

# Elektrochemische Detektion von „*Escherichia coli*“ im Trinkwasser

8-Hydroxychinoline-B-D-Glukuronide (Natrium Salz) als spezifisches Substrat für die beta-Glukuronidase

Dr. Jörg Ettenauer studierte Biologie an der Universität Wien und spezialisierte sich im Laufe seines Studiums in der Fachrichtung „Genetik und Mikrobiologie“. Seine Diplom- und Doktorarbeit führte er am „Austrian Center of Biological Resources and Applied Mycology“ (ACBR) bei Dr. Guadalupe Pinar bzw. bei Prof. Dr. Katja Sterflinger an der Universität für Bodenkultur Wien durch. Während seiner Forschungstätigkeit am ACBR beschäftigte sich Dr. Ettenauer mit der Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen (Pilze, Bakterien, Archaea) auf Kunstgegenständen und Baumaterialien. Hierbei kamen sowohl klassische Kultivierungs- als auch moderne molekulare Methoden zum Einsatz.

An der Donau-Universität Krems ist er als Mikrobiologe und wissenschaftlicher Projektmitarbeiter am Zentrum für Integrierte Sensorsysteme tätig. Dort beschäftigt er sich mit der Entwicklung von Methoden und neuen Technologien für die Verwendung in automatischen Biosensoren für Wasser- und Umweltsanalysen. Neben den praktischen Forschungsarbeiten im Labor, der Betreuung von Masterstudenten des IMC FH-Krems, ist er zusätzlich ISO- und Qualitätsmanagementbeauftragter des Zentrums, Mitglied des Komitees für biologische Sicherheit und leitet das mikrobiologische Bio Safety Level 2-Labor.



Dr. Jörg Ettenauer

Wissenschaftlicher Projektmitarbeiter  
Zentrum für Integrierte Sensorsysteme  
Donau Universität Krems

*Escherichia coli* sind die bekanntesten Bakterien in unserer normalen Darmflora. Die meisten Stämme sind harmlos und helfen uns, unsere tägliche Nahrung zu verdauen. Allerdings können einige Serotypen schwere Krankheiten verursachen und sogar zum Tod führen. Daher ist die Identifizierung und Quantifizierung von Kolibakterien und insbesondere von *E. coli* als fäkalen Indikatororganismus essentiell. Die Bestimmung des Gehalts an Mikroorganismen in einer wässrigen Lösung ist insbesondere im Gesundheitsbereich, im Trinkwasser und in der Nahrungsmittelindustrie von großer Bedeutung.

Heutzutage wird üblicherweise ein definiertes Volumen einer zu untersuchenden Probe filtriert und anschließend die Zahl bzw. Art der Mikroorganismen durch Kultivierung auf universellen und/oder speziellen Medien unter kontrollierten Umgebungsbedingungen dargestellt.

Durch die Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) aus den gewachsenen Mikroorganismen, deren Vereinzelung bzw. Reinkulturerstellung sowie durch selektive Medien und biochemische Analysen können sowohl quantitative als auch qualitative Ergebnisse der Probenana-

lyse erhalten werden. Der größte Nachteil dieser kulturellen Verfahren liegt jedoch in deren Analysendauer, die typischerweise mehrere Tage benötigt, bis ausgebildete Kolonien gezählt werden können. Die Herstellung von Reinkulturen und folgende biochemische oder serologische Bestimmungen können weitere Zeit in Anspruch nehmen.

Die folgend beschriebene Neuerung bezieht sich auf die Entwicklung einer schnelleren Methode zum Nachweis von *E. coli* Bakterien in einer wässrigen Flüssigkeit. Diese Methode soll in weiterer Folge in ein Mess-

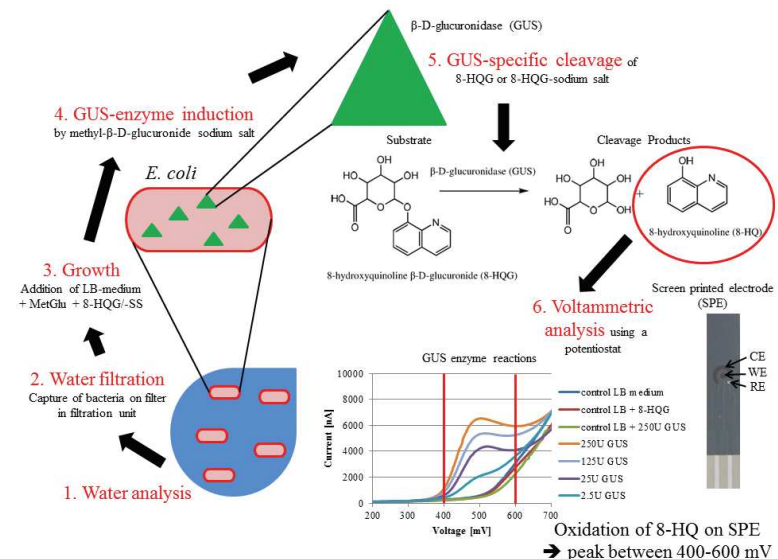


Abbildung 1: Genereller Ablauf der *E. coli* Detektion. Elektrochemischer Nachweis durch die spezifische β-D-Glukuronidase Enzymaktivität. Für die Wasserprobenanalyse (1) werden die Bakterien durch Filtration (2) gesammelt. Durch Zugabe von LB-Medium mit MetGlu und 8-HQG/-SS wachsen *E. coli* Bakterien und produzieren das gewünschte Enzym GUS. GUS spaltet spezifisch das vorhandene Substrat, dessen Spaltungsprodukt (8-HQ) auf Siebdruckelektroden (SPE; CE Gegenelektrode, WE Arbeitselektrode, RE Referenzelektrode) potentiometrisch detektiert werden kann.

system integrierbar sein und automatische Probenanalysen mit einer online Datenweiterleitung ermöglichen.

Daher war das Ziel der Studie die Entwicklung eines neuen elektrochemischen Verfahrens für einen schnellen und sensitiven Nachweis von *E. coli*. In diesem neuen Verfahren wird die  $\beta$ -D-Glukuronidase (GUS) - Enzymproduktion durch Zugabe von Methyl- $\beta$ -D-Glukuronid-Natriumsalz induziert. Durch die GUS-Aktivität wird das beigemengte Substrat 8-Hydroxychinolin  $\beta$ -D-Glukuronid bzw. 8-Hydroxychinolin  $\beta$ -D-Glukuronid Natrium-Salz (8-HQG bzw. 8-HQG-SS) zur elektroaktiven Verbindung 8-Hydroxychinolin (8-HQ) gespalten. Dieses Spaltungsprodukt kann auf der Arbeitselektrode eines Potentiostats oxidiert werden und weist einen Stromanstieg in einem spezifischen Spannungsbereich - zwischen 400-600 mV (bei pH 7) - aus (Abbildung 1). Das erhaltene Stromsignal gibt Rückschluss auf in der Probe vorhandene *E. coli* Zellen. Eine Schwellwertüberschreitung von 2  $\mu$ A (Mittelwert der Stromausgangssignale zwischen 400 - 600 mV) gilt als Indiz für die Präsenz von *E. coli* Bakterien (Ettenauer et al., 2016). Das allgemeine Prinzip des Assays wurde zuerst mit verschiedenen Konzentrationen einer reinen Enzymlösung getestet und überprüft, bevor lebende *E. coli* Bakterien untersucht wurden. Mit diesem Ansatz konnten wir spezifisch eine KBE pro ml innerhalb von 10 h erkennen (Abbildung 2). Die entwickelte Methode erlaubt eine klare und empfindliche Identifizierung von *E. coli* ohne Störungen durch andere Bakterienstämme, die auch untersucht wurden.

Die Eigenschaft von *E. coli*, die Enzyme  $\beta$ -D-Galactosidase (GAL)

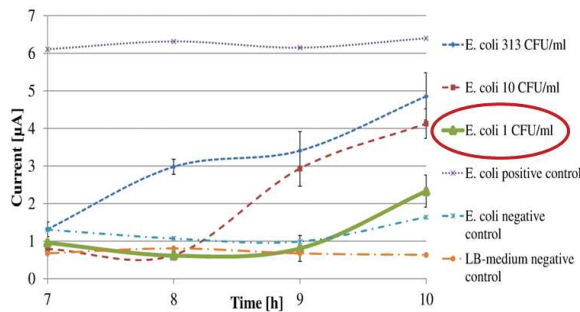


Abbildung 2: Das voltametrische Output-Signal zeigt die Enzymaktivität, die wiederum proportional zu den in der Probe vorhandenen *E. coli* Bakterien ist. Nach 10 Stunden kann 1 Kolonie-bildende-Einheit (CFU) detektiert werden.



Abbildung 3: Übersicht über das modulare Konzept des Biosensorsystems mit „Eco-Con“, „EcoBot“ und „EcoStat“: 1) Stufenregler, 2) Drucksensor, 3) peristaltische Pumpe, 4) Z-Kopf mit Wasserdüse und Pipette, 5) Filtereinheit mit Inkubator, 6) Reservoirs mit Wachstumsmedium und Spüllösung, 7) Siebdruckelektroden und 8) USB Potentiostat.

und  $\beta$ -D-Glukuronidase (GUS) zu produzieren, sowie deren spezifische Enzymaktivität kann in Assays für den Nachweis dieser Bakterien verwendet werden. Unser Ziel war die Entwicklung eines elektrochemischen Biosensor-Systems basierend auf der Aktivität von  $\beta$ -D-Glukuronidase zum Nachweis von *Escherichia coli*

in Wasserproben. Da dieses Enzym in *E. coli*-Stämmen meist reichlich vorhanden ist (etwa 95 % besitzen GUS), ist es ein vielversprechender Ansatz, um spezifisch diese Art von Bakterien zu detektieren. Das 8-Hydroxychinolin- $\beta$ -D-Glukuronid/-Natrium Salz (8-HQG/-SS) wurde als „elektroaktives“ Substrat für die

$\beta$ -D-Glukuronidase ausgewählt. Das entsprechende hydrolysierte Produkt, 8-Hydroxychinolin (8-HQ), kann voltametrisch durch Oxidation unter Verwendung eines Potentiostat erfasst werden, was zu einer erhöhten Stromabgabe bei einem bestimmten Spannungsbereich führt.

In weiterer Folge wurde ein Laborprototyp entwickelt, um die zuvor dargestellte Methodik in ein automatisiertes Detektionssystem zu integrieren (Kellner et al., 2016). Bei der Analyse von Wasserproben mit dem Gerät wird eine definierte Wassermenge (100 ml) filtriert und die enthaltenen Bakterien auf dem 0,22  $\mu$ m Filter aufgefangen. Nach der Zugabe von Wachstumsmedium (mit Substraten) zu der Filtereinheit und einem Inkubationsschritt wird ein Probenaliquot auf eine Siebdruckelektrode übertragen. Das Ergebnis der elektrochemischen Messung zeigt die Anwesenheit von *E. coli* an (Abbildung 3). Die unterschiedlichen Arbeitsschritte werden automatisch von dem Prototyp durchgeführt und das Ausgabesignal wird zurzeit auf einem Display angezeigt. Nach einer allgemeinen Überprüfung jedes Arbeitsschrittes des Instruments wurden mit *E. coli* versetzte Wasserproben mit

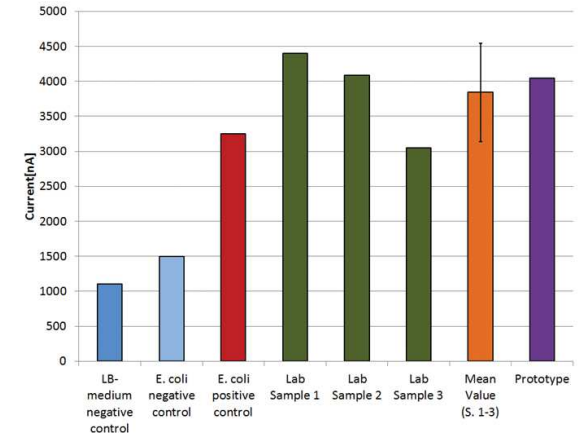


Abbildung 4: Mittelwerte des gemessenen Stromsignals für Oxidationsspannungen zwischen 400 - 600 mV (ca. 200 CFU pro 5 ml nach 18 h) angegeben.

diesem Biosensor analysiert und die Ergebnisse mit Proben verglichen, die manuell im Labor untersucht wurden (Abbildung 4). Die praktische Anwendbarkeit der Methodik wurde hauptsächlich mit dem *E. coli* Stamm ATCC 11303 untersucht. Positive Ergebnisse konnten ebenfalls mit den *E. coli* Stämmen ATCC 12651, 23226, 15766 und 11775 erhalten werden. In weiterer Folge muss in einem Folge-

projekt die entwickelte Methodik an weiteren Laborstämmen sowie aus Umweltproben isolierten Wildtypstämmen untersucht werden. Durch die praktische Evaluierung und weiterführende Validierung der Methodik kann der konstruierte Laborprototyp optimiert und miniaturisiert werden um eine Integration in Wasserversorgungssysteme zu erleichtern.

## Referenzen

- » Ettenauer, J., K. Zuser, KH. Kellner, T. Posniecek, M. Brandl (2016): 8-hydroxy-quinoline-glucuronide sodium salt used as electroactive substrate for a sensitive voltammetric detection of *Escherichia coli* in water samples. *Procedia Eng.* 2016; 168: 143 - 46.
- » Zuser, K., J. Ettenauer, M. Brandl. Patentanmeldung 2016: „Verfahren zur potentiometrischen Detektion von *Escherichia coli* Bakterien mit Hilfe des elektroaktiven Substrats.“
- » Kellner, K.H., J. Ettenauer, K. Zuser, T. Posniecek, M. Brandl. 2016. An automated, robotic biosensor for the electrochemical detection of *E. coli* in water. *Procedia Eng.* 2016 ; 168: 594 - 97.
- » Die Autoren danken dem Land Niederösterreich und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (ERDF) für die finanzielle Unterstützung (WST3-T-91/026-2012 Phase I und WST3-T-91/031-2014 Phase II).