

Impedanzspektroskopie zur Verfolgung der metabolischen Aktivität von *Saccharomyces cerevisiae* mit interdigitalen Platindickschichtelektroden

Juliane Posseckardt, Christine Schirmer, Alfred Kick, Katrin Rebatschek, Thomas Lamz, Michael Mertig

*Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e.V. Meinsberg, 04736 Waldheim/Deutschland
posseckardt@ksi-meinsberg.de*

Zusammenfassung

Die Impedanzspektroskopie ermöglicht *in situ* eine schnelle sowie zerstörungsfreie Charakterisierung lebender Zellen, was beispielsweise für die Referenzierung von Messwerten von Bedeutung ist. Zur Detektion lebender Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) mittels Impedanzspektroskopie wurden hier interdigitale Platindickschichtelektroden verwendet. Dabei wurde die komplexe Impedanz in einem Bereich zwischen 0,01 Hz und 1 MHz sowohl für Elektroden mit lebenden als auch Hitze-inaktivierten Hefezellen, suspendiert in Nährmedium bzw. immobilisiert in Agar über einen Zeitraum von 300 min bestimmt. Für ein besseres Verständnis der Vorgänge an den Elektroden wurde ein Ersatzschaltbild aufgestellt und analysiert. Dieses enthält ein *constant phase element* (zur Beschreibung der Doppelschichtkapazität an den Elektroden), einen Elektrodendurchtrittswiderstand und den Suspensionswiderstand. Wir konnten zeigen, dass der Suspensionswiderstand durch die Sedimentation sowohl der lebenden als auch der Hitze-inaktivierten Hefezellen in das Streufeld des Sensors ansteigt. Dieser Anstieg ist bei den lebenden Hefezellen größer als bei den Hitze-inaktivierten Hefezellen. Im Gegensatz dazu ändert sich die Doppelschichtkapazität der Elektroden nur bei den lebenden Hefezellen. Vermutlich resultieren die Veränderungen in der Doppelschichtkapazität aus der metabolischen Aktivität der Zellen; ein Einfluss der Sedimentation vitaler Zellen kann jedoch mit Suspension nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden weitere Experimente durchgeführt, bei denen die Sedimentation der Hefezellen durch Immobilisierung in Agar verhindert wurde. In diesem Fall können die gemessenen Veränderungen in der Doppelschichtkapazität nur auf die metabolische Aktivität der Hefezellen zurückgeführt werden. Die zeitliche Veränderung der Doppelschichtkapazität kann daher genutzt werden, um die Vitalität von *Saccharomyces cerevisiae in situ* zu verifizieren.

Keywords: Impedanzspektroskopie, Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), metabolische Aktivität

Einleitung

Die Impedanzspektroskopie bietet verschiedene Möglichkeiten für das Monitoring des mikrobiellen Wachstums [1,2]. Dazu zählt die Verfolgung der Polarisation der Zellwände, die sogenannte β -Dispersion [3]. Diese findet aber bei sehr hohen Frequenzen statt und ist deshalb für unseren Sensor nicht geeignet. Weiterhin kommt es aufgrund der Stoffwechselaktivität der Hefezellen zu Veränderungen der Leitfähigkeit des Mediums [4]. Diese Veränderungen sind aber nur in hochohmischen Flüssigkeiten detektierbar [5]. Unsere Messung soll dagegen in niederohmischen Kulturmedien stattfinden. Wir haben uns daher auf die Bestimmung der Oberflächenimpedanz der Elektrode konzentriert: Durch den Metabolismus der

Hefezellen kommt es zu Veränderungen an der Doppelschicht der Elektroden, welche mit Hilfe der Impedanzspektroskopie detektiert werden sollen [6,7].

Material und Methoden

Für die Experimente wurde der Hefestamm *S. cerevisiae* BY4741 $\Delta bar1$ [MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 yil015w::kanMX4] $\Delta tyr1::GPD-tRFP$ verwendet. Der Stamm wurde im Rahmen des gemeinsamen Wachstumskernes BioSAM von der Arbeitsgruppe von Prof. Rödel (Institut für Genetik, Technische Universität Dresden, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in synthetischem Komplettmedium (SC-Medium): 6,9 g Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat

(Formedium, UK), 20 g/l D(+)-Glukose (Roth, Germany) und 2,002 g/l Kaiser mix SC complete (Formedium, UK). Die Vorkultur wurde im Schüttelinkubator bei 30 °C und 180 U/min kultiviert. Vor der Messung wurde die optische Dichte der Vorkultur bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Eine gewünschte OD_{600} wurde durch Abzentrifugieren und Resuspendieren in frischem Medium eingestellt.

Die Platin (Pt)-Interdigitalelektroden (24 Elektrodenfinger mit einer Breite von 150 μm , einem Abstand von 100 μm und einer Länge von 9,6 mm) wurden mittels Siebdrucktechnik auf Basis einer Platinpaste im Kurt-Schwabe-Institut Meinsberg hergestellt. Alle Interdigitalelektroden wurden vor der Messung mit Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt. Um ein Reaktionsgefäß auf den Elektroden herzustellen, wurde mittels Agarose ein Glasring auf die Dickschichtelektroden geklebt (siehe Abb. 1a). In den Reaktionsraum wurden 2 ml der in frischem Medium resuspendierten Zellen mit definierter OD_{600} gegeben. Die Impedanzmessung erfolgte mittels eines Gamry-Interface 1000 (Gamry Instruments, USA) im Bereich von 0,01 Hz bis 1 MHz bei einer Amplitude von $V_{RMS} = 50 \text{ mV}$. Vor jeder Messung wurde die Elektrode auf ein Potential von 0 mV konditioniert und anschließend das Ruhepotential bestimmt.

Ergebnisse

Zunächst erfolgte die Charakterisierung der Impedanz-Sensoren im Frequenzbereich von 0,01 Hz – 1 MHz mit SC-Medium ohne Zellen. Die Anpassung des Ersatzschaltbildes an die Messwerte erfolgte mit Hilfe des Programmes EchemAnalyst (Gamry Instruments, USA). Aus der Abb. 1 b ist ersichtlich, dass die Fitdaten gut mit den Messwerten übereinstimmen, das heißt, das erstellte Ersatzschaltbild (Abb. 1 c) passt zum Messaufbau. Die Elektrodenoberfläche entspricht dabei dem Durchtrittswiderstand (R_D) parallel geschaltet mit einem konstanten Phasenelement (CPE). Es werden gleiche R_D und CPE-Werte für beide Elektroden der Interdigitalstruktur angenommen. In Reihe dazu geschaltet ist der Elektrolytwiderstand R_{Sol} des Mediums.

Bei der Inkubation der Elektroden in der Hefezellsuspension kommt es zu Veränderungen des komplexen elektrischen Widerstandes im hohen und niedrigen Frequenzbereich. Im hohen Frequenzbereich ($f \sim 10 \text{ kHz bis } 1 \text{ MHz}$) verhält sich der Sensor resistiv; das Phasensignal beträgt circa 0°. Gezeigt wird in Abb. 2 die prozentuale Veränderung der Impedanz bei 1 MHz. Aus Abb. 2 a ist ersichtlich, dass der Betrag der

Impedanz im Verlauf der Messung sowohl bei lebenden als auch bei toten Zellen ansteigt. Mit dieser Messung kann die Sedimentation der Zellen verfolgt werden. Die sedimentierten Zellen verhalten sich dabei wie ein Widerstand und erhöhen damit den Realteil der Impedanz. Dabei ist der Anstieg bei den lebenden Hefezellen stärker als bei den Hitzeinaktivierten Zellen (Abb. 2 a), da erstere zusätzlich proliferieren und damit noch mehr Zellen sedimentieren können.

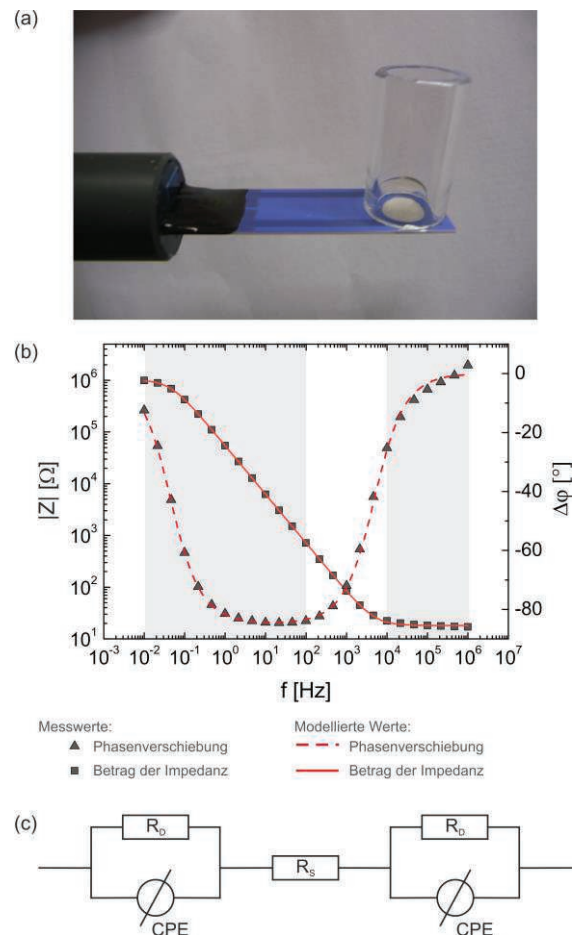


Abb. 1: (a) Messaufbau für die Impedanzmessungen. (b) Bode-Plot des Sensor-Signales für SC-Medium (Messwerte und modellierte Werte). (c) Ersatzschaltbild für die gefitteten Impedanzspektroskopie-Daten.

Wertet man den Realteil der Impedanz in Abhängigkeit von der optischen Dichte aus, kann man erkennen, dass mit Erhöhung der Zellkonzentration auch der Realteil der Impedanz steigt (Abb. 2 b). Interessanterweise ist der Anstieg der gedachten Geraden durch die Messpunkte bei lebenden Zellen stärker als bei toten Zellen, was die Vermutung bestätigt, dass die Sedimentation bei lebenden Zellen stärker ist als bei toten Zellen.

Nun zu den Effekten im niederen Frequenzbereich: In diesem Bereich spielen sowohl resistive als auch kapazitive Effekte eine Rolle (der Durchtrittswiderstand als auch das *constant phase element*). Wir tragen daher den Betrag der Impedanz als Funktion der Zeit für lebende und Hitze-inaktivierte Hefezellen auf (Abb. 3). Dabei kommt es nur bei den lebenden Hefezellen zu Veränderungen im Betrag der Impedanz [8]. Bei den toten Hefezellen bleibt dieser konstant.

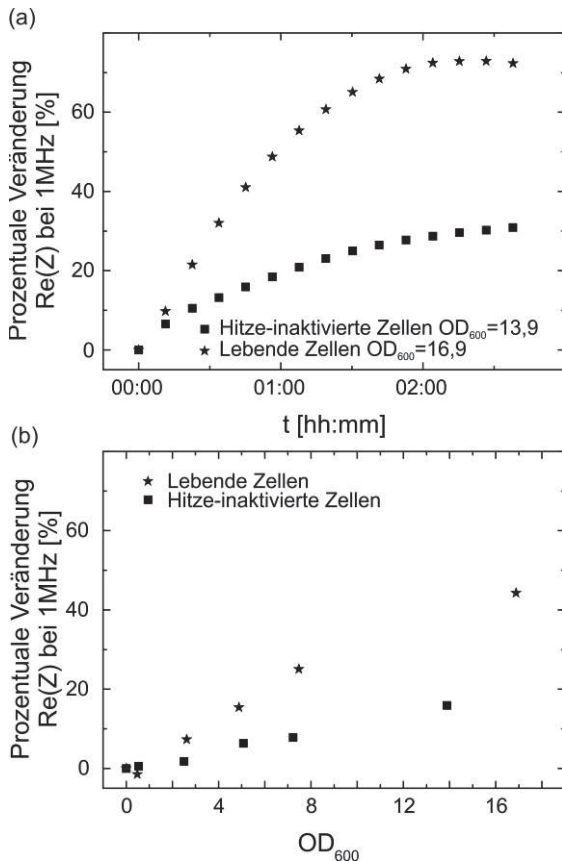


Abb. 2: Prozentuale Veränderung des Realteils der Impedanz bei 1 MHz bei der Inkubation mit lebenden bzw. Hitze-inaktivierten Hefezellen definierter Zelldichte, aufgetragen gegen (a) die Zeit und die (b) Zelldichte.

Die Frage stellt sich nun, ob dieser Effekt auch auf dem steigenden Anteil isolierender Hefezellen im Streufeld der Elektroden beruht oder auf Veränderungen an der Doppelschicht der Elektroden. Da wir den Effekt aber nicht bei den Hitze-inaktivierten Hefezellen, welche ebenfalls sedimentieren, beobachten, schlussfolgern wir, dass die Veränderungen im Betrag der Impedanz durch den Metabolismus der Hefezellen hervorgerufen werden. Durch den Stoffwechsel werden nicht-geladene

Metabolite produziert, welche die Kapazität der Doppelschicht erhöhen.

Im niederen Frequenzbereich kommt es bei den lebenden Hefezellen zu Veränderungen im Betrag der Impedanz sowohl als Funktion der Zeit als auch als Funktion der Zellzahl. Wir können die metabolische Aktivität der Hefezellen also auch bei im Agar immobilisierten Hefezellen detektieren [8]. In einem weiteren Versuch haben wir die Sedimentation der Hefezellen durch Immobilisierung in Agar verhindert.

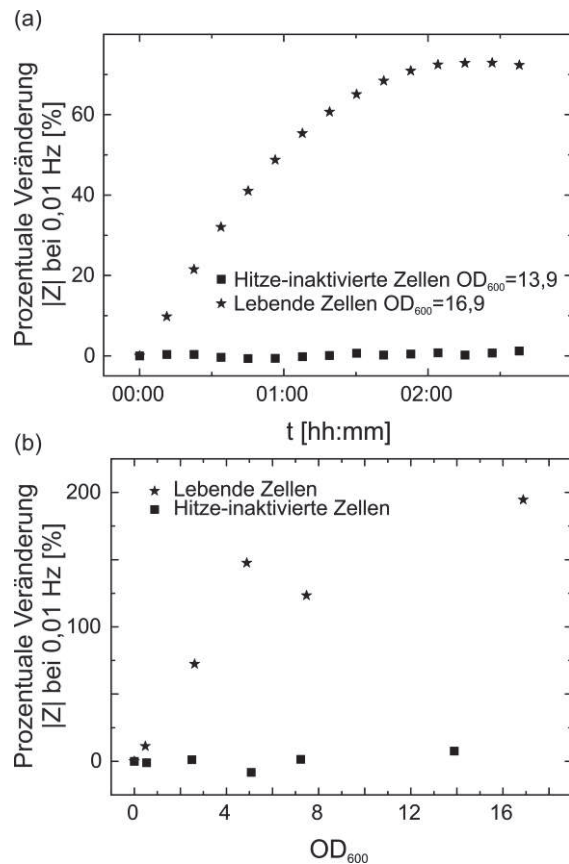


Abb. 3: Prozentuale Veränderung des Betrags der Impedanz bei 0,01 Hz bei der Inkubation mit lebenden bzw. Hitze-inaktivierten Hefezellen definierter Zelldichte, aufgetragen gegen (a) die Zeit und die (b) Zelldichte.

In Abb. 3a ist der Realteil der Impedanz als Funktion der Zeit für lebende und Hitze-inaktivierte Zellen, die in Agar immobilisiert wurden, gezeigt. Wie erwartet sehen wir, dass es zu keiner Veränderung im Realteil der Impedanz kommt. Es tritt keine Sedimentation der Hefezellen auf.

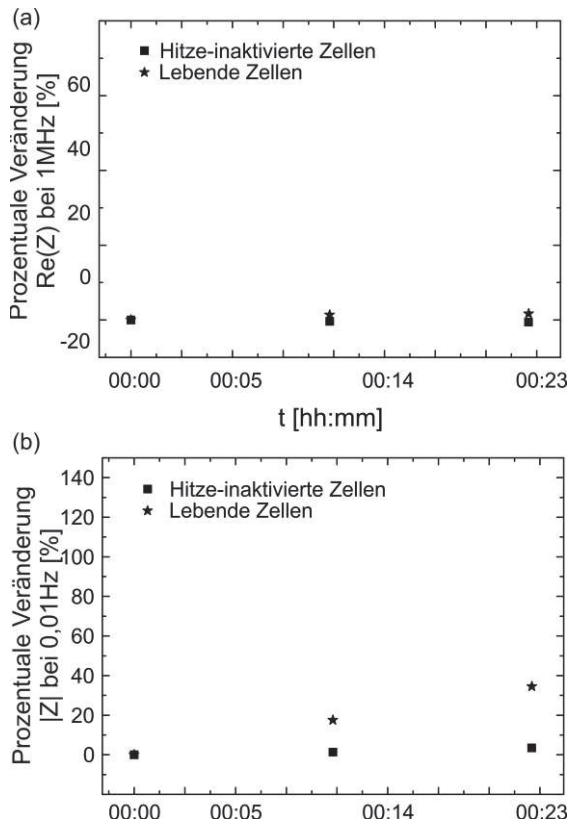


Abb. 4: (a) Prozentuale Veränderung des Realteils der Impedanz bei 1 MHz als Funktion der Zeit. (b) Prozentuale Veränderung des Betrags der Impedanz bei 1 MHz als Funktion der Zeit. Dargestellt sind Messungen von lebenden und Hitze-inaktivierten Zellen immobilisiert in einer Medium-Agar-Mischung.

Zusammenfassung

Mit den Platin-Dickschichtelektroden können wir impedimetrisch im hohen Frequenzbereich die Sedimentation und Proliferation sowohl der lebenden als auch der toten Hefezellen verfolgen. Im niederen Frequenzbereich dagegen können wir den Metabolismus der stoffwechselaktiven Hefezellen detektieren.

Literaturnachweis

- [1] Varshney, M., Li, Y., 2009. Biosensors and Bioelectronics 24 (10), 2951–2960. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656630800571X>.
- [2] Yang, L., Bashir, R., 2008. Biotechnol. Adv. 26 (2), 135–150. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007001176>.
- [3] Schwan, H.P., 1957. Advances in Biological and Medical Physics 5, 147–209.
- [4] Stewart, G.N., 1899. J. Exp. Med. 4 (2), 235–243. <http://jem.rupress.org/content/4/2/235>.
- [5] Silley, P., Forsythe, S., 1996. J. Appl. Bacteriol. 80 (3), 233–243.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03215.x>.

- [6] Ruan, C., Yang, L., Li, Y., 2002. Anal. Chem. 74 (18), 4814–4820. <http://dx.doi.org/10.1021/ac025647b>.
- [7] Kim, S., Yu, G., Kim, T., Shin, K., Yoon, J., 2012. Electrochim. Acta 82, 126–131. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468612009516>.
- [8] Posseckardt, J., Schirmer, C. Kick, A., Rebatschek, K. Lamz, T. Mertig, M., *Sensors and Actuators B: Chemical* in press (2017); doi: 10.1016/j.snb.2017.09.171.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Förderung des Projekts HIGS (FKZ 03WKCL01G) im Rahmen des Wachstumskerns BioSAM.