

Impedimetrischer Biofilm-Inlinesensor

Annekatri Delan¹, Michael Becker², Michael Boer², Klaus Liefeth³, Marion Frant³, Jürgen Rost³, Uwe Schirmer³, Christian Pietsch⁴, Daniel Glöß⁵, Margarita Günther¹ und Gerald Gerlach¹

¹Institut für Festkörperelektronik, Technische Universität Dresden, 01062 Dresden/Deutschland

²4H-JENA engineering GmbH, 07745 Jena/Deutschland

³Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V., 37308 Heilbad Heiligenstadt/Deutschland

⁴3Faktur GmbH, 07745 Jena/Deutschland

⁵Fraunhofer-Institut für Organische Elektronik, Elektronenstrahl- und Plasmatechnik, 01277 Dresden/Deutschland

Kontakt: margarita.guenther@tu-dresden.de

Einleitung

Bakterielle Kontaminationen in wasserführenden Systemen stellen ein großes Problem insbesondere für die menschliche Gesundheit dar. Selbst in Trinkwasseranlagen mit einem nur reduzierten Angebot an Nährstoffquellen werden regelmäßig Bakterien nachgewiesen. Prophylaktische Maßnahmen, z.B. durch Desinfektion der Trinkwasseranlagen oder periodisches Molchen von Kühlwassersystemen, sind mit Kosten und Betriebsunterbrechungen verbunden [1]. Die Detektion von Bakterien kann mit traditionellen analytischen Methoden präzise und sensitiv durchgeführt werden [2]. Allerdings erfordern diese Methoden speziell ausgestattete Labore, geschultes Personal und einen Transport der Proben ins Labor, wodurch diese Analysen zeitaufwendig und teuer werden.

Für die Inline-Überwachung der Qualität des Wassers in Leitungssystemen bezüglich der Kontamination mit Bakterien einschließlich Krankheitserregern sowie der damit verbundenen Bildung von Biofilmen sind daher Biosensoren, welche den schnellen sowie kostengünstigen Nachweis geringster Biofilmmengen ermöglichen, von großem Interesse. Hier stellen wir einen neuartigen impedimetrischen Biosensor vor, der mittels Impedanzmessung das Aufwachsen eines Biofilmes am bzw. im porösen Substratmaterial detektiert.

Methoden und Materialien

Aufbau der Durchflusseinheit

Abb. 1 zeigt den Aufbau des impedimetrischen Sensors und seine Integration in die zu überwachende Rohrleitung. Der Sensor befindet sich dabei in einem Bypass, um so den Hauptstrom des wasserführenden Rohrleitungssystems möglichst gering zu beeinflussen (Abb. 1a). Zur Detektion des Bewuchses ist der Sensor als Zweikanalsystem (4H-JENA engineering GmbH, Jena, Deutschland) ausgeführt. Im Messkanal befindet sich eine Substratfalle aus 3D-Strukturen (3Faktur GmbH, Jena, Deutschland) (Abb. 1b). Der Referenzkanal ist ohne bzw. mit Substratfalle. Die zwei Elektrodenplatten (jeweils mit zwei Ringelektroden, Durchmesser 19 mm, Breite 2 mm; Abb. 1c) und eine 10 mm dicke Trennplatte dazwischen

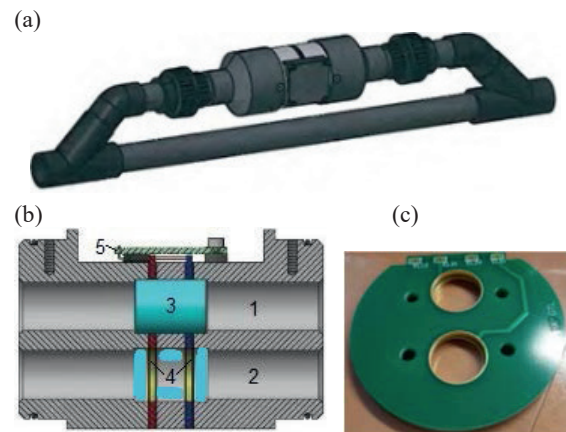


Abb. 1: Bypasslösung (a) mit Zweikanalsystem (b) und zwei Elektrodenplatten (c): 1-Messkanal, 2-Referenzkanal, 3-Substratfalle, 4-Elektrodenplatten (Abstand zwischen zwei Elektrodenplatten 10 mm), 5-elektronische Auswerteeinheit (4HJE-Platine)

sind in der Durchflusseinheit platziert.

Die Platine mit der Auswerteelektronik (Schaltung der Firma 4H-JENA engineering GmbH, Jena, Deutschland) liegt am Außenmantel des Sensorträgers und kommt nicht mit dem zu überwachenden Wassermilieu in Kontakt.

Die Impedanzmessung selbst basiert auf einem Vergleich der Messsignale in beiden Kanälen. Die Messlösungen wurden durch die beiden Kanäle mit einer Geschwindigkeit von 0,9 ml/min mithilfe einer 4-kanaligen Peristaltikpumpe REGLO Digital MS-4/12 (ISMATEC, Cole-Parmer GmbH, Deutschland) gepumpt.

4HJE-Schaltung

Die 4HJE-Schaltung dient der Impedanzmessung bei einer Frequenz von 110 kHz, wobei die Frequenz über einen LC-Schwingkreis erzeugt wird. Der Ausgang des Schwingkreises geht auf eine spannungsgesteuerte Stromquelle.

Ein Mikrocontroller misst die Effektivspannung, welche benötigt wird, um den Konstantstrom von 1 mA durch den Sensor zu treiben. Je leitfähiger das Medium wird (z.B. bei Bewuchs), umso kleiner werden

die Werte der Effektivspannung. Die Schaltung befindet sich in doppelter Ausführung auf einer Leiterplatte, um jeweils beide Kanäle zu messen.

Die beiden Kanäle werden nacheinander und getrennt mit einer Abtastzeit von 2 s gemessen. Der Mikrocontroller misst die Signale beider Kanäle, bildet ein Differenzsignal und gibt dieses über eine serielle Schnittstelle aus.

Poröse Substratfallen

Zielstellung für das Design der Substratfalle ist ein poröses 3D-Substratmaterial mit einer fluidmechanisch optimierten Struktur für die permanente Rückhaltung von zirkulierenden Bakterien durch Akkumulation in einem Biofilm. Es sind Substratgeometrien anzustreben, deren Porendurchmesser minimal 300 μm beträgt bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung einer notwendigen Durchflussrate. Dabei gilt es, einen optimalen Kompromiss zwischen fluidisch optimierter 3D-Struktur und der technologischen Realisierbarkeit mittels 3D-Druck zu evaluieren.

Das Design der Substratfalle beruht auf numerischen Fluidik-Simulationen verschiedener Mikrostrukturen [3]. Als designspezifische Parameter gingen die Permeabilität, die Oberflächenvergrößerung, das Porengrößenverhältnis und der Wandscherstress ein.

Die Bestimmung der topografischen und physikochemischen Oberflächenparameter erfolgte am unbeschichteten Ausgangsmaterial (Polyamid 12 bzw. PA12). Auf der Basis von Kontaktwinkelmessungen wurde die erwartete Hydrophobizität (Wasserkontaktwinkel $88,8^\circ$) und eine nahezu unpolare Oberflächenspannung (gesamt 55,96 mN/m, Polarität 0,01%) bestimmt. Zetapotenzialmessungen, basierend auf der Bestimmung des Strömungspotenzials, zeigten eine schwach negativ geladene Oberfläche. Die Oberflächentopografie wurde mittels Weißlichtinterferometrie untersucht und zeigte vergleichsweise raue Oberflächen (Rautiefe $R_a = 7,7 \mu\text{m}$).

In vitro-Bioadhäsionstests mit 2D-Oberflächen und 3D-Strukturen wiesen nach, dass das Substrat PA12 sehr gut zur Adhäsion von Bakterien geeignet ist. Es bildet sich bei andauernder Inkubation ein massiver Biofilm. Die Bakterien wurden mit Syto9 (Thermo Fisher Scientific) gefärbt. Die Biofilmbildung wurde mithilfe eines Fluoreszenz-Konfokalmikroskops (LSM 710, Zeiss) analysiert. Zur initialen Adhäsion vor der Biofilmbildung wurde die *E. coli*-Bakteriensuspension in PBS in einer Fließzelle unter dynamischen Kultivierungsbedingungen für 6 h in Kontakt mit den Proben gebracht. Nach der Initialadhäsion wurde die Bakteriensuspension durch Kultivierungsmedium ersetzt und die Proben unter gleichen Bedingungen für die angegebenen Zeiten inkubiert.



Abb. 2: Poröse Substratfalle mit Gyroid-Struktur

Die Substratfallen mit porösen (Porosität 82%) Gyroid-Strukturen (Zylinder, Durchmesser 18,5 mm, Länge 27 mm, Wandstärke 0,4 mm, s. Abb. 2) wurden mittels eines pulverbasierten additiven 3D-Druckverfahrens „Multi Jet Fusion“ aus Polyamid 12 (Material „HP 3D Reusability PA12“) hergestellt.

Die frequenzabhängige Dielektrizitätskonstante des porösen PA12 wurde anhand der Messungen von Impedanzspektren mittels eines Impedanzspektrometers Sciospec ISX-3v2 (Sciospec, Bennewitz, Deutschland) bestimmt und betrug 2,1 bei 50 Hz.

Die Dielektrizitätskonstante des Vollmaterials PA12 wurde an PA12-Folien (Durchmesser 150 mm, Dicke 0,3 mm) gemäß den Normen IEC 6025 und 62631 im Frequenzbereich von 10 Hz bis 1 MHz mittels eines Impedanzanalysators Solartron SOSL 1260 bestimmt. Sie lag im Bereich von 1,5 bis 1,7.

Messlösungen

Die Funktionalität des Sensors wurde in synthetischem Trinkwasser (sTW), in R2A-Wachstumsmedium und in Leitungswasser (LW) getestet.

Synthetisches Trinkwasser wurde mit 358,5 mg/l Calciumsulfat Dihydrat, 95,5 mg/l Magnesiumchlorid Hexahydrat, 34,6 mg/l Calciumchlorid Dihydrat, 42,0 mg/l Natriumbicarbonat (Sigma-Aldrich), 2,15 mg/l D(+)-Glukose (Roth, Deutschland) und 2,0 mg/l Pepton (Millipore, Deutschland) vorbereitet.

Das R2A-Medium enthält 0,5 g/l Hefe-Extrakt, 0,5 g/l Proteose Pepton, 0,5 g/l Caseinhydrolysat (Millipore, Deutschland), 0,5 g/l Glukose, 0,5 g/l lösliche Stärke, 0,3 g/l Natriumpyruvat, 0,3 g/l Dikaliumhydrogenphosphat und 0,05 g/l Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich).

Die Leitfähigkeit der vorbereiteten Messlösungen wurde mithilfe des Leitfähigkeitsmessers Seven Compact S230 (Mettler Toledo, Deutschland) ermittelt und betrug bei einer Temperatur von 22 °C für synthetisches Trinkwasser und für R2A-Medium 662 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bzw. 1375 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Der Leitfähigkeitswert des Leitungswassers betrug 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Impedanzmessung

Die Impedanzmessung erfolgte mittels eines Impedanzspektrometers ISX-3v2 (Sciospec, Bennewitz, Deutschland), das mit den Elektroden verbunden ist.

Durch den Multiplexer ist es möglich, die beide Kanäle (Mess- und Referenzkanal) parallel zu betreiben. Dabei wurde eine 4-Punkt-Messung angewendet, da es den Einfluss der Zuleitungen und Kontakte auf die Impedanz der Probe minimiert. Die Impedanzspektren wurden über einen Frequenzbereich von 0,1 Hz bis 10 MHz mit einer Amplitude von 250 mV aufgenommen. Die Temperatur wurde mit einem Temperatursensor LM61CIZ (Texas Instruments Inc., Dallas, Texas, USA) kontrolliert.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Substratfallen wurden einzeln in ein Gläschen für den Ultraschall überführt, welches 12 ml PBS enthält. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Baclight® (Thermo Fisher Scientific). Die Einzelbilder wurden im Anschluss mit einem Fluoreszenz-Konfokalmikroskop (LSM 710, Zeiss) bei einer 5- bzw. 20-fachen Vergrößerung aufgenommen. Dabei erfolgten Einzelaufnahmen sowie mittels der „Tile Scan“-Funktion die Aufnahme von 3D-Ansichten eines Ausschnittes der Substratfalle. Im Tile Scan wurden mehrere (6x3) Bilder bei einer 5-fachen Vergrößerung zusammengefügt.

Quantifizierung

Zur Bestimmung der Lebend- bzw. Tot-Zellen erfolgte eine Ultraschallvorbehandlung, um alle anhaftenden Mikroorganismen zu lösen. Dazu wurden die Substratfallen einzeln in ein Gläschen überführt, welches 12 ml PBS enthält. Mit der Einstellung von 100% am Ultraschall-Gerät (Bandelin Sonorex RK510H, Berlin, Deutschland) wurden die Proben für 10 min mit Ultraschall belastet. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit Baclight®. Die Konzentrationen der abgelösten Bakterien wurden mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu erfolgte eine Vierfachmessung und die Lebend/Tot-Bestimmung.

Ergebnisse und Diskussion

Die Erfassung der Effektivspannung U der beiden Kanäle mittels der 4HJE-Schaltung und die Aufnahme der Impedanzspektren wurden innerhalb von 116 h parallel durchgeführt. Zum Vergleich sind die Messergebnisse für die PA12-Substratfalle 1 im R2A-Medium (Kanal 1) und für die PA12-Substratfalle 2 in synthetischem Trinkwasser (Referenzkanal 2) in Abb. 3 dargestellt. Gezeigt sind die Werte des Impedanzbetrages $|Z|$ bei einer Frequenz von 100 kHz, ermittelt vom zeitlichen Verlauf der Impedanzspektren.

Nach dieser 116-stündigen Langzeitmessungen wurden beide Substratfallen der Durchflusseinheit entnommen, mit Baclight® markiert und mithilfe der Fluoreszenzaufnahmen analysiert, um eine Biofilmbildung nachzuweisen (Abb. 4 und 5).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen weisen die Mikroorganismen auf beiden Substratfallen

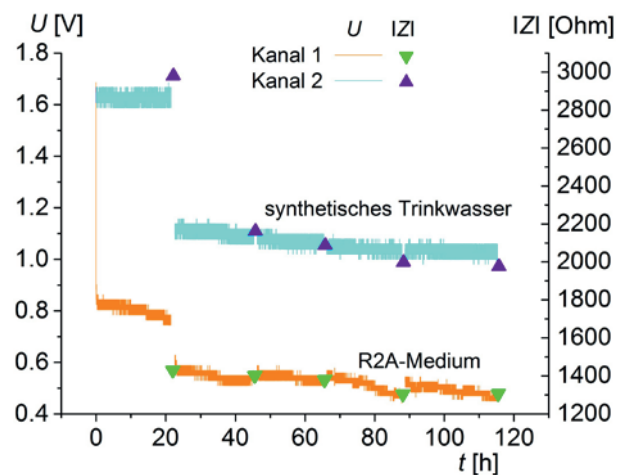


Abb. 3: Änderung des Signals U der 4HJE-Platine mit der Zeit für zwei Kanäle: Kanal 1 mit PA12-Substratfalle 1 im R2A-Medium und Kanal 2 mit PA12-Substratfalle 2 in synthetischem Trinkwasser sowie entsprechende Werte des Impedanzbetrages $|Z|$ bei einer Frequenz von 100 kHz für eine parallele Messung mit 4HJE-Platine und Impedanzspektrometer

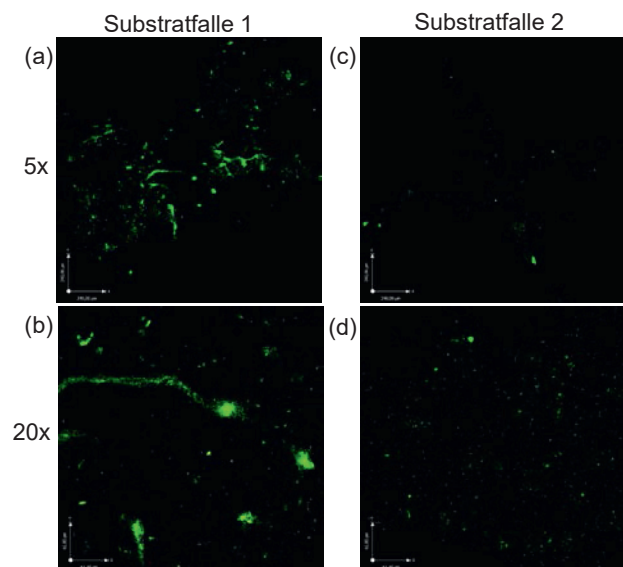


Abb. 4: Bildung eines Biofilms auf der Substratoberfläche nach 116-stündiger Langzeitmessungen im R2A-Medium (a), (b) (Substratfalle 1) und in synthetischem Trinkwasser (c), (d) (Substratfalle 2). Die Bakterien wurden mit Baclight® fluoreszenzmarkiert. In Einzelaufnahmen (a) und (c) ist der Biofilm in 5-facher, in (b) und (d) in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Die Maßstäbe entsprechen 240 μm bzw. 61 μm .

nach. Die Substratfalle 1 zeigt dabei eine stärkere Besiedlung im Biofilm im R2A-Wachstumsmedium, wobei diese gleichmäßig über die Oberfläche verteilt ist. Die anschließende Quantifizierung der abgelösten Organismen bestätigt diesen Befund (Abb. 6). Die Präsenz von Mikroorganismen auf der Substratfalle 2

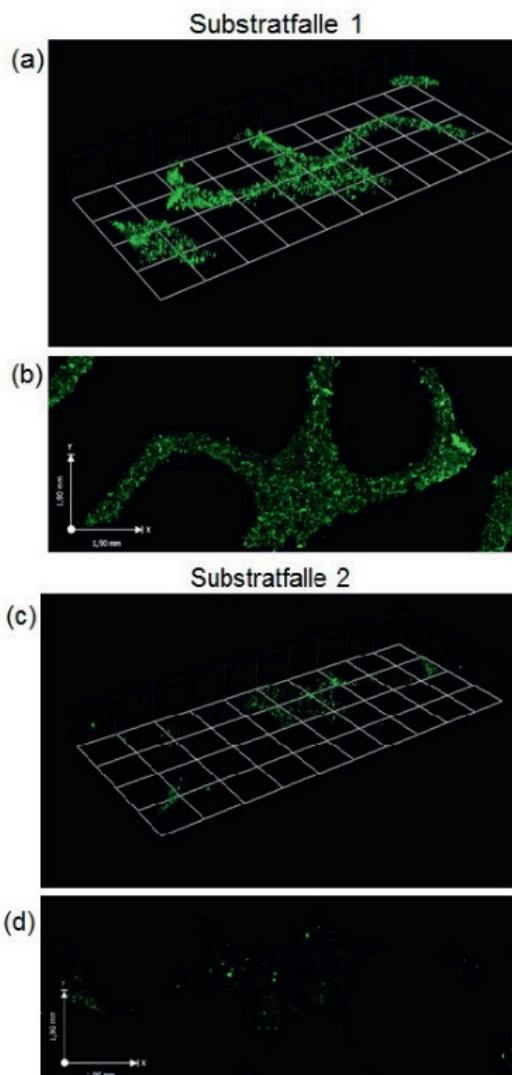


Abb. 5: 3D-Fluoreszenzaufnahmen nach 116-stündiger Langzeitmessungen im R2A-Medium für Substratfalle 1 (a), (b) und in synthetischem Trinkwasser für Substratfalle 2 (c), (d) mit 5-facher Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 1,9 mm.

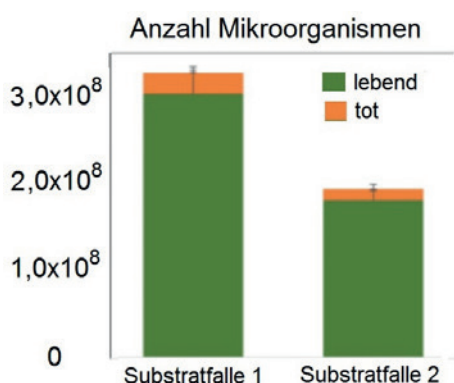


Abb. 6: Anzahl der von Substratfallen 1 und 2 abgelösten lebenden bzw. toten Bakterien, ermittelt mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Mikroorganismen wurden mit Baclight® fluoreszenzmarkiert.

kann durch eine unsterile Behandlung mit Leitungswasser erklärt werden.

Zusammenfassung

Die impedimetrische und fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung des vorgestellten Messaufbaus hat gezeigt, dass eine permanente Überwachung wasserführender Rohrleitungssysteme mit einem neuartigen Schwellwert-Sensor zum Nachweis des Bewuchses mit Biofilmen auf Basis der Auswertung von frequenzabhängigen elektrischen Signalen möglich ist. Für die Funktionalität des entwickelten Sensorkonzeptes gelten daher zunächst zwei grundlegende Anforderungen: (i) Der Inline-Sensor erlaubt auf Basis der Impedanzmessung einen geeigneten Informationsoutput als Ampelkriterium. (ii) Das Differenzsignal der Impedanzmessung erlaubt die Detektion des Wachstums von Biofilmen.

In den bisher realisierten Arbeiten wurde ein entsprechendes Sensorkonzept konstruktiv umgesetzt, welches ein Zweikanalsystem nutzt. Mittels der integrierten Elektronik wurden Testmessungen unter *in vitro*-Bedingungen durchgeführt. Referenzierte Messungen an Substratfallen und biologisch simulierten Bedingungen sowohl mit als auch ohne bakterielle Besiedlung verdeutlichten, dass mittels der impedimetrischen Messung eine Schwellenwertaussage bezüglich der bakteriellen Besiedlung möglich ist.

Literatur

- [1] DVGW, *Desinfektion von Trinkwasser-Installationen*. twin, 2009, Nr. 05, S. 1-2
- [2] FRANT, M. ; SCHADE, R. ; LIEFEITH, K.: Entwicklung klinisch validierter *in vitro*-Testsysteme auf der Basis mikrobiologischer Infektionsmodelle für die Prüfung von Implantatwerkstoffen. In: *BIOMaterialien* 11 (2010), S. 59
- [3] ALI, D. ; OZALP, M. ; BLANQUER, S. ; ONEL, S.: Permeability and fluid flow-induced wall shear stress in bone scaffolds with TPMS and lattice architectures: A CFD analysis. In: *European Journal of Mechanics / B Fluids* 79 (2020), S. 376-385

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWi) für die Förderung des ZIM-Verbundprojektes „Entwicklung eines Inline-Sensors zur permanenten Kontrolle und Beurteilung der Ausbildung und Entwicklung von Biofilmen in wasserführenden Rohrleitungssystemen (Inline-Biofilm-Sensor)“ (FKZ ZF4190805MD9, ZF4674402MD9, ZF4115804MD9 und ZF4019608MD9).