Optical transmission .....	14
2.4.5 Mätning av biologiska molekyler med EOT .....	17
3 Material och metod .....	19
3.2 Beskrivning av prover .....	19
3.3 Beskrivning av dielektrikum .....	21
3.4 Mätuppställning .....	21
3.5 Grundläggande mätningar .....	21
3.5.1 Material .....	21
3.5.2 Tillvägagångssätt .....	23
3.6 Biomätningar .....	23
3.6.1 Material .....	23
3.6.2 Tillvägagångssätt .....	24
4 Resultat och diskussion .....	25
4.1 Verifierande mätningar .....	25
4.3 Biomätningar .....	30
4.3.1 Kinetikmätningar .....	30
6 Slutsatser .....	33
7 Referenser .....	34

# 1 Inledning

Vatten av god kvalitet är något medborgare i Sverige ofta tar för givet tack vare den högt utbyggda VA-infrastrukturen. Vattenburna sjukdomar förknippas därför normalt med utvecklingsländer där ekonomiska och sociala aspekter försvårar produktion och distribution av rent vatten. Verkligheten är tyvärr en annan eftersom Sverige har haft större utbrott av vattenburna sjukdomar trots vårt utvecklade VA-nät. Ett exempel på ett utbrott i Sverige är de 5 700 personer som blev smittade av *Cryptosporidium* i Östersund år 2010. En vattensmitta kan leda till att en stor del av befolkningen blir sjuk och i extrema fall leda till att viktiga samhällsfunktioner hotas. Det finns exempel på extrema utbrott där 400 000 människor smittats vilket naturligtvis påverkar handel, sjukhus och andra institutioner som alla fick nedsatt förmåga att hantera dagliga rutiner (Ramirez m.fl. 2004).

Även om utbrott sker relativt sällan är målet att minimera antalet med hjälp av olika tekniker och rutiner. En metod är att detektera råvatten med patogenhalter som överskrider verkets reningskapacitet varefter råvattenintaget stoppas. Detta görs idag i Göta Älv där Göteborg Vatten hämtar sitt råvatten där ett antal mätstationer finns utplacerade för att ge en överblick av vattenkvaliteten i vattendraget. Mätningarna består ofta av manuella mätningar som utförs av de kommuner som använder vattnet i Göta älv. Göteborg Vatten har dessutom en automatisk mätstation som mäter mängden *E. Coli* genom bakterierodning där provsvar erhålls efter 12 timmar. En teknisk lösning som kan mäta patogener i realtid är naturligtvis önskvärd för att ge snabbare reaktionsförmåga.

Utveckling av sensorerna är naturligtvis en stor utmaning rent teknisk där en del lösning är att utnyttja plasmonresonans för detektion. Plasmonresonans tros ge upphov till ett optiskt fenomen vid namn Extraordinary Optical Transmission vilket innebär en förhöjd transmission då ett gitter belyses med ljus. Detta transmissionsmaxima uppstår vid en specifik våglängd som beror av brytningsindexet för omgivande dielektrikum. Detta innebär att olika molekyler som förändrar brytningsindexet framför gittret kommer att kunna detekteras eftersom det leder till en förskjutning av transmissionsmaximum.

Ett antal olika forskarlag har lyckats påvisa detektion av olika molekyler med hjälp av EOT och förhoppningen är att denna teknik kan användas som grund för ett sensornätverk riktat mot dricksvattensektorn.

## 1.1 Syfte

Syftet med examensarbetet är att:

- Utvärdera en specifik fysikalisk mätprincip baserad på så kallad Extraordinary Optical Transmission (EOT) för vattentillämpningar.

Syftet kommer att uppnås genom att utveckla en mätmetod för att mäta EOT. Olika försök kommer att utföras för att verifiera den mätprincip som bygger på förskjutning av transmissionsmaxima.

## 1.2 Avgränsning

Utvärderingen av EOT som mätprincip kommer att baseras på två typer av försök, nämligen verifierande mätningar och biomätningar. Vid de verifierande mätningarna användes tre olika dielektrikum för att påvisa EOT medan under biomätningarna användes två olika protein. Försöken utfördes på fem olika prov med varierande hålstorlek och avstånd.



## 2 Bakgrund

### 2.1 Inledning

Sensortekniken som detta arbete behandlar kan definieras som ett ”tidigt varningssystem” då det är ett verktyg för att förvarna vattenproducenter om bristande råvattenkvalitet (Hedström m.fl. 2009). Idag finns inga specifika krav på råvattenkvaliteten. Lagstiftningen kräver endast att ”särskild hänsyn skall tas till beskaffenheten” (Livsmedelsverket 2001). Detta leder till varierade ansträngningar från vattenproducenterna gällande kvalitetskontroll av inkommande råvatten. (Hedström m.fl. 2009). Detta avsnitt syftar till att beskriva olika aktörers ansträngningar för att täcka dagens behov, visa de tekniker som finns tillgängliga idag samt vilka som är under utveckling.

Även den fysik som ligger bakom fenomenet kommer att presenteras för ge en ingående bild av hur mätprincipen fungerar.

### 2.2 Tidiga varningssystem

#### 2.2.1 Dagens teknikalternativ

Idag finns ett fåtal aktörer i Sverige som använder tidiga varningssystem för att på något sätt skydda råvattenberedningen från kommande föroreningar. Detta låga antal beror delvis på det saknade kravet från kontrollmyndigheter samt att det faktiska behovet i Sverige har bedömts som lågt då råvattenkvaliteten är hög. (Hedström m.fl. 2009). Studier visar dock att detta kan ändras på grund av framtida klimatförändringar. Eftersom klimatförändringarna tros ge upphov till ökad temperatur och nederbörd kommer detta att påverka råvattenkvaliteten negativt. (Svenskt Vatten 2007)

Göteborg Vatten är den aktör med störst erfarenhet av tidiga varningssystem när de redan på 70-talet blev medlemmar i Göta älvs vattenvårdsförbund eftersom deras råvatten hämtas därifrån (Hedström m.fl. 2009). Förbundet startade 1957 och är en ideell organisation där medlemmarna består av aktörer som vill skydda Göta älvs vattenkvalité. Idag består medlemmarna av representanter från kommun, industri samt andra intressenter som exempelvis fiskevårdsområden (Göta älvs vattenvårdsförbund 2011). Detta har bidragit till att denna aktör har över 30 års erfarenhet inom tidiga varningssystem. Inledningsvis var förvarningssystemet manuellt då industrier och reningsverk placerade uppströms kontaktade Göteborg vatten ifall en olycka inträffade varefter vattenverket vidtog passande åtgärder. Denna kommunikation sker fortfarande men är numera automatiserad via telenätet (Hedström m.fl. 2009). Det som särskiljer Göteborg Vatten från resterande aktörer är inköpet av verktyget Colifast som genomför automatisk mätning av patogenen *E. Coli*.

Sydvatten är en aktör som har arbetat med varningssystem i form av doftbänkar samt provtagning uppströms på specifika parametrar för att detektera oljeföroreningar. Eftersom Sydvatten använder en råvattentunnel för transport från Bolmen till vattenverket är oljeföroreningar ett problem då tunneln skulle vara mycket svår att sanera (Hedström m.fl. 2009).

Stockholm Vatten arbetar precis som deras kollegor vid Göta älv med vattenvårdsförbund, i deras fall Mälarens vattenvårdsförbund. Genom förbundet har de kontakt med olika industrier där vattenverken informeras ifall olyckor sker vid industrier, reningsverk eller annan verksamhet som kan tänkas hota vattenberedningen. Till skillnad från Göta älv är det svårare att förutsäga om ett utsläpp kommer att påverka råvattenintaget då strömningarna i Mälaren varierar mycket. För att lösa detta problem använder Stockholm Vatten en mjukvara utvecklad av SMHI vid namn Seatrack. Mjukvaran används för att bygga strömningsmodeller och innehåller en modell över Mälarens strömmar så vattenverk kan avgöra ifall ett eventuellt utsläpp kan komma att hota vattenförsörjningen. Modellen använde olika inparametrar så som utsläppets storlek och olika meteorologiska data. Utöver detta finns även doftbänkar samt mätning av pH och UV-absorbans på inkommande råvatten (Hedström m.fl. 2009).

Exemplen ovan visar på att behoven varierar och därmed även teknikerna för att lösa dem. För att lättare identifiera behoven kan utsläppen delas in i två kategorier, nämligen diffusa och akuta föroreningar. Diffusa föroreningar kan definieras som långsamma händelser och uppmärksammas genom analys av trender av olika slag. Exempel på detta är ökande humushalt i råvatten eller salthalt. Akuta föroreningar är däremot större plötsliga händelser som exempelvis en olycka vid industri, reningsverk eller sabotage (Hedström m.fl. 2009).

### 2.2.2 Teknik som används i Sverige

De vanligaste parametrarna som mäts idag vid ett förvarningssystem är pH, redoxpotential, konduktivitet, temperatur och perturbeditet. Alla de exempel som gavs i föregående avsnitt mäter någon eller några av dessa parametrar i olika kombinationer.

Redoxpotential och pH används för att påvisa olika industriföroreningar men har hög felmarginal eftersom den naturliga variationen på parametrarna är stor på grund av temperaturberoendet. Felmarginalen kan dock sänkas genom att mäta temperaturen. Turbiditet används som indikator för ökad avrinning samt breddning av avlopp uppströms eftersom ökade bakteriehalter ofta sammanfaller med ökad turbiditet (Hedström m.fl. 2009).

Göteborg Vatten är idag den enda aktör med automatisk mätning av *E. Coli* vilket möjliggörs genom en lösning som marknadsförs av ett bolag vid namn Colifast. Instrumentet tappar automatiskt upp råvatten i vialer innehållandes reagens som hydrolyseras av *E. Coli* varefter slutprodukten kan detekteras med fluorescens (Colifast 2001).

Ytterligare teknik som ett fåtal vattenverk använder i Sverige är doftbänkar. Som namnet antyder är detta ett verktyg för att kontrollera vattnets doft och används specifikt för att kontrollera kvalitet med hänsyn på petroleumföroreningar innan, under och efter beredning i vattenverken. Detta möjliggörs tack vare att den mänskliga näsan har förmåga att känna specifika petroleum föroreningar långt innan vattnet blir otjänligt ur hälsosynpunkt (Hedström m.fl. 2009).

### 2.2.3 Övriga teknikalternativ

Levande organismer har länge använts inom medicin för att mäta toxicitet. Denna metod har även integrerats i dagens förvarningssystem och går under benämningen biomonitorer. Konceptet bygger på att mäta förändringar i beteendet hos organismen och utifrån denna information avgöra vattenkvaliteten. Exempel på en fungerande teknik som finns tillgänglig idag är ”BBEDaphnia Toximeter”. Genom att låta

kräftdjuret *Daphnia magna* simma i en delström av råvattnet och samtidigt mäta dess rörelser med kamera kan kvaliteten på vattnet uppskattas. Parametrar som simhastighet, simhöjd, avstånd mellan organismer och antalet aktiva organismer används som en indikator på kräftdjurens hälsa (Hedström m.fl. 2009).

Véolia Water utvecklar ett instrument vid namn Coliplage som mäter ett enzym som finns naturligt hos *E. Coli* med hjälp av fluorescens. Detta leder till att metoden är mycket snabbare än Colifast. För Coliplage tar ett svar cirka 30 minuter att producera. Dessutom är detektionsnivån lägre tack vare förfiltrering av vattenprovet (Hedström m.fl. 2009).

Tyvärr är kostnaden för Coliplage och Colifast hög vilket betyder att ett helt nätverk skulle bli ekonomiskt oförsvarbart, speciellt när dricksvattenproducenter ofta har begränsade resurser. Detta betyder att priset är avgörande för sensorns konkurrenskraft. Ytterligare en anledning till att instrumenten inte är utbredda förklaras av Livsmedelsverkets dricksvattenföreskrifter där den mikrobiella kvalitetskontrollen inte blir godkänd om instrument som Coliplage används. Denna kvalitetskontroll genomförs på utgående vatten samt hos abonnenterna. Detta betyder att tekniker som Coliplage får användas för mätningar som ligger utanför det lagstadgade kravet, dvs för kontroll av inkommande råvatten alternativt för att utöka mätningar av utgående dricksvatten.

Ett svenskt bolag vid namn Aqua Q AB utvecklar och säljer en metod för att mäta patogener i vatten genom turbiditetsmätning. Genom mätning av partikelfördelningen inom storleksintervallet 0,5-20  $\mu\text{m}$  när vattnet är av god kvalitet kan Aqua Q:s algoritm avgöra när partikelfördelningen påvisar patogener i vattnet (Hedström m.fl. 2009).

En relativt ny teknik är den som går under namnet elektroniska näsor och tungor. Metoden bygger på voltmetri och fokuserar på att ge ett allmänt svar på vattenkvaliteten då metoden inte kan urskilja enstaka molekyler. Detta räcker för att ge svar på om vattnet i fråga är tjänligt dricksvatten (Boyko, m.fl. 2006).

## 2.4 Sensorteknik

Sensorerna i detta arbete baseras på Extraordinary optical transmission (EOT) vilket är ett optiskt fenomen som innebär en förhöjd transmission när ett gitter av aperturer på en metallyta belyses med ljus. Det finns ett antal exempel där denna typ av teknik har använts för detektion av olika ämnen däribland virus (Yanik m.fl. 2010). Detta avsnitt syftar till att ge en bakgrund i hur och varför detta fenomen uppkommer samt de beräkningar som utförs för att styrka validiteten av experimentella resultat.

### 2.4.2 Relativ permittivitet

EOT uppkommer på grund av samspelet mellan fotoner och elektronmoln i en metall. Att fotoner påverkar elektronmolnet beror på att den elektromagnetiska strålning som fotonen representerar har en förmåga att polarisera elektronmolnet. Ett sätt att förstå detta samspel är att betrakta den relativa permittiviteten vilket är ett mått på hur dielektrikumet påverkas och påverkar ett elektriskt fält. Den relativa permittiviteten för ett dielektrikum (i vårt fall guld och olika vätskor) beskrivs på följande sätt (Prangma 2009):

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega) \quad (1)$$

Den relativa permittiviteten  $\varepsilon$  är ett komplext tal där den reella delen representeras av  $\varepsilon_1$  och den komplexa av  $\varepsilon_2$ . Samband (1) visar tydligt att den relativa permittiviteten är en funktion av vinkelfrekvensen  $\omega$  för det infallande ljuset som beräknas enligt följande:

$$\omega = \frac{2\pi c}{\lambda} \quad (2)$$

där  $c$  betecknar ljusets hastighet och  $\lambda$  är ljusets våglängd.

För att beräkna den relativa permittiviteten för metallen används följande samband som baseras på Drudemodellen (Maier 2007):

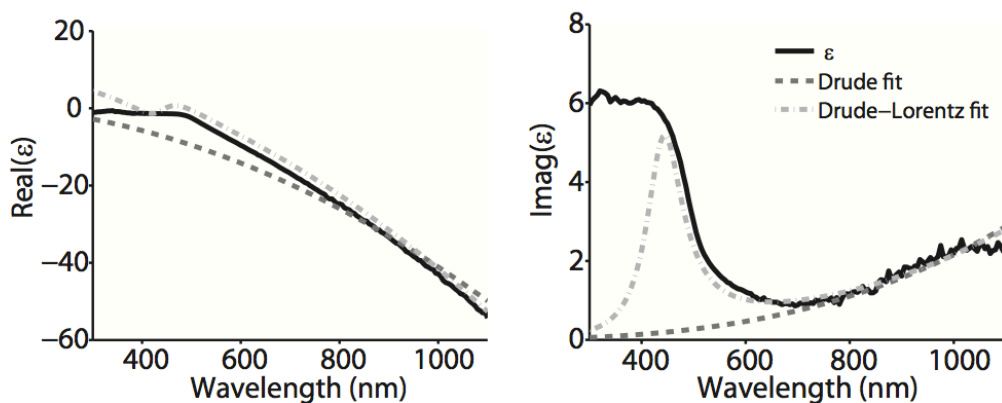
$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (3)$$

där  $\omega_p$  är plasmafrekvensen och  $\gamma$  är kollisionsfrekvensen för metallen.

Plasmafrekvensen är den frekvens med vilka elektronerna i metallen oscillerar och kollisionsfrekvensen är ett medelvärde på antalet kollisioner mellan elektronerna i metallen. Sambandet är naturligtvis en förenkling av verkligheten och räcker inte för att beskriva alla vinkelfrekvenser. För mycket höga frekvenser är energin hos de infallande fotonerna så hög att elektronerna i metallen förändrar sitt beteende och inte längre kan beskrivas på ett tillfredsställande sätt av (3). För att ekvation (3) skall ge en bra beskrivning av den relativa permittiviteten måste villkoret  $\omega < \omega_p$  vara uppfyllt (Maier 2007). Eftersom guld används som metall i experimenten blir konstanterna följande (Uxia m.fl. 2010):

$$\begin{aligned} \omega_p &= 1,374 \cdot 10^{16} \text{ s}^{-1} \\ \gamma &= 4,08 \cdot 10^{13} \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

Ur värdet för  $\omega_p$  samt ekvation (2) erhålls att den kortaste våglängd som Drudemodellen kan representera är 137 nm. Denna modell används för att beskriva hur elektroner rör sig i en metall. Den bygger på antagandet att metallens valenselektroner kan röra sig fritt. Detta leder till att elektronernas rörelse kan liknas med hur molekyler i gasform interagerar med varandra. Tyvärr visar det sig att Drudemodellen slutar representera den relativa permittiviteten redan vid 600 nm vilket visar på de svårigheter som finns kring denna typ av beräkningar. Detta på grund av att vid våglängder lägre än 600 nm är energin hos fotonerna så hög att antagandet som Drudemodellen bygger på inte längre gäller. Vid dessa energinivåer är det inte enbart valenselektroner som rör sig fritt utan även de elektroner som tidigare var bundna till atomerna. För att beskriva elektronernas rörelse vid högre energinivåer utökades Drudemodellen av Henrik Antoon Lorentz och fick därför namnet Drude-Lorentz modellen. Figur 5 visar beräknade värden av både Drude samt Drude-Lorentz modellen jämfört med experimentella värden.



Figur 5: Reella och imaginära dielektricitetskonstanter för guld där uppmätta värden jämförs med Drude- samt Drude-Lorentz modellen (Prangsmå 2009).

När ekvation (3) beräknas erhålls både en reell och komplex del enligt ekvation (1). Om delarna beräknas separat görs detta enligt (Maier 2007):

$$\epsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (4)$$

$$\epsilon_2(\omega) = \frac{\omega_p^2 \tau}{\omega(1 + \omega^2 \tau^2)} \quad (5)$$

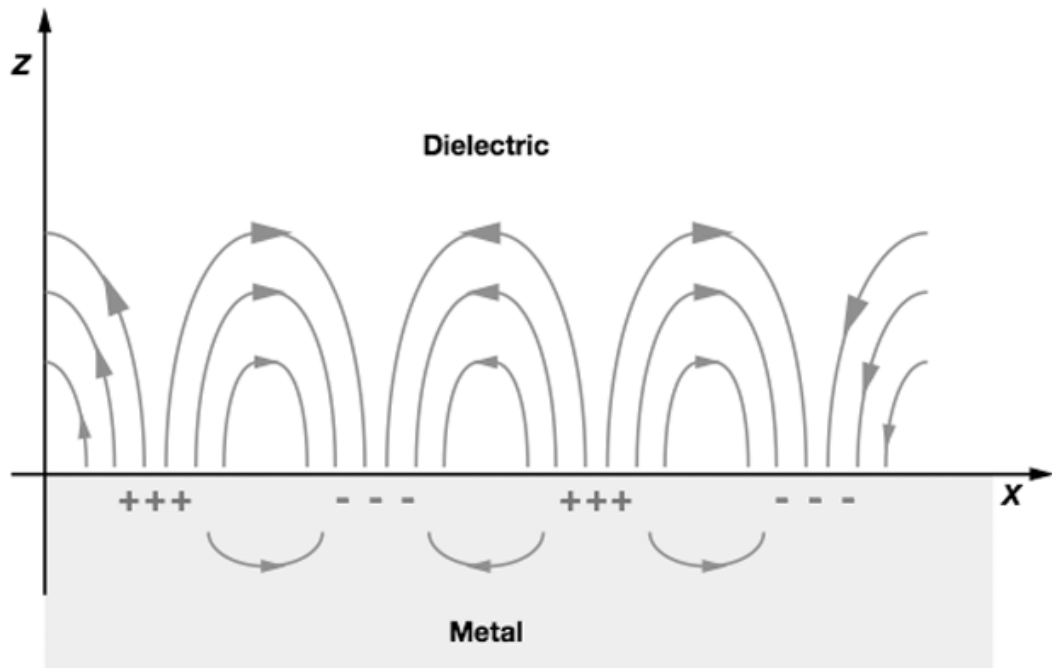
där  $\tau = \gamma^{-1}$ .

Det kommer visa sig i senare avsnitt att den relativa permittiviteten har en central roll i beräkningarna som används för att verifiera experimentella värden mot teoretiska värden. Därför är det viktigt att ha i åtanke hur noggranna de teoretiska värdena är så att detektion av eventuella felkällor underlättas.

### 2.4.3 Ytplasmonpolaritoner

När en foton infaller vid metallytan kommer denna att polarisera elektronmolnet på olika sätt beroende på värdet av den relativa permittiviteten. Polariseringen kan ge upphov till en polariton, d.v.s en elektromagnetisk vågrörelse som rör sig längs med dielektrikumets yta. Vågrörelsen kallas för ytplasmonpolariton (SPP) och består av

förtätningar och förtunningar av elektronmolnet som i sin tur ger upphov till områden med positivt respektive negativ laddning. Figur 6 ger en bild av hur laddningarna fördelas vid ytan:



Figur 6: Polaritonens uppbyggnad där förtätningar och förtunningar av elektronmolnet representeras av positivt och negativt laddade områden (Willetts & Duyne 2007).

Ett sätt att beskriva vågrörelsen är genom vågvektorn  $\beta$  (Maier 2007):

$$\beta(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\omega)\epsilon_d(\omega)}{\epsilon_m(\omega)+\epsilon_d(\omega)}} \quad (6)$$

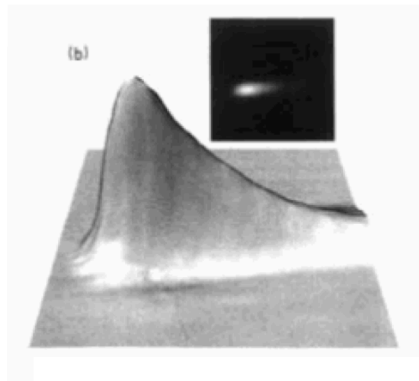
där  $\omega$  är ljusets vinkelfrekvens,  $c$  är ljusets hastighet,  $\epsilon_m$  är den relativa permittiviteten för metallen medan  $\epsilon_d$  är den relativa permittiviteten för omgivande dielektrikum (i vårt fall olika vätskor) (Maier 2007). Viktigt att poängtera är att det alltid finns två ämnen som är i kontakt med ytan. På ena sidan befinner sig det dielektrikum som undersöks och på andra finns i vårt fall glas i form av  $\text{SiO}_2$ . Termen  $\frac{\omega}{c}$  i ekvation (6) representerar magnituden av vågvektorn hos det infallande ljuset. Följande villkor måste dock vara uppfyllda för att vågvektorn skall infinna sig (Maier 2007):

$$\epsilon_m(\omega)\epsilon_d(\omega) < 0 \quad (7)$$

$$\epsilon_m(\omega) + \epsilon_d(\omega) < 0 \quad (8)$$

Detta betyder att ett av värdena måste vara negativt för att uppfylla villkoren (7) och (8).

Figur 7 visar hur polaritonen rör sig längs med dielektrikumets yta och hur det elektriska fältet som uppstår på grund av polariseringen avtar.



Figur 7: Polaritonen som bildas när HeNe laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) belyser ett 53 nm tjock lager av silver. Det syns tydlig hur styrkan, d.v.s det elektriska fältet, avtar allt eftersom vågvektorn rör sig (Maier 2007).

Polaritonen rör sig en begränsad sträcka eftersom dess energi absorberas av metallen vilket även resulterar i en temperaturökning.

När en metall som uppfyller villkor (7) och (8) belyses med ljus uppstår plasmonen. Eftersom plasmonen måste exciteras för att EOT skall uppstå måste en mängd perforeringar som tillsammans skapar ett gitter av hål med specifik hålstorlek och avstånd anläggas på ytan. Det infallande ljuset räcker inte för att excitera plasmonen vilket visas exempelvis ur ekvation 6 där det är tydligt att  $\beta$  alltid kommer vara större än vågvektorn ( $\frac{\omega}{c}$ ) för det infallande ljuset. Excitering kommer däremot att ske när följande villkor är uppfyllt (Maier 2007):

$$\beta = k \sin \theta \pm (i + j)g \quad (9)$$

där  $k$  är ljusets vågvektor ( $\frac{\omega}{c}$ ),  $\theta$  är ljusets infallsvinkel,  $g = \frac{2\pi}{a}$  där  $a$  är avståndet mellan hålen och  $i, j$  är gitterkonstanter i form av heltal (1,2,3,...). Det moment som behövs för att excitera plasmonen uppkommer genom en process som kallas Umklapp. Det är först när plasmonen är exciterad som EOT uppstår och en detektion kan genomföras. En viktig aspekt är att det finns olika tekniker för att excitera plasmoner där anläggning av gitter är en av dem (Pitarke m.fl. 2007).

#### 2.4.4 Extraordinary Optical transmission

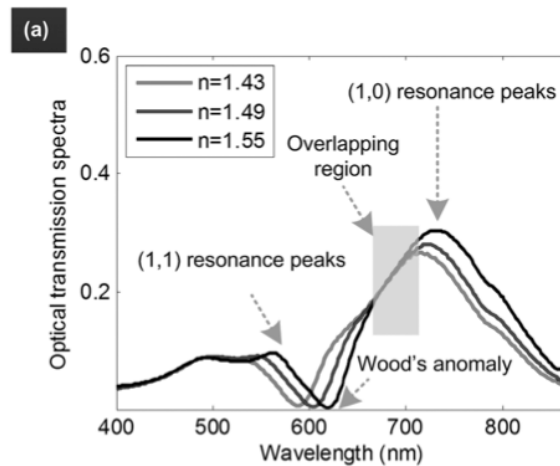
Tidigare avsnitt har gett en teoretisk bakgrund till varför detta EOT uppstår. När fenomenet upptäcktes väckte det stor förvåning eftersom den förväntade transmissionen genom gittret kan beräknas med följande samband (Ebbesen m.fl. 1998):

$$I = \left(\frac{r}{\lambda}\right)^4 \quad (10)$$

där  $r$  är håldiametern i nm och  $I$  transmissionen. Formeln ovan lades fram av Bethe och Bouwkamp och visar att intensiteten förväntas bli liten (Ebbesen m.fl. 1998). Sambandet stämmer inte när ett gitter av små aperturer belyses eftersom en mycket hög transmission erhålls vilket betyder att gittret i sig är ett aktivt element som påverkar intensiteten (Ebbesen m.fl. 1998).

Ett antal olika gitterparametrar påverkar utseendet av transmissionstoppen däribland period, bildförhållande, samt infallsvinkel för ljuset. Perioden av arrayen, d.v.s avståndet från hål till hål, avgör var EOT kommer att infalla. Bildförhållandet (tjocklek dividerat med hålstorlek) avgör om EOT-toppen blir distinkt eller inte. När bildförhållandet närmar sig 1, dvs då hålstorleken är lika stor som ytans tjocklek erhålls väldigt distinkta toppar. Vinkeln till vilket fotonerna infaller på ytan påverkar intensiteten hos EOT samt vid vilken våglängd den uppkommer (Ebbesen m.fl. 1998).

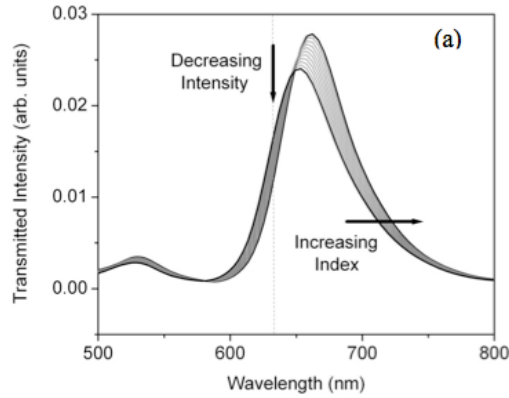
Figur 8 ger ett exempel på hur EOT visar sig under spektrofotometriska mätningar där de är utmärkta med texten "resonance peaks":



Figur 8: EOT är utmärkta med texten "resonance peaks" och man kan även se en förskjutning som beror av brytningsindexet där ett lägre brytningsindex ger en rödförskjutning (Mohamadreza m.fl. 2012).

Det första som man bör lägga märke till i bilden är den förskjutning mot det röda ljuset som sker när brytningsindex för omgivande dielektrikum ökar. Figur 8 visar även ordningen av det maximala värdet där den största toppen är av ordningen  $(i, j) = (1, 0)$ . Även en marginell minskning i intensitet kan urskiljas ur figur 8 vilket även stärks av figur 9:





Figur 9: Beskrivning av hur ökat brytningsindex påverkar transmissionsspektrum vid EOT (Lesuffleur m.fl. 2008).

Figur 9 visar det generella beteende hos EOT när brytningsindex förändras. Kännedomen av olika gitterparametrar ger möjligheten att i förväg beräkna var EOT kommer att inträffa samt det minima som i figur 8 är utmärkt som ”Woods anomaly”. Transmissionstoppens position kan beräknas med hjälp ekvation (6) och (9) som tillsammans ger ekvation (11) (Yanik m.fl. 2010).

$$\lambda_{EOT} \approx \frac{a}{i^2 + j^2} \operatorname{Re} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (11)$$

Detta samband kommer inte att ge den exakta placeringen av EOT utan experimentella resultat kommer att vara förskjutna mot det röda ljuset (Jiang-Yan m.fl. 2010).

För att beräkna  $\epsilon_d$  användes följande samband eftersom information om vätskors brytningsindex är lättillgänglig:

$$n = \sqrt{\epsilon_d \mu_r} \quad (12)$$

Tack vare att  $\mu_r \approx 1$  för de dielektrikum som används kan sambandet förenklas till följande:

$$\epsilon_d = n^2 \quad (13)$$

Ekvation (11) kombinerat med (13) ger sambandet nedan:

$$\lambda_{EOT} \approx \frac{a}{\sqrt{i^2 + j^2}} \operatorname{Re} \sqrt{\frac{\epsilon_m n^2}{\epsilon_m + n^2}} \quad (14)$$

Detta skapar möjligheten att förutsäga var EOT-toppen kommer inträffa för omgivande dielektrikum. Även de minima som finns i figur 8 kan beräknas eftersom de uppkommer på grund av Woods anomalier och inträffar vid följande våglängd (Jiang-Yan m.fl. 2010):

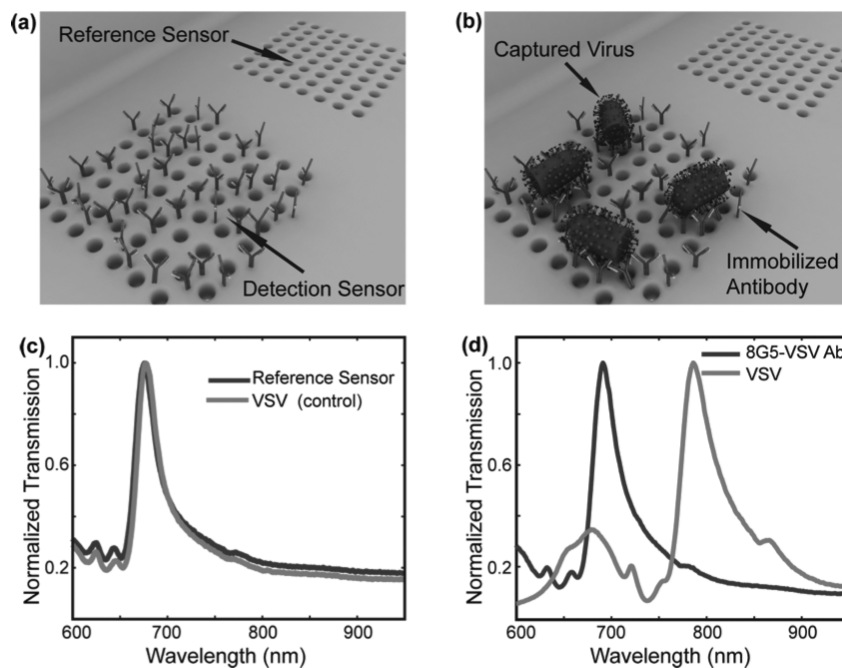
$$\lambda_{Wood} = \sqrt{\epsilon_{SiO_2}} a_0 = n_{SiO_2} a_0 \quad (15)$$

där  $n_{SiO_2}$  är brytningsindexet för det glas som omger guldytan. Dessa anomalier är förknippade med framträdandet och försvinnandet av diffraktionsordningar (Catrysse & Fan 2007). För proven som används under experimentet användes  $TiO_2$  för att fästa guldmetall på glaset vilket skulle rent teoretiskt kunna ge upphov till EOT och Woods anomali. Det visar sig dock att lagret är så tunt (5 nm) att denna effekt kan försummas (Ortuño m.fl. 2009).

### 2.4.5 Mätning av biologiska molekyler med EOT

I tidigare avsnitt låg fokus på att förutsäga värdet på  $\lambda_{EOT}$  men denna metod kan istället genomföras baklänges för att avgöra vilket dielektrikum som befinner sig i lösningen. Genom att mäta förskjutningen  $\lambda_{EOT}$  kan brytningsindexet för lösningen beräknas varefter det är lätt att avgöra vilket ämne som befinner sig i lösningen genom att studera tabeller brytningsindex.

Principen går att utveckla ytterligare genom att funktionalisera ytan vilket innebär att molekyllära receptorer (ex. antikroppar) placeras på guldytan. Molekylerna placeras lättast på ytan genom att skapa Self-Assembled Monolayers (SAM) (Ulman 1996). Detta lager består av molekyler som naturligt bildar ett ordnat lager på guldytan (Ulman 1996). Receptorerna gör att specifika molekyler kan fästa vid ytan och detta leder till ett urval av analyt. Figur 10 ger en konceptuell bild av hur tekniken fungerar:



Figur 10: a) Gitter med molekyllär receptor (grön) samt referensgitter utan. b) Gitter med receptor samt inbundet virus (blått) och gitter utan. c) Transmissionsspektra över gitter med receptor och referensgitter där knappt någon förskjutning visas. d) Gitter med bundet virus visar en tydlig förskjutning mot det röda ljuset. Referensen förblir oförändrad (Yanik m.fl. 2010).

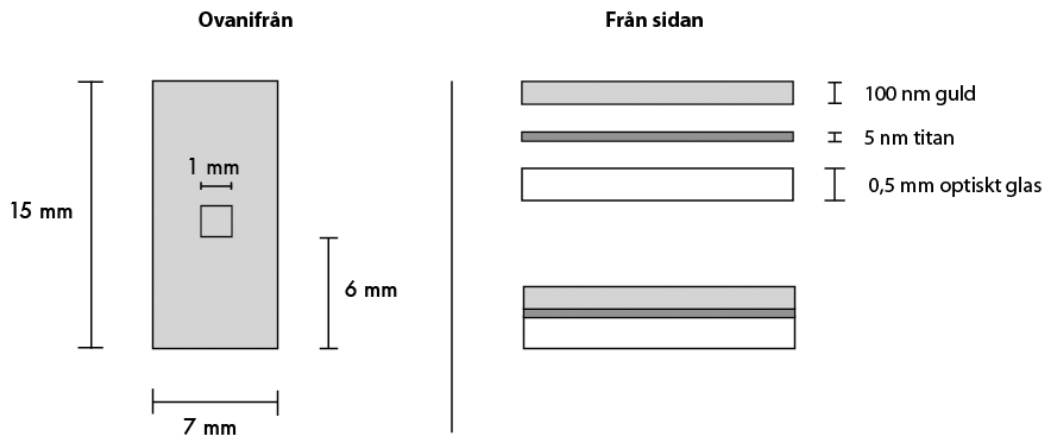
De molekyllära receptorerna representeras av gröna y-formade stavar som är designade för att binda in ett specifikt virus. Detta virus binder och en förskjutning uppkommer på grund av att viruset förändrar brytningsindexet och därmed den

dielektriska konstanten vid guldytan. Tekniken leder till att komplexa lösningar kan användas eftersom enbart de molekyler som söks kommer fästa vid ytan och därmed påverka transmissionsspektrumet. Samtidigt används ingen inmärkning av molekylerna vilket gör att lösningens egenskaper i form av exempelvis pH och redoxpotential kan variera kraftigt utan att påverka detektionen. Den begränsning som finns är att lösningen i vilken analyten befinner sig inte skadar inbindningsproteinerna (Yanik m.fl. 2010). Eftersom vissa inbindningsproteiner denatureras vid exempelvis höga eller låga pH-värden kan detta göra att inbindningen upphör att fungera (Yanik m.fl. 2010). Det är därför viktigt att matcha inbindningsproteinernas optimala miljö med lösningens egenskaper (Yanik m.fl. 2010).

### 3 Material och metod

#### 3.2 Beskrivning av prover

Proven består av 0,5 mm optiskt glas ( $\text{SiO}_2$ ), 5 nm titan och 100 nm guld och dimensionerna illustreras av fig 11. Gittret har formen av en kvadrat där sidorna är c:a 1 mm.



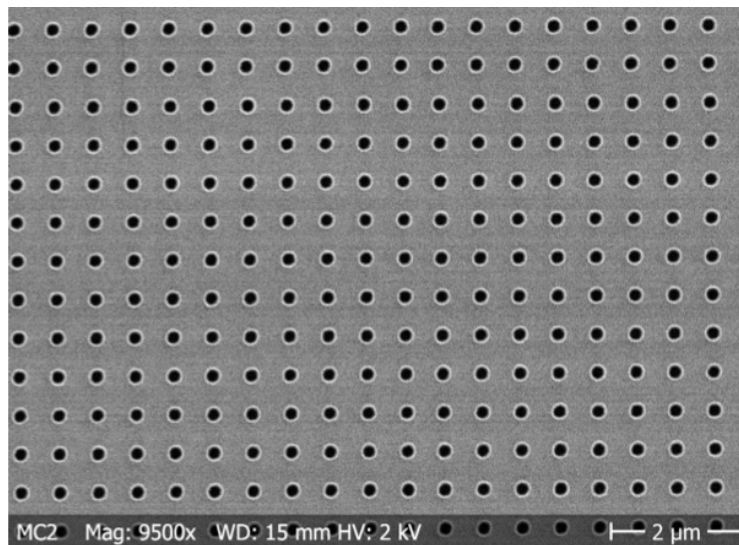
Figur 11: Guldytan är 100 nm tjock och för att fästa denna vid glaset användes 5 nm titan. Den optiskt aktiva ytan representeras av den prickade området med en yta av  $1 \text{ mm}^2$ .

Det fanns sammanlagt 5 olika prover där gitterparametrar varierades. De parametrar som varierade var hålstorlek samt avståndet mellan hålen som under teoridelen benämndes med konstanten  $a$ . De 5 olika storlekarna som användes beskrivs i tabell 1.

Tabell 1: Proverna var döpta efter hålstorlek och hålavstånd.

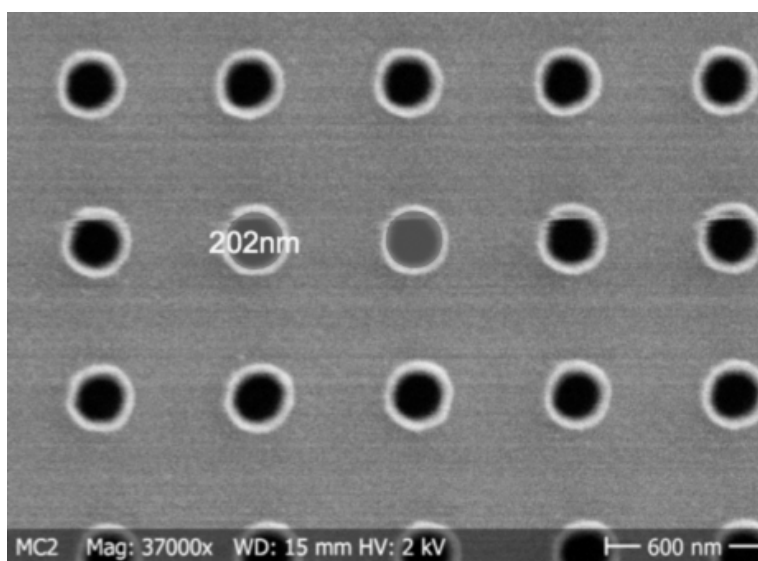
Namn	Hålstorlek [nm]	Hålavstånd [nm]
140P600	140	600
200P600	200	600
400P600	400	600
400P1000	400	1000
600P1000	600	1000

Figur 12 visar gitter 200P600 när det är förstorat 9500 gånger.:



*Figur 12: Prov 200P600 vid 9500 gångers förstoring där kortet är taget med ESM. Redan vid denna förstoring går det att se att hålen inte är helt cirkelformade.*

För att visa detta tydligare har figur 13 förstorats 37 000 gånger så att man med lätthet kan urskilja storlek och avstånd.



*Figur 13: Prov 200P600 vid 37000 gångers förstoring där kortet är taget med ESM. Vid denna bild är de geometriska anomalierna tydligare tack vare förstoringen.*

### 3.3 Beskrivning av dielektrikum

I de verifierande mätningarna användes ett antal olika dielektrikum vilka beskrivs i tabell 2.

Tabell 2: Lista över de dielektrikum som användes i de grundläggande mätningarna.

Ämne	Brytningsindex
Vatten	1,33326
Aceton	1,35542
Metanol	1,35815

För biomätningarna användes proteinerna Bovine Serum Album, Biotin (B-BSA) och fluidMAG Streptavidin.

### 3.4 Mätuppställning

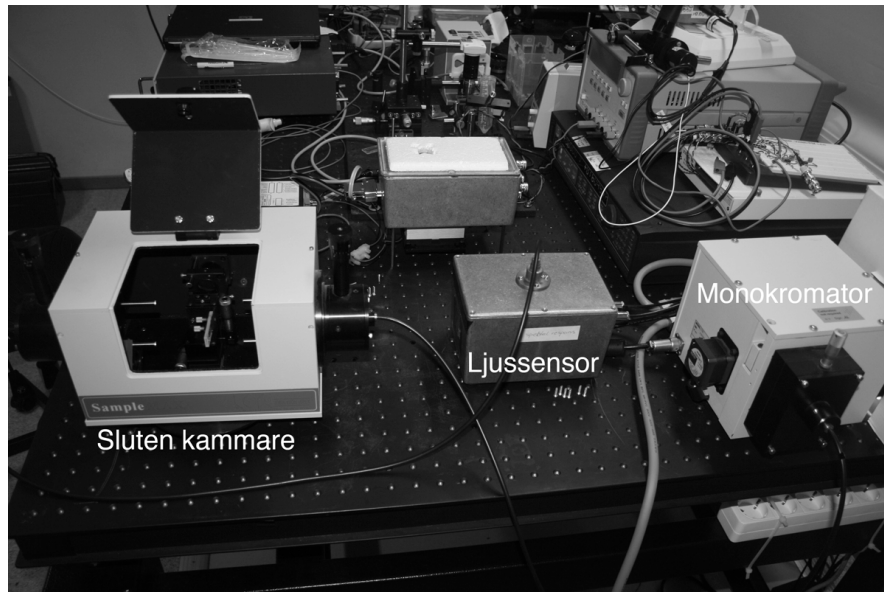
För att avgöra om EOT kan användas som teknik måste en mätuppställning som möjliggör mätning av fenomenet utvecklas. Utvecklingen var en iterativ process där målet var att uppnå reproducerbarhet för mätningarna. De faktorer som ändrades i detta arbete var mätutrustning samt det förfarande som användes för exempelvis rengöring innan och efter mätning. Mätningarna delades upp i grundläggande mätningar vilka genomfördes med en egenkonstruerad spektrofotometer samt biomätningar som genomfördes med en spektrofotometer tillverkad av Perkin-Elmer.

### 3.5 Grundläggande mätningar

Denna mätserie hade till syfte att presentera hur proverna svarade på olika typer av dielektricitetskonstant vid specifika våglängder. Våglängdintervallet som användes startade vid 400 nm och slutade vid 1100 nm. I resultatdelen kommer enbart intervallet 600 nm till 1100 nm redovisas eftersom det är först då Drude-modellen ger en god approximation av guldets dielektricitetskonstant och experimentella och beräknade data kan jämföras.

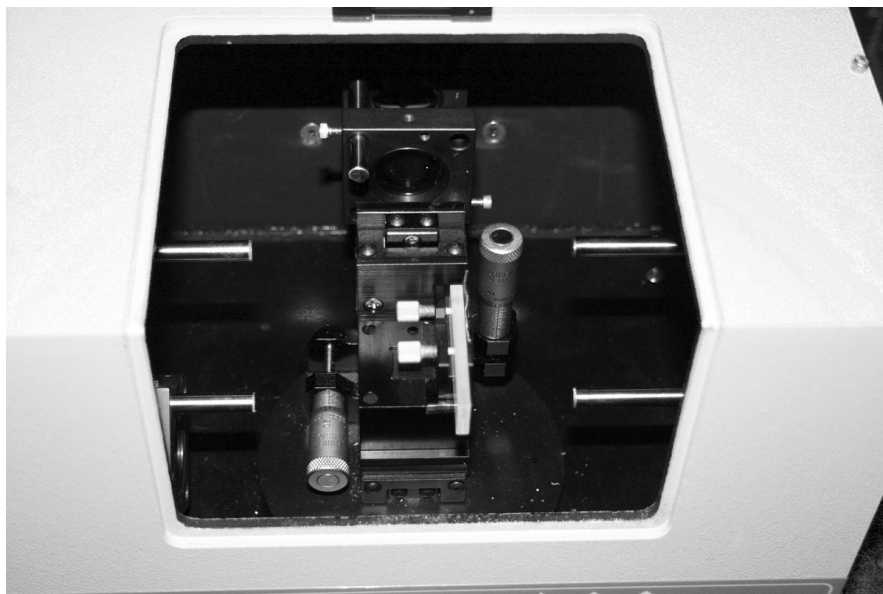
#### 3.5.1 Material

För att genomföra mätningarna användes en spektrofotometer. Den bestod av en bredspektrumlampan som ljuskälla varefter en våglängd valdes med hjälp av en monokromator. Ljus skickades via optisk fiber till en sluten kammare där det fanns möjlighet att fästa kyvetten för att garantera provets position. Efter att ljuset passerat gittret skickades det till en CCD-detektor varefter dess ström mättes (mätinstrument: Keithley 238). Figur 14 visar hur uppställningen såg ut.



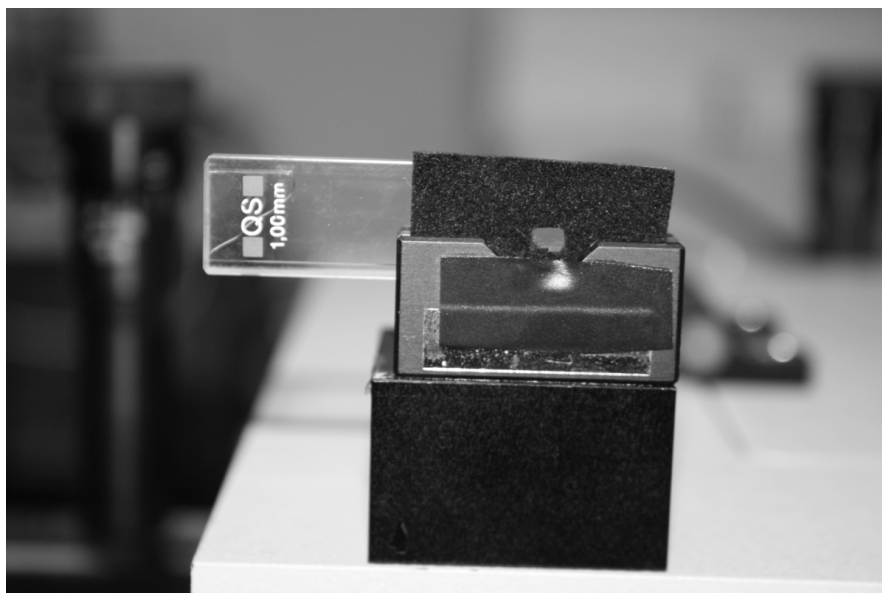
Figur 14: Till höger om monokromatorn (utanför bild) fanns en bredspektrumlampan som genererade ljus. Monokromatorn använde ett gitter för att välja ut en specifik våglängd och gav hög noggrannhet på det utgående ljuset. Ljussensorn bestod av en CCD-sensor som skickade en ström till Keithley 238 som hade förmågan att mäta väldigt små mängder ström.

Figur 14 ger en översikt över de olika komponenter som utgjorde mätutrustningen. Den slutna kammaren som syns i figur 15 har ett lock eftersom mätningarna måste utföras i mörker.



Figur 15: Den slutna kammaren garanterade att provet alltid var vinkelrätt mot det infallande ljuset.

Reglagen i kammaren gjorde det lätt att justera provet så att strålen träffade provet. Att provet fästes i kammaren garanterade även att provet befann sig på samma ställe. I figur 15 syns även hur kyvetten är placerad, nämligen liggandes med öppningen mot öppningen av kammaren. Figur 16 visar hur kyvetten är monterad:



Figur 16: Kyvetten monterad på hållaren. Det luddiga material som täcker större delen av kyvetten gör att ljuset enbart träffar den aktiva ytan (gittret). Materialet valdes på grund av dess goda förmåga att absorbera ljus.

Kyvetten består av högkvalitativ kvarts vilket ger en transmission på över 80% för intervallen 200 nm till 2500 nm (Hellma 2012). Den är 1 mm djup med volymen 350  $\mu$ l. Framför kyvetten finns ett optiskt inert material som garanterar att endast gittret träffas av ljuset.

För styrning av monokromatorn samt inläsning av data användes det LabVIEW-program som fanns tillgängligt i laboratoriet.

### 3.5.2 Tillvägagångssätt

Inför varje provtagning rengjordes alla prover i UV-ozon i 5 minuter på varje sida. Därefter sköljdes proverna med destillerat vatten samt torkades med torr tryckluft. 300  $\mu$ l destillerat vatten pipetterades i kyvetten. En referensmätning utförs inför varje provtagning. Där placerades provet i kyvetten så enbart gittret var blottat och resterande yta täcktes av det optiskt inerta materialet. När mätningen från 400 nm till 1100 nm var genomförd sparades resultatet i en textfil, provet tog ur kyvetten och proceduren upprepades för nästa prov. Detta tillvägagångssätt upprepades för alla proverna.

Samma tillvägagångssätt användes för alla dielektrikum.

## 3.6 Biomätningar

### 3.6.1 Material

Mätningarna genomfördes med hjälp av en spektrofotometer modell Lambda 25 tillverkad av Perkin Elmer. Lambda 25 valdes framför Keithley 238 på grund av mät hastigheten eftersom inbindningen är en väldigt snabb process. Enbart provet 400P600 användes för biomätningar då detta ansågs vara bäst lämpat för denna typ av försök enligt de kriterier som var uppsatta. Alla försök genomfördes i Phosphate Bufferd Salt (PBS) som tillverkades genom att lösa upp 1 st. PBS-tablett i 1000 ml destillerat vatten. De två proteiner som användes i biomätningarna var Biotin labeled Bovine Serum Album (B-BSA) samt fluidMAG Streptavidin där båda proteinerna



blandades till en lösning med koncentrationen 1 mg/ml i PBS. fluidMAG Streptavidin är en produkt från Chemicell där en magnetisk partikel i storleken 100 till 200 nm omges av en matris bestående av Streptavidin. Alla försök utfördes i samma kyvetter som användes i de grundläggande mätningarna.

### 3.6.2 Tillvägagångssätt

Inför mätningarna rengjordes 400P600 med UV-ozon i 15 minuter på vardera sida varefter provet tvättades med destillerat vatten och torkades med torr tryckluft. I kyvetten tillsattes 300 µl PBS och en referensmätning utfördes inom intervallet 400 nm till 1100 nm. Efter referensmätningen tillsattes prov 400P600 i kyvetten och transmissionen uppmättes. Provet togs ut och lades i destillerat vatten medan 10 µl B-BSA-lösning pippeterades i kyvetten. För att mäta inbindningen av B-BSA på provet genomfördes 15 spektrofotometriska mätningar efter varandra inom intervallet 750 nm till 850 nm. Efter kinetikmätningen lades provet i destillerat vatten. Kyvetten rengjordes och pippeterades därefter med 300 µl PBS. Provet lades i kyvetten och en mätning från 400 nm till 1100 nm genomfördes. Därefter togs provet ut, lades i blöt medan 10 µl Streptavidin adderades till kyvetten. Även denna gång utfördes en kinetikmätning genom att upprepa mätningen inom intervallet mellan 750 nm till 850 nm 15 gånger. Detta för att se inbindningen mellan B-BSA och fluidMAG. Provet lades i blöt, kyvetten sköljdes och pippeterades med 300 µl PBS varpå den sista mätningen utfördes inom intervallet 400 nm till 1100 nm. Mellan provtagningarna förvarades provet i 1% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS).

Eftersom inbindningen mellan guldytan och proteinet var stark testades ett antal olika tvättar för att rengöra ytan:

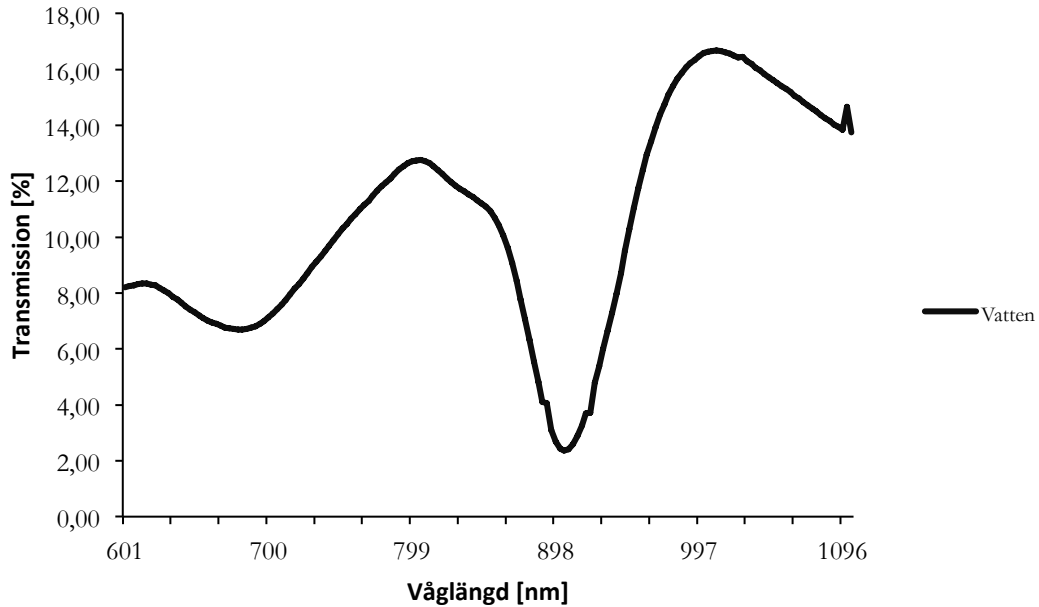
- TL1-tvätt i 85°C under 1,2,5,10,15 min.
- 1% SDS-tvätt över natt
- 2mg/l SDS-tvätt i 37°C under 40 min.
- 2mg/l SDS-tvätt i 60°C under 2h.
- 2mg/l SDS-tvätt i 90°C under 30 min.

Tyvärr var bindningen så stark att rengöringen inte lyckades vilket var ett väntat. Detta innebar att inbindningen enbart kunde mätas en gång.

## 4 Resultat och diskussion

### 4.1 Verifierande mätningar

För de verifierande mätningarna erhöles resultat för prov 400P600 enligt figur 17:



Figur 17: Transmissionsspektrum för prov 400P600 från 600 till 1100 nm.

Resultatet visas inom intervallet 600 nm till 1100 nm eftersom de teoretiska beräkningar som genomförts är tillförlitligast inom detta intervall. Två tydliga toppar i figur 17 finns vid 800 nm, 1000 nm samt ett minima vid 900 nm vilka förklaras av EOT samt Woods anomalier. De beräkningar som genomförts med ekvation 14 gav att  $\lambda_{EOT}$  för  $n_{H_2O}$  inträffar vid 819 nm vilket är en god överensstämmelse med experimentella data.  $\lambda_{Wood}$  skall enligt beräkningar med ekvation 15 inträffa vid 900 nm när  $n_{SiO_2} = 1,5$  vilket stämmer med de uppmätta resultaten.

Den största toppen vid 1000 nm uppkommer från EOT för  $n_{SiO_2}$  där beräkningar ger ett värde av 958 nm. Skillnaden mellan teoretiska och uppmätta värden förklaras av att vissa optiska effekter har försumrats i de teoretiska modellerna för att underlätta beräkning (Uxia m.fl. 2010). Denna förenkling leder till att uppmätta värden kommer vara rödförskjutna jämfört med beräknade värden (Uxia m.fl. 2010). Anledningen till att det teoretiska resultatet för  $n_{H_2O}$  är rödförskjutet beror på att EOT inträffar för nära gränsen för när Drudemodellen slutar att ge en korrekt beskrivning av dielektricitetskonstanten.

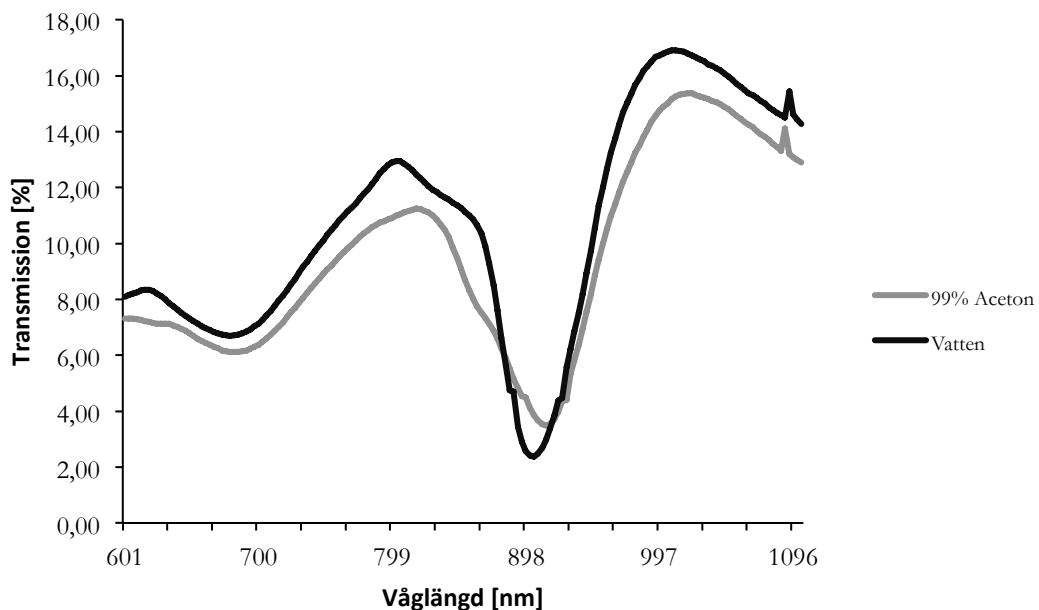
Viktigt att notera är att  $\lambda_{Wood}$  och  $\lambda_{EOT}$  för  $n_{H_2O}$  inträffar vid ungefär samma våglängd vilket är intressant. Detta kan betyda att signalen för  $\lambda_{EOT}$  egentligen är större om den inte hade inträffat vid samma punkt som Wood's.

I tabell 3 visas de teoretiska och experimentella värden för  $\lambda_{EOT}$  och  $\lambda_{Wood}$  för prov 400P600.

Tabell 3: Experimentella och teoretiska värden för  $\lambda_{Wood}$  och  $\lambda_{EOT}$  för prov 400P600 enligt ekvation (14) och (15).

	Experimentellt värde [nm]	Teoretiskt värde [nm]
$\lambda_{Wood}$ för $n_{SiO_2}$	900	900
$\lambda_{EOT}$ för $n_{H_2O}$	800	819
$\lambda_{EOT}$ för $n_{SiO_2}$	1000	958

Nedan visas de uppmätta resultat för  $n_{H_2O}$  jämfört med  $n_{Aceton}$  för att visa den rödförskjutning som uppkommer när  $n$  ökar:



Figur 18: Transmissionsspektrum för 99% aceton jämfört med vatten. En tydlig rödförskjutning uppkommer runt 800 nm.

EOT för  $n_{H_2O}$  inträffar vid samma punkt som figur 18, nämligen 800 nm och den beräknade punkten för EOT är 819 nm. Experimentellt inträffar EOT för  $n_{Aceton}$  vid 817 nm medan den beräknade punkten är 836 nm. Eftersom det teoretiska resultatet är rödförskjutet i båda fallen undersöks  $\Delta\lambda_{EOT}$  där detta värde överensstämde med det experimentella:  $\Delta\lambda_{Teori} = \Delta\lambda_{Uppmätt} = 17 \text{ nm}$ . Anmärkningsvärt är att även  $\lambda_{Wood}$  blir rödförskjutet med 17 nm.  $n_{SiO_2}$  borde förbli oförändrat vid byte av dielektrikum vilket visas av att  $\lambda_{EOT}$  för  $n_{SiO_2}$  inte förskjuts åt något håll. Detta leder till frågan ifall  $\lambda_{Wood}$  verkligen beror på interaktionen mellan guldets och glasets.

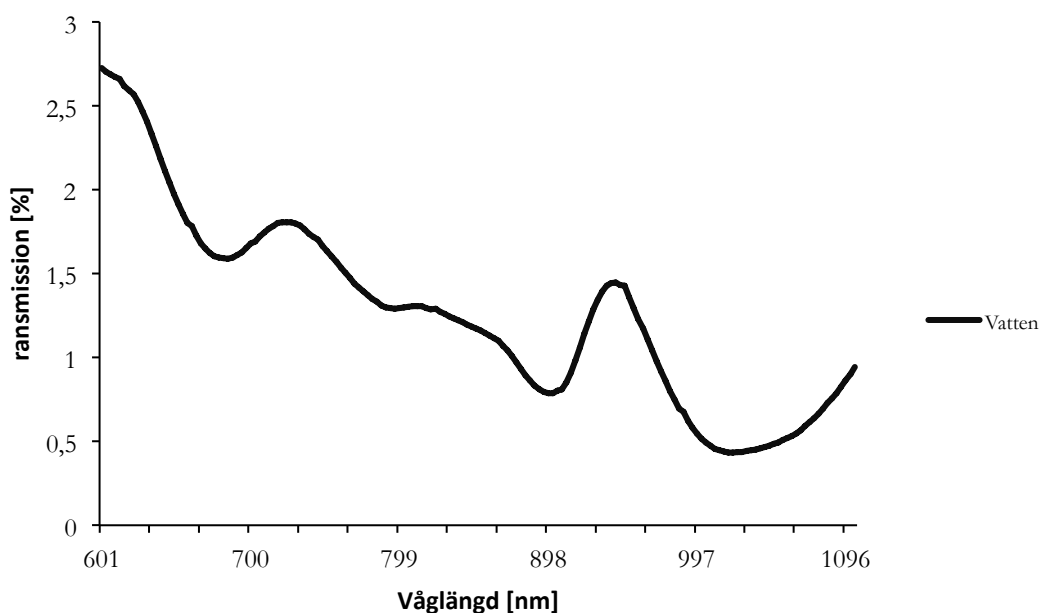
För proven 140P600 och 200P600 skall utseendet av transmissionsspektrumet påminna om det för 400P600 eftersom  $a$  är samma. Skillnaden mellan proverna är hålstorleken vilken påverkar bildförhållandet där ett bildförhållande nära 1 ger en väldigt skarp topp.

Tabell 4 visar att 140P600 är det prov vars bildförhållande är närmast 1 där  $\lambda_{EOT}$  och  $\lambda_{Wood}$  borde befinna sig vid samma punkt som 400P600 eftersom  $a = 600 \text{ nm}$ .

Tabell 4: Bildförhållandet för alla prover vilket är guldlagrets tjocklek dividerat med hålets diameter.

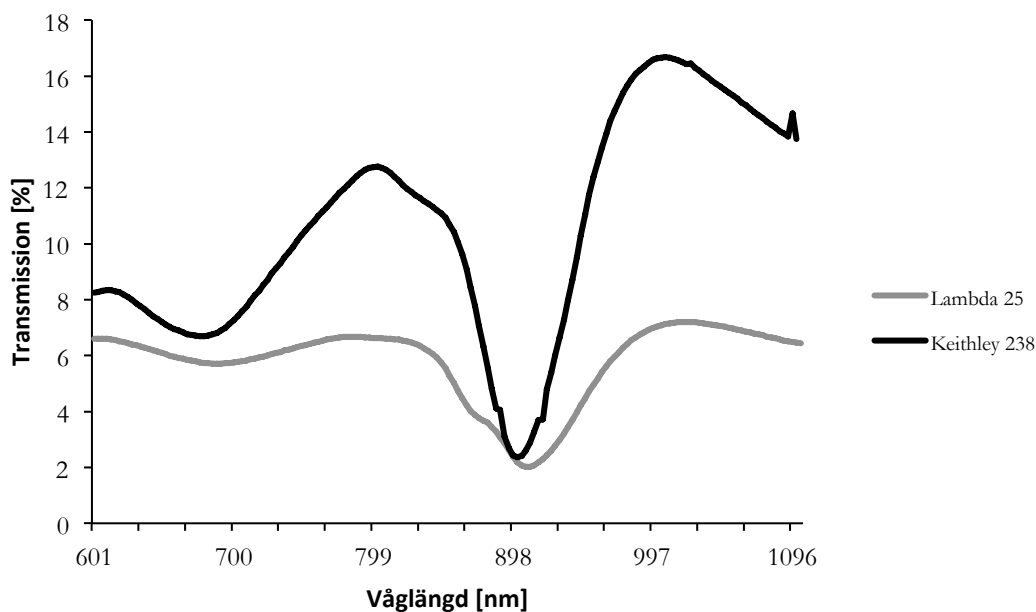
Prov	Bildförhållande
140P600	0,71
200P600	0,5
400P600	0,25
400P1000	0,25
600P1000	0,16

Figur 19 visar transmissionsspektrumet från 140P600:



Figur 19: Transmissionsspektrum för 140P600 där utseendet skiljer sig avsevärt från 400P600.

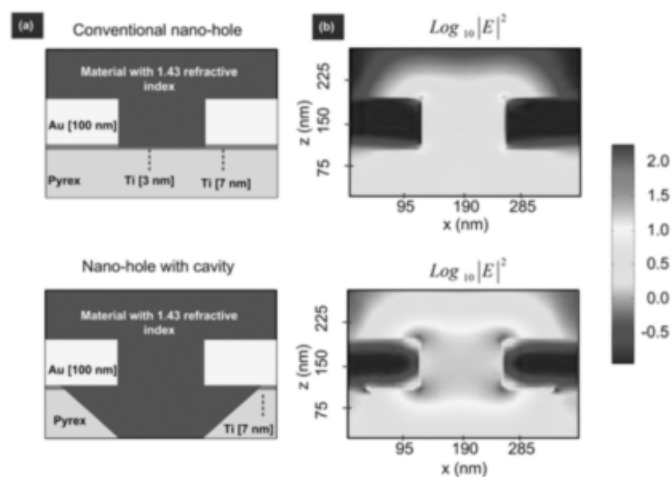
Utseendet stämmer inte med teorin eftersom  $\lambda_{EOT}$  och  $\lambda_{Woods}$  inte inträffar vid samma punkt. Anledningen till denna skillnad i transmissionsspektra kan bero på att transmissionen för 140P600 och 200P600 var väldigt låg på grund av de små aperturerna. Det är bland annat på grund av detta som de verifierande mätningarna genomfördes med Keithley 238 då denna utrustning hade mycket högre noggrannhet. Figur 20 visar skillnaden i signalstyrka mellan Lambda 25 och Keithley 238.



Figur 20: Signal från Lambda 25 jämfört med Keithley 238 för prov 400P600.

Signalstyrkan hos EOT är nästan två gånger större hos Keithley 238 vilket visar på fördelen med denna mätutrustning. Trots detta påverkade förmodligen signalstyrkan resultatet vilket visar på att gitter med små aperturer förmodligen inte är lämpade för denna applikation då de kräver väldigt noggranna instrument som ofta är både dyra och känsliga.

Ett sätt att öka signalstyrkan för små aperturer är att etsa glaset under aperturen eftersom proverna som användes inte var etsade (Mohamadreza m.fl. 2012). Figur 21 visar fältstyrkan hos plasmonen för glas med och utan etsning:



Figur 21: a) Överst syns hur konventionella gitter är byggda där ingen etsning av glas har genomförts. Underst visas hur en etsning av glas ser ut. b) Överst visas fältstyrkan då etsning saknas och under när glaset har blivit etsat. (Mohamadreza m.fl. 2012).

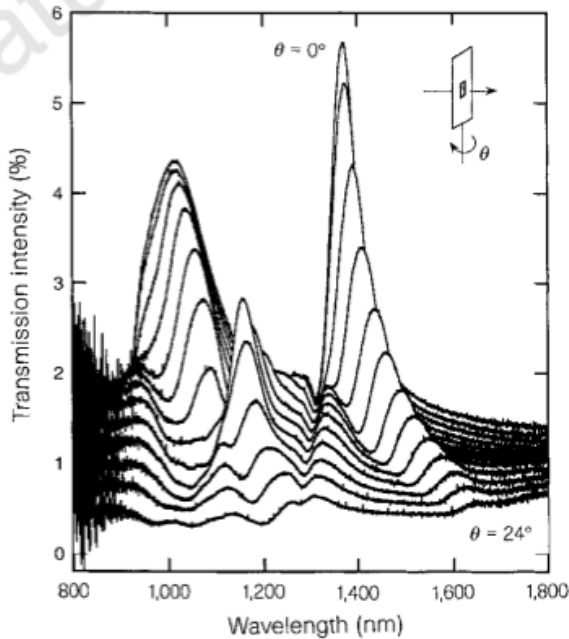
En tydlig förstärkning av fältstyrkan resulterar i en starkare signal. Figur 21 visar hur signalen påverkar transmissionsspektrumet där a) visar utan etsning och b) är med etsning.

För proverna 400P1000 och 600P1000 ( $a = 1000$  nm) uppkommer  $\lambda_{EOT}$  enligt beräkningar vid 1329 nm för  $n_{H_2O}$  vilket är utanför det intervall som Lambda 25 och Keithley 238 kan mäta. Detta betyder att det inte finns möjlighet att jämföra mätresultaten från proverna med teorin.

Under genomförandet av mätningarna uppdagades ett antal praktiska problem som

exempelvis linjeringen av provet. Förfarandet var att placera provet längst ner i kyvetten så att centreringen alltid var den samma.

Eftersom kyvetten var 1 mm djup och provet var 0,5 mm tjockt fanns det risk för att provet lutade i kyvetten. Vinkeln leder till att ljuset inte faller vinkelrätt mot provet. Figur 22 visar hur både placering och intensitet av transmissionstoppen påverkas av ljusets infallsvinkel. Det kan även leda till att provet riskerar att fästa sig vid kyvettens yta på grund av vakumkrafter som uppstår när provet appliceras. Detta kan förhindra dielektrikum från att nå gittret. Utöver att dielektrikum inte når gittret riskerar provets yta att repas på



Figur 22: Sambandet mellan EOT-spektrum och ljusets infallsvinkel. När vinkeln ökar erhöles en rödförskjutning samt en förminskning av intensitet. (Ebbesen m.fl. 1998)

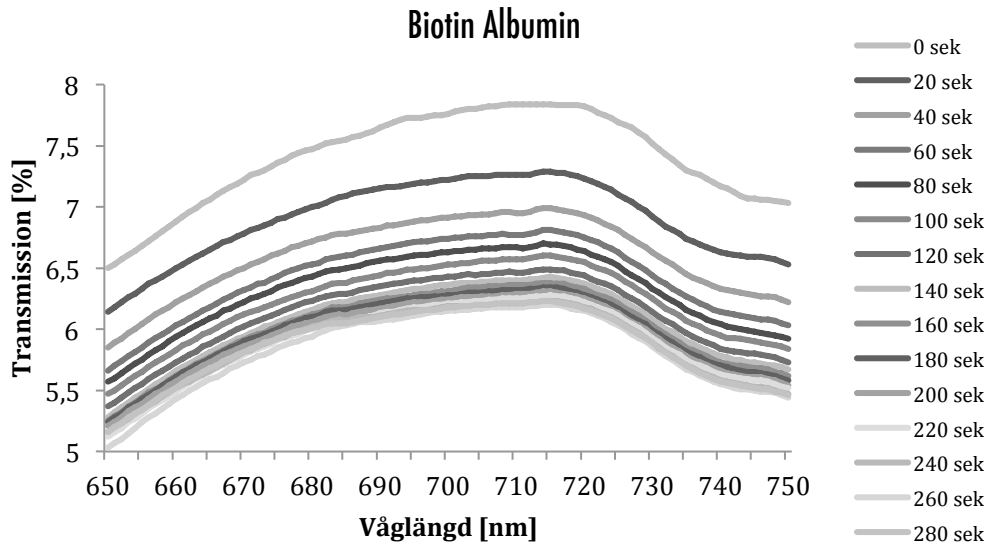
grund av kontakten med kyvetten. Även metoden för att sätta in och ta ut provet borde förbättras för att undvika att guldtytan slits ut.

Den bästa lösningen är att specialbeställa kyvetter vars mått är anpassade efter provet. Det är även fördelaktigt ifall det finns möjlighet att genom kyvetten pumpa olika dielektrikum, detta för att minimera behovet av att föra provet in och ut ur kyvetten.

## 4.3 Biomätningar

### 4.3.1 Kinetikmätningar

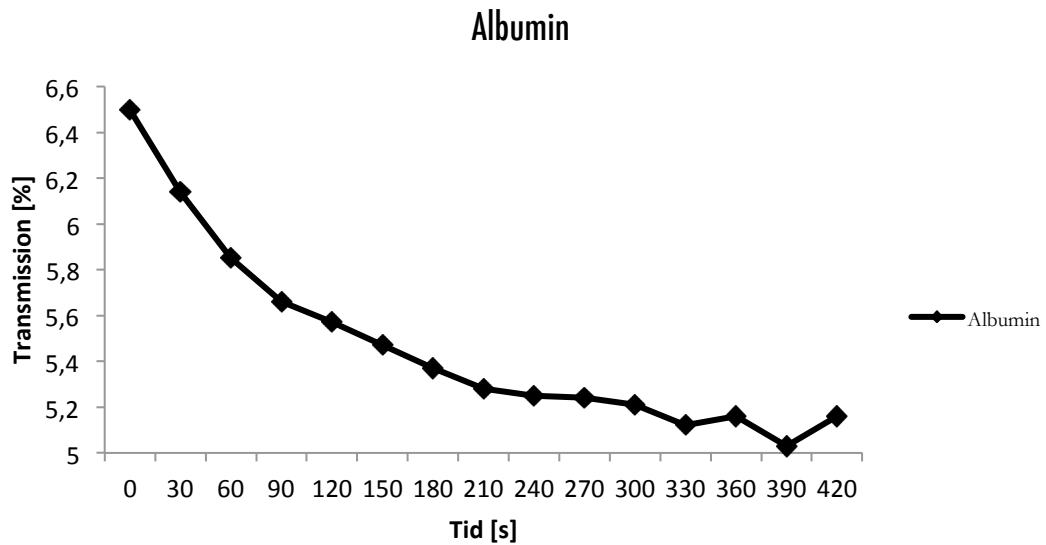
Det protein som användes som molekylär receptor var B-BSA. Figur 23 intensitetsändringen under inbindningen.



Figur 23: Kinetikmätningar av B-BSA där intensiteten minskar efter varje mätning. Detta innebär att intensiteten minskar allt eftersom B-BSA binder till guldytan. Den största minskning sker i början då inbindning till ytan sker snabbt.

Inbindningen kännetecknas av en avtagande intensitet av transmissionen efter varje mättillfälle. Transmissionsminskningen avtar med tiden då ytan blir mättad på proteiner vilket motsvarar en täckning av c:a 60% (Yunzhi m.fl. 2003).

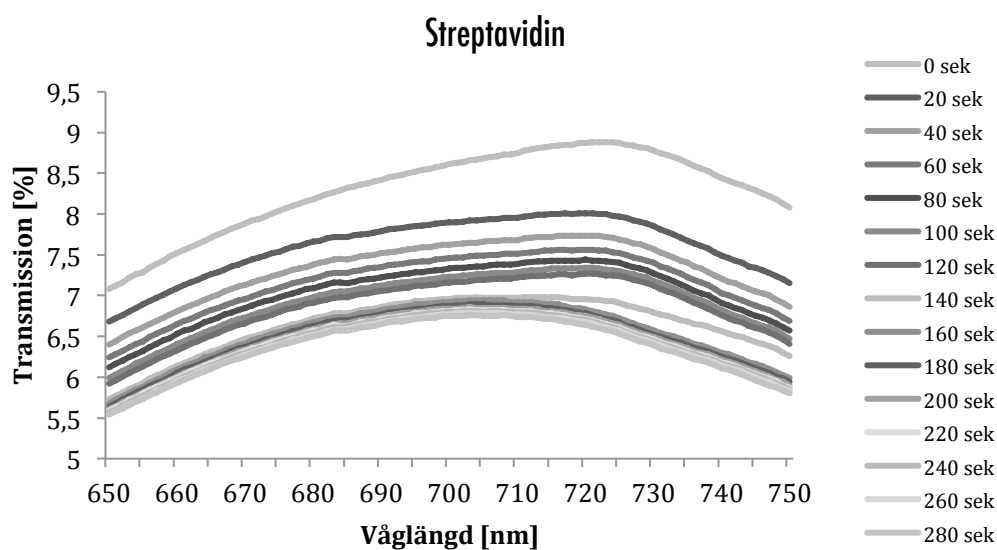
Transmissionsminskningen avtar exponentiellt med tiden vilket visas av figur 24:



Figur 24: Kinetikmätning av B-BSA där maxima visas mot tiden.

Enligt teorin borde även en förskjutning infinna när brytningsindex förändras vid guldtytan. Brytningsindexet för PBS-buffert och B-BSA är olika eftersom  $n_{PBS} = 1,33$  (Chien & Chen 2006) och  $n_{B-BSA} = 1,5$  (Larsson & Liedberg 2007) men trots denna skillnad kunde ingen förskjutning mätas. Detta beror med största sannolikhet på att Lambda 25 inte har den upplösning som krävs för att visa en våglängdsförskjutning. En annan förklaring är att proverna innehåller orenheter som uppkom under produktionen som i sin tur försämrar känsligheten.

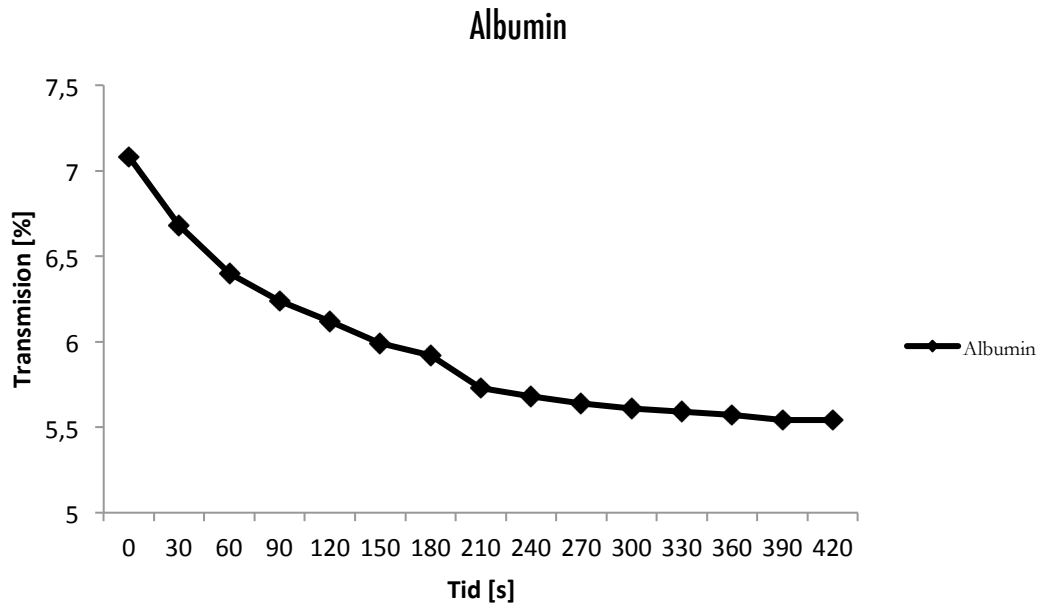
För fluidMAG Streptavidin fanns tyvärr ingen data om brytningsindex tillgänglig. Brytningsindexet för vanligt Streptavidin när det bildar en film över en yta är 1,45. Detta leder till att det inte är möjligt att beräkna ett teoretiskt värde för  $\lambda_{EOT}$  som sedan kan jämföras med experimentella värden. Figur 25 visar hur fluidMAG Streptavidin binder till B-BSA genom att en tydlig intensitetsminskning uppkommer.



Figur 25: Inbindning av fluidMag Streptavidin. En tydlig intensitetsminskning syns.

Figur 25 visar inbindning av FluidMag Streptavidin på samma sätt som för B-BSA genom en tydlig minskning i intensitet. Precis som för B-BSA kan detta förlopp visas genom att maxvärdet visas mot tiden, se figur 26:





Figur 26: Kinetikmätning av B-BSA där maxima visas mot tiden.

Resultatet visar att B-BSA har bildat ett monolager vid guldytan varpå Streptavidinet har bundit in till dem.

## 6 Slutsatser

Den mätmetod som utvecklades för att mäta EOT vid de verifierande mätningarna fungerade på ett tillfredsställande sätt eftersom experimentella värden överensstämde med teoretiska för ett av proven, nämligen 400P600. För att mäta EOT för övriga prover måste noggrannheten och mätintervallet utökas. Detta är nödvändigt eftersom proverna 140P600 och 200P600 hade låg transmittans och EOT för proverna 400P1000 och 600P1000 inföll utanför mätintervallet i enlighet med de teoretiska beräkningarna.

Vid de verifierande mätningarna uppmättes även förskjutning av EOT när olika dielektrikum användes vilket visar att mätprincipen för detektion fungerar samt att mätmetoden kan mäta dem. Även vid förskjutning av EOT var det prov 400P600 som levererade det resultat där experimentella värden stämde bäst överens med de teoretiska resultaten.

Under biomätningarna lyckades inbindning av både B-BSA och Streptavidin mätas. Detta innebär att principen med att funktionalisera ytan med olika proteiner fungerar. Ingen förskjutning av EOT vid inbindningen kunde detekteras vilket var väntat enligt den litteratur som studerats innan genomförande av experimentet. Anledningen till detta är med största sannolikhet att den utrustning som användes för att mäta kinetiken inte hade tillräcklig hög lateral noggrannhet.

Studien indikerar att EOT kan principiellt användas som detektionsmetod vid vattentillämpningar. Försöken som har utförts visar att fenomenet fungerar i laborationsmiljö med destillerat vatten och specifika kemikalier. Tyvärr är det svårt att säga vid detta stadium om tekniken kan användas ute i fält, dvs i väldigt komplexa vattenlösningar som exempelvis sjöar.

## 7 Referenser

Catrysse P., Fan S. (2007). "Near-complete transmission through subwavelength hole arrays in phonon-polaritonic thin films." *Physical Review B* 75(7).

Chien F., Chen S. (2006). "Direct determination of the refractive index and thickness of a biolayer based on coupled waveguide–surface plasmon resonance mode." *Optics Letters* 31(2): 2.

Colifast (2001). "Colifast At-Line Microbial Monitor." Hämtad 03-05, 2012, från <http://www.colifast.no/media/pdf/AT-Line.pdf>

Ebbesen, T., Lezec H., Ghaemi H., Thio T., Wolff P. (1998). "Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays." *Nature* 391: 667-669.

Göta älvs vattenvårdsförbund (2011). "Organisation - Göta älvs vattenvårdsförbund." Hämtad 02-05, 2012, från <http://www.gotaalvvvf.org/organisation.4.101b298612d0e33932680001775.html>

Hedström A., Jönsson R., Mäki A., (2009). "Tidiga förvarningssystem – Är det någonting för våra kommuner?" Hämtad 02-05, 2012, från <http://vav.griffel.net/filer/2009-03.pdf>

Hellma (2012). "Material and Technical Information." Hämtad 02-05, 2012, från <http://www.hellma-analytics.com/text/283/en/material-and-technical-information.html>

Ilie B., Lindquist M., Robertsson L., Wide P. (2006). "A fuzzy technique for food- and water quality assessment with an electronic tongue." *Fuzzy Sets and Systems* 157(9): 1155–1168.

Jiang-Yan L., Yi-Lei H., Jin-Xin F., Zhi-Yuan L. (2010). "Influence of hole geometry and lattice constant on extraordinary optical transmission through subwavelength hole arrays in metal films." *Journal of Applied Physics* 107(7): 8.

Larsson A., Liedberg B. (2007). "Poly(ethylene glycol) Gradient for Biochip Development." *Langmuir* 23(22).

Lesuffleur, A., Hyungsoon I., Lindquist M., Kwan Seop L., Sang-Hyun O. (2008). "Plasmonic Nanohole Arrays for Real-Time Multiplex Biosensing." *Proc. SPIE* 7035(703504): 1-10.

Livsmedelsverket (2001). Livsmedelsverkets föreskrifter om dricksvatten,. SLVFS 2001:30. Livsmedelsverket.

Maier A. (2007). *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. New York, Springer.

Mohamadreza N., Fartash V., Bozena K., Carson J. (2012). "Nano-hole array structure with improved surface plasmon energy matching characteristics." *Applied Physics Letters* 100(4): 4.

Ortuño R., García-Meca C., Rodríguez-Fortuño F., Håkansson A., Griol A. (2009). "Midinfrared filters based on extraordinary optical transmission through subwavelength structured gold films." *Journal of Applied Physics* 106(12).

Pitarke J., Silkin V., Chulkov E., Echenique P. (2007). "Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons." *Reports on Progress in Physics* 70(1): 1-87.

Prangma J. (2009). Local and dynamic properties of light interacting with subwavelength holes. FOM-Institute for Atomic and Molecular Physics (AMOLF) Enschede, University of Twente. PhD.

Svenskt vatten (2007). Dricksvattenförsörjning i förändrat klimat. Östervåla, Elanders.

Ulman A. (1996). "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers." *Chemical Reviews*, 1996, Vol. 96, No. 4 96(4).

Uxia X., Hongjian L., Shaoli F., Haiqing X., Xin Z., Zhimin L. (2010). "The extraordinary optical transmission through double-layer gold slit arrays." *Optics Communications* 283(20): 4017–4024.

Willems K., Van Duyne R. (2007). "Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing." *Annual Review of Physical Chemistry* 58: 267-297.

Yanik A., Huang M., Kamohara O., Artar A., Geisbert T., Connor J., Altug H. (2010). "An Optofluidic Nanoplasmonic Biosensor for Direct Detection of Live Viruses from Biological Media." *Nano Letters* 10(12): 4962-4969.

Yunzhi Y., Cavin R., Ong J. (2003). "Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment." *Journal of Biomed Materials Research Part A*. 63(1).