

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

KEEMIA INSTITUUT

Ingrid Väling

**Biosensori konstrueerimine *Escherichia coli* määramiseks ja
selle kasutamine Tartu Anne kanali veekvaliteedi hindamiseks**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: Toonika Rinken, Phd
Erik Jõgi, MSc

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja: _____

Tartu 2018

Biosensori konstrueerimine *Escherichia coli* määramiseks ja selle kasutamine Tartu Anne kanali veekvaliteedi hindamiseks

Käesolevas bakalaureusetöös konstrueeriti antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhinev biosensor *Escherichia coli* määramiseks ning testiti selle kasutatavust Tartu Anne kanali vee analüüsimisel. *Escherichia coli* on indikaatorbakter, mille sisaldus veeproovis viitab fekaalsele reostusele. Seetõttu on suplusvee kvaliteedi ja inimeste tervisohutuse seisukohalt äärmiselt oluline *Escherichia coli* sisalduse kiire määramine. Praegusel ajal on erinevate patogeenide, sealhulgas *Escherichia coli*, määramiseks põhiliselt kasutusel aeganõudvad traditsioonilised mikrobioloogilised meetodid ja qPCR-analüüs. Nende meetodite korral kulub analüüside tulemuste avaldamiseni kuni 4 päeva. Selle aja jooksul suplevad inimesed aga fekaalselt reostunud ja potentsiaalselt nakkusohtlikus vees. Biosensorite kasutuselevõtt veeproovide analüüsimisel võimaldaks tulemusi saavutada kordades kiiremini, võimaldades analüüsi läbi viia 20 minutiga ja tulemused avaldada juba proovivõtu päeva jooksul.

Märksõnad: *Escherichia coli*, biosensor, patogeenide määramine, suplusvesi, Anne kanal

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

Construction of *Escherichia coli* biosensor and its implementation for water quality analyses of Anne Canal.

The aim of the present work was to develop an antigen-antibody based biosensor for the detection of *E. coli* cells and use it for the analyses of the water quality of Anne Canal – an artificial water body with a beach area in the city centre of Tartu, Estonia. *Escherichia coli* is an indicator bacteria for monitoring faecal pollution in natural swimming water. Rapid pathogen detection is of crucial importance for issuing timely warnings about potential threats. The most common microbiological bacterial detection methods like colony counting and qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) methods are extremely time consuming. Using these methods, it can take up to 4 days to obtain the results of the analysis. During that time, people are swimming in faecally contaminated and potentially infectious water. By implementing biosensors, it would be possible to yield an answer within 20 min. and disclose the results during the day of the sampling.

Keywords: *E. coli*, biosensor, pathogen detection, natural swimming water, Anne Canal

CERCS: T270 Environmental Technology, pollution control

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 <i>Escherichia coli</i> bakter	6
1.1.1 <i>E. coli</i> raku ehitus	6
1.1.2 <i>E. coli</i> leidumine looduses ja piirnormid	7
1.2 Meetodid <i>E. coli</i> määramiseks	8
1.2.1 Traditsiooniline mikrobioloogiliste külvide meetod	8
1.2.2 Kvantitatiivne PCR meetod	10
1.2.3 Kokkuvõtte <i>E. coli</i> määramise meetoditest	12
1.3 Biosensorid <i>E. coli</i> määramiseks	13
1.4 Tartu Anne kanal	15
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid	16
2.2 Kasutatud seadmed	17
2.3 Metoodikad	18
2.3.1 Anne kanali veeproovide kogumine	18
2.3.2 <i>E. coli</i> kultiveerimine	19
2.3.3 Fluorestsentsi mõõtmisel põhinev <i>E. coli</i> immunobiosensor	19
2.3.4 IgG puhastamine inimese vereseerumist	21
2.3.5 Puhastatud antikeha fragmenteerimine ja Fc fragmendi eraldamine	22
2.3.6 IgG Fc fragmendi sidumine Sephadex geelile	22
2.3.7 Mõõtmismetoodika	23
3 TULEMUSED JA ARUTELU	25
3.1 Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine	25
3.1.1 IgG Fc fragmendi puhastamine inimese vereseerumist	25
3.1.2 IgG Fc fragmendi immobiliseerimine geelile	27
3.1.3 Biosensori kalibreerimine <i>E. coli</i> määramiseks	27
3.1.4 <i>E. coli</i> sisalduse määramine Anne kanali vees	29
KOKKUVÕTE	31
KASUTATUD KIRJANDUS	33
SUMMARY	37
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .	39

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

BIA - mikrograanulite sisestusanalüüs (*Bead Injection Analysis*)

CFU - kolooniaid moodustav üksus (*colony forming unit*)

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

ELISA - ensüüm-immunosorptsioon analüüs (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

E. coli - *Escherichia coli*

Fc - IgG Fc fragment

FITC – fluorestseiinisotsüanaat

IgG - immunoglobuliin G

MALDI-TOF - maatriks-assisteeritud laser-desorptsioon-ionisatsioon lennuajaanalüsaator (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*)

PBS - fosfaatpuhver NaCl-soolaga

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)

Tris - tris(hüdroksümetüül)aminometaan

SISSEJUHATUS

Escherichia coli (*E. coli*) on imetajate ja teiste püsisoojaste loomade soolestikus elutsev enamasti kahjutu mikroob. Seevastu *E. coli* patogeensed tüved on tuntud ägedate haigusnähtude, peamiselt kõhulahtisuse, haavainfektsioonide ja kuseteede põletike tekitajana.

E. coli üldise sisalduse kaudu määratakse vesikeskkondade fekaalset reostust. Vältimaks võimalike haigusnähtude esinemist, on oluline, et *E. coli* sisaldus vesikeskkondades ei ületaks lubatud piirnorme. Seega on *E. coli* kiire määramine vees inimeste tervise ja terviseohutusega seotud probleemide ennetamise seisukohalt väga oluline. Samas on praegusel ajal erinevate patogeenide, sealhulgas *E. coli*, määramiseks põhiliselt kasutusel aeganõudvad traditsioonilised mikrobioloogilised meetodid ja qPCR-analüüs.

Üheks võimaluseks patogeenide kiireks määramiseks on biosensorite kasutamine. Biosensorite tähtsus patogeenide määramisega tegelevates valdkondades on viimastel aastatel märgatavalt kasvanud ning suure tõenäosusega on lähitulevikus võimalik nende kasutuselevõtmine traditsiooniliste meetodite asemel.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli konstrueerida antikeha–antigeen äratundmisreaktsioonil põhinev biosensor *Escherichia coli* määramiseks ja testida selle kasutatavust Anne kanali vee analüüsimisel.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Escherichia coli* bakter

E. coli bakteri avastas 1885.aastal saksa lastearst ja bakterioloog Theodore von Escherich. Ta nimetas avastatud bakterid *Bacterium coli commune*'ks, viidates ladinakeelsele sõnale *cōlōn*, mis tuleneb käärsoole nimetusest, kust *E. coli* esmalt leiti. [1]

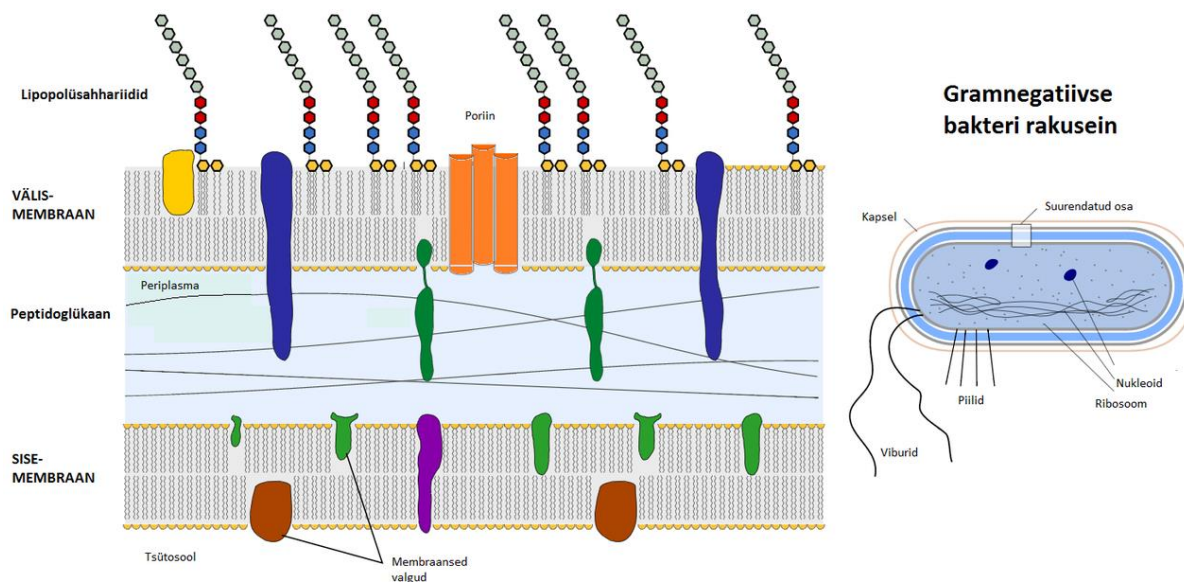
Veel 1960. aastatel arvati, et *E. coli* on inimese mikrofloora "heatahtlik" komponent. Molekulaarbioloogiliste uuringute tulemusena on aga selgunud, et erinevad *E. coli* tüved omavad tänu genoomis või plasmiidides paiknevale lisainformatsioonile mitmesuguseid erinevaid virulentsusfaktoreid ning võivad põhjustada erinevaid haigusi (seedeinfektsioone, kuseteede- ja haavainfektsioone, meningiiti jms.). [2]

Tänapäeval jagatakse inimest koloniseerivad *E. coli* tüved kommensaalseteks ja patogeenseteks tüvedeks. Suurem osa *E. coli* tüvedest on kommensaaalsed, st. sellised mis ei tekita infektsioone ning moodustavad osa imetajate ja lindude normaalselt mikrofloorast [3]. Patogeensed tüved jagatakse lisaks veel soolesisesteks ja soolevälisteks tüvedeks, vastavalt sellele, kus nad infektsioone põhjustavad [4].

1.1.1 *E. coli* raku ehitus

E. coli on gram-negatiivne oksüdaasnegatiivne pulkbakter mõõtmetega $(0,5-0,8) \times (1,0-1,2) \mu\text{m}$. *E. coli* bakterid on võimelised kasvama nii aeroobses kui anaeroobses keskkonnas, eelistatuimaks temperatuuriks on 37°C. 80% *E. coli* tüvedest omavad vibureid või pilisid, mis tagavad nende liikuvuse. [4]

Gram-negatiivsele bakterile iseloomulikult koosneb *E. coli* rakusein kahest membraanist: sisemisest tsütoplasma membraanist ja välismembraanist, mis on eraldatud peptidoglükaani kihiga. *E. coli*le iseloomuliku gram-negatiivse rakuseina ehitus on kujutatud joonisel 1.



Joonis 1. Gram-negatiivse bakteri rakuseina ehitus [5].

Välismembraan koosneb fosfolipiididest, valkudest ja lipopolüsahhariididest. *E. coli* välismembraani üheks olulisemaks valguliseks komponendiks on proteiin A (OmpA: *Outer membrane protein A*) [6]. OmpA mängib oma arvukuse ja välismembraanist väljaulatuvuse tõttu olulist rolli organismide nakatamisel ning kutsus organismis esile immuunvastuse. *E. coli* bakteri organismi sattudes tunneb organism ära, et tegemist on kehavõõra molekuliga ning saadab selle vastu võitlemiseks teele antikehad, mis võivad kinnituda OmpA-le või ka teistele valkudele. Ühe *E. coli* bakteriraku välismembraanis esineb ligikaudu 10^5 OmpA molekuli. [7] See teeb OmpA-st ka hea sihtmärgi *E. coli* bakteriraku detekteerimiseks.

1.1.2 *E. coli* leidumine looduses ja piirnormid

Keskkonnas esineb *E. coli* pinnases, vees, loomadel ja taimedel. Patogeensed ehk haigust tekitavad *E. coli* tüved võivad pärineda inimese või teiste imetajate sooletraktist, saastunud toidust

või veest, haigla personali käteelt ning saastunud instrumentidelt või kaasasündinud infektsioonina ema sünniteedest. Inimese soolestikus on leitud viis erinevasse kategooriasse kuuluvat patogeenset *E. coli* bakteritüve: shigatoksiini tootev *E. coli* (STEC), enteropatogeeniline *E. coli* (EPEC), enteroinvasiivne *E. coli* (EIEC), enteroagregatiivne *E. coli* (EaggEC) ja enterotoksigeeniline *E. coli* (ETEC) [8].

E. coli kui indikaatorbakteri üldise sisalduse ehk koliindeksi kaudu määratakse vesikeskkondade fekaalset reostust. See tähendab, et kui analüüsitavas vees sisaldub *E. coli*, viitab see fekaalselt reostunud veele, millega kokku puutudes on suur oht nakatuda erinevatesse bakteriaalsete viirustesse nagu rotaviirus ja noroviirus.

Eestis on *E. coli* piirsisalduseks suplusvees 10^3 CFU/100 ml. Kui *E. coli* sisaldus suplusvees ületab piirnormi, loetakse suplusvesi nõuetele mittevastavaks ning veekogus keelatakse suplemine. Joogivees *E. coli* olla ei tohi. [6]

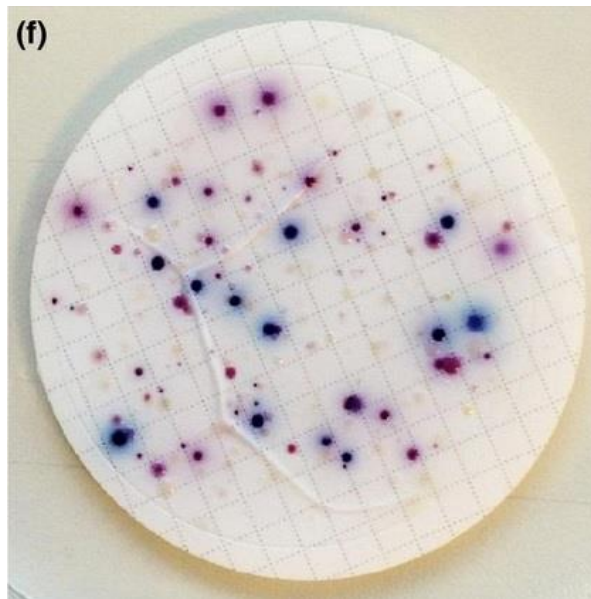
1.2 Meetodid *E. coli* määramiseks

1.2.1 Traditsiooniline mikrobioloogiliste külvide meetod

Proovide külvamine ja väljakasvavate kolooniate loendamine on vanim ja tuntuim patogeenide määramise meetod. Proovid külvatakse spetsiaalsetele söötmetele, mis sisaldavad analüüsi segavate mikroorganismide kasvu peatavaid või pärssivaid inhibiitoreid (näiteks kristallviolett inhibeerib grampositiivseid baktereid nagu enterokokid ja stafülokokid). Määratava bakteri detekteerimiseks kasutatakse substraate, mida suudab metaboliseerida vaid antud bakter. Enamasti on söötmele lisatud ka kromogeenseid ühendeid (bromotümoosin, neutraalpunane jms), mille tulemusel omandab kasvav bakterikoloonia spetsiifilise värvi. Söötmele arenenud bakterikolooniad saab määrata optiliste meetoditega ja ka visuaalsel vaatlusel. [9]

2014. aastal jõustunud Eesti standardi kohaselt määratakse *E. coli* sisaldust veeproovides *coli*-laadsete bakterite kromogeenset selektiivsöötmele, kus põhilist selektiivset rolli mängib NaCl

kõrge kontsentratsioon ja mitteioonse detergendi (Tergitol®) sisaldus. Esmalt filtreeritakse proovivee katsekogus läbi mikroorganisme kinnipüüdva membraanfiltr (0,45 µm) ning seejärel asetatakse filter kromogeensöötmepinnale ning inkubeeritakse 36±2°C juures 21 kuni 24 tundi. *E. coli* loendatakse kolooniad, mis värvuvad tumesiniselt kuni tumelillaks. Kolooniad, mille värvus on roosa kuni punane, loendatakse *coli*-laadseteks bakteriteks ehk bakteriteks, mis on teatud tunnuste alusel *E. coli* sarnased, kuid võivad pärineda lisaks soolestikule ka mullast ja pinnaveest ning ei ole seetõttu otseselt fekaalse reostuse indikaatorliikideks [10]. *E. coli* ja *coli*-laadsete bakterikolooniate väljakasvu kromogeensöötmel iseloomustab joonis 2.

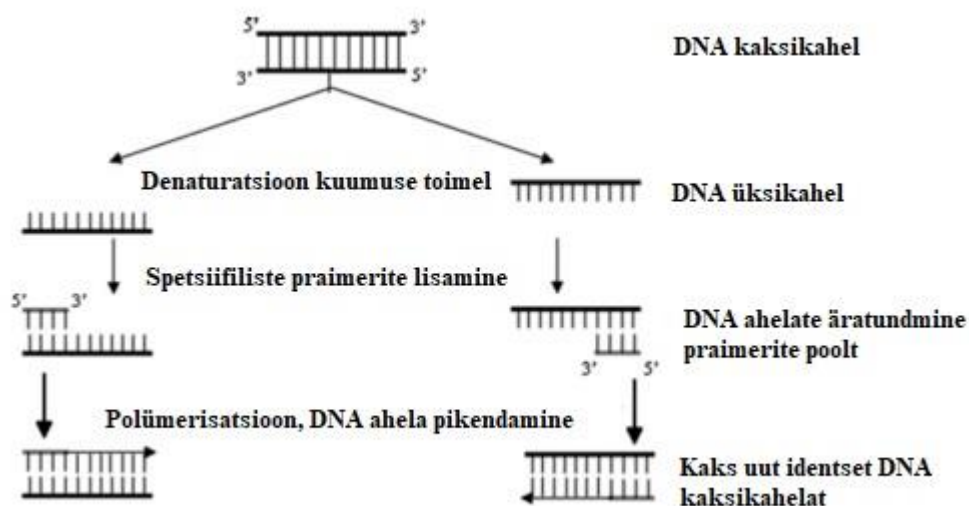


Joonis 2. Ruhri jõe veeproovi analüüsimisel väljakasvanud kolooniad *coli*-laadsete bakterite kromogeensöötmel. Tumesiniselt-lillaks on värvunud *E. coli* bakterikolooniad. [11]

Kolooniate külvamise ja loendamise meetodi suurimateks puudusteks on suur ajakulu, mis võib ulatuda mitmete päevadeni ning visuaalsest vaatlusest tingitud potentsiaalsed ebatäpsused kolooniate loendamisel [12].

1.2.2 Kvantitatiivne PCR meetod

Kvantitatiivne PCR (qPCR) on polümeraasi ahelreaktsiooni ehk PCR'i alamliik. PCR on meetod DNA järjestuse amplifikatsiooniks ehk kordistamiseks ja määramiseks, mis töötati välja 1980-ndate aastate keskel. Meetod põhineb bakteri geneetilist materjali sisaldava lühikese iseloomuliku DNA lõigu järjestuse isolatsioonil, amplifikatsioonil ja kvantiseerimisel. Analüüsiks kulub PCR-i spetsiifikast olenevalt tavaliselt 5 – 24 tundi [8]. qPCR meetodi puhul on võimalik baktereid nendes sisalduva DNA kaudu ka kvantitatiivselt määrata. Tava-PCR meetodi läbiviimise skeem on toodud joonisel 3.



Joonis 3. PCR meetodi läbiviimises üldine skeem [12]

PCR kolmest etapist koosnev protsess: esimeses etapis tõstetakse temperatuur 95°C juurde, et denatureerida DNA fragmendi kaksikahel. Analüüsi teises etapis langetatakse temperatuuri 65°C juurde, et praimerid (lühikesed nukleiinhappe lõigud ehk oligonukleotiidid, mille külge DNA polümeraas DNA replikatsiooni ajal kinnitub ning mis on seega DNA sünteesi alguskohaks) seonduksid DNA üksikahelatega. Analüüsi kolmandas etapis tõstetakse temperatuur 72°C juurde, et toimuks DNA süntees. Kogu protsessi saab korrata tsüklite kaupa senikaua kuni amplifitseeritud DNA lõikude arv on saavutanud soovitava taseme. [13]

Polümeraasi ahelreaktsioon viiakse läbi termotsükliks ehk PCR-masinas, kuhu sisestatakse spetsiaalsed reaktsioonituubid uuritava märklaud DNA ja märklaud DNA-le kinnituvate praimeritega. Termotsükler töötab automatiseeritult, kuumutades tuube kindlal temperatuuril kindlate ajavahemike kaupa. [14]

qPCR protsess kulgeb üldjoontes eelnevalt kirjeldatud skeemi järgi, kuid kvantitatiivsete andmete saamiseks mõõdetakse peale iga amplifikatsiooni tsükli fluorestsentssignaali intensiivsust. Fluorestsentssignaali genereerimiseks on samuti mitmeid võimalusi. Levinuimad on interkaleeruva värvainega qPCR ja fluorestseeruva prooviga qPCR. Interkaleeruv värvaine seondub PCR protsessi käigus moodustuva PCR fragmendi kaksikahelate nukleotiidipaaride vahele ning emiteerib mõõdetava fluorestsentssignaali. Fluorestseeruva prooviga qPCR korral kasutatakse lisaks praimeritele veel ka DNA oligot, ehk proovi, mis seondub spetsiifiliselt amplifitseeritavale DNA-le. Selle oligo ühes otsas on fluorestsentsmärgis ja teises otsas „kustutaja“, mis asuvad füüsiliselt üksteisele väga lähedal. Tavaolukorras, kui proov on terve, blokeerib „kustutaja“ fluorestsentsmärgise nii, et märgis ei anna fluorestsentssignaali. Polümerisatsiooni käigus inkorporeeritakse proov sünteesitava DNA ahela koosseisu, nii, et fluorestsentsmärgis vabaneb ning on võimeline andma fluorestsentssignaali. Fluorestsentssignaali kasv proovis on proportsionaalne tekkiva amplifikatsiooni produkti hulgaga ning registreeritakse fluoromeetriga, mis on qPCR masinas lisaks tavalisele termotsükli. Konstrueerides fluorestsentssignaalide standardkõvera, saab selle abil arvutada bakterite märklaud DNA kaudu nende hulka amplifitseeritavas proovis. [15,16]

qPCR meetod on küllalt lihtne ja tundlik, võimaldades kasutada vaid ühes rakus sisalduvat DNA-d [15]. Seevastu on sarnaselt mikrobioloogiliste külvidega ka qPCR meetodi suureks puuduseks ajakulu. Kuigi fragmendi amplifitseerimiseks kulub tavaliselt vaid 2-3 tundi, lisandub sellele ajale veel ka DNA eraldamine, millele kulub samuti vähemalt 2 tundi. qPCR meetodi põhiprobleemiks on aga inhibiitorid, mis amplifikatsiooni inhibeerimisel annavad valetulemusi. Sellised inhibiitorid võivad pärineda nii proovivõtukeskkonnast (polüsahhariidid, humiinhapped, kaltsiumiioonid jms) kui ka laboris kasutatavatelt plastikust tarvikutelt. [17]

Võrreldes mikrobioloogiliste külvidega, kus määratakse ainult eluvõimelisi rakke, sisaldub PCR tulemustes ka "uinuvatest" ja surnud rakkudest tulenev informatsioon [18].

1.2.3 Kokkuvõte *E. coli* määramise meetoditest

Kokkuvõtlikult on *E. coli* määramiseks kasutatavate põhimeetodite olulisemad näitajad toodud tabelis 1.

Tabel 1. *E. coli* määramiseks kasutatavad meetodid

	Meetod	Määramispiir CFU/ml	Analüüsi aeg	Märkused	Viide
1.	Mikrobioloogilised külvid	10^2	24-48 h	Lihtne, odav, võimalik määrata vaid elus olevaid rakke	[19,20]
2.	qPCR analüüs	10^3	5-6 h	Küllaltki lihtne, võimalik määrata nii eluvõimelisi, “uinunud” kui surnud rakke, probleemiks on ihibiitorid	[19,21]

Lisaks kolooniate külvamise ja loendamise ning qPCR meetoditele on *E. coli* sisalduse tuvastamiseks kasutusel veel ka mitmeid mittekvantitatiivseid meetodeid, näiteks MALDI-TOF massispektromeetria (maatriks-assisteeritud laser-desorptsioon-ionisatsioon lennuajaanalüsaator) ning ELISA (ensüüm-immunosorptsioon analüüs). Veeproovide analüüsimisel on aga eelkõige oluline just *E. coli* kvantitatiivne määramine, milleks on siiski sobivaimad vaid mikrobioloogilised külvid ja qPCR.

1.3 Biosensorid *E. coli* määramiseks

Biosensorid on analüütilised seadmed, mis koosnevad bioäratundvast elemendist, äratundmisreaktsiooni signaali detekteerivast andurist ja mõõteandmeid töötlevast üksusest. Bioäratundvaks elemendiks on bioloogiliselt aktiivne materjal (ensüümid, antikehad jms), mis reageerib selektiivselt määratava ühendi või ühendite rühmaga. Sõltuvalt analüüdi ja bioäratundva elemendi vastastoimel tekkiva signaali iseloomust registreeritakse see optilise, elektrokeemilise, termomeetrilise, magnetilise või piesoelektrilise anduriga. [22]

Biosensorite eeliseks võrreldes teiste olemasolevate analüüsimeetoditega on proovide eeltöötamise vajaduse puudumine ja lühike analüüsiaeg, mis võimaldab mõõtmiste teostamist reaalajas ning lisaks kõrge selektiivsus määratava analüüdi suhtes [23]. Biosensorite puudusteks on bioäratundmiselemendi suhteliselt väike stabiilsus ning suur tundlikkus keskkonnatingimuste muutustele [20].

Biosensoreid on valmistatud ja uuritud juba üle poole sajandi, kuid suurimad edusammud nende arendamise vallas on saavutatud just viimase 10 aasta jooksul [24]. *E. coli* biosensorites on bioäratundva elemendina enim kasutust leidnud mitmesugused *E. coli* vastased antikehad [25,26,27], kasutatud on ka letsitiine [3,28]. Tavapärased määramisajad *E. coli* biosensorites varieeruvad kümnest minutist kuni 1,5 tunnini ning detekteerimispiir jääb vahemikku 10^1 kuni 10^3 CFU/ml. Käesoleval ajal teevad teadlased pingutusi selle nimel, et *E. coli* biosensorite tundlikkus oleks isegi alla 5 CFU/ml [11]. Kokkuvõtlik informatsioon erinevatest *E.coli* määramiseks konstrueeritud biosensoritest on toodud tabelis 2.

Tabel 2. *E.coli* määramiseks kasutatavad biosensorid

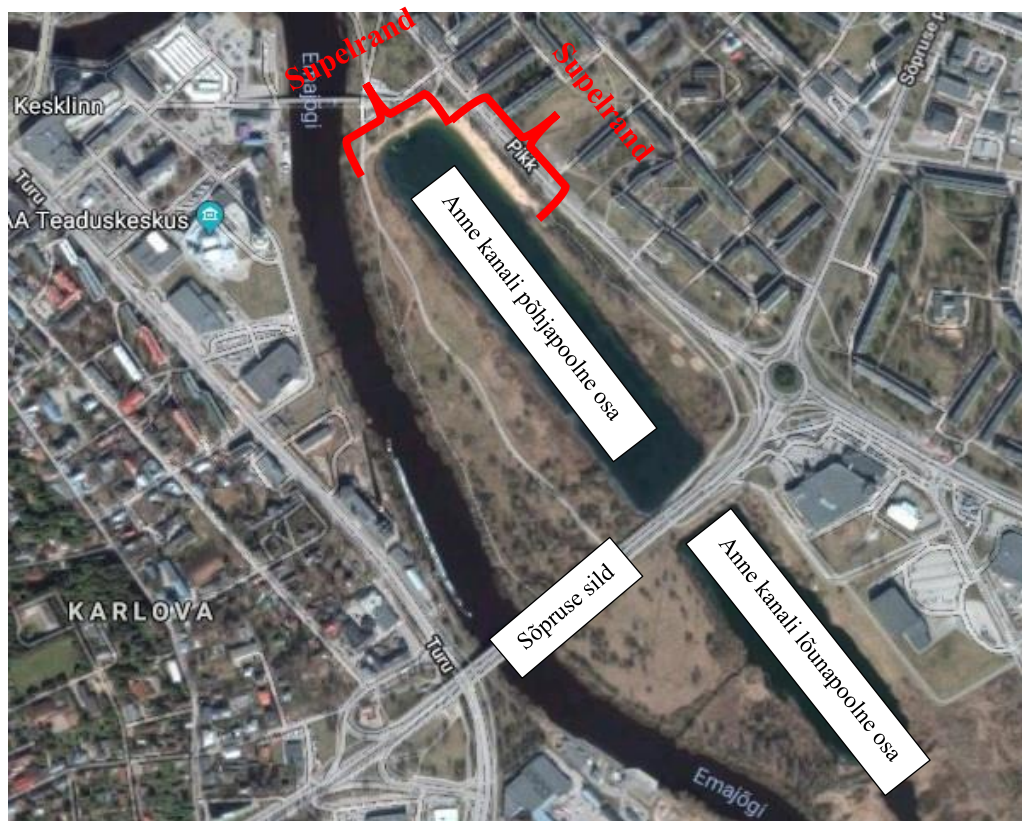
	Analüüdi äratundmissüsteem	Signaali meetod	detekteerimise	Määramispiir, CFU/ml	Analüüsi aeg, min	Viide
1.	Peptiidid	QCM (Quartz Crystal Microbalance) -biosensor		10^2	7	[29,30]
2.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	Amperomeetriline biosensor		7×10^1	10	[27]
3.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	Elektrokeemiline biosensor		10^2	60	[1,25,31]
4.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	SPR (Surface Plasmon Resonance) -biosensor			20	[29]
5.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	Potentsiomeetriline NH_3 elektroodiga biosensor		10^1	90	[25,32]
6.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	FTIR (Fourier Transform Infrared) biosensor		10^3	< 30	[26,33]
7.	Letsitiinid	Impedimeetriline SPC (Screen Printed Carbon paper) – sensor		$1,9 \times 10^3$		[28]
8.	Letsitiin conA (Concanavalin A)	Impedimeetriline kuld- elektroodiga biosensor		5×10^3		[3]
9.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) - biosensor		5×10^3	< 30	[26,34]
10.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	FET (Field-effect Transistor) - biosensor		10^1	30	[26,35]
11.	Anti - <i>E. coli</i> antikehad	Akustiline biosensor		10^3	30 - 50	[26]

1.4 Tartu Anne kanal

Anne kanal on tehisveekogu, mis asub Tartu linnas Anne linnaosas Emajõe vasakul kaldal. Anne kanali pindalaks on 9,5 ha ning kaldajoone kogupikkuseks 1660 m. Tartu linna üldplaneeringu kohaselt on Anne kanal ja selle supelrand avalikult kasutatav. [36]

Anne kanal rajati koos Annelinna ehitamisega aastatel 1965-1971 ning kanalist väljakaevatud pinnast kasutati Annelinna rajamisel täitematerjaliks [36].

Anne kanal koosneb kahest osast: põhjapoolsest osast, mille kaldal asub ka supelrand ning lõunapoolsest osast, mis on kasutamata. Rannaala ligikaudseks pikkuseks on 550 m [36]. Kahte kanalit eraldab üle kanali kulgev Sõpruse sild koos selle all asuva täidetud kanali osaga. Anne kanali mõlemad osad, neid eraldav Sõpruse sild ja suplusranna asukoht on kujutatud joonisel 4.



Joonis 4. Anne kanal, Sõpruse sild ja suplusranna asukoht satelliidipildil.

Tänu oma asukohale Tartu linna keskuse lähedal ning intensiivsele kasutamisele on Anne kanal üks Eesti probleemsemaid suplusvee kvaliteediga kohti, milles *E. coli* sisaldus on mitmetel kordadel ületanud lubatud piirnормi. 2017. aasta 17. juulil võetud veeproovides oli *E. coli* sisaldus 6100 CFU/100 ml, mis on lubatust ligikaudu 6 korra suurem. Ka 2013. aasta suvel olid Anne kanali veeproovid erakordselt suure *E. coli* sisaldusega, ulatudes kuni 5670 CFU/100 ml [37]. Selle tagajärjel suleti Anne kanali rand suplejatele terveks augustikuuks. Kuna aga proovide analüüsimine mikrobioloogiliste külvide abil võttis aega 4 päeva, siis hoiatus hilines ning inimesed suplesid enne ranna ametlikku sulgemist potentsiaalselt nakkusohtlikus vees [38].

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid

- 1) HiTrap™ valk A HP kolonn (GE Healthcare, 5 ml, sidumisvõimega 20 mg inimese IgG/ml kohta)
- 2) Dialüüsimembraan Spectra/Por® 6-8 kDa
- 3) Dinaatriumvesinikfosfaat Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, 99%)
- 4) Naatriumdiveinikfosfaat NaH_2PO_4 (Sigma Aldrich)
- 5) Naatriumkloriid NaCl (AppliChem, 99,9%)
- 6) Glütsiin $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (AppliChem, 99,5%)
- 7) Tris(hüdroksümetüül)aminometaan $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Scharlau, 99,2 %)
- 8) Ammooniumsulfaat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AppliChem)
- 9) Vesinikkloriidhape HCl (Sigma Aldrich, 30-50%)
- 10) Papaiin, Lot 1G000215, (AppliChem)
- 11) EDTA $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (BioTop, 99%)
- 12) L-tsüsteiin $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ (AppliChem, 99%)
- 13) 2-jodoatsetamiid $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ (AppliChem, 99%)
- 14) Sephadex G50 Medium (GELifesciences, osakeste suurus 80-150 μm)

- 15) Epikloorhüdriin C_3H_5ClO (Acros Organics, min 99%)
- 16) Etanoolamiin C_2H_7NO (Fluka Chemika, 99%)
- 17) Naatriumkarbonaatdekahüdraat $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ (AppliChem, min 99%)
- 18) Naatriumdivesinikfosfaat-dihüdraat $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (AppliChem, min 99%)
- 19) Naatriumvesinikfosfaat Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, min 99%)
- 20) Naatriumkloriid $NaCl$ (Реахим, Ч)
- 21) Naatriumhüdrokksiid $NaOH$ (AppliChem, min 99%)
- 22) Vesinikkloriid HCl (Реахим, 35-38%)
- 23) FITC-ga märgistatud küüliku polükloonaalne IgG tüüpi anti-*E. coli* antikeha, NB100-64448, 2 mg/ml (Novusbio)
- 24) Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma Aldrich)

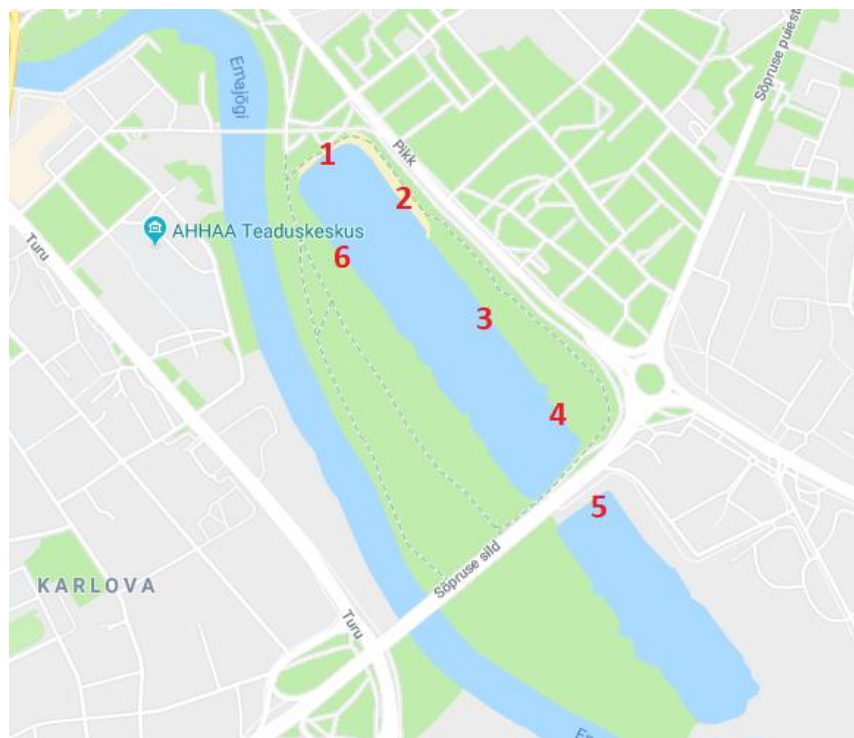
2.2 Kasutatud seadmed

- 1) ÄKTApurifier UPC 10 (GE Healthcare)
- 2) UV 1800 UV-Vis Spektrofotomeeter (Shimadzu corporation)
- 3) pH-meeter (Mettler Toledo), täpsusega $\pm 0,02$ ühikut
- 4) Vortex segaja (Heidolph)
- 5) Analüütiline kaal XS105 Dual Range (Mettler Toledo) täpsusega $\pm 0,01$ mg
- 6) Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
- 7) Loksuti MS-3000 (Biosan)
- 8) FIA lab 3500B (FIALab)
- 9) Spektrofotomeeter USB2000+ (Ocean Optics)
- 10) Valgusallikas DH-2000+ (Ocean Optics)
- 11) Analüütiline kaal PB 602-S/FACT (Mettler Toledo) täpsusega $\pm 0,01$ g
- 12) Crystal Spec nefelomeeter, täpsusega $\pm 0,2$ McFarlandi ühikut

2.3 Metoodikad

2.3.1 Anne kanali veeproovide kogumine

Anne kanali veeproovid koguti 17. septembril 2017. aastal. Ilm oli sellel päeval selge ja päikeseline, keskmiseks õhutemperatuuriks oli 12,5°C. Proovid koguti spetsiaalsetesse viaalidesse Anne kanali mõlemast osast kaldaäärsest veest 6 erinevast kohast, 15-20 cm sügavuselt. 2 proovivõtukohta asusid supelrannas, 2 asusid Pika tänava poole jääva haljasala kaldal, 1 Emajõe poolse haljasala kaldal ning 1 proovivõtukoht asus teisel pool Sõpruse silda Anne kanali lõunapoolses osas. Proovide kogumise asukohad on välja toodud joonisel 5. Kõik proovid olid suurusega 40 ml ning neid säilitati kuni mõõtmistega alustamiseni sügavkülmas temperatuuril -18°C. Enne külmutamist lisati igale proovile ka 1:1 suhtes glütserooli, et bakterid külmumisel ei lõhkeks.



Joonis 5. Anne kanali veeproovide kogumise kohad.

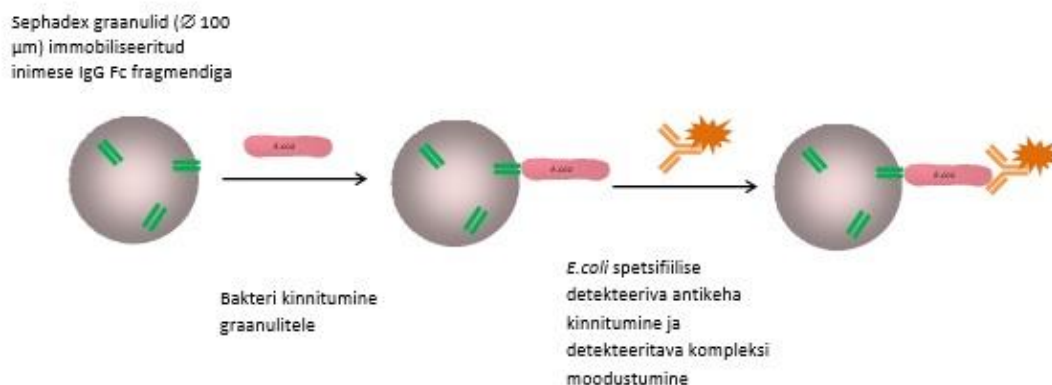
2.3.2 *E. coli* kultiveerimine

Escherichia coli (ATCC 25922) rakkude kasvatamiseks külvati bakterikultuur Tartu Ülikooli Mikrobioloogia instituudis veriagari söötmele ja inkubeeriti 24 h aeroobses keskkonnas 37 °C juures.

Kolooniad korjati 24 h möödudes steriilse tampooniga ja viidi 40 ml fosfaatpuhvrissi (10 mM; 0,15 M NaCl; pH 6,5). Suspensiooni optiline tihedus mõõdeti Crystal Spec nefelomeetriga McFarlandi standardil. Mõõtetulemuseks saadi 6,8 McFarlandi ühikut, millele vastav rakkude hulk on 2×10^9 CFU. *Escherichia coli* suspensiooni säilitati 4 °C juures.

2.3.3 Fluorestsentsi mõõtmisel põhinev *E. coli* immunobiosensor

Käesolevas töös *E. coli* määramiseks konstrueeritud immunobiosensor põhineb antigeen-antikeha vahelisel bioäratundmissüsteemil, mis on integreeritud graanulsisestusanalüüsiga. Biosensori põhimõtteline skeem *E. coli* määramiseks on toodud joonisel 6.



Joonis 6. *E. coli* määramiseks rakendatud fluorestsentsi mõõtmisel põhineva immunosensori tööskeem.

E. coli määramiseks seotakse esmalt proovis leiduvad *E. coli* bakterid mikrograanulitele, millele on immobiliseeritud inimese IgG Fc fragment, mis seondub *E. coli* välismembraanil leiduva OmpA valguga. Seondunud bakterite määramiseks kasutatakse fluorestsentsmarkeriga märgistatud detekteerivat antikeha ning registreeritakse fluorestsentsi mõõtmise kaudu kompleksi moodustumine. *E. coli* bakteri määramiseks kasutati amiinreaktiivse värvainega FITC (fluorestseiniisotiotsüanaat) märgistatud anti-*E. coli* antikeha. FITC markeri ergastuskiirguse lainepikkus on 495 nm ja emissioonkiirguse lainepikkus 525 nm.

2.3.4 IgG puhastamine inimese vereseerumist

Antikehad puhastati tervete inimeste vereseerumist, mis saadi Tartu Ülikooli Kliinikumi Verekeskusest. Puhastamiseks kasutati HiTrap valk A HP kolonni (5 ml), mis ühendati ÄKTApurifier UPC 10 süsteemiga (GE Healthcare). Vereseerumit hoiti puhastamiseni temperatuuril -18 °C ning enne puhastamist sulatati +4 °C juures. Esmalt tsentrifuugiti nimese vereseerumit võimalike valguagregaatide eraldamiseks 10 min (10 000×g). Antikehade eraldamiseks vereseerumist kasutati järgnevat eeskirja:

- 1) Valk A kolonni voolutati 25 ml seondumispuhvriga (10 mM Na₂HPO₄ + 0,15 M NaCl, pH 7,2) voolukiirusel 3,0 ml/min;
- 2) proov (4,4 ml) sisestati kolonni;
- 3) kolonni mitte seondunud valgud pesti kolonnist välja 50 ml seondumispuhvri abil;
- 4) elueerimispuhvri (100 mM glütsiin/HCl, pH 2,7) abil voolutati kolonnist välja seondunud antikehad. Kogutud fraktsioonide pH neutraliseeriti koheselt neutraliseerimispuhvri (1 M Tris, pH 9,0) lisamisega;
- 5) kolonn pesti ja tasakaalustati uuesti 30 ml seondumispuhvriga.

IgG tüüpi antikehade kontsentratsioon kogutud fraktsioonis määrati spektrofotomeetriliselt 280 nm juures, võttes arvesse IgG koefitsienti 1,37 (1 mg/ml lahuse korral).

2.3.5 Puhastatud antikeha fragmenteerimine ja Fc fragmendi eraldamine

Puhastatud antikehade lahusele lisati esmalt ammooniumsulfaati lõppkontsentratsioon 50% küllastusest) ning inkubeeriti 4 °C juures 24 tundi. Sademe eraldamiseks tsentrifuugiti proovi 25 min (2450×g). Lahus eraldati ning sade lahustati PBS-puhvrts (10 mM Na₂HPO₄ + 0,15 M NaCl, pH 7,2) nii, et lahuse lõppruumalaks jäi 2,2 ml. Seejärel proov dialüüsi (dialüüsimembraan Spectra/Por® 6-8 kDa) PBS puhvrts 24 tundi 14 °C juures pidevalt segades.

IgG fragmenteerimiseks inkubeeriti proovi papaiini lahusega 24 tundi 37 °C juures. Papaiini lahus valmistati PBS puhvrtsse, mis sisaldas 1 mM EDTA ja 10 mM L-tsüsteiini. Papaiini (lähtelahuses 10 mg/ml) lisati antikeha lahusele ruumalalise suhtega 1:10. Inkubeerimisele järgnevalt lisati proovile joodatseetamiidi lõppkontsentratsioonini 30 mM ning inkubeeriti veelkord 15 min 37 °C juures. Proovi tsentrifuugiti 1 min (2450×g).

IgG Fc fragmendi eraldamiseks kasutati taaskord afiinsuskromatograafiat (sama eeskirja järgi nagu eelnevalt kirjeldatud IgG puhastamisel inimese vereseerumist). Eraldatud IgG Fc fragmendi kontsentratsioon kogutud fraktsioonis määrati spektrofotomeetriselt 280 nm juures.

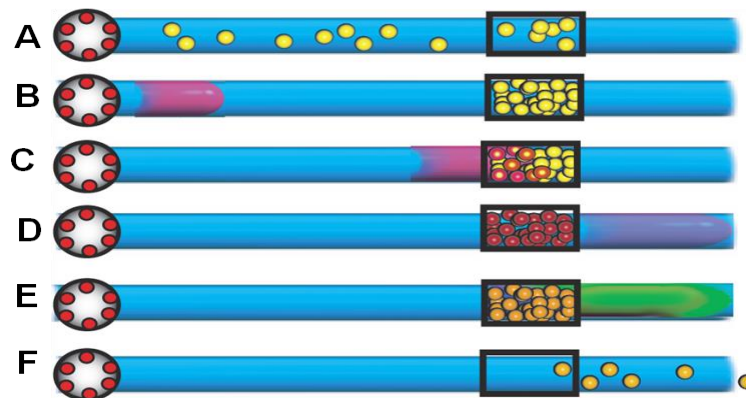
2.3.6 IgG Fc fragmendi sidumine Sephadex geelile

Geeli aktiveerimiseks immobiliseeriti Sephadex G50 Medium graanulitele inimese IgG Fc fragment, millega saavad seonduda *E. coli* membraanil olevad OmpA molekulid. 47,32 milligrammile Sephadex G50 Medium geelile lisati 1 ml MilliQ vett (ülipuhast vesi eritakistusega 18,2 MΩ·cm) ning jäeti ööpäevaks toatemperatuurile punduma. Paralleelselt asetati eelnevalt puhastatud IgG Fc fragment PBS-lahusesse (10 mM, pH 7,2) 24-tunniks 4°C juurde dialüüsi. Pundunud geeligranulitele lisati katalüsaatorina 400 µl NaOH (0,4 M) lahust ning loksutati kergelt. Seejärel lisati Sephadex geeli aktiveerimiseks 50 µl 5% epikloorhüdriini lahust ning geel asetati 3 tunniks toatemperatuuril loksutile. Geeli tsentrifuugiti 5 minutit (2450×g), pesti kaks korda 685 µl Milli-Q veega ning üks kord 685 µl Na₂CO₃ (0,5 M, pH 9,50) lahusega PBS-lahuses

dialüüsunud IgG Fc fragment asetati Na₂CO₃ lahusesse ning jäeti 3 tunniks 4°C juurde dialüüsi. Seejärel lisati 685 µl dialüüsunud IgG Fc fragmendi lahust aktiveeritud geelile ning asetati 24 tunniks toatemperatuuril loksutile. Seejärel tsentrifuugiti IgG Fc fragmendiga Sephadex geeli graanuleid 5 minutit (2450×g) ning pesti üks kord 685 µl Na₂CO₃ (0,5 M, pH 9,50) lahusega. Geeli pinnal olevate mittespetsiifiliste hüdroksüülrühmade blokeerimiseks lisati geelile 685 µl 8,5%-list etanoolamiini lahust Na₂CO₃ lahuses (85 µl etanoolamiini 1 ml-s Na₂CO₃ lahuses). Segu loksutati 4°C juures veelkord 2 tundi. IgG Fc fragmendiga geeli pesti üks kord 685 µl Milli-Q veega ja kuus korda 685 µl PBS-lahusega. Viimaks lisati geelile 685 µl PBS-lahust ning hoiustati 4°C juures. IgG Fc fragmentide seondumist geeli graanulitele kontrolliti Coomassie Brilliant Blue G-250 abil. Lisaks määrati geelile seondunud valgukoguse hindamiseks spektrofotomeetriselt seondumata valgu kogus inkubatsioonilahuses neeldumise alusel 280 nm juures. Käesolevas töös modifitseeriti varasemalt bioaktiivsete graanulite valmistamiseks väljatöötatud protokoll NaOH lahuse lisamisega [39].

2.3.7 Mõõtmismetoodika

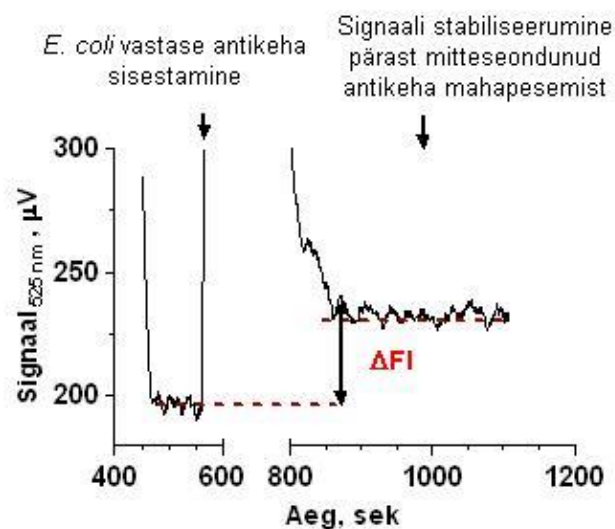
E. coli immunobiosensoris kasutati mõõtmiste läbiviimiseks graanulsisestusanalüüsi BIA (Bead Injection Analysis). BIA tööpõhimõtteks on ühekordse analüüti siduva mikrokoloni moodustamine voolukanalisse mikrograanulite voolusega sisestamise teel. Mikrograanulite külge oli eelnevalt seotud funktsionaalsed rühmad, millega saab seonduda proovis olev analüüsitav komponent. Seejärel voolutatakse koloni proovi maatriksi ja mitteseondunud analüüdi eemaldamiseks ning lisatakse detekteeriv komponent, mis moodustab seondunud analüüdiga detekteeritava kompleksi; mitteseondunud detekteeriv komponent eemaldatakse süsteemist voolutamise teel. Analüüdiga moodustunud kompleksi detekteerimine toimub tavaliselt spektrofoto- või fluoromeetriselt kas otse või kasutades sobivat värvi- või fluorestsentsmarkerit. BIA tööpõhimõte on kujutatud joonisel 7.



Joonis 7. Mikrograanulite sisestusanalüüsi (BIA) tööpõhimõte [40]. A: graanulite sisetamine kolonni moodustamiseks, B: analüüti sisaldava proovi sisestamine, C: analüüdi seondumine graanulitele, D: proovimaatriksi eemaldamine, E: analüüdi detekteerimine flurestsentsmarkeriga antikeha abil, F: süsteemi regenereerimine.

E. coli määramiseks sisestati mõõterakku 20 μl inimese Fc fragmendi abil aktiveeritud geeli graanuleid kiirusega 1 $\mu\text{l}/\text{sek}$. Mikrograanulite transport mõõterakku tagati 30 μl PBS puhvri (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) lisamisega kiirusel 2 $\mu\text{l}/\text{sek}$. 150 μl *E. coli* lahust sisestati süsteemi kiirusega 1 $\mu\text{l}/\text{sek}$. *E. coli* inkubeerimise ajaks oli 180 sekundit. Mitteseondunud *E. coli* rakkude eemaldamiseks mõõterakust pesti mõõterakku 150 μl fosfaatpuhvriga (10 mM PBS; 0,15 M NaCl, pH 7,20) kiirusel 2 $\mu\text{l}/\text{sek}$. Mõõterakku sisestati 30 μl proteiin A vastast FITC-ga märgistatud *E. coli* antikeha kiirusega 1 $\mu\text{l}/\text{sek}$. FITC-ga märgistatud *E. coli* antikeha inkubeerimisajaks mõõterakus oli 120 sekundit. Mitteseondunud antikehad pesti süsteemist välja 150 μl PBS puhvriga (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) kiirusel 2 $\mu\text{l}/\text{sek}$. Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril ning mõõtmiste läbiviimiseks kasutatud protokoll on varasemalt optimeeritud *E. coli* määramiseks piimas [39].

E. coli sisaldusele vastavate kontsentratsioonide leidmiseks leiti iga mõõtmise kohta väärtus ΔFI , mis iseloomustab fluorestsentsi intensiivsuse erinevust stabiliseerunud signaali keskmiste intensiivsuste vahel enne ja pärast detekteeriva antikeha lisamist proovi. Fluorestsentsi intensiivsust süsteemis mõõdeti perpendikulaarselt ergastuseks kasutatava valguskiirega. Näide biosensori signaali intensiivsuse muutustest mõõtmise jooksul on toodud joonisel 8.



Joonis 8. Näide biosensori signaali intensiivsuse muutumisest mõõtmise jooksul.

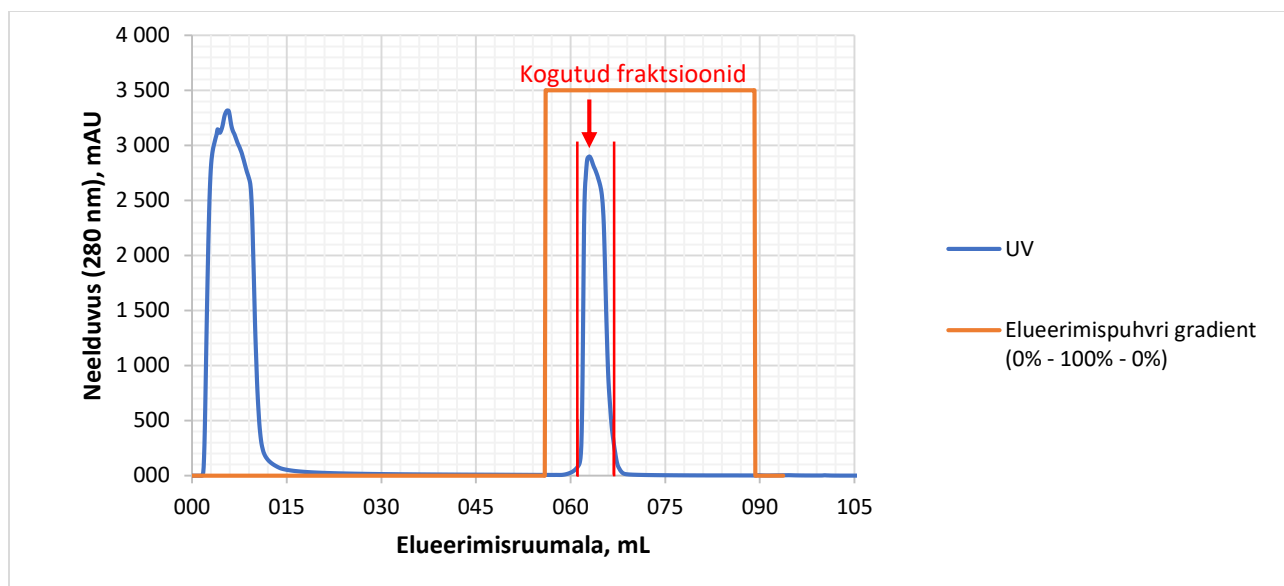
Igal *E. coli* kontsentratsioonil viidi läbi 3-5 kordusmõõtmist.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine

3.1.1 IgG Fc fragmendi puhastamine inimese vereseerumist

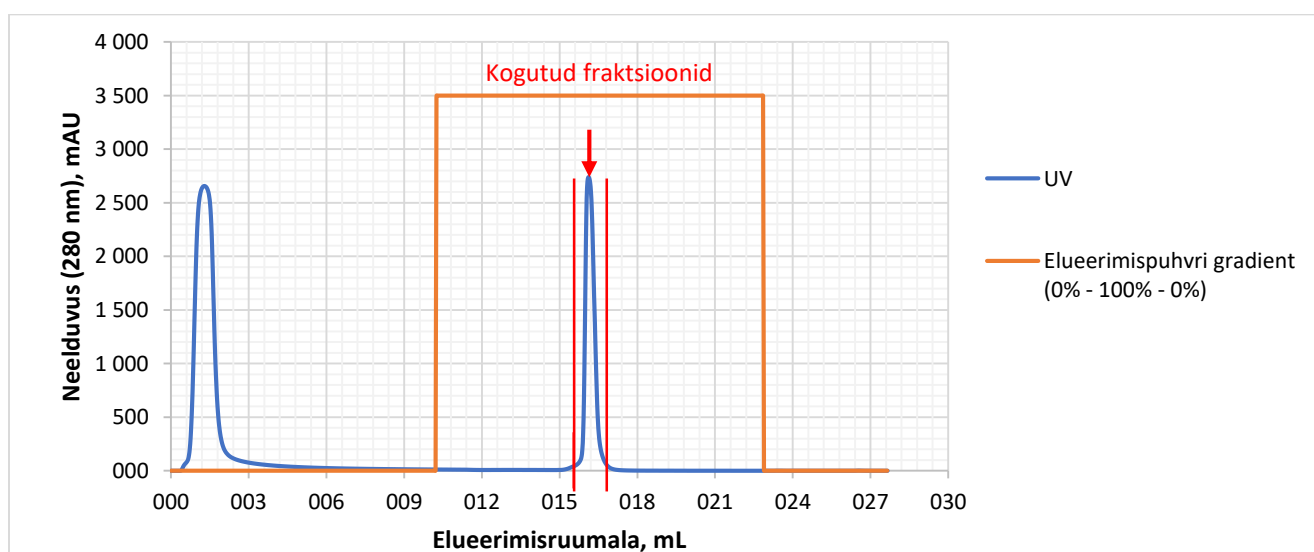
IgG Fc puhastamiseks kasutati afiinsukromatograafiat. Esmalt eraldati inimese vereseerumist kogu IgG. 4,4 ml vereseerumist saadi 7 ml puhastatud IgG lahust, mille kontsentratsiooniks mõõdeti 6,99 mg/ml (kokku 48,9 mg). 1 ml inimese vereseerumist õnnestus eraldada 11,1 mg IgG, mis on väga hea saagis, kuna kirjanduse andmetel on inimese veres keskmiselt 7,5-22 mg/ml IgG tüüpi antikehasid [41]. IgG puhastamisel valk A kolonni abil saadud kromatogramm on toodud joonisel 9.



Joonis 9. IgG puhastamisprotsessi iseloomustav kromatogramm.

Eraldatud IgG kontsentreerimiseks viidi läbi sadestamine ammoniumsulfaadiga. Sadestunud antikeha lahustamisel saadi 2,2 ml lahust kontsentratsiooniga 21,1 mg/ml (kogu antikeha hulk 46,4 mg). Seega oli sadestamise saagis 95% ning IgG kadu protsessi käigus ligikaudu 5%.

IgG fragmenteeriti ning saadud Fc fragment eraldati kasutades afiinsuskromatograafiat (joonis 10).



Joonis 10. IgG Fc fragmendi puhastamisprotsessi iseloomustav kromatogramm.

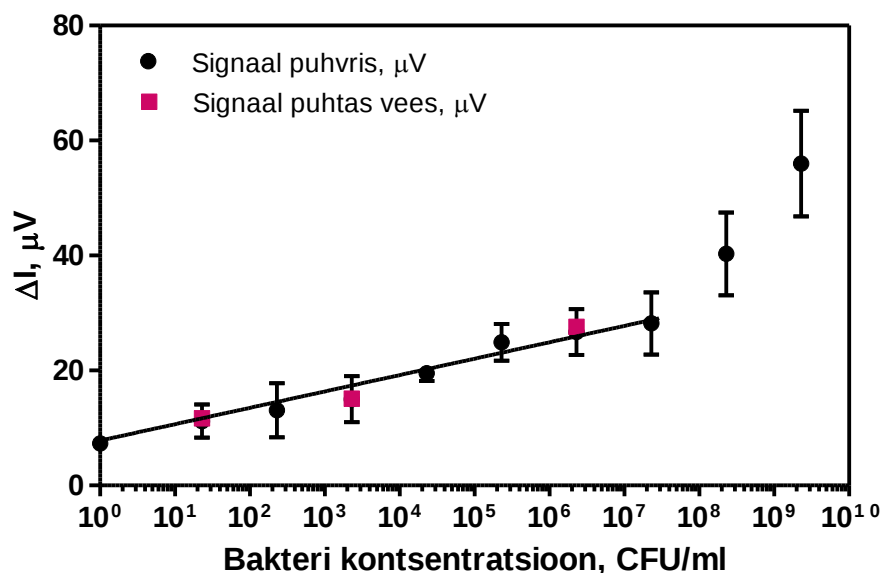
Koguti kolm erinevat fraktsiooni: piigi keskosast põhifraktsioon ja piigi äärtest kaks lahjat fraktsiooni (lahjemad fraktsioonid pandi kokku) ning saadi 2 x 1 ml puhastatud IgG Fc lahuseid. Põhifraktsiooni kontsentratsioon oli 3,7 mg/ml (3,7 mg), mida kasutati ka edasises töös, ning lahjema lahuse kontsentratsiooniks mõõdeti 0,2 mg/ml (0,2 mg). Kokku saadi 3,9 mg IgG Fc fragmenti, mille alusel leiti, et IgG Fc fragmendi saagiseprotsent oli ligikaudu 26% (teoreetiline maksimaalne võimalik IgG Fc fragmendi kogus oleks 15 mg). Saagise suurendamiseks tuleks edaspidi suurendada papaiini kontsentratsiooni, mida saaks teha kui 1:10 ruumala suhte asemel kasutada 1:10 massi suhet.

3.1.2 IgG Fc fragmendi immobiliseerimine geelile

Immobiliseerimise efektiivsuse määramiseks viidi läbi katseseeria, kus kasutati geeligraanulitele immobiliseerimiseks erinevate kontsentratsioonidega IgG Fc lahuseid. Esimese katse korral immobiliseeriti geeligraanulitele 1,4 mg IgG Fc fragmenti ja teise katse korral 3,7 mg IgG Fc fragmenti. Selgus, et mõlema immobiliseerimise korral kinnitus geeligraanulite pinnale $1,1 \pm 0,1$ mg IgG Fc fragmenti. Seega piisab maksimaalse võimaliku immobiliseerimise efektiivsuse saavutamiseks kui immobiliseerimisel kasutada madalama kontsentratsiooniga IgG Fc fragmendi lahust.

3.1.3 Biosensori kalibreerimine *E. coli* määramiseks

E. coli määramiseks konstrueeritud biosensori iseloomustamiseks ning selle kalibreerimiseks mõõdeti biosensori signaali sõltuvust *E. coli* kontsentratsioonist lainepikkusel 525 nm ning mõõtmistulemuste põhjal koostati kalibreerimisgraafik poollogaritmilises teljestikus. Koostatud kalibreerimisgraafik on kujutatud joonisel 11.



Joonis 11. *E. coli* kalibreerimisgraafik poollogaritmilises teljestikus. Linearse osa sõltuvus on kujutatud musta pideva joonega.

Mõõtmised fosfaatpuhvris viidi läbi kaheksal erineval bakteri kontsentratsioonil vahemikus 3×10^1 kuni 3×10^9 CFU/ml. Biosensori taustasignaali leidmiseks mõõdeti signaal ka puhtas PBS-puhvris, kuhu ei olnud *E. coli* lisatud ning saadud väärtuseks oli $7,3 \pm 1,0 \mu V$. *E. coli* määramispiiri väärtus, mis vastab bakteri kontsentratsioonile, mille põhjustatud signaal ületab taustasignaali vähemalt 3 standardhälbe suuruse võrra, oli 10 CFU/ml ($10,3 \mu V$). Biosensori lineaarne tööpiirkond oli vahemikus $10^1 - 10^7$ CFU/ml. Kuna tavapäraselt on suplusvees *E. coli* indeks 1 – 10 CFU/ml ja normidele ei vasta vesi siis, kui indeks on üle 10^2 CFU/ml, siis võib olla vajalik ka madalama bakterite kontsentratsiooni määramine. Antud biosensorsüsteemi kasutamisel on *E. coli* määramispiiri alandamine tehniliselt väga lihtne ja tuleb lihtsalt suurendada analüüsiks võetavat proovi hulka, ehkki see suurendab ka analüüsiks kuluvat aega. Kalibreerimisgraafiku tõus, mis iseloomustab biosensori tundlikkust, oli lineaarses tööpiirkonnas $3,04 \pm 0,19 \mu V/\log$ (CFU/ml). Sõltuvusest leitud telglõigu väärtus on $6,63 \pm 0,86$, mis vastab süsteemi taustasignaale, langeb hästi kokku eksperimentaalselt mõõdetud väärtusega, mis oli $7,3 \pm 1,0 \mu V$.

Lisaks puhverlahuses tehtud mõõtmistele teostati mõõtmised ka ülipuhtas Milli-Q vees *E. coli* kontsentratsioonidel 10^1 , 10^3 ja 10^6 CFU/ml (joonisel 11 tumeroosaga tähistatud punktid), et uurida mõõtmiste läbiviimise võimalikkust looduslikus vees, kus soolade kontsentratsioon on

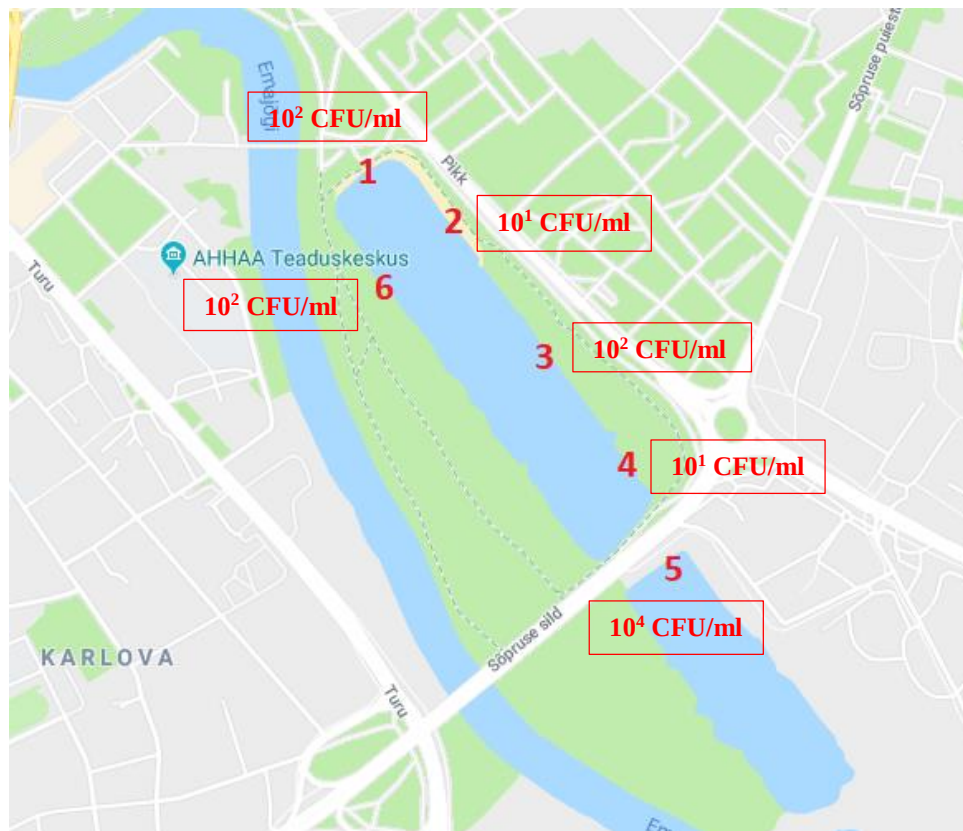
madalam kui puhverlahuses ning pH võib kõikuda vahemikus 6 – 9, samas aga võib leiduda mitmeid lahustunud aineid [42]. Selgus, et mõõdukas lahustunud soolade kontsentratsioon (kuni 0,15 M) ei mõjuta mõõtmistulemusi ning PBS-puhverlahuses koostatud kalibreerimisgraafikon kasutatakse ka Anne kanali veeproovide analüüsimisel.

3.1.4 *E. coli* sisalduse määramine Anne kanali vees

E. coli sisalduse määramine Anne kanali veeproovides teostati vastavalt eelnevalt kirjeldatud mõõtmismetoodikale. Keskmise signaali väärtus iga veeproovi kohta leiti 3 kordusmõõtmise tulemusena ning ühe mõõtmise läbiviimiseks kulus aega 20 minutit. Keskmistest signaalidest leiti kalibreerimisgraafikule tuginedes vastav *E. coli* sisaldus (CFU/ml) iga veeproovi kohta. Tulemused veeproovides mõõdetud signaalide väärtuste ja vastavate *E. coli* sisalduste kohta on esitatud tabelis 3. Joonisel 12 on saadud *E. coli* sisaldused veeproovides kujutatud ka kaardikihil.

Tabel 3. Anne kanali veeproovides mõõdetud signaalide väärtused ja vastavad *E. coli* sisaldused

Proovi nr	Mõõdetud signaali väärtused (µV)	Keskmine signaal (µV)	<i>E. coli</i> sisaldus (CFU/ml)
1	13,9 15,4 12,1	$13,8 \pm 1,35$	10^2
2	10,7 10,9 11,3	$11,0 \pm 0,25$	10^1
3	13,1 11,9 13,1	$12,7 \pm 0,57$	10^2
4	10,9 11,9 11,4	$11,4 \pm 0,41$	10^1
5	17,2 18,1 19,4	$18,2 \pm 0,9$	10^4
6	12,0 11,7 12,4	$12,0 \pm 0,29$	10^1



Joonis 12. *E. coli* sisaldus Anne kanali proovipunktides.

Nagu saadud andmetest selgub, vastas 2017. aasta septembris kogutud proovide põhjal *E. coli* sisaldus Anne kanali linnapoolses osas, kus asuvad supelrannad, kehtestatud normatiividele ning oli vahemikus 10 - 100 CFU/ml. Samas kanali Ihaste poole jäävas osas oli *E. coli* kontsentratsioon väga kõrge, ulatudes lausa väärtuseni 10^4 CFU/ml (10^6 CFU/100 ml), mis ületab lubatud kontsentratsiooni ligikaudu tuhat korda. Kõrgem *E. coli* kontsentratsioon on tõenäoliselt põhjustatud sellest, et see vastav kanali osa on kasvanud kõrkjatesse, kuhu takerdub inimtekkeline prügi ning lisaks meeldib kõrkjate varjus pesitseda ka veelindudele. Sealse kalda ääres asub ka koerapark ja inimesed käivad kaldavees oma koeri ujutamas. Nii koerte kui lindude väljaheidete sattumine vette on väga oluline *E. coli* sisalduse suurendaja.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli konstrueerida antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhinev biosensor *Escherichia coli* määramiseks ja testida selle kasutatavust suplusvee kvaliteedi hindamisel Anne kanalist kogutud veeproovide abil.

Escherichia coli on imetajate ja teiste püsisoojaste loomade soolestikus elutsev enamasti kahjutu mikroob. Küll aga esineb *E. coli* bakteril ka patogeenseid tüvesid, mis põhjustavad ägedaid haigusnähtusid nagu kõhulahtisus, haavainfektsioonid ja kuseteede põletikud. Vältimaks patogeense *E. coli* sattumist inimorganismi ja ennetamaks võimalike haigusnähtude esinemist, on oluline, et *E. coli* sisaldus vesikeskkondades ei ületaks lubatud piirnorme. Seejuures on äärmiselt oluline, et *E. coli* sisalduse määramine toimuks kiiresti ning hoiatus potentsiaalse ohu kohta jõuaks inimesteni õigeaegselt.

Traditsiooniliste meetoditena *E. coli* sisalduse määramiseks vesikeskkondades on tänapäeval kasutusel mikrobioloogilised analüüsid, mis võtavad aega 1-2 päeva ja PCR analüüs, mille läbiviimiseks kulub ligikaudu 6 tundi.

Üheks võimalikuks alternatiiviks traditsioonilistele kasutusel olevatele meetoditele *E. coli* määramiseks on biosensorite kasutamine. Biosensorite eeliseks võrreldes teiste olemasolevate analüüsimeetoditega on lühike analüüsiaeg, kõrge selektiivsus määratava analüüdi suhtes, võimalus teostada mõõtmisi reaalajas ning lisaks puudub vajadus proovide eelkontsentreerimiseks.

Bakalaureusetöö käigus konstrueeriti esmalt biosensor *E. coli* määramiseks. *E. coli* kontsentratsiooni määramiseks koostati kalibreerimisgraafik, mille lineaarne tööpiirkond oli vahemikus $10^1 - 10^7$ CFU/ml ning veenduti, et soolade olemasolu vees ei mõjuta biosensoriga mõõdetud tulemusi. *E. coli* määramispiiriks biosensoriga oli 10^1 CFU/ml ning analüüsi läbiviimise ajaks 20 minutit.

Konstrueeritud biosensorit kasutati Anne kanalist kogutud veeproovide analüüsimiseks. Selgus, et Anne kanali linnapoolses osas jäi *E. coli* sisaldus veeproovides lubatud normatiivi

(10^3 CFU/100 ml) piiridesse, kuid teisel pool Sõpruse silda, kanali lhaste poolses osas ületas *E. coli* sisaldus lubatud normatiivi koguni 1000 korda. Biosensoriga saadud tulemuste valideerimiseks oleks edaspidi vajalik teha veeproovide analüüsid erinevate meetoditega ning võrrelda saadud tulemusi. Võrdlusmeetoditeks sobivad mikrobioloogilised külvid ning qPCR.

Lisaks on võimalik väljapakutud biosensortechnoloogiat tulevikus täiendada, et oleks võimalik eristada patogeensed bakterid mittepatogetestning vähendada aparatuuri mõõtmeid, et biosensorit oleks mugav veekogude äärde kaasa võtta ning proove saaks läbi viia kohapeal.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Encoclopedia of Life. *Escherichia coli* BW2952.
http://eol.org/pages/972688/hierarchy_entries/53167449/details viimati alla laetud 17.04.2018.
- [2] C. Lui, N. Cady, C. Batt, Nucleic Acid-based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems, *Sensors*. 9 (2009) 3713–3744.
- [3] S. Rengaraj, Á. Cruz-Izquierdo, J.L. Scott, M. Di Lorenzo, Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water, *Sensors Actuators B Chem.* 265 (2018) 50–58.
- [4] I. Lutsar, M. Mikhelsaar, T. Karki, *Escherichia coli*, in: *Med. Mikrobioloogia Bakterioloogia Ja Mükoloogia*, II osa, Tartu, 2007, pp. 102–107.
- [5] J. Dahl. Gram negative cell wall.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gram_negative_cell_wall.svg viimati uuendatud 02.03.2008.
- [6] Riigi Teataja, Vabariigi Valitsuse 3. aprilli 2008. a määruse nr 74 “Nõuded suplusveele ja supelrannale”; lisa 2, (2008).
- [7] T. Strachan, Chapter 6.2, *Human Molecular Genetics*, 2nd edition, Read AP, New York, 1999, chapter 6.2.
- [8] M. Fujioka, Y. Otomo, C.R. Ahsan, A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 92 (2013) 289-292.
- [9] B. D. GmbH. KASUTUSJUHEND – KASUTUSVALMIS PLAATIDEL SÖÖDE.
<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=31282> viimati uuendatud 01.2016.
- [10] Eesti Standardikeskus, Euroopa standardil EN ISO 9308-1:2014 ja muudatusel A1:2017 põhinev Eesti Standard *E. coli* ja *coli*-laadsete bakterite loendamiseks veeproovides, (2017).
- [11] B. Lange, M. Strathmann, R. Oßmer, Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria, *Lett. Appl. Microbiol.*

- 57 (2013) 547–553.
- [12] O. Lazcka, F. Javier, D. Campo, F. Xavier Muñoz, Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1205–1217.
 - [13] C. Lui, N. Cady, C. Batt, Nucleic Acid-based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems, *Sensors.* 9 (2009) 3713–3744.
 - [14] T. Strachan, Chapter 6.2, *Human Molecular Genetics*, 2nd edition, Read AP, New York, 1999, chapter 6.2.
 - [15] A. Kurg. Hübridisatsioonitehnika ja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).
<http://gt.inkblue.net/biotehnoloogia/molekulaarbiotehnoloogia/Loeng4.pdf> viimati alla laetud 10.02.2018.
 - [16] New England BioLabs. Overview of qPCR. <https://www.neb.com/tools-and-resources/video-library/overview-of-qpcr> viimati alla laetud 24.05.2018.
 - [17] J. Bessetti. An Introduction to PCR Inhibitors. <https://www.promega.es/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1001/an-introduction-to-pcr-inhibitors.pdf?la=es-es> viimati uuendatud 03.2007.
 - [18] T. Soejima, K. Iida, T. Qin, H. Taniai, M. Seki, S. Yoshida, Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. In press, online from 30.04.2018,
<https://10.1128/JCM.02171-07>.
 - [19] F. Ramírez-Castillo, A. Loera-Muro, M. Jacques, P. Garneau, F. Avelar-González, J. Harel, A. Guerrero-Barrera, Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges, *Pathogens.* 4 (2015) 307–334.
 - [20] W. Sangadkit, O. Rattanabumrung, P. Supanivatin, A. Thipayarat, Practical coliforms and *Escherichia coli* detection and enumeration for industrial food samples using low-cost digital microscopy. *Procedia Eng.* 32 (2012) 126–133.
 - [21] A.M. Ibekwe, C.M. Grieve, Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. In press, online from 12.02.2003,
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01848.x>.
 - [22] J.A. Goode, J.V.H. Rushworth, P.A. Millner, Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir* 31 (2015) 6267–6276.
 - [23] A.C. Acta, R.L. Caygill, G.E. Blair, P.A. Millner, A review on viral biosensors to detect human pathogens, *Anal. Chim. Acta.* 681 (2010) 8–15.

- [24] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors. In press, online from 30.06.2016, <https://10.1042/EBC20150001>.
- [25] B. Byrne, E. Stack, N. Gilmartin, R. O’Kennedy, Antibody-based sensors: Principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins, *Sensors*. 9 (2009) 4407–4445.
- [26] R. Elena Ionescu, *Escherichia coli* - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications, InTechOpen, Rijeka, 2017, pp. 275 - 292.
- [27] E. Libe. Immunosensorsüsteem *Escherichia coli* määramiseks. Bakalaureusetöö, Tartu, 2014.
- [28] K. Rijal, A. Leung, P.M. Shankar, R. Mutharasan, Detection of pathogen *Escherichia coli* O157:H7 AT 70 cells/mL using antibody-immobilized biconical tapered fiber sensors, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 871–880.
- [29] E. Yilmaz, D. Majidi, E. Ozgur, A. Denizli, Whole cell imprinting based *Escherichia coli* sensors: A study for SPR and QCM, *Sensors Actuators B Chem.* 209 (2015) 714–721.
- [30] S. Smit. Kvartskristall mikroaalude kasutamine biosensorina. Bakalaureusetöö, Tartu, 2010.
- [31] M. Xu, R. Wang, Y. Li, An electrochemical biosensor for rapid detection of *E. coli*. In press, online from 30.06.2016, <https://10.1039/C6AN00873A>
- [32] M.B. Maas, W.J. Perold, L.M.T. Dicks, Review: Biosensors for the detection of *Escherichia coli*. In press, online from 04.10.2017, <http://dx.doi.org/10.4314/wsa.v43i3.01>.
- [33] S. Mura, G. Greppi, M.L. Marongiu, P.P. Roggero, S.P. Ravindranath, L.J. Mauer, N. Schibeci, F. Perria, M. Piccinini, P. Innocenzi, J. Irudayaraj, FTIR nanobiosensors for *Escherichia coli* detection, *Beilstein J. Nanotechnol.* 3 (2012) 485–492.
- [34] Y. Wang, Z. Ye, Y. Ying, New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria, *Sensors*. 12 (2012) 3449–3471.
- [35] L.T. Kubota, A.C. Mazarin de Moraes, Chemosensors. <http://www.mdpi.com/journal/chemosensors> viimati uuendatud 21.10.2016.
- [36] Kobras AS. Anne kanal I seisundi uuring suplusvee kvaliteedi tagamiseks. Keskkonnauuring, Tartu, 2014.

- [37] Terviseamet. Suplusvee veekvaliteedi andmebaas.
http://vtiav.sm.ee/index.php/?active_tab_id=SV viimati alla laetud 09.04.2018.
- [38] J. Voltri, Anne kanali veekvaliteet on tõsiselt halvenenud, punane lipp jääb. Tartu Postimees. <https://tartu.postimees.ee/4184625/anne-kanali-veekvaliteet-on-tosiselt-halvenenud-punane-lipp-jaab> viimati uuendatud 20.07.2017.
- [39] D. Juronen, A. Kuusk, K. Kivirand, A. Rinken, T. Rinken, Immunosensing system for rapid multiplex detection of mastitis-causing pathogens in milk, *Talanta*. 178 (2018) 949–954.
- [40] Fia.I. Inc. Leaders in Flow Injection Technology MicroSI Chromatography on Renewable Column. http://www.flowinjection.com/images/Bead_Injection.pdf viimati alla laetud 16.04.2018.
- [41] Sigma-Aldrich. Normal Serum, Ascites and Cell Supernatant Typical Immunoglobulin Concentration Ranges Normal Sera. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/normalimmunoranges.pdf viimati alla laetud 25.05.2018.
- [42] Terviseamet. Suplusvee profiilid.
<http://www.terviseamet.ee/keskkonnatervis/vesi/suplusvesi/suplusvee-profiilid.html> viimati uuendatud 31.05.2017.

SUMMARY

Construction of *Escherichia coli* biosensor and its implementation for water quality analyses of Anne Canal.

Escherichia coli is an indicator for monitoring faecal pollution in natural swimming water. Since pathogenic serotypes of *E. coli* can cause serious illnesses, such as diarrhea and wound infections in humans, rapid pathogen detection is of crucial importance for issuing timely warnings about potential threats.

The most common microbiological bacterial detection methods like culture and colony counting and qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) methods are time consuming taking up to several hours or even a few days to yield an answer.

Biosensors are a prospective option to decrease the analysis time and at the same time provide high sensitivity, selectivity and working range.

The aim of the present work was to develop an antigen-antibody based biosensor for the detection of *E. coli* cells, determine the sensitivity of the constructed sensor and use it for the analyses of the water quality of Anne Canal – an artificial water body with a beach area in the city centre of Tartu, Estonia.

For the construction of the biosensor, IgG was purified from human blood serum and its Fc fragment was used for the production of bioactivated beads. These beads were used for the attachment of *E. coli* bacteria from water samples using the principles of bead injection analysis. *E. coli* was captured on the beads and detected with anti-*E. coli* antibody labelled with FITC (Fluorescein Isothiocyanate) fluorescence marker. The formed antibody-antigen complex was detected by fluorescence signal at emission wavelength 525 nm.

The linear working range of the biosensor was between 10^1 and 10^7 CFU/ml and its detection limit 10^1 CFU/ml. The estimated time of analysis was 20 min.

The constructed biosensor was used to measure the amount of *E. coli* cells in water samples collected from six different locations ashore the Anne canal. We found that the amount of *E. coli* cells was below the allowed limit (10^3 CFU/100 ml) in five samples and above it in one sample, which was collected from the southern part of Anne Canal.

For further developments, the biosensor technology can be modified to decrease the limit of detection and to enable the identification of different *E.coli* stems. What is more, the biosensor itself can be minimized so that it would be comfortable to bring it along to the water body and carry out the analysis right on site.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ingrid Väling,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Biosensori konstrueerimine *Escherichia coli* määramiseks ja selle kasutamine Tartu Anne kanali veekvaliteedi hindamiseks,

mille juhendajad on Toonika Rinken ja Eerik Jõgi,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **07.06.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **30.05.2018**