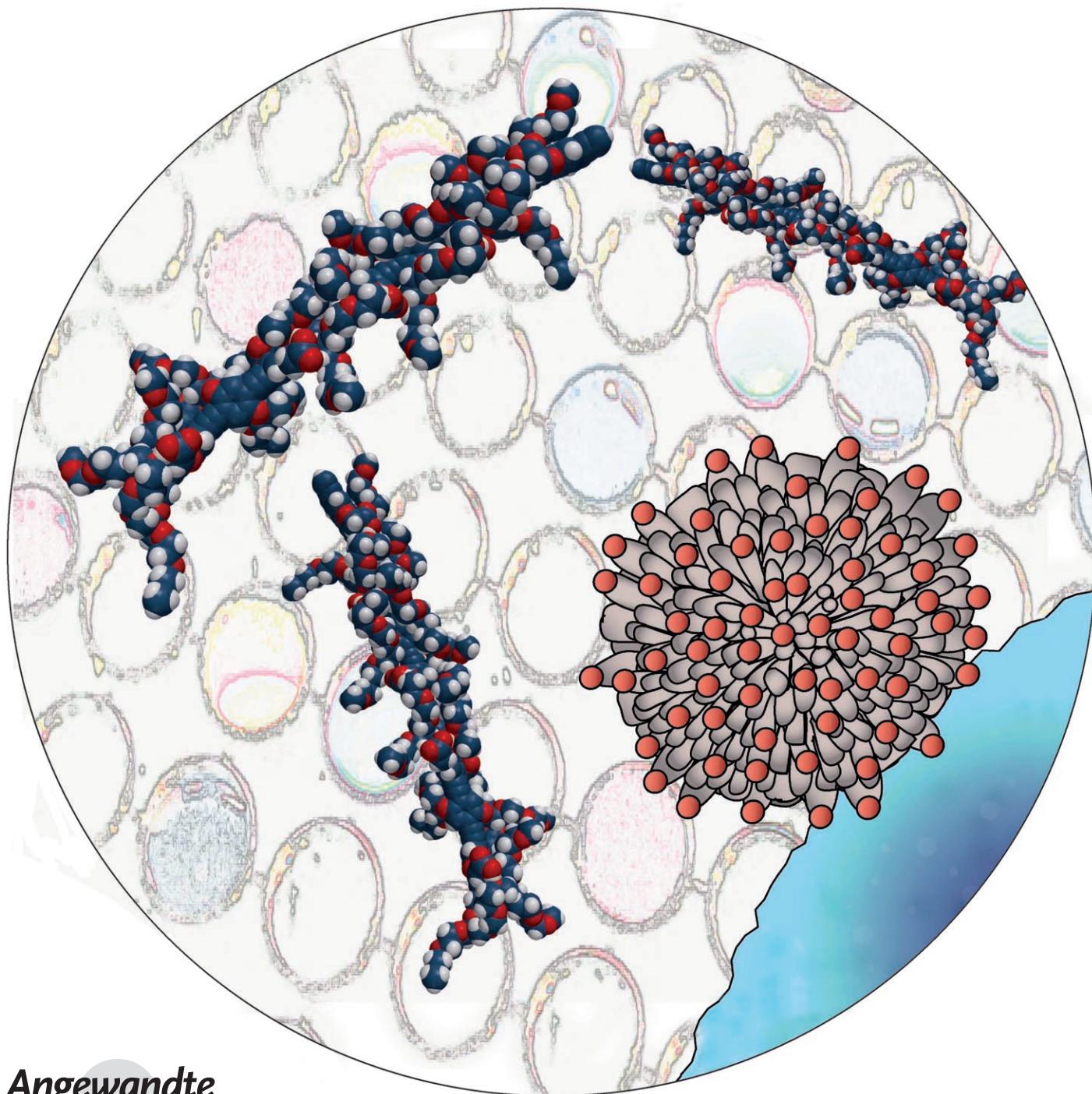


# Effiziente Erkennung von Bakterien mit Goldnanopartikel-Poly(*para*-phenylenethinyl)-Konstrukten\*\*

Ronnie L. Phillips, Oscar R. Miranda, Chang-Cheng You, Vincent M. Rotello\* und Uwe H. F. Bunz\*



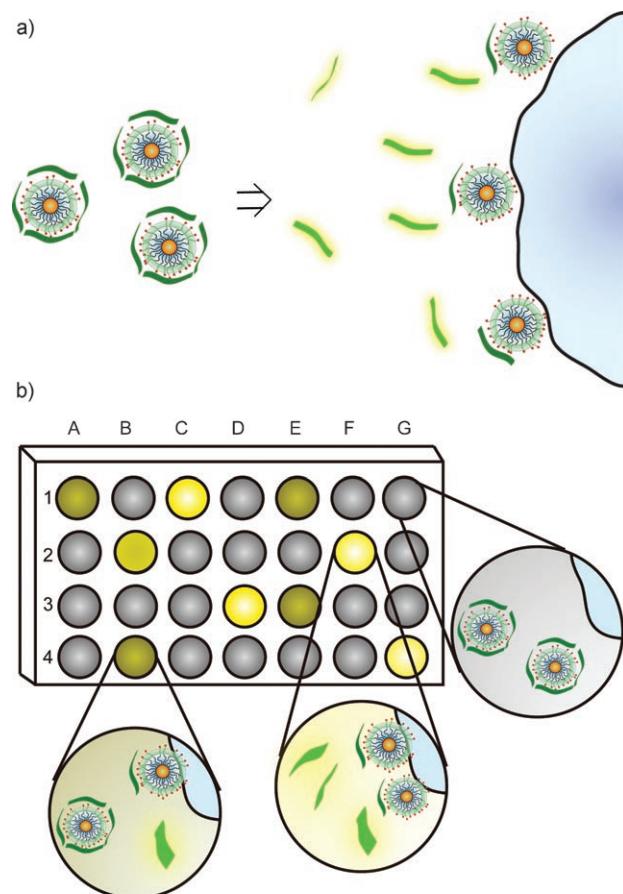
Der effiziente Nachweis pathogener Mikroorganismen in Wasser, Blutserum und anderen biologischen Flüssigkeiten ist wichtig in der Medizin, der Forensik und den Umweltwissenschaften.<sup>[1-2]</sup> Wir berichten hier, dass nichtkovalente Konjugate aus Goldnanopartikeln und einem Poly(*para*-phenylenethinylen) (PPE) Bakterien innerhalb weniger Minuten erkennen können.<sup>[3-8]</sup> Die Wechselwirkung zwischen Nanopartikel und Bakterien führt zur Freisetzung des gebundenen Polymers und damit zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Dieser ist so effizient, dass zwölf Bakterienstämme differenziert werden konnten.<sup>[5]</sup> Die Methode identifiziert Mikroorganismen ohne die Verwendung von Antikörpern<sup>[6,7]</sup> oder radioaktiv markierten Reagentien.<sup>[8]</sup>

In der klinischen Praxis werden pathogene Mikroorganismen durch Abstrich und Kultur auf geeignetem Medium bestimmt.<sup>[9]</sup> Zwar wurden auch andere, neuere Methoden für die Erkennung spezifischer Mikroorganismen entwickelt,<sup>[10]</sup> diese sind aber komplex oder brauchen aufwändige Instrumentierung. Die Methode der Bakterienkultivierung ist akkurat, jedoch sind Ergebnisse erst nach 24 h erhältlich. Rasche Behandlungsentscheidungen werden dann meist ohne mikrobiologische/pathologische Information getroffen; die Verschreibung sub-optimaler oder unwirksamer Antibiotika ist daher ein tatsächliches Problem. Ein gutes Beispiel ist die Infektion durch Keflex- und Penicillin-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA), die Behandlung mit Sulfa-Medikamenten oder Vancomycin erfordern.<sup>[11]</sup> Reisner und Woods haben mehr als 9000 Fälle klinischer Infektionen untersucht und fanden, dass 85–90% von nur sieben Arten von Bakterien hervorgerufen wurden.<sup>[9]</sup> Allein *S. aureus* und *E. coli* waren für die Hälfte aller Infektionen verantwortlich. Ein einfach auszuführender und zeitsparender Test, der klinisch wichtige Pathogene unterscheiden könnte, wäre deshalb von großem Wert, würde die Effizienz antibakterieller Therapien erhöhen und Fälle von medikamentenresistenten Infektionen verhindern.

Der Nachweis pathogener Bakterien spielt ebenfalls eine Rolle in der Nahrungsmittelindustrie,<sup>[12]</sup> da der Bakterienstamm *E. coli* O157:H7 Nahrungsmittelvergiftungen hervorruft. Jedes Jahr werden mehr als 2000 schwere Vergiftungen mit Krankenhausaufenthalt sowie 60 Todesfälle allein in den

Vereinigten Staaten als Folge der Infektion mit diesem Erreger gemeldet.<sup>[7,13]</sup> Epidemieartige Ausbrüche von Nahrungsmittelvergiftungen werden durch unpasteurisierte Fruchtsäfte, Gemüse, Wasser usw. ausgelöst,<sup>[14]</sup> aber leider sind die herkömmlichen Strategien zur Detektion bakterieller Kontaminierung komplex und zeitaufwändig.

Um Bakterien schnell und effizient zu identifizieren, haben wir ein Protokoll entwickelt, das sich eines Goldnanopartikel-PPE-Arrays bedient.<sup>[15,16]</sup> Diese „chemische Nase“ vereinigt verschiedene Rezeptoren, um Analyten durch ihre differentiellen Reaktionen zu unterscheiden. Ein anionisches PPE (Abbildung 1) wird mit einer wässrigen Goldnanopartikelösung gemischt und ergibt ein fluoreszenzgelöstes Konjugat. In der Gegenwart von Bakterien, deren Oberflächen immer negativ geladen sind, wird das anionische PPE verdrängt. Daher wird nach Zugabe von Bakterien zum Nanopartikel-PPE-Konjugat ein Anstieg der Fluoreszenz be-



**Abbildung 1.** Entwurf des Nanopartikel-PPE-Sensorarrays. a) Verdrängung des anionischen PPE von den kationischen Nanopartikeln durch die negativ geladene bakterielle Zelloberfläche. b) Fluoreszenzmusterentstehung auf der Mikrotiterplatte. Nach Freisetzung vom Goldnanopartikel zeigen die PPEs Fluoreszenz, allerdings moduliert durch die relative Bindungsenergie zwischen Nanopartikel und PPE und der Wechselwirkung zwischen Bakterium und Nanopartikel. Durch die Variation dieser Wechselwirkungen generiert dieser Sensorarray unterschiedliche Fluoreszenzmuster für verschiedene Bakterien. A–G bezeichnen die unterschiedlichen Bakterien auf der Mikrotiterplatte, 1–4 die PPE-Nanopartikel-Konstrukte.

[\*] R. L. Phillips, Prof. Dr. U. H. F. Bunz  
School of Chemistry and Biochemistry,  
Georgia Institute of Technology  
901 Atlantic Drive, Atlanta, GA 30332 (USA)  
Fax: (+1) 404-385-1795  
E-Mail: uwe.bunz@chemistry.gatech.edu

O. R. Miranda, Dr. C.-C. You, Prof. Dr. V. M. Rotello  
Department of Chemistry, University of Massachusetts  
710 North Pleasant Street, Amherst, MA 01003 (USA)  
Fax: (+1) 413-545-2058  
E-Mail: rotello@chem.umass.edu

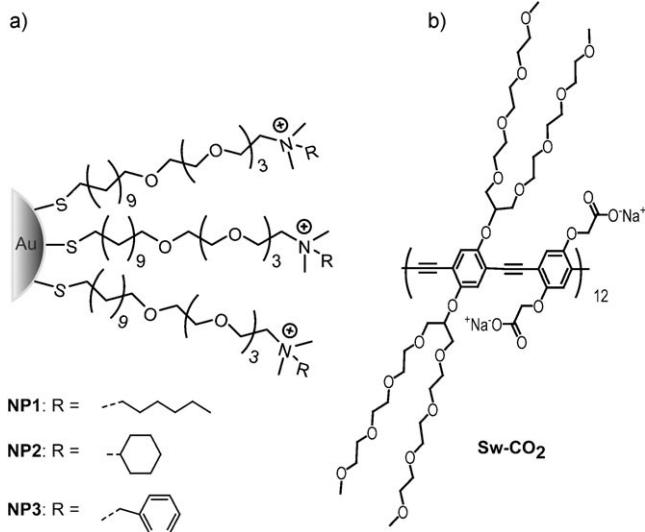
[\*\*] Wir danken dem Department of Energy (DE-FG02-04ER46141) für finanzielle Unterstützung (U.H.F.B. und V.R.) sowie Dr. A. Bommaris (Georgia Institute of Technology) und Dr. J. Hardy (University of Massachusetts Amherst) für die Bakterienstämme.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

obachtet, der auf das Vorliegen von freien PPEs zurückgeht.<sup>[16]</sup> In der Literatur wurde die Präparation von Polylysinfunktionalisierten Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von 1.6 nm beschrieben,<sup>[17]</sup> diese wechselwirken mit hydrophoben und/oder funktionalen bakteriellen Oberflächen und ergeben selbstorganisierte elektrostatische Konjugate aus lebenden Bakterien und Nanopartikeln.<sup>[18]</sup>

Das in dieser Studie verwendete, fluoreszierende PPE ist ein multivalenter molekularer Draht,<sup>[19,20]</sup> der die effiziente Erzeugung eines Fluoreszenzsignals ermöglicht. Da auf bakteriellen Zelloberflächen funktionale Regionen, d. h. Gruppen negativ geladener Aminosäurereste und hydrophobe Zentren („hot spots“), existieren,<sup>[21]</sup> sollte diese Strategie zum Nachweis verschiedenster Mikroorganismen sehr nützlich sein.

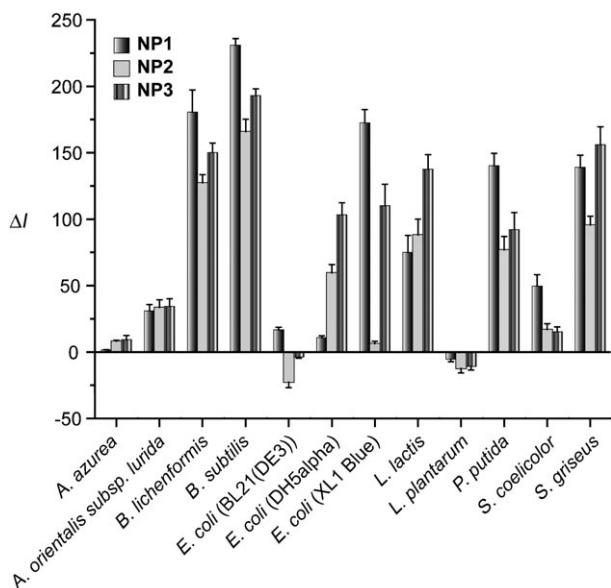
Als geeignetes Substrat für die Fluoreszenzverdrängung verwendeten wir das PPE **Sw-CO<sub>2</sub>**<sup>[22]</sup> und drei hydrophob ammoniumfunktionalisierte Goldnanopartikel, **NP1–NP3**,<sup>[16]</sup> als Sensorelemente (Abbildung 2). Fluoreszenztitrationsstu-



**Abbildung 2.** Rezeptor und Signaleinheiten des Bakteriensensors. a) Struktur der drei kationischen, hydrophoben Goldnanopartikel **NP1–NP3**. b) Struktur des PPE **Sw-CO<sub>2</sub>**, das verzweigte Oligo(ethylenglycol)-Seitenketten aufweist, die unspezifische Wechselwirkungen zwischen PPE und Bakterien unterdrücken.

dien zeigten, dass die kationischen Goldnanopartikel **NP1–NP3** die Fluoreszenz des PPE effizient unter Bildung der entsprechenden supramolekularen Komplexe löschen (Abbildung S1 und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).<sup>[15]</sup> Eine wässrige Lösung des PPE (100 nm, basierend auf einem Polymerisationsgrad von 12 Monomereinheiten) wurde mit den Nanopartikeln titriert, bis die Fluoreszenz auf 20% des ursprünglichen Wertes ( $\phi = 0.33$ ) abgefallen war. Das PPE und die Nanopartikel (**NP1–NP3**) wurden in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) gemischt. In den Konstrukten war die PPE-Konzentration 100 nm und die Nanopartikelkonzentration 10–40 nm. Die Konstrukte wurden sodann mit unterschiedlichen Bakterien versetzt ( $\text{OD}_{600} = 0.05$ ) und zeigten abhängig vom Bakterium und Nanopartikel eine se-

lektive Änderung der Fluoreszenz (Abbildung 3). In den meisten, aber nicht in allen Fällen, wurde ein Fluoreszenzanstieg gefunden. Die beobachtete Fluoreszenzänderung ist



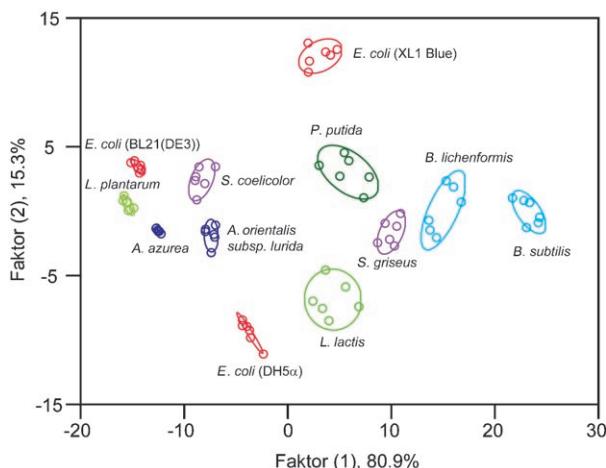
**Abbildung 3.** Fluoreszenzantwort der Nanopartikel-PPE-Konstrukte in Gegenwart unterschiedlicher Bakterien ( $\text{OD}_{600} = 0.05$ ). Jeder Datensatz ist eine Mittelung über sechs unabhängige Messungen mit Fehlerbalken.

reproduzierbar, und es war möglich, zwölf unterschiedliche Mikroorganismen mit diesen einfachen Nanokonstrukten zu differenzieren, wenn die relative Fluoreszenzänderung von **NP1–NP3** als Achsen in einem dreidimensionalen Diagramm aufgetragen wurde (Abbildung S2).

Anfänglich wurden sowohl hydrophil als auch hydrophob funktionalierte Nanopartikel als Sensor untersucht. Nach Inkubierung mit den Bakterienstämmen zeigten aber nur die Konstrukte mit hydrophob funktionalierten Nanopartikeln, **NP1–NP3**, eine signifikante Fluoreszenzänderung. Da beide Typen von Nanopartikel ähnliche Affinitäten zu dem verwendeten PPE **Sw-CO<sub>2</sub>** aufweisen, müssen signifikante Unterschiede in der Bindung zu den Mikroorganismen vorliegen. Eine plausible Erklärung dieser Beobachtungen geht davon aus, dass bakterielle Zelloberflächen sowohl negativ geladene als auch hydrophobe Regionen aufweisen (d. h. die Alkylketten der Teichonsäuren), die zu elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Nanopartikel und den Bakterien führen und damit den Fluoreszenzanstieg zwangsläufig erklären. Wir werden in Zukunft Nanopartikel verschiedener Größe, Form und variablen hydrophoben Resten entwerfen, um stärkere Fluoreszenzsignale nach Zugabe der Bakterien zu erzielen.

Die Fluoreszenzmuster wurden mithilfe der linearen Diskriminantenanalyse (LDA) untersucht; LDA ist eine statistische Methode zur Mustererkennung.<sup>[23–24]</sup> Diskriminierende Funktionale werden ermittelt, indem man die räumliche Trennung zwischen Klassen maximiert, während man für die experimentellen Daten die Variation innerhalb einer

Klasse minimiert; LDA (Abbildung 4) wandelt die Rohdaten in zwölf kanonische Gruppen um. Die Jackknifed-Matrise (mit Kreuzvalidierung) zeigt eine vollständig korrekte Klas-



**Abbildung 4.** Kanonischer Gruppengraph für die durch LDA erhaltenen Fluoreszenzantwortmuster. Die ersten beiden Faktoren vereinigen 96.2 % der Varianz. Die Ellipsen umschließen den mathematischen Raum, in den 95 % der individuellen Bakterien fallen.

sifizierung. Wir können die zwölf unterschiedlichen Mikroorganismen mit sowohl Gram-positiven (z.B. *A. azurea*, *B. subtilis*) als auch Gram-negativen (z.B. *E. coli*, *P. putida*) Vertretern unterscheiden. Der LDA-Graph gruppiert weder Gram-negative noch Gram-positive Bakterien; andere Faktoren scheinen eine größere Rolle zu spielen. Unterschiedliche Stämme von *E. coli* werden ebenfalls sicher und ohne Probleme durch das hier verwendete Sensorfeld erkannt. Die drei *E.-coli*-Stämme treten nicht als Gruppe im LDA-Graphen auf, vielmehr führen feine Unterschiede zwischen den Stämmen zu deutlichen Unterschieden in der Fluoreszenzantwort. Das hierin vorgestellte Konzept ist attraktiv, allerdings können Bakterien im Augenblick nur in gepufferter Lösung nachgewiesen und identifiziert werden. Wir können sowohl biologische als auch Umweltpolen untersuchen, diese müssen aber wahrscheinlich vorgereinigt werden, da die in biologischen Flüssigkeiten vorhandenen Proteine die Resultate dieses Assays verfälschen könnten. Zusätzliche Erkennungselemente auf dem Goldnanopartikel, die für bakterielle Oberflächen spezifisch sind, sollten dieses Problem aber lösen. Experimente in diese Richtung sind geplant.

Die Datenmuster in Abbildung 3 und Tabelle S2 können als Trainingsmatrix verwendet werden (3 Konstrukte  $\times$  12 Bakterien  $\times$  6 Messungen), die es ermöglicht, unbekannte Bakterienproben zu identifizieren und zu differenzieren. Hierzu wurden verschiedene Chargen der zwölf Bakterien nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, und die Fluoreszenzreaktion dieser Proben mit den drei Nanopartikel-PPE-Konstrukten wurde mithilfe der LDA untersucht. Nach Transformation in kanonische Gruppen durch die an den Trainingsmatrizen entwickelten Funktionale wurden die Mahalanobis-Abstände der mit den Zufallsproben gewonnenen Daten den entsprechenden Zentren der zwölf Gruppen zu-

geteilt. Je näher ein spezifischer Datenpunkt an einem der zwölf Zentren liegt, desto wahrscheinlicher ist es, dass er zu dieser Gruppe (spezifisches Bakterium) gehört. Die Zuordnung beruht auf den kleinsten Mahalanobis-Abständen zu den zwölf Bakterien in einem dreidimensionalen Raum (den kanonischen Faktoren 1 bis 3). Von den untersuchten 64 Proben wurden 61 (d.h. > 95 %) korrekt identifiziert. Diese von uns hier vorgestellte Methode ist daher sowohl effizient als auch genau. Die erfolgreiche Differenzierung der drei *E.-coli*-Stämme legt nahe, dass auch pathogene Mutanten sonst harmloser Mikroorganismen ohne Probleme differenziert werden können.

Die Kombination kationisch funktionalisierter Goldnanopartikel mit konjugierten Polymeren bietet sich als einfaches, aber elegantes biodiagnostisches Werkzeug an. Die Nanopartikel fungieren als Erkennungselemente, und das fluoreszierende konjugierte Polymer dient der Signalübermittlung. Effiziente Fluoreszenzlösung (Goldnanopartikel) und molekularer Draht (konjugiertes emittierendes Polymer) modulieren die durch die Bindung der Bakterien an die Goldnanopartikel hervorgerufene Fluoreszenzantwort. Durch Variation der Oberflächenchemie der Goldnanopartikel und des verwendeten konjugierten Polymers sollten Konstrukte mit erweiterten Bindungseigenschaften zugänglich sein. Im Augenblick untersuchen wir den Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Goldnanopartikel, konjugiertem Polymer und Bakterium, um spezifische Faktoren, die die Fluoreszenzmodulation hervorrufen, zu analysieren. Unser Vorgehen, mit nur drei unterschiedlichen Goldnanopartikel-PPE-Konstrukten zwölf Arten von Mikroorganismen zu unterscheiden, lässt vermuten, dass wir jeden beliebigen Mikroorganismus, inklusive resistenter und/oder pathogener Bakterienstämme, mithilfe von Goldnanopartikel-Polymer-Konjugaten spezifisch identifizieren können.

### Experimentelles

**Sw-CO<sub>2</sub>**<sup>[22]</sup> und **NP1-NP3** (Kerndurchmesser ca. 2 nm) wurden nach Lit. [16] erhalten. Das Molekulargewicht von **Sw-CO<sub>2</sub>** ( $M_n = 14$  kDa), die Polydispersität (PDI = 1.8) und der Polymerisationsgrad ( $P_n = 12$ ) wurden durch Gelpermeationschromatographie der entsprechenden Ethylester-Vorstufe bestimmt.<sup>[22]</sup> Die Bakterienkulturen wurden uns von Prof. A. Bommarius (Georgia Institute of Technology) und Prof. J. Hardy (University of Massachusetts at Amherst) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden in Lysogeniebrühe (LB-Medium) (3 mL) bei 37 °C zu einer optischen Dichte von 1.0 bei 600 nm gezüchtet. Die Kulturen wurden zentrifugiert (4000 rpm, 15 min), dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen (5 mM, pH 7.4), in Phosphatpuffer resuspendiert und zu einer optischen Dichte von 1.0 bei 600 nm verdünnt.

Die Komplexierung der Goldnanopartikel mit **Sw-CO<sub>2</sub>** wurde durch Fluoreszenztitration gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz von **Sw-CO<sub>2</sub>** (463 nm) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm bestimmt; **Sw-CO<sub>2</sub>** und stöchiometrische Mengen an **NP1-NP3** (nach Titrationsstudien, Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen) wurden mit Phosphatpuffer (5 mM, pH 7.4) verdünnt, bis eine **Sw-CO<sub>2</sub>**-Konzentration von 100 nM vorlag. Jede dieser Lösungen (200  $\mu$ L) wurde in eine Vertiefung der Titerplatte überführt. Nach Inkubation für 15 min wurde die Fluoreszenzintensität bei 463 nm erneut gemessen. Als nächstes wurden 10  $\mu$ L einer bakteriellen Suspension ( $OD_{600} = 1.0$ ) zugegeben. Nach 15 min wurde die Fluoreszenzintensität bei 463 nm wiederum gemessen. Die Fluoreszenzintensität

tensität vor der Zugabe der Bakterien wurde von der nach der Zugabe der Bakterien subtrahiert ( $\Delta I$ ). Dieser Prozess wurde für zwölf Bakterientypen sechsmal wiederholt und führte zu einer Trainingsmatrix aus 3 Konstrukten  $\times$  12 Bakterien  $\times$  6 Replikaten (Tabelle S2), die einer LD-Analyse mit Systat (Version 11.0) unterzogen wurden. Die Mahalanobis-Abstände eines jeden Responsusters zum Zentroid jeder Gruppe (im entsprechenden dreidimensionalen Raum) wurden ermittelt und der Gruppe mit dem kleinsten Mahalanobis-Abstand zugeordnet. Ein ähnliches Protokoll wurde für die Identifizierung der 64 zufällig ausgewählten Bakterienproben anhand ihrer entsprechenden Fluoreszenzantwort verwendet. Die Klassifizierung wurde anhand ihres kleinsten Mahalanobis-Abstands zu einer spezifischen Gruppe nach der Trainingsmatrix vorgenommen. Die Probenselektion, die folgende Identifizierung der unbekannten Bakterien und die LD-Analyse wurden von drei verschiedenen Mitarbeitern durchgeführt.

Eingegangen am 26. Juli 2007,  
veränderte Fassung am 10. Oktober 2007  
Online veröffentlicht am 28. Januar 2008

**Stichwörter:** Bakterien · Bioanalytik · Biosensoren · Goldnanopartikel · Konjugierte Polymere

- 
- [1] A. K. Deisingh, M. Thompson, *Analyst* **2002**, *127*, 567–581.
  - [2] V. Berry, A. Gole, S. Kundu, C. J. Murphy, R. F. Saraf, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17600–17601.
  - [3] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
  - [4] a) S. W. Thomas, G. D. Joly, T. M. Swager, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1339–1386; b) I. B. Kim, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, *Chem. Commun.* **2005**, 1273–1274.
  - [5] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547–1562.
  - [6] X. Zhao, L. R. Hilliard, S. J. Mechery, Y. Wang, R. P. Bagwe, S. Jin, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15027–15032.
  - [7] C. R. Bertozi, M. D. Bednarski, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2242–2245.
  - [8] R. I. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 143–169.
  - [9] B. S. Reisner, G. L. Woods, *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2024–2026.
  - [10] Siehe Tabelle S5 in den Hintergrundinformationen.
  - [11] M. B. Edmond, S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones, R. P. Wenzel, *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *29*, 239–244.
  - [12] C. A. Batt, *Science* **2007**, *316*, 1579–1580.
  - [13] P. D. Frenzen, A. Drake, F. J. Angulo, *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 2623–2630.
  - [14] P. S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, R. V. Tauxe, *Emerging Infect. Dis.* **1999**, *5*, 607–625.
  - [15] C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5642–5643.
  - [16] C.-C. You, O. R. Miranda, B. Gider, P. S. Ghosh, I.-B. Kim, B. Erdogan, S. A. Krovi, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 318–323.
  - [17] Durch dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde bestimmt, dass die in dieser Studie verwendeten Goldnanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser von 8–9 nm aufweisen.
  - [18] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128–4158.
  - [19] I. B. Kim, B. Erdogan, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6247–6254.
  - [20] Q. Zhou, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12593–12602.
  - [21] a) Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren sind auf der Oberfläche Gram-positiver Bakterien präsent, während die äußeren Membranen Gram-negativer Bakterien aus Lipopolysacchariden (LPSs) bestehen. Die Membranen der meisten Bakterien bestehen zu einem signifikanten Anteil aus anionischen Phospholipiden (z.B. Phosphatidylglycerin), die bakterielle Zelloberfläche ist daher negativ geladen. b) M. Kates in *Handbook of Lipid Research: Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulfoglycoproteins* (Hrsg.: M. Kates), Plenum, Oxford, **1990**, S. 123–234; c) B. Dmitriev, F. Toukach, S. Ehlers, *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 569–574; d) A. L. Koch, *Clinical Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 673–687; e) C. Schaffer, P. Messner, *Microbiology* **2005**, *151*, 643–651; f) M. P. Bos, B. Tefsen, J. Geurtzen, J. Tommassen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9417–9422.
  - [22] I. B. Kim, R. Phillips, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **2007**, *40*, 5290–5293.
  - [23] R. G. Brereton in *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Wiley, New York, **2003**.
  - [24] P. C. Jurs, G. A. Bakken, H. E. McClelland, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2649–2678.