

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

KEEMIA INSTITUUT

Ingrid Väling

***Escherichia coli* biosensori kasutamine suplusvee kvaliteedi
hindamiseks**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Toonika Rinke, PhD

Eerik Jõgi, MSc

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja: _____

Tartu 2020

***Escherichia coli* biosensori kasutamine suplusvee kvaliteedi hindamiseks**

Käesolevas magistritöös testiti antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhinevat *Escherichia coli* immunobiosensorit Anne kanali suplusvee kvaliteedi analüüsimisel ning võrreldi biosensoriga saadud tulemuste kokkulangevust mikrobioloogiliste külvide ja qPCR meetoditega. *Escherichia coli* on indikaatorliik, mille üldine sisaldus veeproovides viitab fekaalsele reostusele. Töö käigus leiti olulisuskriteeriumid biosensoriga mõõdetava *E. coli* kontsentratsiooni kasutamiseks vee kvaliteedi hindamisel ning analüüsiti, milline on vees leiduvate kolivormsete rakkude ning osaliselt ja täielikult lagununud *E. coli* rakkude poolt põhjustatud efekt biosensoriga mõõdetavas signaalis. Biosensorite kasutuselevõtt veeproovide analüüsimisel võimaldaks analüüsi läbi viia vaid 20 minutiga, samas kui traditsiooniliste analüüsimeetodite korral võib tulemuste saamiseks kuluda kuni 4 päeva. Biosensortehnoloogia kiirus aitaks oluliselt vähendada riski, et inimesed suplevad fekaalselt reostunud ja potentsiaalselt nakkusohtlikus vees.

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

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

The implementation of *Escherichia coli* biosensor for natural swimming water quality analyses

The aim of the present work was the implementation of an antigen-antibody immunorecognition based *Escherichia coli* biosensor for the assessment of bathing water quality in Anne Canal – an artificial water body in Tartu, Estonia, and to compare the biosensor results with the results of microbiological culturing and quantitative PCR (qPCR). *Escherichia coli* is an indicator species for monitoring faecal pollution in natural swimming water. The effect of coliform bacteria and fully or partly degraded *E. coli* cells to the biosensor signal was found, and the threshold for biosensor results for the evaluation of the quality of water proposed. The implementation of biosensors allows to get results in 20 minutes, whereas the most common current methods (microbiological cultivation and qPCR) can take up to 4 days. Short analysis time is crucial for issuing timely warnings of potential microbiological pollution of bathing water quality.

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

CERCS: T270 Environmental Technology, pollution control

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Suplusvee kvaliteedi iseloomustamiseks kasutatavad parameetrid	7
1.2 <i>Escherichia coli</i> bakteri iseloomustus	7
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> raku ehitus	8
1.3 Tartu Anne kanal	9
1.4 Traditsioonilised meetodid <i>Escherichia coli</i> määramiseks	11
1.4.1 Mikrobioloogiliste külvide meetod	11
1.4.2 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon	11
1.4.3 DNA-mikrokiiptehnoloogia ja isotermaalse DNA amplifikatsiooni meetodid	12
1.4.4 MALDI-TOF massispektromeetria	12
1.4.5 ELISA meetod	13
1.5 Biosensorid <i>E. coli</i> määramiseks	15
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid	18
2.2 Kasutatud seadmed	19
2.3 Metoodikad	19
2.3.1 Anne kanali veeproovide kogumine	19
2.3.2 <i>E. coli</i> mikrobioloogilised analüüsid	20
2.3.3 <i>E. coli</i> kultiveerimine	21
2.3.4 Kolivormsete bakterite kultiveerimine	21
2.3.5 <i>E. coli</i> rakukestade purustamine ja rakumembraanide lüüsimine	21
2.3.6 qPCR analüüsid <i>E. coli</i> määramiseks	22
2.3.7 PCR analüüsid kolivormsete bakterite sekveneerimiseks	23
2.3.8 Graanulite voogisestusanalüüsil põhinev immunobiosensor	23
2.3.9 IgG puhastamine inimese vereseerumist afiinsuskromatograafia abil	24
2.3.10 IgG fragmenteerimine ja Fc fragmendi eraldamine	25
2.3.11 IgG Fc fragmendi sidumine Sephadex geelgraanulitele	25
2.3.12 Mõõtmismetoodika <i>E. coli</i> immunobiosensoriga	26
3 TULEMUSED JA ARUTELU	29

3.1	Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine.....	29
3.2	Biosensori iseloomustamine ja kalibreerimine veeproovide analüüsimiseks	29
3.3	Anne kanali veeproovide analüüsimine	30
3.4	Biosensori, mikrobioloogiliste külvide ja qPCR tulemuste võrdlemine.....	32
3.5	Kolivormsete bakterite mõju biosensori signaalile	34
3.6	Surnud ja lagunenu <i>E. coli</i> rakkude mõju biosensori signaalile	35
KOKKUVÕTE		39
KASUTATUD KIRJANDUS		41
SUMMARY		48
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks		50

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

ALP – aluseline fosfataas (*Alkaline phosphatase*)

BIA - mikrograanulite voogsisestusanalüüs (*Bead Injection Analysis*)

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

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

E. coli - *Escherichia coli*

FITC – fluorestseiniisotiotsüanaat

HRP – mädarõika peroksüdaas (*Horseradish peroxidase*)

IgG - immunoglobuliin G

IsoAmp – DNA isotermaalne amplifikatsiooni meetod (*Isothermal DNA Amplification method*)

LOD – määramispiir (*Limit of detection*)

Lpp – Brauni lipoproteiin (Lpp, BLP: *Braun's lipoprotein*)

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

OMP – välismembraani valk (*Outer Membrane Protein*)

PBS - fosfaatpuhver NaCl-soolaga

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

SISSEJUHATUS

Looduslike vesikeskkondade mikrobioloogilise saastatuse hindamiseks kasutatakse käesoleval ajal põhilise indikaatororganismina *Escherichia coli* (*E. coli*), mille üldise sisalduse kaudu hinnatakse nii joogi- kui ka suplusvee kvaliteeti.

E. coli on püüsoojaste loomade soolestikus elutsev enamasti kahjutu mikroob, mille patogeensed tüved on seevastu tuntud ägedate haigusnähtude (kõhulahtisus, haavainfektsioonid, kuseteede põletikud) tekitajatena.

Vee mikrobioloogilise saastatuse hindamisel kasutatakse *E. coli* arvukuse määramiseks standardina mikrobioloogilist meetodit, mis on aga ajakulukas (sõltuvalt mikroorganismist kulub saastatuse hindamiseks 1-3 päeva). Muud kasutus leidvad meetodid nagu MALDI-TOF massispektromeetria või polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) on küll täpsed, kuid ei võimalda mikroorganismide kiiret kohapealset identifitseerimist ja kvantitseerimist. Üks lahendusi mikroobide kiireks määramiseks on biosensortehnoloogia kasutamine.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on biosensori konstrueerimine *Escherichia coli* määramiseks looduslikus vees ja selle alusel vee mikrobioloogilise saastatuse hindamine Tartu Anne kanali näitel. Biosensoriga saadud tulemusi võrreldakse mikrobioloogiliste külvide ning qPCR meetodite abil saadud tulemustega, et hinnata eri meetoditel saadud tulemuste kokkulangevust. Töös uuritakse ka vees leiduvate kolivormsete bakterirakkude ning osaliselt ja täielikult lagunenuid *E. coli* rakkude poolt põhjustatud efekti biosensori signaalis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Suplusvee kvaliteedi iseloomustamiseks kasutatavad parameetrid

Suplusvee iseloomustamiseks võib kasutada kolme erinevat näitajat: kolivormsete bakterite sisaldus, fekaalsete kolivormsete bakterite sisaldus, mille hulka kuulub ka *E. coli* ja soole enterokokkide (üldjuhul ohutud, inimese ja soojavereliste loomade soolestikus elutsevad fekaalsed streptokokid) sisaldus vees [1]. Kolivormsed bakterid on gram-negatiivsed bakterid, mille hulka kuuluvad teiste hulgas *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* ja *Hafnia* perekonnad [2]. Kehtiv EL regulatsioon ei nõua enam üldist fekaalsete kolivormsete bakterite määramist suplusvees, vaid fekaalsete kolivormsete indikaatorliikide *Escherichia coli* ja/või *Enterococcus sp.* määramist. Kõikides Euroopa Liidu liikmesriikides sh Eestis on suplusvee hindamiseks kehtestatud piirväärtused soole enterokokkide sisalduse ning *E. coli* sisalduse alusel, vastavalt 100 CFU/100 ml (1 CFU/ml) ja 1000 CFU/100 ml (10 CFU/ml). [3]

Kui soole enterokokkide või *E. coli* sisaldus suplusvees ületab piirnормi viie järjestikuse aasta jooksul, loetakse suplusvesi nõuetele mittevastavaks ning Terviseamet kehtestab supluskohale alalise suplemiskeelu või annab soovitusel mitte supelda. Alalise soovitusel mitte supelda võib anda ka varem, kui suplusvee „piisava“ kvaliteedi saavutamine on võimatu või ebaproportsionaalselt kulukas. [4]

1.2 *Escherichia coli* bakteri iseloomustus

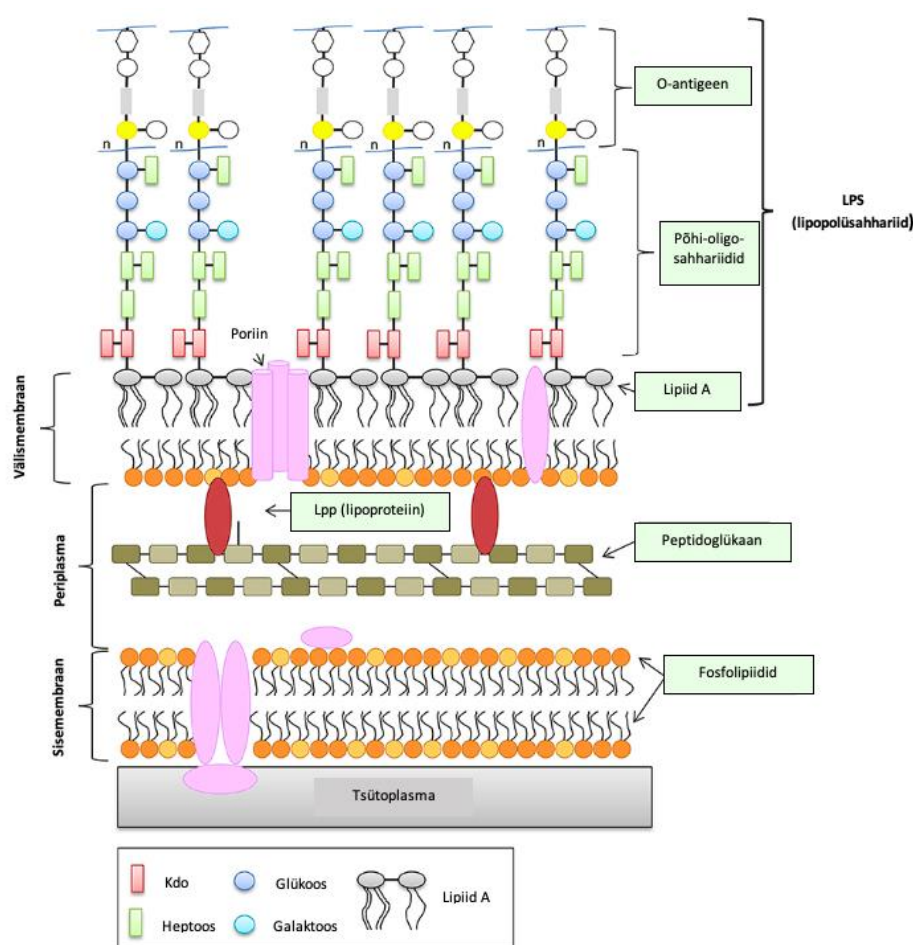
E. coli bakteri avastas saksa lastearst ja bakterioloog Theodore Escherich 1885. aastal [5]. *E. coli* on enterobakterite sugukonda kuuluv liik, mis on imetajate seedetrakti normaalse mikrofloora üks tuntumaid esindajaid. *E. coli* kontsentratsioon jämesooles on 10^7 – 10^8 rakku/soole seina g kohta. [1]

Erinevaid *E. coli* tüvesid on hinnanguliselt 3300 [6], millest suurem osa on kommensaalsed, st nad ei põhjusta infektsioone [7]. Seevastu omavad mõned *E. coli* tüved tänu genoomis või plasmiidides paiknevale geenidele mitmesuguseid erinevaid virulentsusfaktoreid ning võivad põhjustada erinevaid haiguseid (seede-, kuseteede- ja haavainfektsioone, meningiiti jms) [8].

1.2.1 *Escherichia coli* raku ehitus

E. coli on gram-negatiivne oksüdaasnegatiivne pulkbakter, mis on võimeline kasvama nii anaeroobses kui aeroobses keskkonnas, eelistatult 37°C juures. *E. coli* rakk on mõõtmetega $(0,5-0,8) \times (1,0-1,2) \mu\text{m}$ ning 80% *E. coli* tüvedest omavad vibureid või piiliseid, mis tagavad nende liikuvuse. [9]

E. coli rakusein koosneb gram-negatiivsele bakterile iseloomulikult peptidoglükaani kihiga eraldatud sisemisest tsütoplasma membraanist ja valkudest, fosfolipiididest ja lipopolüsahhariididest koosnevast välismembraanist (joonis 1). [10]



Joonis 1. *Escherichia colile* (tüvi K-12) iseloomulik rakuseina ehitus.

E. coli välismembraani valgulisteks komponentideks on Brauni lipoproteiinid ehk Lpp-d (Lpp, BLP: *Braun's lipoprotein*) ja OMP-id ehk välismembraani proteiinid (OMPs: *Outer membrane proteins*) [10]. Lpp-de ülesandeks on peptidoglükaankihi ja välismembraani omavaheline kovalentne sidumine ning OMP-id on kanalid välismembraanis, mille eesmärgiks on võimaldada hüdrofiilsete madalmolekulaarsete ainete (aminohapped, monosahhariidid,

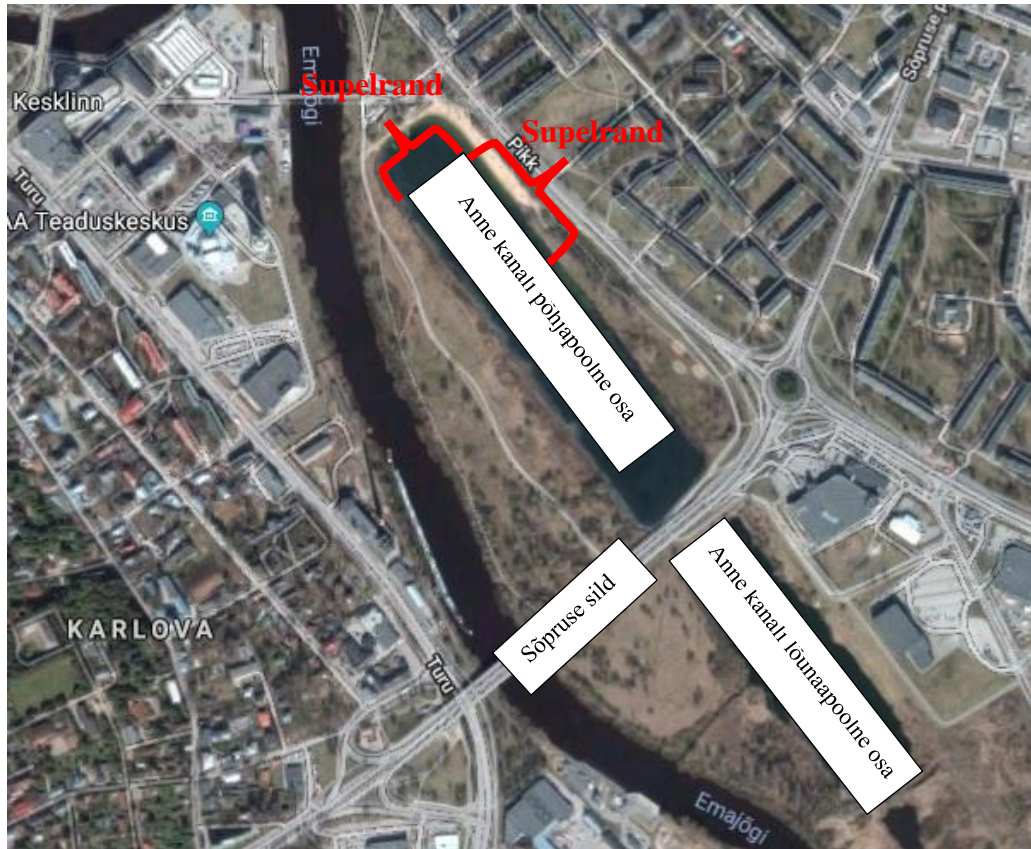
ioonid) difusiooni. OMP kanalid on erineva läbilaskvusega, võimaldades ühe OMP-i kaudu vaid teatud suuruse ja laenguga (katioonid või anioonid) molekulide liikumist [11, 12].

OMP-molekulid ulatuvad rakuseinast välja ning on seetõttu esimeseks kokkupuutepinnaks bakteriraku ja seda ümbritseva keskkonna vahel [13]; need on ka heaks märklauaks *E. coli* rakkude selektiivseks määramiseks. OMP-molekulidele kinnituvad ka nakatunud organismi poolt välja saadetud antikehad, et võidelda kehavõõra organismiga. Üheks olulisemaks *E. coli* OMP-molekuliks, mis kutsub nakatunud organismis esile immuunvastuse, on nõrgalt anioon-selektiivne proteiin A (OmpA: *Outer membrane protein A*), mida leidub universaalselt peaaegu kõigil erinevatel *E. coli* tüvedel [14, 15]. Ühe *E. coli* bakteriraku välismembraanis esineb ligikaudu 1.6×10^5 OmpA molekuli, mis teeb OmpA-st arvukaima välismembraani proteiini ning seetõttu ka hea sihtmärgi *E. coli* raku detekteerimiseks [16, 17]. Lisaks OmpA-le on *E. coli* iseloomulikeks välismembraani proteiinideks ka kation-selektiivsed OmpC ja OmpF, mida esineb bakteriraku välismembraanis ligikaudu 10 korda vähem, vastavalt 2×10^4 ja $\sim 10^4$ molekuli [18, 19].

1.3 Tartu Anne kanal

Anne kanal on Tartu linnas Emajõe vasakul kaldal asuv tehisveekogu pindalaga 9,5 ha ja kaldajoone kogupikkusega 1660 m. Anne kanal ja selle supelrand on Tartu linna üldplaneeringu kohaselt avalikult kasutatav. Suvehooajal on Anne kanali suplusranna päevane külastajate arv 2000-4000 inimest. [20]

Anne kanali põhjapoolses osas asub supelrand kaldajoonega ligikaudu 550 m [21]. Kanali lõunapoolne osa on kasutamata. Põhja- ja lõunapoolset kanaliosa eraldab üle kanali kulgev Sõpruse sild koos selle all asuva täidetud kanali osaga. Anne kanali mõlemad osad, suplusranna asukoht ja Sõpruse sild on kujutatud joonisel 2.



Joonis 2. Anne kanal, supelranna asukoht ja Sõpruse sild satelliitpildil. [22]

Anne kanalit on läbi aegade iseloomustanud probleemne suplusvee kvaliteet, mil *E. coli* sisaldus suplusvees on ületanud piirnormi. 2013. aastal suvel suleti Anne kanali rand suplejatele terveks augustikuuks. Nii *E. coli* kui soole enterokokkide sisaldused ületasid piirmäärasid korduvalt mitmekordselt. Suurimad väärtused olid 2013. aasta 21. augustil, mil *E. coli* näitajaks oli 5670 CFU/100 ml ning soole enterokokkide sisaldus 925 CFU/100 ml [23]. Anne kanali veekvaliteet oli piirmäära nõuetele mittevastav ka 2017. aastal ning see on toodud välja ka Euroopa Liidu 2017. ja 2018. aastate suplusvee kvaliteedi aruannetes „European Bathing Water Quality“ [24, 25]. *E. coli* sisaldus ületas lubatud piirmäära 2017. aasta 17. juulil lausa enam kui kuuekordselt, küündides väärtuseni 6100 CFU/100 ml ning ka soole enterokokkide sisaldus ületas korduvalt piirmäära. [23].

1.4 Traditsioonilised meetodid *Escherichia coli* määramiseks

1.4.1 Mikrobioloogiliste külvide meetod

Kõige vanemaks ja tuntumaks *E. coli* määramise meetodiks on proovide külvamine ja kolooniate loendamine ehk mikrobioloogiliste külvide meetod. Proovid külvatakse spetsiaalsele selektiivsele söötmele, millele eelneb proovi filtreerimine tagamaks väikseimat esinduslikku proovikogust. Selektiivne sööde sisaldab ensüümidele β -D-glükoronidaas ja β -D-galaktosidaas liigispetsiifilist substraati, tagamaks *E. coli* bakterirakkude eristamise teistest kolivormsete bakterite liikidest [26]. Tavapäraselt on mikrobioloogilise külvi suurus 10 μ l, ning sellest tulenevalt määramispiiriks 100 CFU/ml [27].

Kolooniate külvamise ja loendamise meetodi puudusteks on suur ajakulu, mis ulatub 14 või enamagi tunnini ning vajadus analüüside läbiviimiseks spetsiaalses laborikeskkonnas [27]. Lisaks võivad takistavaks asjaoluks olla persistorid ehk uinuvolekus või väga aeglaselt kasvavad bakterikultuuri subpopulatsioonid. Persistorid söötmel välja ei kasva, nii et kolooniate loendamine kirjeldab sel juhul vaid teatud osa *E. coli* tegelikust arvukusest veeproovis [27, 28].

1.4.2 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Teiseks levinud *E. coli* määramise võimaluseks on kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni meetodi (qPCR) kasutamine. qPCR põhineb *E. coli* bakteri geneetilist materjali sisaldava spetsiifilise DNA lõigu järjestuse isolatsioonil, amplifikatsioonil ja kvantiteerimisel. Kvantiteerimiseks mõõdetakse amplifikatsioonitsükli järgselt fluorestsentsignaali intensiivsust. Levinuimateks fluorestsentsignaali genereerimise võimalusteks on interkaleeruva värvaine lisamine proovile või proovi fluorestseeruvaks muutmine kasutades lisaks praimeritele veel fluorestsentsmärgistusega DNA oligomeeri [29]. Erinevalt kolooniate külvamise ja loendamise meetodist, kus määratakse vaid elusaid rakke, sisaldub qPCR tulemustes ka surnud ja "uinuvatest" rakkudest tulenev informatsioon [30].

qPCR viiakse läbi termotsükliks, mis võimaldab püstitada ja hoida isolatsiooni, amplifikatsiooni ja kvantiteerimise toimumiseks vajalikke temperatuure. qPCR meetod eeldab sarnaselt mikrobioloogilistele külvidele proovide eelkontsentreerimist ning sellest tulenevalt on qPCR määramispiiriks 10 CFU/ml [30, 31].

Sarnaselt külvamise ja kolooniate loendamise meetodile, on ka qPCR-meetodi puuduseks suur ajakulu. Fragmendi amplifitseerimiseks koos eelneva DNA eraldamisega

(vähemalt 2 tundi) kulub kokkuvõttes 5-6 tundi. Amplifikatsiooni inhibeerimisel võivad valetulemusi põhjustada proovivõtu keskkonnast pärinevad inhibiitorid (polüsahhariidid, humiinhapped, kaltsiumiioonid jms), aga ka laboris kasutatavad plastikust tarvikud [32].

1.4.3 DNA-mikrokiiptehnoloogia ja isotermaalse DNA amplifikatsiooni meetodid

Lisaks eelnevalt kirjeldatud *E. coli* määramise meetoditele, kasutatakse *E. coli* kvantitatiivseks määramiseks ka DNA-mikrokiiptehnoloogiat (*DNA-microarray technology*) ning isotermaalse DNA amplifikatsiooni (IsoAmp: *Isothermal DNA Amplification*).

DNA-mikrokiiptehnoloogia põhineb tahkele kandjale (enamasti klaas- või silikoonplaat) kinnitatud tuhandetest oligonukleotiidsetest järjestustest, mida hübridiseeritakse komplementaarsete DNA või RNA proovidega. Meetodi määramispiiriks *E. coli* määramisel on ~50 CFU/ml. Meetodi miinuseks on suur ajakulu (24-36 tundi). [33, 34]

IsoAmp meetodi põhimõte on sarnane qPCR-le, põhinedes DNA amplifikatsioonil, kuid kõik protsessid viiakse läbi konstantsel temperatuuril (60-65°C), mistõttu ei ole vajadust termotsükli kasutamiseks. Termotsükli asemel saab IsoAmp läbi viia tavalises vesivannis. Meetodi määramispiiriks *E. coli* määramisel on 25 CFU/ml [35]. Sarnaselt qPCR meetodile, lisandub ka IsoAmp meetodi läbiviimisele eelnev DNA eraldamisele kuluv aeg, mis kokkuvõttes väljendub suures ajakulus (4-5 tundi) [35-37].

Mõlemad meetodid on küll tundlikud ning spetsiifilised, kuid vajavad samuti analüüside läbiviimiseks spetsiaalset laborikeskkonda. Lisaks on vajalikud eelnevad ajakulukad etapid proovide puhastamise tarbeks ning DNA-mikrokiiptehnoloogia puhul on tegemist küllaltki keeruka ja ajakuluka meetodiga [38-40]. Sarnaselt qPCR-meetodile, on ka DNA-mikrokiiptehnoloogia ja isotermaalse DNA amplifikatsiooni meetodite puuduseks valetulemusi põhjustavad inhibiitorid [41].

1.4.4 MALDI-TOF massispektromeetria

E. coli määramisel on kasutust leidnud veel ka poolkvantitatiivne meetod MALDI-TOF massispektromeetria (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight mass spectrometer*) [42].

Massispektromeetria tööpõhimõtteks on osakeste massi ja elektrilaengu suhte mõõtmine. MALDI-TOF massispektromeetria korral seotakse määratavad osakesed energiat absorbeeriva maatriksiga, milleks on tavapäraselt mõni kristalne orgaaniline ühend (nt. 2,5-dihüdrosübensoehape) ning neid ioniseeritakse laserkiire abil. Ioonide määramine toimub

lennuaja analüsaatoriga, mis kasutab elektrivälja, et ioniseeritud osakesi samasuguse potentsiaaliga kiirendada ja möödab aega, mille jooksul ioonid jõuavad detektorini. Meetodi miinuseks on kõrge määramispiir, mis on *E. coli* määramisel 10⁵ CFU/ml. Analüüsi läbiviimise ajakulu on 5 tundi. [43-45]

1.4.5 ELISA meetod

E. coli määramiseks on rakendatud ka immunoäratundmisel põhinevat poolkvantitatiivset meetodit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [46].

ELISA põhineb antigeeni ja antikeha vahelisel vahelisel äratundmisreaktsioonil, kus tahkele kandjale (mikroplaadile) lisatakse antigeeni sisaldav puhverlahus, millest antigeen seondub kandja pinnale. Seejärel lisatakse tahkele kandjale antikeha, mis on konjugeeritud ensüümiga (tavaliselt HRP: *horseradish peroxidase* või ALP: *alkaline phosphatase*) [47]. Antigeeni olemasolul proovis seondub antikeha-ensüümi kompleks antigeeniga. Antigeeni olemasolu detekteerimiseks lisatakse substraati, mis ensüümide katalüüsival toimel toob kaasa värvimuutuse. Mida suuremas kontsentratsioonis on lahuses antigeeni, seda nähtavam on värvimuutus. Kui värvimuutust ei teki, siis lahus antigeeni ei sisalda. Meetodi määramispiiriks *E. coli* määramisel on 20 CFU/ml ning meetodi ajakulu on 7 tundi [48].

Veeproovide analüüsil on siiski aga oluline just *E. coli* täielik kvantitatiivne määramine, mille tõttu tänapäeval on kombineerituna oma laialdase levikuga sobivaimateks meetoditeks ikkagi mikrobioloogiliste külvide meetod ning qPCR.

E. coli määramiseks kasutatavate põhimeetodite olulisemad näitajad on kokkuvõtlikult välja toodud tabelis 1.

Tabel 1. *E. coli* määramiseks kasutatavate meetodite olulisemad näitajad.

Meetod	Määramispiir (CFU/ml)	Analüüsi aeg (h)	Proovi liik	Märkused	Viide
Mikrobioloogilised külvid	1	>14-18	Suplusvesi, bioloogilised vedelikud.	Odav ja lihtne, kuid määramispiiri 1 CFU/ml saavutamiseks vajalik proovide eelkontsentreerimine. Võimalik määrata vaid elusaid rakke.	[27]
qPCR analüüs	10	5-6	Suplusvesi, joogivesi, bioloogilised vedelikud.	Küllaltki keerukas. Võimalik määrata nii elusaid, surnuid kui „uinuvaid“ rakke. Määramispiiri 10 CFU/ml saavutamiseks on vajalik proovide eelkontsentreerimine. Probleemiks inhibiitorid.	[31, 50]
DNA-mikrokiptehnoloogia	~50	24-36	Bioloogilised vedelikud.	Keerukas. Võimalik määrata nii elusaid kui surnuid rakke. Probleemiks inhibiitorid.	[33, 34, 49]
IsoAmp meetod	25	4-5	Suplusvesi, joogivesi, bioloogilised vedelikud.	Küllaltki lihtne ja odav. Võimalik määrata nii elusaid, surnud kui „uinuvaid“ rakke. Probleemiks inhibiitorid.	[35, 36, 50,]
MALDI-TOF massispektromeetria	10 ⁵	5	Suplusvesi, joogivesi, bioloogilised vedelikud.	Küllaltki lihtne. Rakke saab määrata vaid mittekvantitatiivselt. Detekteerimine on probleemne madalate bakterikontsentratsioonide korral.	[42, 43]
ELISA	20	7	Suplusvesi, joogivesi, bioloogilised vedelikud.	Odav ja lihtne. Võimalik määrata elusaid ja surnuid rakke. Rakke saab määrata vaid mittekvantitatiivselt.	[46, 47]

1.5 Biosensorid *E. coli* määramiseks

Biosensorid on analüütilised seadmed, mis on perspektiivseks alternatiiviks laboratoorsetele *E. coli* määramise meetoditele. Biosensorid koosnevad bioäratundvast elemendist (ensüümid, antikehad jms), mis reageerib selektiivselt määratava ühendi või ühendite rühmaga; äratundmisreaktsiooni signaali detekteerivast andurist; ja mõõteandmeid töötlevast üksusest. [51]

Seni väljatöötatud biosensorite tööpõhimõtted on väga erinevad, varieerudes ensüümreaktsioonide metaboliitide detekteerimisest [52, 53] spetsiifiliste membraanvalkude sh. lektiinide detekteerimiseni [54, 55]. Samuti on märkimisväärse erinevusega erinevate biosensorite määramispiirid, varieerudes 8 CFU/ml [55] kuni 600 CFU/ml [54]; ning analüüsiks kuluvad ajad, varieerudes 15 minutist [54] kuni 7 tunnini [56].

Üheks enamlevinud biosensorite tööpõhimõtteks on elektrokeemiline detekteerimine. Elektrokeemilise detekteerimise korral toimub elektroodi (enamasti kullast) pinnal elektronide ülekanne läbi elektrilise kaksikkihi ning sellest reaktsioonist võtab osa määratav analüüt. Analüüdi kontsentratsiooni määramiseks mõõdetakse elektrivoolu või -potentsiaali, kuid nende sensorite selektiivsus on suhteliselt madal. Analüüsiajad ja määramispiirid on elektrokeemilise detekteerimise sensoritel väga varieeruvad, olenevalt sensori spetsiifikast. Faagipõhisel detekteerimisel võimaldab faagide ehk bakteriviiruste proovile lisamine omavahel eraldada ning kontsentreerida *E. coli* rakke, millest tulenevalt on määramispiir madalam (100 CFU/ml), kui klassikalisel elektrokeemilise detekteerimise sensoril (600 CFU/ml). Seevastu on faagipõhise meetodi ajakulu 7 tundi, samas kui klassikalise meetodi analüüsiaeg vaid 15 minutit. [54, 56]

Fluorestsentsil põhinevate biosensorite korral lisatakse proovile fluorestsentsmarkeriga märgistatud äratundev element (antikeha, aptameer), mis proovis sisalduva analüüdiga spetsiifiliselt seondub. Vastava lainepikkusega ergastades annab analüüdi ja fluorestsentsmarkeriga märgistatud äratundva elemendi vahelise kompleksi moodustumine signaali, mida saab tõlgendada analüüdi kontsentratsiooniks proovis. Üheks fluorestsentsil põhinevaks sensoriks on *E. coli* β -D-glükuronidaasi aktiivsuse määramisel põhinev sensor, mille määramispiir on 10 CFU/ml ning analüüsiaeg 20-120 min. [52]

Magnetilise sondiga biosensorite tööpõhimõtteks on analüüdi eraldamine proovist rakendades selleks magnetilisi vastasmõjusid. Bakteriofaag T7-ga konjugeeritud magnetilise

sondi korral eraldatakse bakterirakud veeproovist magnetgraanulitega, mille külge on kinnitatud lüütiline bakteriofaag T7. Bakteriofaagi tegevuse toimel vabaneb bakterirakust kolorimeetriliselt detekteeritav liigspetsiifiline substraat (*E. coli* bakterirakkudel β -D-galaktosidaas). Bakteriofaag T7-ga konjugeeritud magnetilise sondi määramispiir on 10 CFU/ml ja analüüsiaeg 6 tundi. [57]

Mikrobioloogilised kütuseelemendid on keemilist energiat elektrienergiaks muundavad seadmed, mis koosnevad membraaniga eraldatud anoodist ja katoodist ning välisest elektriahelast. Anoodil toimub oksüdatsiooniprotsess (sellest võtavad osa veeproovis sisalduvad elektroaktiivsed mikroorganismid), millel vabanenud elektronid juhitakse välise elektriahela kaudu katoodile, kus toimub reduktsiooniprotsess. Huvipakkuvate bakterirakkude kontsentratsiooni määramiseks lisatakse esmalt anoodile substraate, mis liigspetsiifiliste ensüümidega (*E. coli* puhul β -D-glükuronidaas ja β -D-galaktosidaas) reageerides muudavad bakterirakud elektroaktiivseks. Katoodile juhitud vabanenud elektronide hulk väljendub võimsuses, mida saab tõlgendada bakterirakkude kontsentratsiooniks proovis. β -D-glükuronidaasi ja β -D-galaktosidaasi detekteerimisel põhineva mikrobioloogiline kütuseelemendi määramispiir on 42 CFU/ml ning analüüsiaeg 100 min. [58, 59]

Graanulite voogsisestusanalüüsil põhinev immunobiosensor põhineb antigeen-antikeha vahelisel äratundmissüsteemil. Analüüsi läbiviimisel kasutatakse sobiva antikeha- või selle fragmentidega aktiveeritud mikrograanuleid (*E. coli* korral näiteks IgG Fc fragment), millele seondatakse proovis sisalduvad bakterid. Bakterite kontsentratsiooni määramiseks kasutatakse fluorestsentsmarkeriga märgistatud detekteerivat antikeha. Fluorestsentsi mõõtmise kaudu registreeritakse kompleksi moodustumine, mida saab tõlgendada bakterirakkude kontsentratsiooniks proovis. Graanulite voogsisestusanalüüsil põhineva immunobiosensori määramispiir on eelnevalt kirjeldatud biosensoritega võrreldes madalaim, 8 CFU/ml, ning analüüsiaeg 20 minutit. [60]

Kokkuvõtlik informatsioon *E. coli* määramiseks konstrueeritud biosensorite põhilistest analüütilistest karakteristikutest on toodud tabelis 2.

Tabel 2. *E. coli* määramiseks konstrueeritud biosensorite põhikarakteristikud.

Tööpõhimõte	Analüüsiaeg	Määramispiir (LOD) (CFU/ml)	Viide
Lektiin ConA elektrokeemiline detekteerimine	15 min	600	[54]
Faagipõhine elektrokeemiline detekteerimine	7 tundi	100	[56]
Fluorestsentsipõhine <i>E. coli</i> β -D-glükuronidaasi aktiivsuse määramine	20-120 min	10	[52]
Bakteriofaag T7-ga konjugeeritud magnetiline sond	6 tundi	10	[57]
β -D-glükuronidaasi ja β -D-galaktosidaasi detekteerimisel põhinev mikrobioloogiline kütuseelement	100 min	42	[59]
Graanulite voogsisestusanalüüsil põhinev immunobiosensor	20 min	8	[55]

Biosensortechnoloogia peamine eelis võrreldes traditsiooniliste meetoditega on analüüsi läbiviimise lühike aeg ning analüüsides kohapealse läbiviimise võimalus. Biosensordid võimaldavad kahjulikke baktereid detekteerida vähem kui tunni ajaga ning tagavad seetõttu võimaluse inimeste reaalajas teavitamiseks veekvaliteedi ja võimaliku reostuse kohta.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid

- 1) Naatriumkloriid NaCl (Applichem, 99,9%)
- 2) Naatriumasiid NaN₃ (Amresco, 99,9%)
- 3) Naatriumdodetsüülsulfaat SDS (Amresco, 20%)
- 4) Lüsosüüm BioChemica BC (AppliChem, A3711, 20000 U/mg (ph 6,2))
- 5) Dinaatriumvesinikfosfaat Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich, 99%)
- 6) Naatriumdivesinikfosfaat NaH₂PO₄ (Sigma Aldrich, 99%)
- 7) Glütsiin C₂H₅NO₂ (AppliChem, 99,5%)
- 8) Tris(hüdroksümetüül)aminmetaan C₄H₁₁NO₃ (Scharlau, 99,2%)
- 9) Ammooniumsulfaat (NH₄)₂SO₄ (AppliChem, 99%)
- 10) Papaiin (AppliChem, Lot 1G000215)
- 11) EDTA C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ × 2H₂O (BioTop, 99%)
- 12) L-tsüsteiin C₃H₇NO₂S (AppliChem, 99%)
- 13) 2-jodoatsetamiid C₂H₄INO (AppliChem, 99%)
- 14) Epikloorhüdroiin C₃H₅ClO (Acros Organics, min 99%)
- 15) Etanoolamiin C₂H₇NO (Fluka Chemika, 99%)
- 16) Naatriumkarbonaat Na₂CO₃ 10H₂O (AppliChem, min 99%)
- 17) Naatriumhüdroksiid NaOH (AppliChem, min 99%)
- 18) Vesinikkloriid HCl (Реахим, 35-38%)
- 19) Membraanfilter 0.45 µm Porafil (Maschery-Nagel)
- 20) Coliform chromogenic agar (Biolife Italiana Sr)
- 21) Plate counting agar (PCA) (Oxoid)
- 22) NucleoSpin® Soil Kit (Maschery- Nagel)
- 23) 5× HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus segu (Solis BioDyne)
- 24) GeneJET genomic DNA purification kit (ThermoFisher Scientific)
- 25) HiTrap™ valk A HP kolonn 5 ml (GE Healthcare)
- 26) Dialüüsimembraan Spectra/Por® 6-8 kDa
- 27) Sephadex G50 Medium (GELifesciences)
- 28) FITC-ga märgistatud küüliku polükloonaalne IgG tüüpi anti-*E. coli* antikeha, NB100-64448, 2 mg/ml (Novusbio)
- 29) Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma Aldrich)

30) 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load PCR segu (Solis BioDyne)

2.2 Kasutatud seadmed

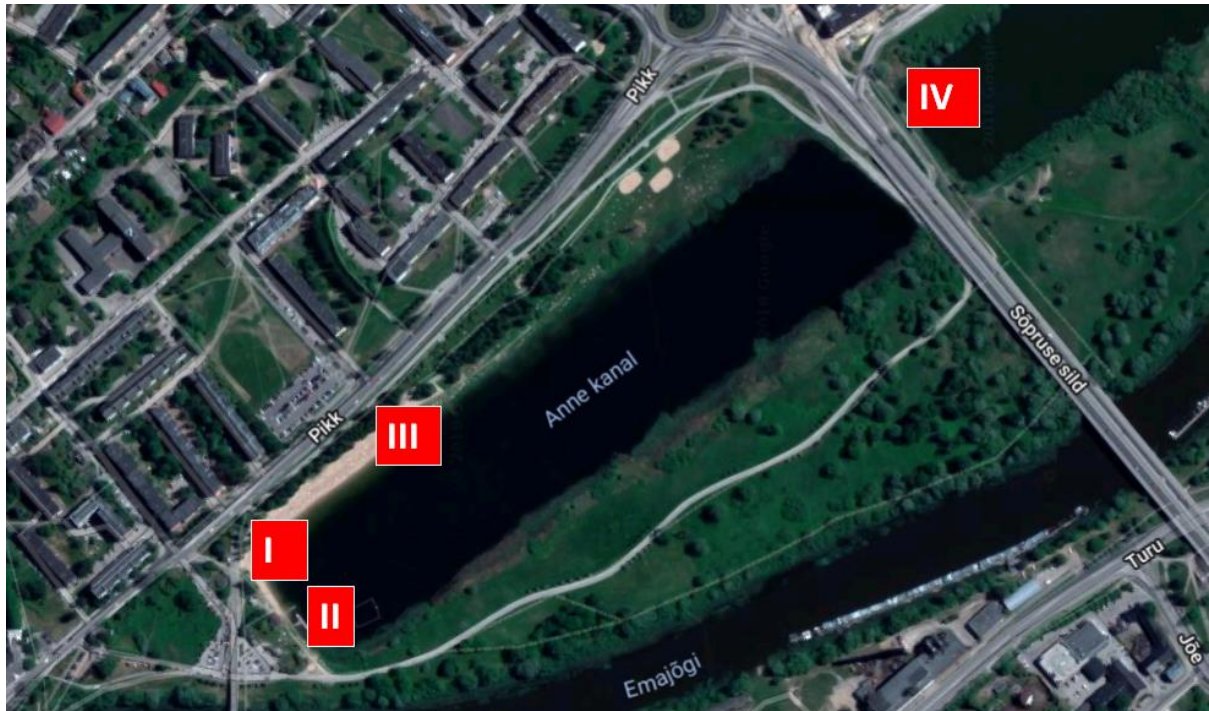
- 1) UV-1800 240V IVDD spektromeeter (Shimadzu)
- 2) qTOWER3 -Real-Time PCR Thermal Cycler (Jena Analytik AG)
- 3) NanoDrop spektrofotomeeter (ThermoFisher Scientific)
- 4) Bandelin Sonoplus UW 2070 (Bandelin Electronics)
- 5) ÄKTApurifier UPC 10 (GE Healthcare)
- 6) pH-meeter (Mettler Toledo), täpsusega 0,02 ühikut
- 7) Vortex segaja (Heidolph)
- 8) Analüütiline kaal XS105 Dual Range (Mettler Toledo) täpsusega 0,01 mg
- 9) Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
- 10) Loksuti MS-3000 (Biosan)
- 11) FIALab 3500B (FIALab)
- 12) Spektrofotomeeter USB2000+ (Ocean Optics)
- 13) Valgusallikas DH-2000+ (Ocean Optics)
- 14) Analüütiline kaal PB 602-S/FACT (Mettler Toledo) täpsusega $\pm 0,01$ g
- 15) GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems).

2.3 Metoodikad

2.3.1 Anne kanali veeproovide kogumine

Veeproovid Anne kanalist mikrobioloogilise saastatuse määramiseks koguti kaks korda kuus, ajavahemikul 5. juuni kuni 13. september 2018. aastal. Proovid koguti steriilsetesse klaaspudelitesse (1 l) neljast erinevast proovivõtukohest kanali kaldaäärsest veest (0,5 - 0,7 m sügavuselt) (joonis 2).

Kolivormsete bakterite kultiveerimiseks koguti Anne kanali kaldaäärsest veest üks veeproov 8. oktoobril 2019. aastal, samuti steriilsesse klaaspudelisse (1 l). Veeproovi kogumise asukohta kolivormsete bakterite kultiveerimiseks iseloomustab joonisel 2 teine kogumispunkt.



Joonis 2. Anne kanali veeproovide kogumise kohad.

Veeproove hoiustati jääl kuni mikrobioloogiliste analüüside läbiviimiseni proovide kogumisega samal päeval. DNA eraldamiseks ja biosensoriga mõõtmiste läbiviimiseks eraldatud proovikogused külmutati ja hoiustati $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

2.3.2 *E. coli* mikrobioloogilised analüüsid

Mikrobioloogilised analüüsid viidi läbi proovide kogumisega samal päeval. *E. coli* arvukuse määramiseks filtreeriti 100 ml suurused veeproovid läbi steriilse membraani ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) ning külvati selektiivsöötmele plaatidele (Coliform chromogenic agar). Külvatud proove inkubeeriti $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures aeroobses keskkonnas ning *E. coli* kolooniad loendati terve plaadi ulatuses 24 tunni möödudes. *E. coli* kolooniaid võimaldab loendamisel eristada nende tumelilla värvus.

Kolivormsete bakterite arvukuse määramiseks külvati selektiivsöötmele (Coliform chromogenic agar) 0,2 ml suurused veeproovid. Külvatud proove inkubeeriti $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures anaeroobses keskkonnas ning kolivormsete bakterite kolooniad loendati 24 tunni möödudes. Kolivormseid baktereid võimaldab kolooniate loendamisel eristada nende roosakas värvus.

2.3.3 *E. coli* kultiveerimine

E. coli (ATCC 25922) rakkude kasvatamiseks külvati bakterikultuurid PCA agari (plate counting agar) söötmetele ja inkubeeriti 24 h aeroobses keskkonnas 37 °C juures. Inkubeerimisaja möödudes korjati kolooniad steriilse tamponiga ja viidi 10 mM fosfaatpuhvrise (PBS, pH 6,50, 0,15 M NaCl). Bakterite arvukuse määramiseks mõõdeti spektromeetriga suspensioonide optilised tihedused ($\lambda=600$ nm). Stabiilsuse tagamiseks lisati suspensioonidele NaN₃ (lõppkontsentratsioon 0,1%). Saadud *E. coli* suspensioone säilitati 4 °C juures.

2.3.4 Kolivormsete bakterite kultiveerimine

Kolivormsete bakterirakkude kasvatamiseks külvati Anne kanalist 2019. aastal kogutud veeproovis sisalduvad bakterikultuurid PCA agari (plate counting agar) söötmetele, jagatuna 16 sektoriks. Bakterikultuuridega agariplaate inkubeeriti 24 h aeroobses keskkonnas 37 °C juures.

Inkubimisaja möödudes korjati söötmel enim üles kasvanud kolooniad steriilse tamponiga ja viidi 10 mM fosfaatpuhvrise (PBS, pH 6,50, 0,15 M NaCl). Söötmel enim üles kasvanud kolivormsete bakterite kolooniaid oli 12 sektoris, seega saadi 12 erinevat kolivormsete bakterite suspensiooni. Kolivormsete bakterite isolaate säilitati 4 °C juures. Bakterite arvukuse määramiseks mõõdeti suspensioonide optilised tihedused spektrotomeetriliselt lainepikkusel 600 nm.

2.3.5 *E. coli* rakukestade purustamine ja rakumembraanide lüüsimine

E. coli rakukestade purustamiseks kasutati ultrahelisondi tsükli intensiivsusega 7/10 ja võimsusega 90%. Rakukestade lõhkumiseks kasutati ultrahelisondi 2 kuni 5 minuti jooksul.

E. coli rakumembraani lüüsimiseks kasutati ka mitte-ioonset detergenti SDS. Selleks lisati SDS-i (Amresco, 20%) 0,1% *E. coli* proovi lõppruumalast.

Lisaks viidi läbi katsed, kus SDS detergendi lisamisele eelnevalt lisati proovidele lüsoosüümi (BioChemica BC, 20000 U/mg), et lagundada rakkude peptidoglükaani kihti. Lüsoosüümi lisati *E. coli* proovidele 1 mg/ml ning proovid jäeti 30 minutiks 37 °C juurde vesivannile inkubeerima. Inkubimisele järgnevalt lisati proovidele 0,1% proovi lõppruumalast SDS-i.

2.3.6 qPCR analüüsid *E. coli* määramiseks

qPCR analüüside läbiviimiseks sulatati toatemperatuuril -18 °C juures hoiustatud veeproovid ning tsentrifuugiti 10 min (4000×g). Bakterirakkudest DNA eraldamiseks kasutati NucleoSpin® DNA eraldamise komplekti (NucleoSpin® Soil Kit). NucleoSpin® DNA eraldamise komplekti tööpõhimõtteks on DNA sidumine kaatroofilise soola juuresolekul SiO₂ – membraaniga kolonni, millele eelneb inhibiitorite eemaldamine bakterirakke sisaldavatest proovidest. Jääkide väljapesu kolonnist viiakse läbi 70% etanooliga ning puhas DNA eraldatakse kolonnist vee või PBS-puhvri abil.

qPCR analüüsi märklauaks oli *E. coli* spetsiifiline geen *ybbW* kahe praimeriga (5'-TGATTGGCAAATCTGGCCG-3' ja 5'-GAAATCGCCCAAATCGCCAT-3') [31]. qPCR reaktsioonisegu koosnes 5 µl 5× HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus segust (Solis BioDyne). Täpsemalt sisaldas segu PCR reaktsioonipuhvrit; deoksünukleotiid trifosfaate (dNTP-d); Taq-polümeraasi ja EvaGreen DNA seondumispigmenti; 1 µl *ybbW* praimereid (igauks 10 pmol); 0,8 µl BSA-d (20 mg/ml, ThermoScientific); 4 µl DNA-d ja 10,2 µl deioniseeritud MilliQ vett.

qPCR analüüsid viidi läbi termotsükli qTOWER3 (qTOWER3 -Real-Time PCR Thermal Cycler). Kõiki reaktsioone viidi läbi kolm korda. qPCR analüüsi protokoll oli järgmine:

1. DNA lõigu inkubeerimine 95 °C juures 15 min;
2. 95 °C juures 15 sek (DNA kaksikahela denatureerimiseks), 68 °C juures 20 sek (praimerite seondumiseks DNA üksikahelatega) ja 72 °C juures 45 sek (DNA sünteesiks) – tsükli korrati 40 korda;
3. Inkubeerimine 72 °C juures 2 min;
4. Amplifitseerimiskõvera analüüs.

Standardina kasutati 24h 37 °C juures inkubeeritud PCA agarile külvatud (plate counting agar) *E. coli* (ATCC 25922) bakterikultuuridest eraldatud genoomset DNA-d. *E. coli* rakkude eraldamiseks kasutati GeneJET puhastuskomplekti (GeneJET genomic DNA purification kit). GeneJET puhastuskomplekti tööpõhimõtteks on DNA sidumine kaatroofilise soola juuresolekul SiO₂ – membraaniga kolonni, jääkide väljapesu kolonnist 70% etanooliga ning puhta DNA eraldamine vee või PBS-puhvri abil.

Eraldatud *E. coli* genoomse DNA kontsentratsioon määrati NanoDrop spektrofotomeetrial (ThermoFisher Scientific) ($\lambda=260$ nm). Mõõdetud kontsentratsiooni abil arvutati eraldatud

gDNA koopiaarv ning qPCR analüüsil kasutati standardina PBS-puhvrise valmistatud lahuseid kontsentratsiooniga 10 – 10⁵ *E. coli* DNA genoomi/μl.

2.3.7 PCR analüüsid kolivormsete bakterite sekveneerimiseks

Kolivormsete bakterite isolaatide liigi määramiseks PCR-meetodil kasutati 16S rDNA amplifikatsiooni. 16S rDNA on bakteriaalse ribosoomi väiksema subühiku geen, mille järjestusi kasutatakse mikroorganismide tuvastamisel ja detekteerimisel nende osaliselt konserveerunud ning samas polümorfse järjestuse tõttu.

Esmalt kuumutati 4 °C juures hoiustatud kolivormsete bakterite suspensioone 10 minutit temperatuuril 96°C, et bakterite DNA vabaneks lahusesse ning siis tsentrifuugiti suspensioone 2 min (10000×g). Analüüside märklauaks olid praimerid 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ja 1525r (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') [60]. PCR reaktsioonisegu koosnes 5 μl 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load PCR segust [sisaldas 10 × Taq-puhvrit (NH₄)₂SO₄-ga; MgCl₂ (25 mM); 0,5 μl deoksünukleotiid trifosfaate (dNTP-d), Solis BioDyne], 0,5 μl praimeritest 27f ja 1525r (kumbki 20 pmol), 17 μl deioniseeritud MilliQ veest ja 2 μl kolivormsete bakterite DNA-d sisaldavast suspensioonist.

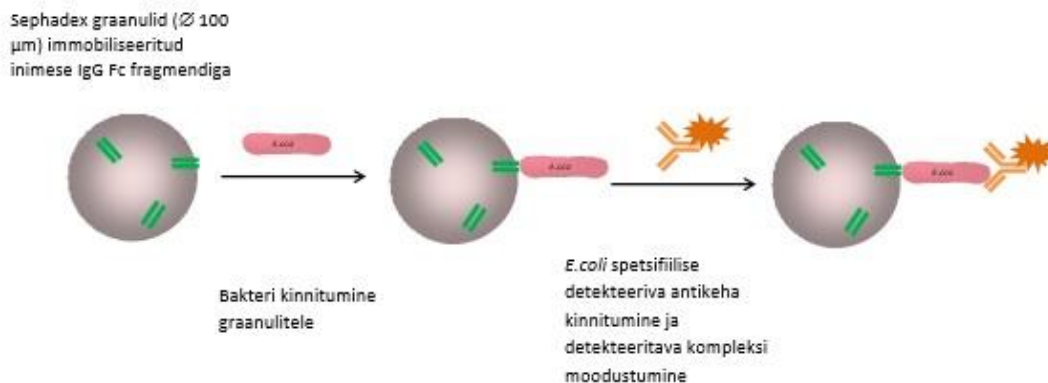
PCR analüüsid viidi läbi termotsükli GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Kõiki reaktsioone viidi läbi kolm korda. PCR analüüsi protokoll oli järgmine:

5. DNA denatureerimine 95 °C juures 2 min;
6. 95°C juures 30 sek (DNA kaksikahela denatureerimiseks), 55 °C juures 30 sek (praimerite seondumiseks DNA üksikahelatega) ja 72 °C juures 60 sek (DNA sünteesiks) – tsükli korrati 30 korda;
7. Inkubeerimine 72 °C juures 5 min;

Amplifitseeritud kolivormsete bakterite sekveneerimise teostas Eesti Biokeskuse Tuumiklabor. Sekveneerimisel saadud 16S rDNA järjestuste järgi otsiti vastavad bakterite liigid või perekonnad RDP andmebaasist [61].

2.3.8 Graanulite voogsisestusanalüüsil põhinev immunobiosensor

Käesolevas töös konstrueeritud immunobiosensor Anne kanali veeproovide analüüsimiseks põhineb antigeen-antikeha vahelisel bioäratundmissüsteemil, mis on integreeritud graanulite voogsisestusanalüüsi platvormiga. Biosensori põhimõtteline tööskeem *E. coli* määramiseks on esitatud joonisel 3.



Joonis 3. *E. coli* määramiseks konstrueeritud graanulite voogsisestusanalüüsil põhineva immunobiosensori tööskeem. [22]

E. coli määramiseks seotakse esmalt veeproovis leiduvad *E. coli* bakterid inimese IgG Fc fragmendiga aktiveeritud mikrograanulitele. IgG Fc fragment seondub *E. coli* välismembraanil leiduva OmpA valguga. Kolonnile mitteseondunud materjal (sh proovi maatriks) eemaldatakse ning seondunud bakterite määramiseks kasutatakse fluorestsentsmarkeriga märgistatud spetsiifilist detekteerivat antikeha, mille fluorestsentsi mõõtmise kaudu registreeritakse kompleksi moodustumine kolonnile seondunud *E. coli* bakteritega. *E. coli* bakteri määramiseks kasutati amiinreaktiivse värvainega FITC (fluorestseiniisotiotsüanaat) märgistatud anti-*E. coli* antikeha. FITC markeraine ergastamine toimus ergastamismaksimumi lainepikkusel 495 nm ja emissiooni mõõdeti emissioonimaksimumi lainepikkusel 525 nm.

2.3.9 IgG puhastamine inimese vereseerumist afiinsuskromatograafia abil

Inimese IgG tüüpi antikehad eraldati Tartu Ülikooli Kliinikumi Verekeskusest saadud tervete inimeste vereseerumist. Puhastamiseks kasutati HiTrap valk A HP kolonni (5 ml, sidumisvõimsusega 20 mg inimese IgG/ml kohta). Vereseerumit hoiti puhastamiseni temperatuuril -18 °C ning enne antikehade puhastamist sulatati 4 °C juures. Esmalt tsentrifugeeriti vereseerumit võimalike valguagregaatide eraldamiseks 10 min (10 000×g). Antikehade vereseerumist eraldamisel toimiti vastavalt järgnevale afiinsuskromatograafia eeskirjale:

- 1) Valk A kolonni voolutati 25 ml seondumispuhvriga (10 mM Na₂HPO₄ + 0,15 M NaCl, pH=7,2) voolukiirusel 3,0 ml/min (maksimaalne rõhk 0,15 MPa);
- 2) Seerumi proov (4 ml) sisestati kolonni voolukiirusel;

- 3) kolonni mitteseondunud valgud pesti välja 50 ml seondumispuhvri abil voolukiirusel 3,0 ml/min (maksimaalne rõhk 0,15 MPa);
- 4) elueerimispuhvri (100 mM glütsiin/HCl, pH=2,7) abil voolutati seondunud antikehad kolonnist välja. Kogutud fraktsioonid (1 ml) neutraliseeriti neutraliseerimispuhvri (0,5 M Tris, pH=9,0) kohese lisamisega;
- 5) kolonn pesti ning tasakaalustati 30 ml seondumispuhvriga voolukiirusel 3,0 ml/min (maksimaalne rõhk 0,15 MPa).

IgG tüüpi antikehade kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 280 nm. Arvesse võeti IgG neeldumiskoeffitsienti 1,37 (1 mg/ml lahuse korral).

2.3.10 IgG fragmenteerimine ja Fc fragменти eraldamine

IgG-st Fc fragmenti eraldamiseks dialüüsi esmalt IgG lahuse (dialüüsimembraan Spectra/Por® 6-8 kDa) PBS puhvril 4 °C juures 24 tundi pidevalt segades. IgG fragmenteerimiseks inkubeeriti proovi papaiini PBS-lahuses (1 mM EDTA-d, 10 mM L-tsüsteiini PBS-is) 37 °C juures 24 tundi. Proovi inkubeeriti papaiini lahuses (lähtelahus 10 mg/ml) ruumalalise suhtega 1:10 (papaiin:antikeha). Inkubeerimise järgselt lisati proovile joodatsetamiidi lõppkontsentratsioonini 30 mM ning inkubeeriti veelkord 37 °C juures 15 min. Proovi tseentrifuugiti 1 min (2450×g).

IgG Fc fragmenti eraldamiseks kasutati taaskord afiinsuskromatograafiat (valk A kolonn, sama eeskirja järgi nagu eelnevalt kirjeldatud IgG puhastamisel inimese vereseerumist). Eraldatud Fc fragmenti kontsentratsioon kogutud fraktsioonis määrati spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 280 nm.

2.3.11 IgG Fc fragmenti sidumine Sephadex geelgraanulitele

Sephadex geeli aktiveerimiseks immobiliseeriti Sephadex G50 Medium graanulitele inimese IgG Fc fragment. Fc fragmendiga saavad seonduda *E. coli* membraanil olevad OmpA molekulid.

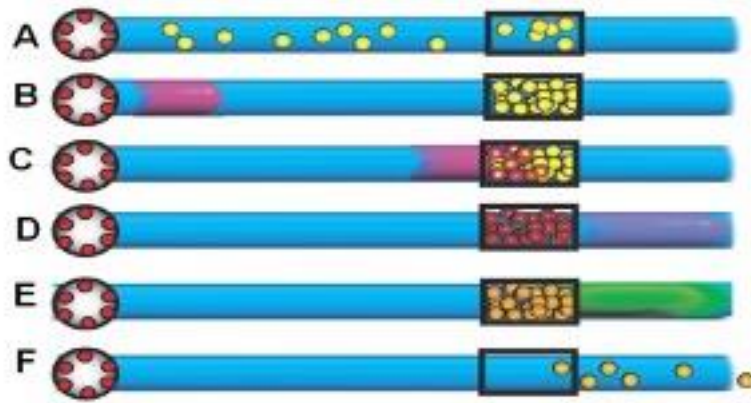
47,32 milligrammile Sephadex G50 Medium geelile lisati 1 ml MilliQ vett (ülipuhastatud vesi eritakistusega 18,2 MΩ·cm) ning jäeti 24 tunniks 4 °C juurde punduma. Samaaegselt asetati puhastatud IgG Fc fragment PBS-lahusesse (10 mM, pH=7,2) 24-tunniks 4 °C juurde dialüüsi. Pundunud geelile lisati katalüsaatorina 0,4 ml NaOH (0,4 M) lahust. Seejärel lisati Sephadex geeli aktiveerimiseks 0,1 ml 5% epikloorhüdriini lahust ning segu asetati 3 tunniks toatemperatuuril loksutile. Geeli tseentrifuugiti 5 minutit (2450×g), pesti kaks korda 685 µl

destilleeritud veega ning üks kord 685 µl Na₂CO₃ puhvriga (0,5 M, pH=9,50). PBS-lahuses dialüüsunud IgG Fc fragment asetati puhverlahuse vahetamiseks Na₂CO₃ puhvrisesse ning jäeti 4 °C juurde 3 tunniks dialüüsi. Seejärel lisati 684,2 µl dialüüsunud IgG Fc fragmendi lahust aktiveeritud geelile ning asetati 24 tunniks 4 °C juurde loksutile. Järgnevalt tsentrifugeeriti seondunud IgG Fc fragmendiga Sephadex graanuleid 5 minutit (2450×g) ning pesti üks kord 685 µl Na₂CO₃ (0,5 M, pH=9,50) lahusega. Geeli pinnal olevate hüdroksüülrühmade inaktiveerimiseks lisati geelile 684,2 µl etanoolamiini lahust Na₂CO₃ lahuses (425 µl etanoolamiini 5 ml-s 0,5 M Na₂CO₃ puhvrises, pH=9,50) ning jäeti 2 tunniks 4 °C juurde loksutile. IgG Fc fragmendiga geeli pesti üks kord 685 µl Milli-Q veega ja kuus korda 685 µl PBS-puhvriga. Geeli hoiustamiseks lisati geelile 685 µl PBS-puhvrit ning geeli hoiustati edaspidi 4°C juures.

IgG Fc fragmentide seondumist geeli graanulitele kontrolliti Coomassie Brilliant Blue G-250 abil. Valgu kinnitumist geelile kinnitab geeli värvumine siniseks.

2.3.12 Mõõtmismetoodika *E. coli* määramiseks immunobiosensoriga

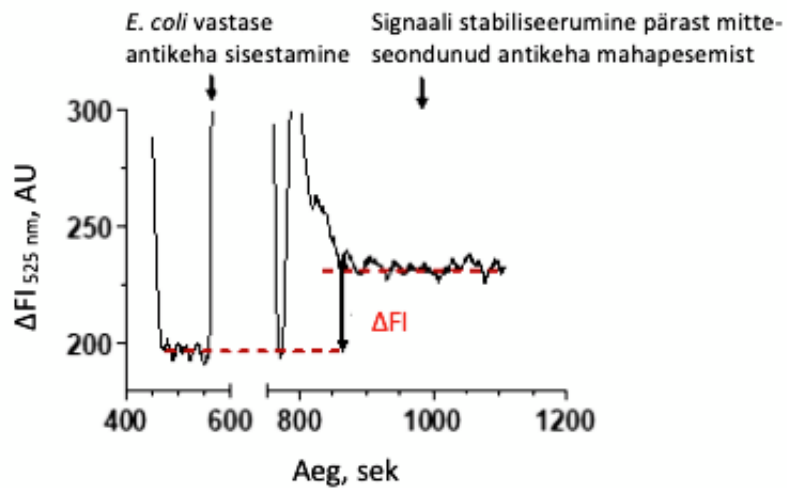
E. coli immunobiosensoris kasutati mõõtmiste läbiviimiseks graanulite voogsisestusanalüüsi BIA (Bead Injection Analysis) platvormi. BIA tööpõhimõtteks on ühekordse analüüti siduva mikrokoloni moodustamine mikrograanulite voolukanalise sisestamise teel. Mikrograanulite külge on eelnevalt seotud funktsionaalsed rühmad, millega saab seonduda proovis sisalduv analüüsitav komponent. Koloni voolutatakse peale analüüdi seondumist proovi maatriksi ja mitteseondunud analüüdi eemaldamiseks ning seejärel lisatakse fluorestsentsmarkeriga konjugeeritud detekteeriv komponent, mis moodustab detekteeritava kompleksi seondunud analüüdiga. Mitteseondunud detekteeriv komponent eemaldatakse süsteemist taaskord voolutamise teel. Analüüdiga moodustunud kompleksi detekteerimine toimub fluoromeetriliselt. BIA süsteemi töö põhimõtteline skeem on kujutatud joonisel 4.



Joonis 4. Mikrograanulite voogsisestusanalüüsi (BIA) töö põhimõtteline skeem [62]. A: mikrograanulite sisestamine kolonni moodustamiseks; B: analüüti sisaldava proovi sisestamine; C: analüüdi seondumine mikrograanulitele; D: proovimaatriksi eemaldamine; E: analüüdi detekteerimine fluorestsentsmarkeriga antikeha abil; F: süsteemi regenereerimine.

Nii *E. coli* kui kolivormsete bakterite määramiseks sisestati mõõterakku 20 µl IgG Fc fragmendi abil aktiveeritud geeli graanuleid kiirusega 1 µl/sek. Mikrograanulite transport mõõterakku tagati 30 µl PBS-puhvri (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) lisamisega kiirusel 2 µl/sek. 150 µl *E. coli* või kolivormsete bakterite lahust sisestati süsteemi kiirusega 1 µl/sek. Bakterite inkubeerimise ajaks kolonnile seondumisel oli 180 sekundit. Mitteseondunud bakterirakkude eemaldamiseks mõõterakust pesti mõõterakku 150 µl PBS-puhvriga (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) kiirusel 2 µl/sek. Mõõterakku sisestati 30 µl FITC-ga märgistatud *E. coli* antikeha kiirusega 1 µl/sek. Märgistatud 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 µl/sek.

Nii *E. coli* kui kolivormsete bakterite sisaldusele vastavate kontsentratsioonide leidmiseks leiti iga mõõtmise kohta väärtus ΔFI , mis iseloomustab fluorestsentsi intensiivsuse erinevust stabiliseerunud signaali keskmiste intensiivsuste (leitud 50 ühesekundiliste vahedega üksikväärtuste keskmistamisel) vahel enne ja pärast detekteeriva antikeha proovile lisamist. Fluorestsentsi intensiivsust süsteemis mõõdeti perpendikulaarselt ergastuseks kasutatava valguskiirega. Näide immunobiosensori signaali intensiivsuse muutustest mõõtmise jooksul on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Näide immunobiosensori signaali intensiivsuse muutustest mõõtmise jooksul. Analüüs viidi läbi PBS-puhvril (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) *E. coli* kontsentratsioonil $4,95 \times 10^8$ CFU/ml.

Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril ning igal bakterisuspensiooni kontsentratsioonil viidi läbi 3 - 5 kordumõõtmist.

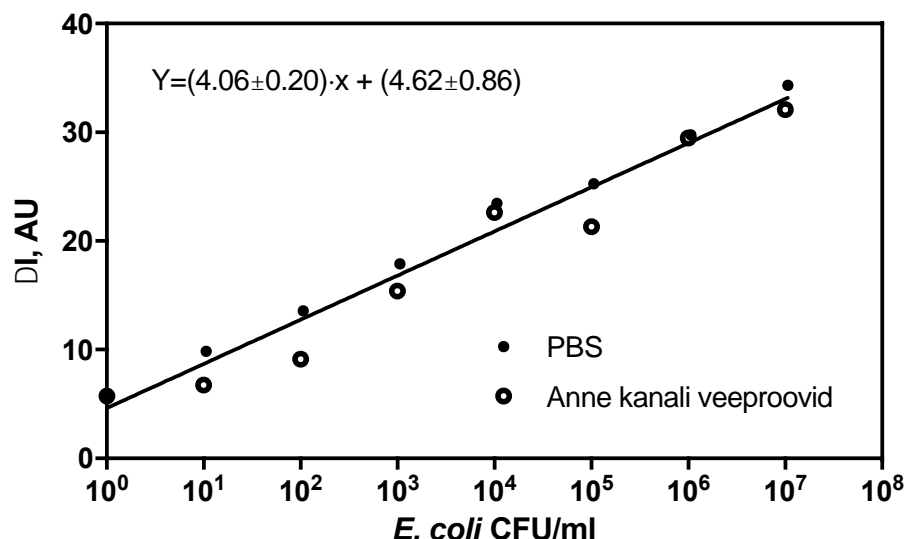
3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine

E. coli sidumiseks proovidest kasutati mikrograanuleid, millele oli immobiliseeritud inimese IgG Fc fragment. IgG Fc fragmendi eraldamiseks ja puhastamiseks inimese vere seerumist kasutati afiinsukromatograafiat, mille abil saadi IgG Fc fragmendi lahuse kontsentratsiooniga 6,95 mg/ml, mis oli piisav bioaktiveeritud graanulite valmistamiseks. Valgu seondumist graanulitele hinnati nii kvalitatiivselt Coomassie Brilliant Blue G-250 abil kui ka kvantitatiivselt, määrates seondumata Fc fragmendi kontsentratsiooni lahuses pärast graanulite inkubeerimist spektrofotomeetriselt lainepikkusel 260 nm. Immobiliseerimisel seondus graanulitele keskmiselt 63% lahuses olnud inimese IgG Fc fragmendist. IgG Fc fragmendi kontsentratsioon graanulitel oli 0,09 mg 1 mg graanulite kohta kuivkaalus, mis on piisav bakterite määramiseks kontsentratsioonini 10^{10} CFU/ml (avaldamata andmed).

3.2 Biosensori iseloomustamine ja kalibreerimine veeproovide analüüsimiseks

E. coli biosensori tundlikkuse ja tööpiirkonna iseloomustamiseks ning selle kalibreerimiseks mõõdeti biosensori signaali sõltuvust *E. coli* kontsentratsioonist nii PBS-puhvril kui ka 2018. aasta augustikuus kogutud Anne kanali veeproovides (joonis 6).



Joonis 6. Biosensori signaali ühine sõltuvus *E. coli* kontsentratsioonist PBS-puhvril (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) ja Anne kanali 2018. aasta augustikuu veeproovides poollogaritmilises

teljestikus. Detekteerimine toimus anti-*E.coli* antikehaga konjugeeritud FITC-markeraine emissioonimaksimumi lainepikkusel 525 nm.

Eeldusel, et potentsiaalselt mõõtmistulemusi mõjutava planktoni hulk on suplusvees suurim suvehooaja lõpus, kasutati loodusliku vee maatriksiefekti hindamiseks augustikuus kogutud Anne kanali veeproove. *E. coli* sisaldusi PBS-puhvris ning Anne kanali veeproovides iseloomustavate kalibreerimisgraafikute tõuse võrreldes selgus, et *E. coli* kontsentratsioonidel $10_1 - 10_7$ CFU/ml ei olnud tõusude vahel olulist erinevust ($P < 0,005$) ning ka kalibreerimisgraafikute alusel arvatud taustasignaali langesid kokku. Seega saab järeldada, et Anne kanali veeproovid ei oma olulist maatriksiefekti ning seda ei ole biosensoriga läbiviidavate mõõtmiste puhul vaja eraldi arvestada. Saadud biosensori kalibreerimisgraafikud olid poollogaritmilises skaalas lineaarsed *E. coli* kontsentratsioonivahemikus $10_1 - 10_7$ CFU/ml, mida võib lugeda antud biosensori tööpiirkonnaks. Mõõtesüsteemist tuleneva taustasignaali leidmiseks mõõdeti eksperimentaalselt biosensori signaal puhtas PBS-puhvris, kuhu ei olnud *E. coli* lisatud ning saadud väärtuseks oli $3,7 \pm 1,2$ AU. Sarnane taustasignaali väärtus saadi ka kalibreerimisgraafikult arvatuna, milleks oli $4,62 \pm 0,86$ AU. Kalibreerimisgraafiku tõus, mis iseloomustab biosensori tundlikkust, oli tööpiirkonnas $4,06 \pm 0,20$ AU/log (CFU/ml).

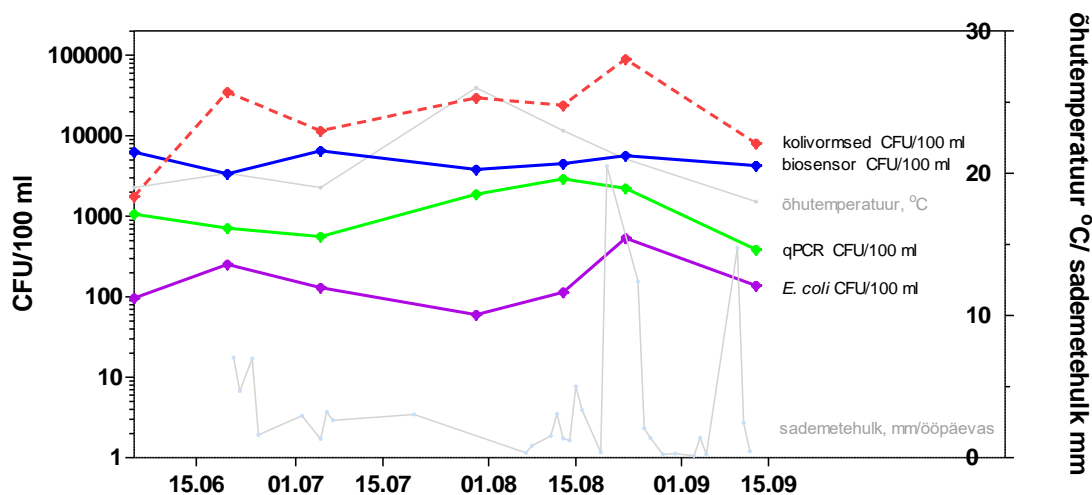
E. coli määramispiir, mis vastab bakteri kontsentratsioonile, mille põhjustatud signaal ületab taustasignaali vähemalt 3 standardhälbe võrra, oli < 10 CFU/ml PBS-puhvris ning < 30 CFU/ml Anne kanali veeproovides. *E. coli* kõrgem määramispiir veeproovides on põhjustatud kõrgematest standardhälvete väärtustest, mis võivad olla põhjustatud suuremast valguse hajumisest vees oleva hõljumi tõttu.

E. coli biosensori selektiivsus on eeldatavalt suhteliselt kõrge, sest anti-*E. coli* antikeha on *E. coli* spetsiifiline ning tootja andmetel ei reageeri teiste Enterobacteriaceae perekonda kuuluvate liikidega ega ka *Streptococcus* liikidega või *Staphylococcus aureusega*. [63, 64] Samas leiti, et kasutatud polükloonaalne anti- *E. coli* antikeha omas afiinsust kolivormsete mikroorganismide suhtes (ptk 3.6).

3.3 Anne kanali veeproovide analüüsimine

E. coli määramine Anne kanali veeproovides, mis olid kogutud ajavahemikul 5. juuni kuni 13. september 2018. aastal, teostati vastavalt eelnevalt kirjeldatud mõõtmismetoodikatele.

Biosensori kalibreerimisgraafiku alusel leiti *E. coli* sisaldus (CFU/ml) iga veeproovi keskmise signaali väärtuse alusel (iga veeproovi kohta tehti 3-5 kordsmõõtmist). Biosensoriga saadud *E. coli* sisalduse tulemusi võrreldi mikrobioloogiste külvide ja qPCR meetoditega saadud tulemustega. Lisaks määrati mikrobioloogiliste külvidega ka kolivormsete bakterite sisaldus veeproovides. Saadud tulemusi iseloomustav graafik koos vastava õhutemperatuuri ja sademete hulga on kujutatud joonisel 7.



Joonis 7. *E. coli* arvukus Anne kanali suplusvees 2018. aasta suvel, mõõdetuna mikrobioloogiliste külvide, qPCR-i ja biosensori meetoditega (kujutatud vastavalt lilla, rohelse ja sinise joonega). Kolivormsete bakterite koguarvukus on kujutatud punase katkendliku joonega ning meteoroloogiline info hallide joontega.

2018. aasta suvi, mil Anne kanali veeproovid koguti, oli väga soe ja kuiv. Keskmiseks õhutemperatuuriks Tartus oli 17,8 °C (tavapäraselt 16 °C) ning sademete hulgaks 149 mm (tavapäraselt 224 mm) [65]. Ilmastikuolud olid bakterite elutegevuseks väga soodsad ning seda iseloomustab ka suhteliselt kõrge *E. coli* kontsentratsioon Anne kanali veeproovides. Mikrobioloogiste külvide ning biosensoriga mõõdetud tulemustest ilmnes, et *E. coli* ja kolivormsete bakterite arvukus oli suurim augustikuu kolmandal nädalal, kui mikrobioloogiliste külvidega saadud *E. coli* kontsentratsiooniks oli > 500 CFU/100 ml ning kolivormsete bakterite kontsentratsiooniks oli ligikaudu 10⁵ CFU/100 ml. Biosensoriga mõõdetud *E. coli* vastavaks kontsentratsiooniks oli > 5000 CFU/100 ml (joonis 7). qPCR meetodiga saadud tulemused näitasid seevastu *E. coli* suurimat kontsentratsiooni ligikaudu kaks nädalat varem, mil *E. coli* sisalduseks Anne kanali vees selle analüüsi põhjal oli 3000 CFU/100 ml.

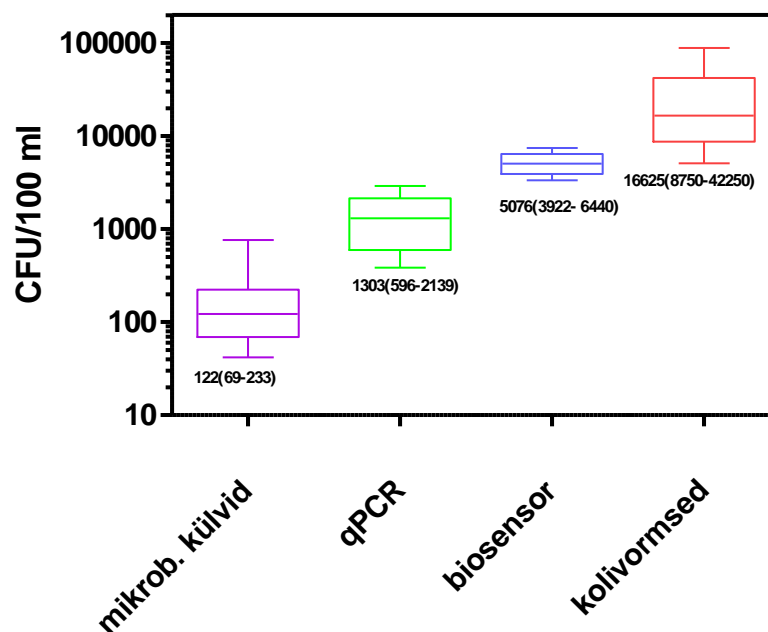
Biosensoriga läbiviidud analüüside tulemused olid dünaamikalt sarnased mikrobioloogiliste külvide meetodi tulemustele, erinedes vaid juuni esimeses pooles, kui keskmised õhutemperatuurid olid madalamad. Juuni esimeses pooles olid biosensoriga mõõdetud tulemused sarnase langustrendiga qPCR meetodiga mõõdetud tulemustele, seevastu mikrobioloogilised külvid näitasid nii *E. coli* kui kolivormsete bakterite kontsentratsiooni tõusu. qPCR ja mikrobioloogiliste külvide meetoditega saadud bakterisisaldusi iseloomustavad trendid erinesid omavahel ka juulis, kui qPCR-i tulemused näitasid *E. coli* arvukuse tõusu ning mikrobioloogiliste külvide tulemused samaaegselt *E. coli* arvukuse langust. Septembris, kui keskmine õhutemperatuur järsult langes, langes ka elusate bakterite arv Anne kanali vees, mida iseloomustavad nii mikrobioloogiliste külvide kui ka qPCR meetodite langevad trendid *E. coli* ja kolivormsete bakterite arvukuse iseloomustamisel. Biosensoriga mõõdetud *E. coli* kontsentratsiooni samaaegne väiksem langus iseloomustab tõenäoliselt *E. coli* raku välismembraani valkude aeglasemat degradatsiooni võrreldes elusate rakkude ja geneetilise materjali (DNA) hulga vähenemisega.

Kokkuvõtlikult olid biosensoriga mõõdetud tulemused märgatavalt kõrgemad mikrobioloogiliste külvide või qPCR meetoditega saadud *E. coli* sisalduse tulemustest, kuid madalamad kolivormsete bakterite sisaldust iseloomustavatest tulemustest. Erinevatel põhimõtetel baseeruvate meetodite signaalide dünaamika erinevused on seletatavad elusate ja surnud rakkude suhte osakaalu muutumisega veeproovides.

3.4 Biosensori, mikrobioloogiliste külvide ja qPCR tulemuste võrdlemine

Anne kanali veeproovide analüüsimiseks kasutatud kolm meetodit, mikrobioloogilised külvid, qPCR ja *E. coli* biosensor, põhinevad kõik erinevatel määramispõhimõtetel. Mikrobioloogiliste külvide meetod määrab selektiivsöötmel välja kasvanud bakterikolooniate arvukust (hõlmab vaid elusaid rakke), qPCR meetod kvantiteerib bakterirakud vastavalt proovides sisalduva genoomse DNA hulgale (hõlmab nii elusaid, surnuid kui „uinunud“ rakke) ning biosensor mõõdab spetsiifiliste membraanvalkude kogust proovis (hõlmab nii elusaid, surnuid kui „uinunud“ rakke). Igal meetodil on oma eelised ja puudused. Mikrobioloogiliste külvidega saadud tulemused sõltuvad selektiivsöötmel üles kasvavate rakkude elujõulisusest (persistorid söötmel välja ei kasva), qPCR meetodil võivad valetulemusi põhjustada proovides sisalduvad inhibiitorid (nt. humiinained [28]) ning biosensori membraanvalkude arvukust registreeriva signaali tugevust võivad vähendada erinevad polüsahhariidkihid raku pinnal, mis varjavad deketeeriva antikeha eest detekteeritava antigeeni epitoobid.

Kolme kirjeldatud meetodiga saadud tulemuste võrdlemiseks kasutati *E. coli* arvukuse mediaanväärtusi (joonis 8).



Joonis 8. Anne kanali suplusvees (suvi 2018) sisalduva erinevate mõõtmismeetoditega määratud *E. coli* ja kolivormsete bakterite arvukuse mediaanväärtused. Alumised ja ülemised kvartiilid on esitatud sulgudes.

Ootuspäraselt olid madalaima mediaanväärtusega, 122 (69-233) CFU/100 ml, mikrobioloogiliste külvide tulemused, mis on suuresti alla Eesti ja Euroopa Liidu regulatsioonidega lubatud *E. coli* piirväärtuse suplusvees (1000 CFU/100 ml) [3]. qPCR meetodi abil saadud tulemuste mediaanväärtuseks oli 1303 (596-2139) CFU/100 ml, olles seega mikrobioloogiliste külvide mediaanväärtusest veidi üle 10 korda kõrgem. Biosensori tulemuste mediaanväärtus, 5076 (3922-6440) CFU/100 ml, oli omakorda orienteeruvalt 4 korda kõrgem qPCR-i mediaanväärtusest.

Biosensori tulemuste kõrge mediaanväärtus võib viidata olukorrale, kus biosensori signaalis sisalduvad lisaks *E. colile* ka teiste bakterite tulemused, samuti see, et sensor registreerib lisaks elusatele, surnud ja „uinunud“ rakkudele ka lagunened rakkude membraanifragmentidel asetsevad membraanivalke.

Kolme meetodi mediaanväärtuste võrdlemise tulemusena selgus, et biosensoriga registreeritud kõrgeim *E. coli* kontsentratsioon veeproovis on orienteeruvalt 40 korda kõrgem mikrobioloogiliste külvidega registreeritud kõrgeimast *E. coli* kontsentratsiooni väärtusest.

Arvestades, et *E. coli* sisalduse piirväärtus suplusvees on 1000 CFU/100 ml [3], on indikatiivne lävi hindamaks suplusvee mikrobioloogilise saastatust *E. coli* immunobiosensoriga vahemikus $4 \times 10^4 - 4 \times 10^5$ CFU/100 ml. Biosensori määramispiiriks oleks sel juhul 400 CFU/ml, mis on antud töös kasutatud BIA-1 põhineva immunosensori tehnoloogiaga väga kergesti saavutatav.

3.5 Kolivormsete bakterite mõju biosensori signaalile

Anne kanali veeproovidest eraldati 12 erinevat kolivormsete bakterite isolaati ning uuriti nende mõju *E. coli* biosensori signaalile. Kolivormsete bakterite isolaatidele leiti 16S rDNA järjestuste alusel RDP andmebaasist perekondlikud või liigilised vastavused ning igale isolaadile mõõdeti biosensoriga vastavad keskmised signaalid kontsentratsioonil 10^6 CFU/ml (iga isolaadi korral tehti 3-5 kordumõõtmist) (tabel 3). Kontsentratsioon 10^6 CFU/ml valiti seetõttu, et reeglina jäid kolivormsete bakterite väljakülvide suspensioonid kontsentratsiooni 10^5 juurde, ent arvestades, et välja kasvab maksimaalselt 10% populatsioonist, siis kontsentratsioon 10^6 kajastaks reaalsust kõige paremini [64].

Tabel 3. Kolivormsete bakterite isolaatidele vastavad bakterite liigid ning biosensori keskmised signaalid bakterite kontsentratsioonil 10^6 CFU/ml.

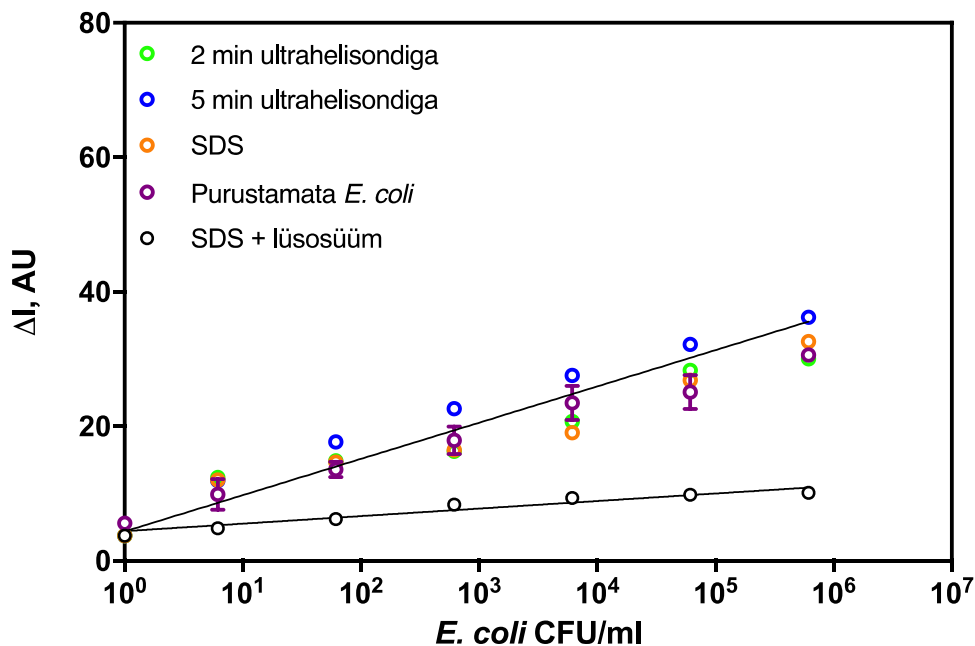
Isolaadi nr	Perekond/liik	Biosensori keskmine signaal bakteri kontsentratsioonil 10^6 CFU/ml (AU)	Perekonna/liigi keskmine signaal (AU)
1.	<i>Aeromonas sp.</i>	$4,74 \pm 1,39$	$6,90 \pm 2,30$
2.	<i>Aeromonas sp.</i>	$10,54 \pm 3,24$	
3.	<i>Aeromonas sp.</i>	$5,08 \pm 0,50$	
4.	<i>Aeromonas sp.</i>	$5,24 \pm 0,76$	
5.	<i>Aeromonas sp.</i>	$8,33 \pm 1,25$	
6.	<i>Aeromonas sp.</i>	$7,53 \pm 2,74$	
7.	<i>Aeromonas veronii</i>	$7,24 \pm 1,51$	$7,24 \pm 1,51$
8.	<i>Enterobacter sp.</i>	$6,59 \pm 1,50$	$6,59 \pm 1,50$
9.	<i>Klebsiella sp.</i>	$7,09 \pm 1,69$	$7,09 \pm 1,69$
10.	<i>Raultella sp.</i>	$5,28 \pm 1,81$	$6,50 \pm 4,40$
11.	<i>Raultella sp.</i>	$2,85 \pm 0,40$	
12.	<i>Raultella sp.</i>	$11,39 \pm 1,97$	

Enterobacteriaceae rühma isendid on omavahel väga sarnased, mistõttu oli isolaatide täpne liigiline määrang keerukas, kuid saadud perekondlike või liigiliste määratluste alusel on tegemist siiski kindlasti kolivormsete bakteritega. 12-st isolaadist määrati 5 erinevat perekonda või liiki ning nendest ülekaalukaimaks, moodustades 50% määratud isolaatidest, oli *Aeromonas sp.* Kõikide perekondade või liikide korral jäi keskmise signaali väärtus bakteri kontsentratsioonil 10^6 CFU/ml vahemikku $6,59 \pm 1,50 - 7,24 \pm 1,51$ AU. Teistest isolaatidest eristus selgelt isolaat nr. 12 (*Raultella sp.*), mille mõõdetud signaal oli teistest ligi 2 korda kõrgem $11,39 \pm 1,97$ AU. Biosensoriga mõõdetud erinevate kolivormsete bakterite keskmine signal kontsentratsioonil 10^6 CFU/ml oli $6,83 \pm 0,84$ AU, mida kasutati ka edaspidistes analüüsid.

Biosensori mõõtmistulemuste hindamiseks ja selektiivsuse iseloomustamiseks uuriti veeproovides ka kolivormsete bakterite üldarvukust. Kolivormsete bakterite üldarvukuse mediaanväärtus oli väga kõrge, 16625 (8750-42250) CFU/100 ml (joonis 8). Kuigi käesoleval ajal ei ole kolivormsete bakterite sisalduse kohta suplusvees ühtegi piirväärtust EU-s kehtestatud, oli enne 2006. aastat kehtivaks piirväärtuseks 10000 CFU/100 ml [66]. Võrreldes kolivormsete bakterite kogusisalduse ja biosensoriga mõõdetud *E. coli* sisalduse tulemusi, selgus, et nende vahel on statistiliselt oluline korrelatsioon (Pearsoni $r = 0,495$; $p = 0,0370$), mis viitab, et anti-*E. coli* polükloonaalne antikeha omab siiski teatud afiinsust ka veeproovis sisalduvate kolivormsete bakterite suhtes.

3.6 Surnud ja lagunenu *E. coli* rakkude mõju biosensori signaalile

Surnud ja lagunenu *E. coli* rakkude mõju uurimiseks mõõdeti erinevatel meetoditel lagundatud *E. coli* rakkude poolt põhjustatud biosensori signaali (joonis 9). Ultrahelisonniga viidi läbi bakterirakkude mehhaaniline purustamine, mille tulemusel saadi rakkudest fragmendid. Ultrahelitöötuse pikkust varieeriti (2 või 5 min), et võrrelda vähemal ja rohkemal määral purustatud rakkude biosensori signaale. Bakterirakkude keemiline lagundamine viidi läbi SDS-detergendiga ning SDS-detergendi ja lüsoosüümi koostoimel rakumembraani lüüsid.



Joonis 9. Erinevate meetoditega lagundatud *E. coli* rakkude poolt põhjustatud biosensori signaal PBS-puhvrts (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20). Detekteerimine toimus anti-*E.coli* antikehaga konjugeeritud FITC-markeraine emissioonimaksimumi lainepikkusel 525 nm.

Biosensori signaali kindlal bakterirakkude kontsentratsioonil pärast nende töötlemist kas ultraheliga või SDS-detergendiga võrreldi purustamata *E. coli* rakkude poolt põhjustatud signaaliga ning selgus, et bakterikontsentratsioonidel 10₁ – 10₆ CFU/ml ei ole nimetatud meetodite graafikute tõusud omavahel statistiliselt oluliselt erinevad (P=0,05). Erinevate meetoditega saadud andmete alusel leitud ühine taustasignaali väärtus oli sarnane varemtoodud taustasignaali väärtusega ning kalibreerimisgraafiku tõus oli tööpiirkonnas 4,36 ± 1,24 AU/log (CFU/ml), mis katsevigade piires langeb kokku joonisel 6 toodud purustamata *E. coli* kalibreerimisgraafiku tõusuga 4,62 ± 0,86 AU/log (CFU/ml) (joonis 9).

Seega sisaldub biosensori signaalis veeproovide analüüsimise korral ka surnud, kuid täielikult lagunemata rakkude poolt põhjustatud signaali komponent, mille osakaal loodusliku vees proovides suureneb elusate rakkude arvukuse vähenedes temperatuuride langedes.

SDS-detergendiga ning lüsoosüümiga töödeldud rakkude korral oli bakterite kontsentratsioonidel kuni 10₆ CFU/ml biosensori signaal kas minimaalsel määral või üldse mitte detekteeritav, jäädes vahemikku 4,83 ± 1,53 – 10,10 ± 2,76 AU/log (CFU/ml) (joonis 9). Signaali hääbumine on tõenäoliselt põhjustatud sellest, et lüsoosüümi poolt lõhutav peptidoglükaankiht asub *E. coli* rakus membraanist seespool [67]. Kuna rakukest on põhiline struktuur, mis hoiab koos välist membraani, valkude ja LPS kompleksi, siis lüsoosüümiga

töötlemine purustab rakukesta nii väikesteks tükkideks, et kompleksi moodustumist IgG Fc-fragmendiga ei toimu või toimub väga vähesel määral.

Täielikult lagunemata rakkude poolt põhjustatud signaalimuutuse osakaalu iseloomustamiseks biosensori signaalis hinnati erinevate komponentide poolt põhjustatud muutusi biosensori kogusignaalis (tabel 4), kusjuures erinevate komponentide signaalide arvutamisel lahutati biosensori signaalist taustasignaali. Nagu tabelis 4 toodud andmetest selgub, siis täielikult lagunemata (mittekultiveeritavate) rakkude poolt põhjustatud biosensori signaali muutus oli kuni $6,9 \pm 2,0$ AU, kusjuures suurim oli see suplushooaja lõpus, 13. septembril kogutud veeproovides. Mittekultiveeritavate bakterite poolt põhjustatud signaali muutust võrreldi ka signaalide vahedega, mis arvutati mikrobioloogiliste külvide teel ja qPCR meetodil leitud bakterite arvukuse vahest (tabel 8, veerg 10). Viimane suurus iseloomustab mittekultiveeritava *E. coli* hulka veeproovides. Nagu tabelis 8 toodud tulemustest selgub, langesid qPCR tulemuste alusel arvutatud signaalimuutuste osakaalud katsevigade piires hästi kokku eksperimentaalsetel mõõtmistel saadud tulemustega, mis viitab sellele, et mittekultiveeritavate bakterite signaal on suuresti põhjustatud osaliselt lagununud *E. coli* bakteritest. Suurim erinevus oli tulemuste vahel sügisel kogutud proovides (13.09.2018), kus mittekultiveeritavate bakterite poolt põhjustatud signaal oli $6,9 \pm 2,0$ ning mittekultiveeritavate kolivormsete bakterite poolt põhjustatud signaal jäi seejuures vahemikku $0,1 - 5,7 \pm 1,2$ AU. Seevastu jäi elusate *E. coli* rakkude poolt põhjustatud signaali osakaal kõikide proovide korral küllaltki madalaks, maksimaalväärtusega $2,8 \pm 0,6$ AU (23.08.2018).

Saadud tulemuste alusel võib järeldada, et biosensoris kasutatud polükloonaalne anti-*E. coli* antikeha ei ole siiski täielikult *E. coli* – spetsiifiline ning seondub mingil määral ka teatud kolivormsete bakteriliikidega, mida tuleks tulevikus biosensoriga veeproovide analüüse läbi viies arvesse võtta. Kolivormsete bakterite täpsema mõju osakaalu hindamiseks tuleks veel teostada edasisi analüüse rohkemate kolivormsete bakterite liikidega, samuti hinnata lüüsunud kolivormsete bakteri mõju biosensori signaalile.

Tabel 4. Erinevate komponentide poolt põhjustatud mõju biosensori signaalis, iseloomustamaks täielikult lagunemata rakkude poolt põhjustatud signaalimuutuse osakaalu.

Nr.	Proovi kogumise päev	Anne kanali vees mõõdetud kogusignaal (AU)	Taustasignaal (AU)	<i>E. coli</i> mikrobiol. konts. (CFU/ml)	<i>E. coli</i> poolt põhjustatud biosensori signaali muut (AU)	Kolivormsete konts. (CFU/ml)	Kolivormsete poolt põhjustatud signaal (AU)	Vahe, mis võib olla põhjustatud mittekultiveeritavatest rakkudest (AU)	qPCR analüüsi tulemustele vastav biosensori signaal (AU)	Täielikult lagunemata rakkude poolt põhjustatud signaal (AU)
1.	0	12,1 ± 1,6	3,7 ± 1,2	0,8	0,3 ± 0,2	27,4	0,0 – 4,7 ± 1,2	5,0 ± 2,6	12,5 ± 0,3	1,0 ± 0,6
2.	15	9,3 ± 3,1	3,7 ± 1,2	2,0	1,9 ± 0,1	278,3	0,2 – 6,0 ± 1,2	1,5 ± 0,3	11,6 ± 1,2	1,0 ± 0,1
3.	30	10,4 ± 3,0	3,7 ± 1,2	1,1	0,4 ± 0,2	136,9	0,1 – 5,7 ± 1,2	6,8 ± 1,4	10,9 ± 0,9	1,0 ± 0,4
4.	55	9,1 ± 3,6	3,7 ± 1,2	0,9	0,8 ± 0,4	392,5	0,3 – 6,3 ± 1,2	2,5 ± 0,6	11,4 ± 1,7	1,0 ± 0,3
5.	69	13,7 ± 3,9	3,7 ± 1,2	1,7	1,8 ± 0,1	286,3	0,2 – 6,1 ± 1,1	5,0 ± 1,2	12,4 ± 1,3	3,3 ± 1,9
6.	79	13,00 ± 1,5	3,7 ± 1,2	2,7	2,8 ± 0,6	668,8	0,5 – 6,5 ± 3,0	6,3 ± 0,6	12,5 ± 1,0	1,4 ± 0,5
7.	100	9,3 ± 2,5	3,7 ± 1,2	1,0	0,3 ± 0,1	151,9	0,1 – 5,6 ± 1,3	2,2 ± 1,4	11,5 ± 0,7	0,2 ± 0,1
8.	114	14,9 ± 4,7	3,7 ± 1,2	0,5	1,2 ± 0,8	153,1	0,1 – 5,7 ± 1,2	6,9 ± 2,0	11,4 ± 1,8	5,5 ± 2,7

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli biosensori konstrueerimine *Escherichia coli* määramiseks looduslikus vees ja selle alusel vee mikrobioloogilise saastatuse hindamine Tartu Anne kanali näitel. Biosensoriga saadud tulemusi võrreldi mikrobioloogiliste külvide ning qPCR meetodite abil saadud tulemustega, et hinnata eri meetoditel saadud tulemuste kokkulangevust. Töös uuriti ka vees leiduvate kolivormsete bakterirakkude ning osaliselt ja täielikult lagunenuid *E. coli* rakkude poolt põhjustatud efekti biosensori mõõdetavas signaalis.

Magistritöö käigus konstrueeriti biosensor ning viidi läbi *E. coli* analüüsid kasutades konstrueeritud biosensorit, mikrobioloogiliste külvide meetodit ning qPCR-analüüsi. Konstrueeritud biosensori lineaarne tööpiirkond asus vahemikus $10^1 - 10^7$ CFU/ml ning määramispiiriks oli < 10 CFU/ml PBS-puhvris ning < 30 CFU/ml Anne kanali veeproovides. Ühe analüüsi läbiviimiseks kuluv aeg oli 20 minutit.

Kolmel meetodil (mikrobioloogilised külvid, qPCR ja *E. coli* biosensor) analüüsitud Anne kanali veeproovide tulemustest selgus, et *E. coli* ja kolivormsete bakterite arvukus oli suurim augustikuu kolmandal nädalal, seevastu kui qPCR meetodiga saadud tulemused näitasid *E. coli* suurimat kontsentratsiooni ligikaudu kaks nädalat varem. Erinevate meetodite signaalide dünaamika erinevused on seletatavad elusate ja surnud rakkude suhte osakaalu muutumisega veeproovides.

Biosensoriga registreeritud kõrgeim *E. coli* kontsentratsioon veeproovis oli orienteeruvalt 40 korda kõrgem mikrobioloogiliste külvidega registreeritud kõrgeimast *E. coli* kontsentratsiooni väärtusest. qPCR meetodiga saadud tulemused olid biosensori tulemustest orienteeruvalt 4 korda madalamad. Biosensori signaali kõrged väärtused on tingitud sellest, et biosensor määrab nii elusaid, surnuid kui ka „uinunud“ bakterirakke, kuid lisaks registreerib teatud määral ka lagunenuid rakkude membraani fragmentidel asetsevaid membraanvalke ning oma osakaalu annavad signaalile ka mittekultiveeritavad kolivormsed bakterid.

Biosensoriga analüüsiti kolivormsete bakterite ja erinevatel meetoditel lagundatud *E. coli* rakkude mõju poolt avalduvat efekti biosensori signaalile. Selgus, et kasutatud polükloonaalne anti-*E. coli* antikeha omas lisaks *E. coli* bakteritele afiinsust ka kolivormsete mikroorganismide suhtes. qPCR tulemuste alusel arvatud signaalimuutuste osakaalud langesid katsevigade piires hästi kokku biosensoriga saadud tulemustega, viidates sellele, et mittekultiveeritavate bakterite signaal on suuresti põhjustatud osaliselt lagunenuid *E. coli* bakteritest. Kolivormsete bakterite suurim efekt biosensori signaalile avaldus sügisel kogutud

proovides (13.09.2018). Nii mehhaaniliselt ultrahelisondiga kui keemiliselt SDS- detergendi ja lüsoosüümiga lagundatud *E. coli* rakkude mõju analüüsimise tulemustest selgus, et biosensori signaalile avaldus nende mõõdetav mõju seni kuni lagundamisprotsessidega jõuti raku peptidoglükaankihi lagundamiseni lüsoosüümiga.

Väljapakutud biosensortehnoloogia on heaks stardiplatvormiks suplusvee ohutuse kiireks kohapealseks hindamiseks. Ohutuskriterimite täpsemaks formuleerimiseks oleks edaspidi vaja põhjalikumalt iseloomustada erinevate bakteriliikide poolt põhjustatud signaali muutusi, samuti elusate ja surnud mikroorganismide sessoonseid osakaalude muutusi biosensori signaalis. Kui osutub vajalikuks biosensori määramispiiri alandamine, on võimalik seda lihtsalt teha proovi ruumala suurendamisega, mis ei vaja mingeid täiendavaid protseduure kui pikendab proovi voolutamiseks (ja seega ka analüüsiks) kuluvat aega. Aparatuuri mõõtmete vähendamisel on võimalik analüüsiseadmete loomine veeproovide automaatseks kohapealseks monitooringuks.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] K. Künis-Beres, I. Lips, Merevees esinevate võimalike patogeenide pilootseire. Aruanne. TTÜ Meresüsteemide Instituut, Tallinn, 2018.
- [2] N. J. Horan, Faecal indicator organisms, in: Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Elsevier Inc., (2003) 105–112.
- [3] Riigi Teataja, Vabariigi Valitsuse 3. aprilli 2008. a määruse nr 74 “Nõuded suplusveele ja supelrannale”; lisa 1, (2012).
- [4] Riigi Teataja, Vabariigi Valitsuse 3. aprilli 2008. a määrus nr 74 “Nõuded suplusveele ja supelrannale” (2008).
- [5] S. T. Shulman, H. C. Friedmann, R. H. Sims, Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician?. In press, online from 15.10.2017, <https://doi.org/10.1086/521946>.
- [6] NCBI Taxonomy Database, *Escherichia coli*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=562>, viimati alla laetud 11.03.2020.
- [7] European Centre for Disease Prevention and Control, List of microorganisms <https://www.ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/microorganisms-and-antimicrobial-resistance/list>, viimati uuendatud 02.06.2013.
- [8] S. Rengaraj, Á. Cruz-Izquierdo, J. L. Scott, M. Di Lorenzo, Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. In press from 15.07.2018, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.020>.
- [9] C. Lui, N. Cady, C. Batt, Nucleic Acid-based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems. In press, online from 18.05.2009, <https://doi.org/10.3390/s90503713>.
- [10] I. Lutsar, M. Mihkelsaar, T. Karki, *Escherichia coli*, in: Med. Mikrobioloogia Bakterioloogia Ja Mükoloogia, II osa, Tartu, 2007, pp. 102–107.
- [11] A. Ebbensgaard, H. Mordhorst, F. M. Aarestrup, E. B. Hansen, The Role of Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides for the Sensitivity of *Escherichia coli* to Antimicrobial Peptides. In press, online from 07.09.2018, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02153>.

- [12] S. V. Torti, J. T. Park, Lipoprotein of Gram-negative bacteria is essential for growth and division,. In press, online from 23.09.1976, <https://doi.org/10.1038/263323a0>.
- [13] J. Tommassenn, Assembly of outer-membrane proteins in bacteria and mitochondria. In press, online from 01.09.2010, <https://doi.org/10.1099/mic.0.042689-0>.
- [14] S. E. Rollauer, M. A. Soorshjani, N. Noinaj, S. K. Buchanan, Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. In press, online from 05.10.2015, <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0023>.
- [15] N. Saint, E. De, S. Julien, N. Orange, G. Molle, Ionophore properties of OmpA of *Escherichia coli*. In press, online from 18.01.1993, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90388-G](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90388-G).
- [16] J. H. Weiner, L. Li, Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. In press, online from 11.08.2007, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.020>.
- [17] D. W. Nielsen, N. Ricker, N. L. Barbieri, H. K. Allen, L. K. Nolan, and C. M. Logue, Outer membrane protein A (OmpA) of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. In press, online from 31.01.2020, <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4917-5>.
- [18] H. Samartzidou, A. H. Delcour, *E.coli* PhoE porin has an opposite voltage-dependence to the homologous OmpF. In press, online from 02.01.1998, <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.93>.
- [19] T. Strachan, Human Molecular Genetics, 2nd edition, Read AP, New York, 1999, chapter 6.2.
- [20] Kobras AS. Anne kanal I seisundi uuring suplusvee kvaliteedi tagamiseks. Keskkonnauuring, Tartu, 2014.
- [21] K. Laursoo, A. Batsinin, A. Annus. Anne kanali suplusvee profiil. https://www.terviseamet.ee/sites/default/files/content-editor/vanaveeb/Keskkonnatervis/vesi/suplus/Profiilid/Anne_ranna_suplusvee_profiil.pdf, viimati alla laetud 17.04.2020.
- [22] I. Väling. Biosensori konstrueerimine *Escherichia coli* määramiseks ja selle kasutamine Tartu Anne kanali veekvaliteedi hindamiseks. Bakalaureusetöö, Tartu, 2018.
- [23] Terviseamet. Suplusvee veekvaliteedi andmebaas.

http://vtiav.sm.ee/frontpage/show?id=58&active_tab_id=SV, viimati alla laetud 02.04.2020.

- [24] European Environment Agency. Estonian bathing water quality in 2017. <https://www.eea.europa.eu/themes/water/europes-seas-and-coasts/assessments/state-of-bathing-water/country-reports-2017-bathing-season/estonia-2017-bathing-water-report/view>, viimati alla laetud 02.04.2020.
- [25] European Environment Agency. European bathing water quality in 2018. <https://www.eea.europa.eu/themes/water/europes-seas-and-coasts/assessments/state-of-bathing-water/country-reports-2018-bathing-season/bwd2018-nationalreport-ee.pdf/view>, viimati alla laetud 02.04.2020.
- [26] G. J. Delisle, A. Ley, Rapid detection of *Escherichia coli* in urine samples by a new chromogenic beta-glucuronidase assay, *Journal of Clinical Microbiology*, (1989), 778–779.
- [27] Centre for Affordable Water and Sanitation Technology, "Manual Introduction to Drinking Water Quality Testing" (2013).
- [28] H. Ingelman. Katsetingimuste mõju persistorite esinemissagedusele *Escherichia coli*'s. Bakalaureusetöö, Tartu, 2014.
- [29] K. P. Flint, The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. In press, online from 01.09.1987, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04945.x>.
- [30] 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://doi.org/10.1128/JCM.02171-07>.
- [31] D. I. Walker, J. McQuillan, M. Taiwo, R. Parks et al., A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. In press, online from 25.08.2017, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>.
- [32] 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.
- [33] N. Ramalingam, Z. Rui, H. Liu, C. Dai et al., Real-time PCR-based microfluidic array chip for simultaneous detection of multiple waterborne pathogens. In press, online from 22.11.2009, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2009.11.025>.
- [34] National Human Genome Research Institute. DNA Microarray Technology

- Fact Sheet. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Microarray-Technology>, viimati uuendatud 27.08.2015.
- [35] ThermoFischer Scientific. The Long and Short of Isothermal Amplification. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/isothermal-amplification.html>, viimati alla laetud 04.04.2020.
- [36] Jena Bioscience. Isothermal DNA Amplification. <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/isothermal-amplification>, viimati alla laetud 04.04.2020.
- [37] W. Liu, C. Yuan, L. Zhang, Y. Feng, Establishment and application of isothermal multiple-self-matching-initiated amplification (IMSA) in detecting Type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. In press, online from 02.05.2019, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216272>.
- [38] Ecology Water Quality Program, "Focus on Fecal Coliform Bacteria". (2005).
- [39] L. Heijnen, G. Medema, Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA, In press, online from 03.05.2009, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.025>.
- [40] E. Maisonneuve, K. Gerdes, Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. In press, online from 24.04.2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>.
- [41] A. Hata, H. Katayama, M. Kitajima, C. Visvanathan, C. Nol, H. Furumai, Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. In press, online from 20.05.2011, <https://doi.org/10.1128/AEM.00077-11>.
- [42] N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, J. S. Viridi, MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. In press, online from 05.08.2015, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>.
- [43] C. Huixia, C. Michael, H. Drexler, C. Patrick et. al., Rapid, sensitive, and specific *Escherichia coli* H antigen typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-based peptide mass fingerprinting. In press, online from 20.06.2015, <https://doi.org/10.1128/JCM.00593-15>.
- [44] L. Ferreira, F. Sánchez-Juanes, M. González-Ávila, D. Cembrero-Fuciños et. al., Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. In press, online from 27.05.2010, <https://doi.org/10.1128/JCM.02215-09>.
- [45] M. Nikopensius. *Streptococcus Uberis*'e vastaste antikehade puhastamine vereseerumist. Bakalaureusetöö, Tartu, 2015.
- [46] ThermoFischer Scientific. Overview of ELISA. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>, viimati alla laetud 04.04.2020.
- [47] S. Shan, D. Liu, Q. Guo et al., Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on cascade signal amplification in ELISA. In press, online from 07.07.2016, <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11320>.
- [48] S. Ç. Uzuner, Development of a Direct Trypan Blue Exclusion Method to Detect Cell Viability of Adherent Cells into ELISA Plates. In press, online from 30.03.208, <https://doi.org/10.18466/cbayarfbe.372192>.
- [49] H. Zhang, Z. Gong, O. Pui, Y. Liu, X. F. Li, An electronic DNA microarray technique for detection and differentiation of viable *Campylobacter* species. In press, online from 05.06.2006, <https://10.1039/b603315f>.
- [50] R. Martzy, C. Kolm, R. Krska, R. L. Mach, A. H. Farnleitner, G. H. Reischer, Challenges and perspectives in the application of isothermal DNA amplification methods for food and water analysis. In press, online from 08.01.2019, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1553-1>.
- [51] J. A. Goode, J. V. H. Rushworth, and P. A. Millner, Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. In press, online from 16.06.2015, <https://doi.org/10.1021/la503533g>.
- [52] N. Hesari, A. Alum, M. Elzein, and M. Abbaszadegan, A biosensor platform for rapid detection of *E. coli* in drinking water. In press, online from 26.11.2015, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.11.007>.
- [53] J. Y. Lee, B. K. Kim, M. Kang, and J. H. Park, Label-Free Detection of Single Living Bacteria via Electrochemical Collision Event, In press, online from 20.07.2016, <https://doi.org/10.1038/srep30022>.
- [54] D. Dechtrirat, N. Gajovic-Eichelmann, F. Wojcik, L. Hartmann, F. F. Bier, and F. W. Scheller, Electrochemical displacement sensor based on ferrocene boronic acid tracer and immobilized glycan for saccharide binding proteins and *E. coli*, In press,

- online from 19.02.2014, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.028>.
- [55] D. Juronen, A. Kuusk, K. Kivirand, A. Rincken, and T. Rincken, Immunosensing system for rapid multiplex detection of mastitis-causing pathogens in milk, In press, online from 22.10.2017, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.043>.
- [56] D. Wang, T. Hinkley, J. Chen, J. N. Talbert, and S. R. Nugen, Phage based electrochemical detection of: *Escherichia coli* in drinking water using affinity reporter probes, In press, online from 13.12.2018, <https://doi.org/10.1039/C8AN01850B>.
- [57] J. Chen, S. D. Alcaine, Z. Jiang, V. M. Rotello, and S. R. Nugen, Detection of *Escherichia coli* in Drinking Water Using T7 Bacteriophage-Conjugated Magnetic Probe, In press, online from 14.07.2015, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02175>.
- [58] H. Priks. Polüürrol mikrobioloogiliste kütuseelementide elektroodimaterjalina. Magistritöö, Tartu, 2016.
- [59] T. Kim and J. I. Han, Fast detection and quantification of *Escherichia coli* using the base principle of the microbial fuel cell, In press, online from 02.10.2013, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.08.051>.
- [60] D.J. Lane, E. Stackebrandt, M. Goodfellow, 16S/23S rRNA sequencing, in: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, Wiley, New York (1991) 115-175.
- [61] J. R. Cole, Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai et. al., Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res.* 42(Database issue):D633-D642, 2014, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- [62] Fia.I. Inc. Leaders in Flow Injection Technology MicroSI Chromatography on Renewable Column. http://www.flowinjection.com/images/Bead_Injection.pdf viimati alla laetud 11.04.2020.
- [63] Novus Biologicals. *E. Coli* Antibody. https://www.novusbio.com/products/e-coli-antibody_nb100-62526, viimati alla laetud 18.04.2020.
- [64] C. H. Puspita, I. D. Kamagata, Y. Tanaka, M. Asano, K. Nakatsu, Are Uncultivated Bacteria Really Uncultivable?, In press, online from 07.12.2012, <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12092>.
- [65] Keskkonnaagentuur. Riigi Ilmateenistus 2018. Suvi 2018, keskmisest kuivem, soojem, päikesepaistelise suvi. https://www.ilmateenistus.ee/wp-content/uploads/2018/09/2018_suvi.png, viimati alla laetud 18.04.2020.
- [66] Euroopa Liidu Teataja, direktiiv 76/160/EMÜ "Nõukogu direktiiv 8. detsember,

1975, suplusvee kvaliteedi kohta" (1976).

- [67] J. C. Gumbart, M. Beeby, G. J. Jensen, B. Roux, *Escherichia coli* Peptidoglycan Structure and Mechanichs as Predicted by Atomic-Scale Simulations, In press, online from 20.02.2014, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003475>.

SUMMARY

The implementation of *Escherichia coli* biosensor for natural swimming water quality analyses.

Escherichia coli is an indicator species for monitoring faecal pollution in natural swimming water. Since pathogenic serotypes of *E. coli* can cause serious illness in humans, rapid pathogen detection is of crucial importance for issuing timely warnings of potential threats.

The most common bacterial detection methods are microbiological culturing and qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) methods. In addition, methods like DNA-microarray technology, isothermal DNA amplification (IsoAmp), matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have been implemented. The main problems with all the named methods is that they are time-consuming (taking up to 5 – 36 hours depending on the analysis method), can not be automated and some of these methods can not be used for quantitative detection of bacteria.

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

The aim of the present work was to implement an antigen-antibody based *Escherichia coli* biosensor to analyse the microbiological water quality of Anne Canal – a popular beach in Tartu, Estonia, and to compare the results with the results obtained with microbiological culturing and quantitative PCR (qPCR). The effect of coliform bacteria and fully or partly degraded *E. coli* cells was evaluated and optimal threshold for the biosensor results was proposed for the assessment of water quality.

For the construction of the biorecognition element of *E. coli* biosensor, IgG was purified from human blood serum and its Fc fragment was used for the production of bioactivated beads, which were then used for capturing of *E. coli* bacteria from Anne canal 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 FITC maximum 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 CFU/ml in PBS (phosphate buffer saline) and < 30 CFU/ml in water samples collected from Anne canal. The estimated time of analysis was 20 min.

The concentrations of *E. coli* in the water samples collected during the summer of 2018 (05.06 – 13.09) from Anne canal, assessed with three different methods – microbiological cultivation, qPCR and *E. coli* biosensor revealed that *E. coli* concentrations obtained with the biosensor were approximately 4 times bigger than the outcome of qPCR and approximately 40 times bigger than the outcome of microbiological cultivation.

The detectable biosensor signal resulting from coliform bacteria revealed that the polyclonal anti-*E. coli* antibody supposed to be only *E. coli* specific and used for biorecognition, was also interacting with different species of coliform bacteria.

The biosensor signal resulting from fully or partly degraded *E. coli* cells was analysed by degrading the cells with ultrasonic sound or chemically with detergent (sodium dodecyl sulfate) and lysosome. The results revealed that the effect to the biosensor signal was detectable as long as the peptidoglycan layer of the *E. coli* cell was processed with lysosome.

For further developments, the biosensor operation protocol can be modified to lower the limit of detection by increasing the sample volume. It is also possible to differentiate between pathogenic and non-pathogenic *E. coli* stems by applying detecting antibodies of different origin. What is more, the biosensor can be miniaturized for on-site automated analyses.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ingrid Väling,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose *Escherichia coli* biosensori kasutamine suplusvee kvaliteedi hindamiseks, mille juhendajad on Toonika Rincken 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 **10.06.2023** 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, **01.06.2020**