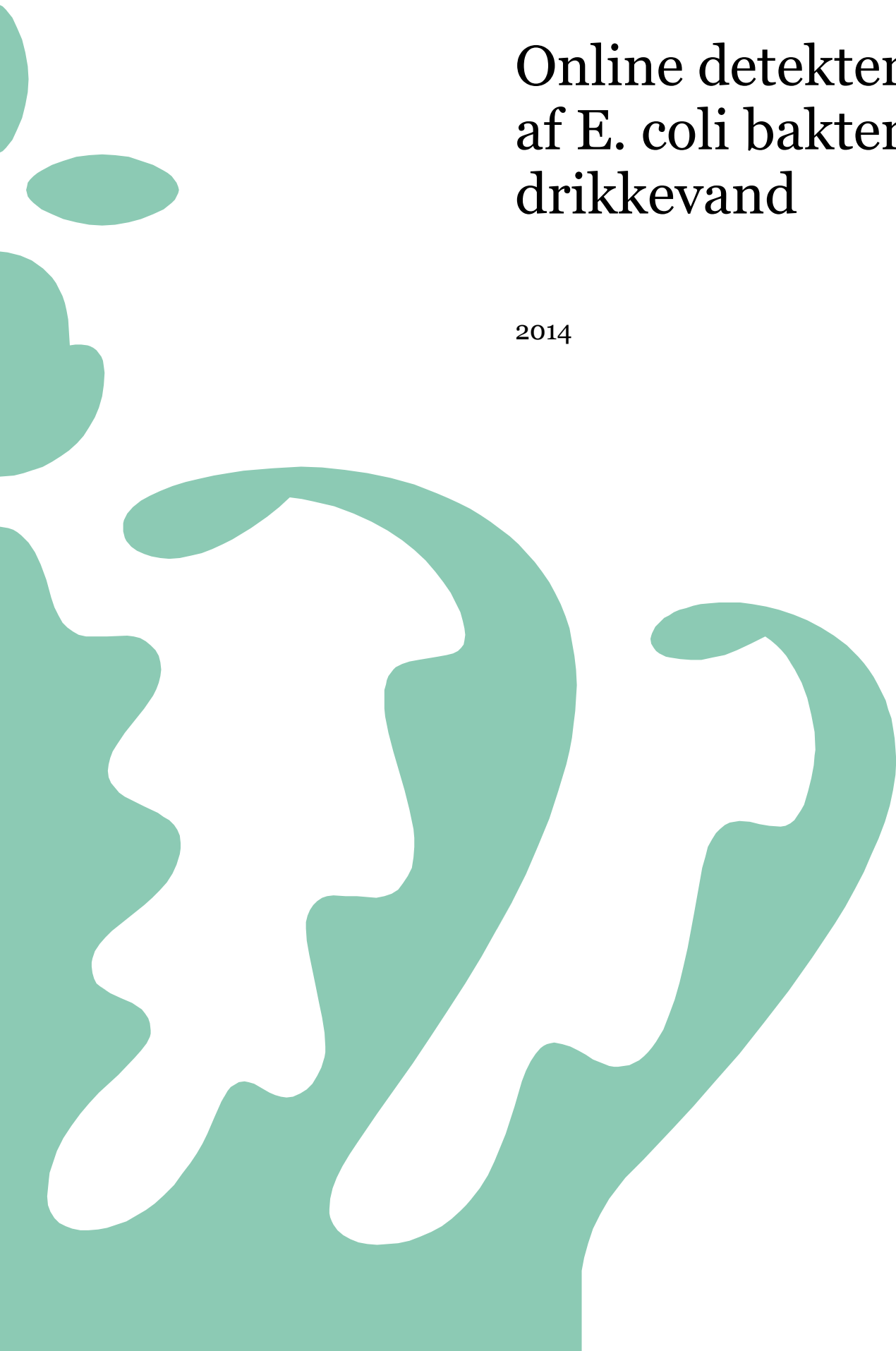




Miljøministeriet
Naturstyrelsen

Online detektering af E. coli bakterier i drikkevand

2014



**Titel: Online detektering af E. coli bakterier
i drikkevand**

MUDP projektrapport

Projektgruppe:
Dansk Fundamental Metrologi A/S

Dept of Veterinary Disease Biology, Københavns Universitet

Udgiver:

Naturstyrelsen
Haraldsgade 53
2100 København Ø

Redaktion [evt. fotos og illustrationer]:

Mark Pollard, Dansk Fundamental Metrologi A/S

www.nst.dk

År:

2014

ISBN nr.

978-87-7091-957-9

Ansvarsfraskrivelse:

Naturstyrelsen offentliggør rapporter inden for vandteknologi, medfinansieret af Miljøministeriet. Offentliggørelsen betyder, at Naturstyrelsen finder indholdet af væsentlig betydning for en bredere kreds. Naturstyrelsen deler dog ikke nødvendigvis de synspunkter, der kommer til udtryk i rapporterne.

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

Forord	5
Sammenfatning	7
Summary	8
1. Indledning	9
2. Indhold	10
2.1 Detekteringsprocesbeskrivelse.....	10
2.2 System beskrivelse.....	10
2.3 Indsamling og separering af bakterier.....	11
2.4 Fluorescendede mærkning af bakterier.....	13
2.5 Detektering af bakterier	14
3. Konklusion	20
Litteratur	20
Bilag	21

Forord

Denne rapport er udarbejdet på baggrund af projektet ”Online detektering af E.koli bakterier i drikkevand”, der er gennemført med tilskud fra Miljøministeriet , 2014

Projektgruppen har bestået af:

Dansk Fundamental Metrologi A/S, Dept. Of Veterinary Disease Biology (Københavns Universitet)

I følgegruppen har, udover projektgruppen, også Naturstyrelsen deltaget v/Anne Christine Duer (Naturstyrelsen), Professor Hanne Ingmer (Københavns Universitet), Finn Mollerup (VandCenterSyd)

Sammenfatning

Vi beskriver forskningen og udviklingen af en ny metode for detektering af *Escherichia coli* bakterier i drikkevand. Metoden er designet til fjernstyret, automatisk brug på et vandværk eller forsyningsledning. Formålet er, at øge hastigheden af eksisterende undersøgelsesteknikker i laboratorier til test af vandkvalitet. Projektet blev koordineret af forskere fra Dansk Fundamental Metrologi A/S, med projektpartnere fra Københavns Universitet (Department of Veterinary Disease Biology). En følgegruppe bestående af VandCenter Syd og Københavns Universitet blev oprettet i projektets forløb. Målet med projektet var, at detektere bakterier med en koncentration af 1 colony-forming unit per milliliter (CFU / mL) i en vandprøve af 100 mL (d.v. s. 100 bakterier i 100 mL vand).

En unik kombination af teknikker fandt anvendelse i måleopstillingen, til at indsamle og opkoncentrere bakterier fra vandprøver ved hjælp af kraften genereret mens prøven spindes ved høj hastighed. Derefter detekteres bakterierne ud fra optisk måling af lys dannet af fluorescerende kemiske mærker som vedhæftes bakterierne.

Vi etablerede en bakteriesepareringsteknik baseret på centrifugering og anvendte teknikken til at separere bakterieprøver med koncentrationer af 10^4 CFU/mL. I denne rapport beskriver vi udviklingen af bakteriemærkningsprocessen under forskellige vandbetingelser for at simulere faktiske testbetingelser. Desuden undersøges kemiske mærker som vedhæfter specifikt *Escherichia coli* bakterier. Et sensitivt fluorescensdetekteringssystem blev udviklet til projektet og anvendt til at detektere mærkede bakterier i forskellige koncentrationer fra 100 to 10^9 CFU/mL.

Et automatisk prototypesystem blev bygget og testet i projektpartnerens laboratorier på Københavns Universitet. Systemet kan tage en 0,1 mL vandprøve med bakterier, som var mærket med fluorescens før testens start. Det blev eftervist at kunne detektere bakterier ned til en koncentration på 10^5 CFU / mL inden for 20 minutter. Et computerstyret væskesystem blev udviklet under projektet for at have et komplet bakteriedetekteringsproces til et vandværk.

Fremtidigt arbejde bør forbedre detektering ved brug af et alternativt fluorescerende mærke. Dette kan give to fordele: større effektivitet ved vedhæftning til bakterierne og bedre optiske egenskaber som kan reducere uønskede baggrundssignaler. Derudover kan bakteriesepareringsprocessen øges i volumen ved yderligere tilpasning af den eksisterende teknologi.

Summary

We present the development of a new method for the detection of *Escherichia coli* bacteria in drinking water that was designed for remote, automatic use at water facilities and increases the speed of water quality testing in comparison to existing, laboratory-based techniques. The project was coordinated by scientists at Dansk Fundamental Metrologi A/S, with project partners at Københavns Universitet (Department of Veterinary Disease Biology) and following group included KU and VandCenter Syd. The goal of the project was to detect a bacteria concentration of 1 colony forming unit per millilitre (CFU / mL) in a water sample of 100 mL (100 bacteria in 100 mL water).

The system used a novel combination of techniques to collect the bacteria from the water sample by applying a force generated as the sample is spun at high speed and then detect the bacteria by measuring the light produced by fluorescent chemical labels attached to the bacteria.

We created the bacteria separation technique based on centrifugation, and applied it to separate bacteria samples with concentrations of 10^4 CFU/mL. We report the development of the bacteria labelling process in different water conditions to replicate realistic conditions and investigate chemical labels that attach specifically to *Escherichia coli* bacteria. A sensitive fluorescence detection system was developed and applied to detect a range of labelled bacteria in the concentration range 100 to 10^9 CFU/mL.

An automated prototype system was produced and tested in laboratories at KU. It took a 0.1 mL water sample with pre-labelled bacteria and was capable of detecting bacteria down to a concentration of 10^5 CFU/mL within a time of 20 minutes. A computer-controlled liquid handling system has been developed for the project in order to provide a complete bacteria detection process at a water facility.

Further work can improve this detection limit by using an alternative fluorescent label that can provide two benefits; greater efficiency when binding to bacteria and different optical properties that can reduce the unwanted effect of background signals. Also, the bacteria separation process can be increased in volume by the adaptation of existing technology.

1. Indledning

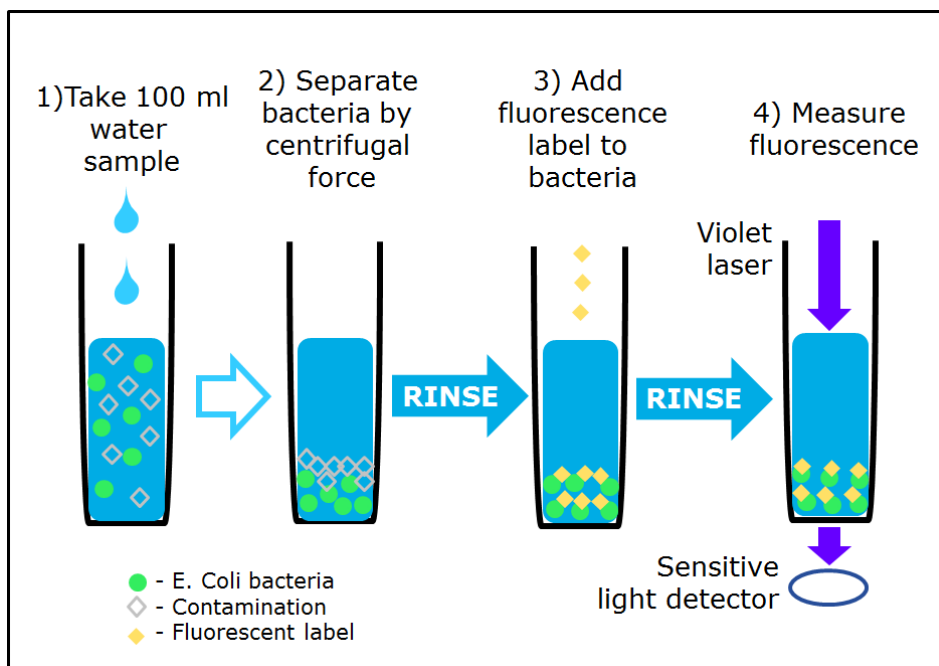
Monitorering af drikkevandskvalitet er et vigtigt emne for folkesundheden, hvor især mikrobiologisk kontaminering af vand ved forskellige bakterier, herunder *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*) bakterier kan forårsage sygdomme, for eksempel gastroenteritis. Derfor er det en vigtig opgave at udvikle nye teknikker til at detektere *E. coli* bakterier i drikkevand så hurtigt som mulig. Aktuelle detekteringsteknikker er udviklet i specialiserede laboratorier, ved fremvækst af bakterier fra vandprøver, hvor resultatet først opnås efter flere timer. Nye teknikker er under udvikling for at øge hastigheden og følsomheden af bakteriedetektering, for eksempel detektering af bakterier ved måling af ændringen i specielle optisk signaler udsendt ved fysisk processer blandt andet 'fluorescens' og 'surface plasmon resonance'. Disse laboratorteknikker har været vist at kunne detektere bakterier med en koncentration på 10 bakterier pr. milliliter vand [1], hvor enheden for bakterie koncentration kaldes 'colony-forming units per milliliter', CFU/mL. Men eksisterende teknikker er ikke sensitive nok til at opfylde lovgivningsmæssige grænser, hvor detektering af 1 CFU/100 mL er krævet. For at opnå dette mål, må det sensitiv optisk detektering system kombineres med teknologi, som indsamler og separerer bakterierne fra vandprøven.

Denne rapport beskriver en gennemført undersøgelse af et nyt system, som indsamler bakterierne fra en vandprøve ved at anvende en centrifugalkraft (dvs. spinding af prøven) og derefter detektere antallet af bakterier ved brug af optisk detektering af fluorescerende mærker vedhæftet til bakterierne. Teknologien udviklet ved dette projekt er beregnet til brug i et vandværk eller forsyningsledning og vil tillade automatisk måling af vandkvalitet, hvorfor processen vil være hurtigere og billigere. Projektets mål var, at detektere en bakteriekoncentration på 100 CFU i en vandprøve af 100 mL indfor en periode af 2 timer. Denne rapport er opdelt i sektioner og omhandler bakterieindsamlingsprocessen, den fluorescerende mærkning af bakterier, efterfulgt af den fluorescerende detektering og udviklingen af en maskine til at automatisere hele processen.

2. Indhold

2.1 Detekteringsprocesbeskrivelse

Den foreslåede detekteringsproces til projektet er vist i figur 1. Processen består af fire trin for at levere vandprøven, separere bakterierne ved brug af centrifugalkraft, vedhæfte fluorescerende mærker og derefter måle antallet af bakterier ud fra det fluorescerende lys udsendt fra vedhæftede fluorescerende mærker.

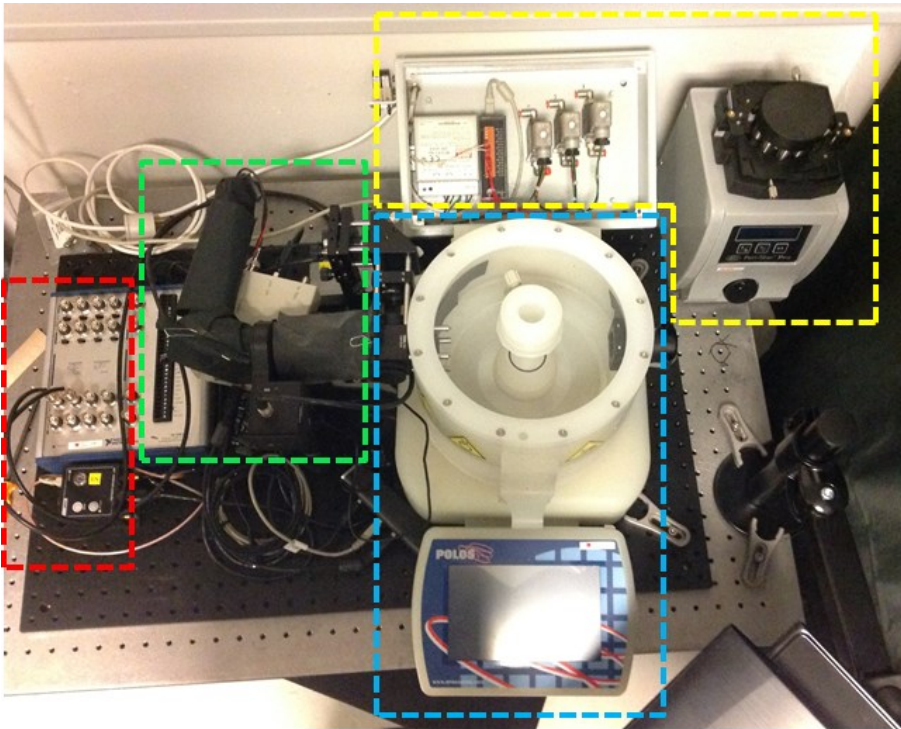


Figur 1 - Bakteriedetekteringsproces

Processen inkluderer et kemisk oprensningstrin for at fjerne andre partikler eller kontaminanter i vandprøven efter bakterierne har været separeret og placeret på enderne af vandprøvebeholder (yderligere detaljer er givet i kapitel 2.3). Processen var konstrueret til at være automatisk, så den kan bruges i et vandværk eller forsyningsledning og en prototype af det automatiske system blev bygget og testet til at udføre bakterier separering og fluorescerende detektering af de mærkede bakterier, se kapitel 2.6 for detaljer.

2.2 System beskrivelse

Detekteringsystemet er opbygget af fire dele som vist i figur 2: væskehåndtering, bakterieseparering (ved brug af en spin coater maskine), bakteriedetektering (ved brug af et fluorescensdetekteringssystem) og procesautomatisering (ved brug af en bærbar computer og elektronik).



Figur 2 – Prototype systemet, består af væskehåndtering (vist i gul), bakterierseparering (vist i blå), bakteriedetektering (vist i grøn) og procesautomatisering (vist i rød)

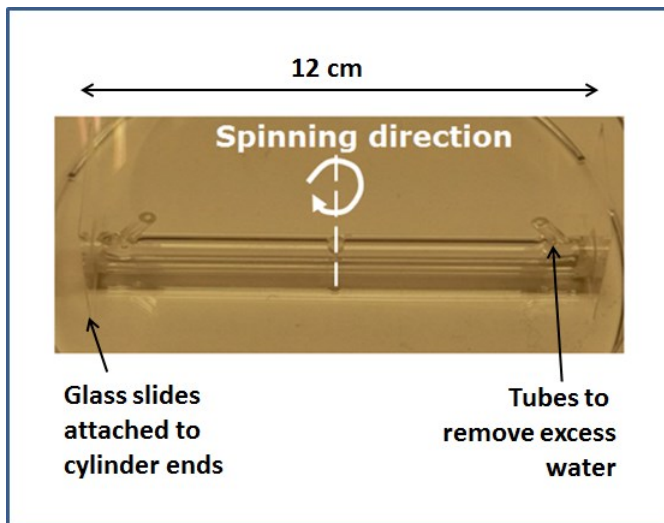
I dette prototypesystem blev vandprøver af 0.1 mL volumen indført i en glasbeholderen, der blev spundet i spin coatermaskinen. Efter en volumen af fluorescerende mærker var tilsat glasbeholderen, blev det fluorescerende signal fra bakterierne målt.

2.3 Indsamling og separering af bakterier

Systemet brugte centrifugalkraft til at separere bakterier fra vandprøven. Centrifugalkraft opnås når en vandprøve og dens beholder spindes med høj hastighed, og centrifugalkraften skubber indholdet af prøven i en retning væk fra centrum af spindingsbevægelsen (ligesom en vaskemaskine der bruger en spindingsbevægelse til at fjerne vand). Størrelsen af kraften kan styres ved at spinde med forskellige hastigheder, hvor enhederne af fart er omdrejninger per minut (angivet som 'rpm'). En maskine kaldet en 'spin coater' blev brugt for at spinde beholderen. Spin coatermaskinen var indkøbt fra SPS Europe (produkt nummer SPIN 150i) og var computerstyret (hvor centrifugeringshastighed og varighed kan justeres) og gav via stik mulighed for automatisering af processen.

Bakteriesepareringen ved brug af centrifugalkraft kan beskrives med en ligning for 'settling time' [2], som beregner tiden for at bakterier skubbes igennem en volumen af vand til et samlingspunkt. Ved brug af kendte værdier for *E.coli* bakterier (omtrentlig sfærisk form på 0,7 mikrometer i omkreds, tæthed på 1160 kg/m³, bevæger sig igennem volumen på 0,1 mL) og en centrifugeringshastighed på 3000 rpm, beregnedes separationstiden til 570 sekunder. I virkeligheden, blev separationstiden fundet at være højere (600 sekunder), med forskellen forårsaget ved antagelser i bakterier form og tæthed.

En prøvebeholder blev udviklet til at indeholde vandprøven og designet til at være stærk nok til at modstå spinding. Beholderen er en cylinder af glas, som vist i figur 3. Enderne af beholderen blev lukket ved fastgørelse af tynde glasplader, dette tillod optisk detektering af bakterier ved brug af fluorescensmålinger. To rør blev tilføjet enderne af beholderen så vandet kunne fjernes fra prøven, efter at bakterierne var adskilt.

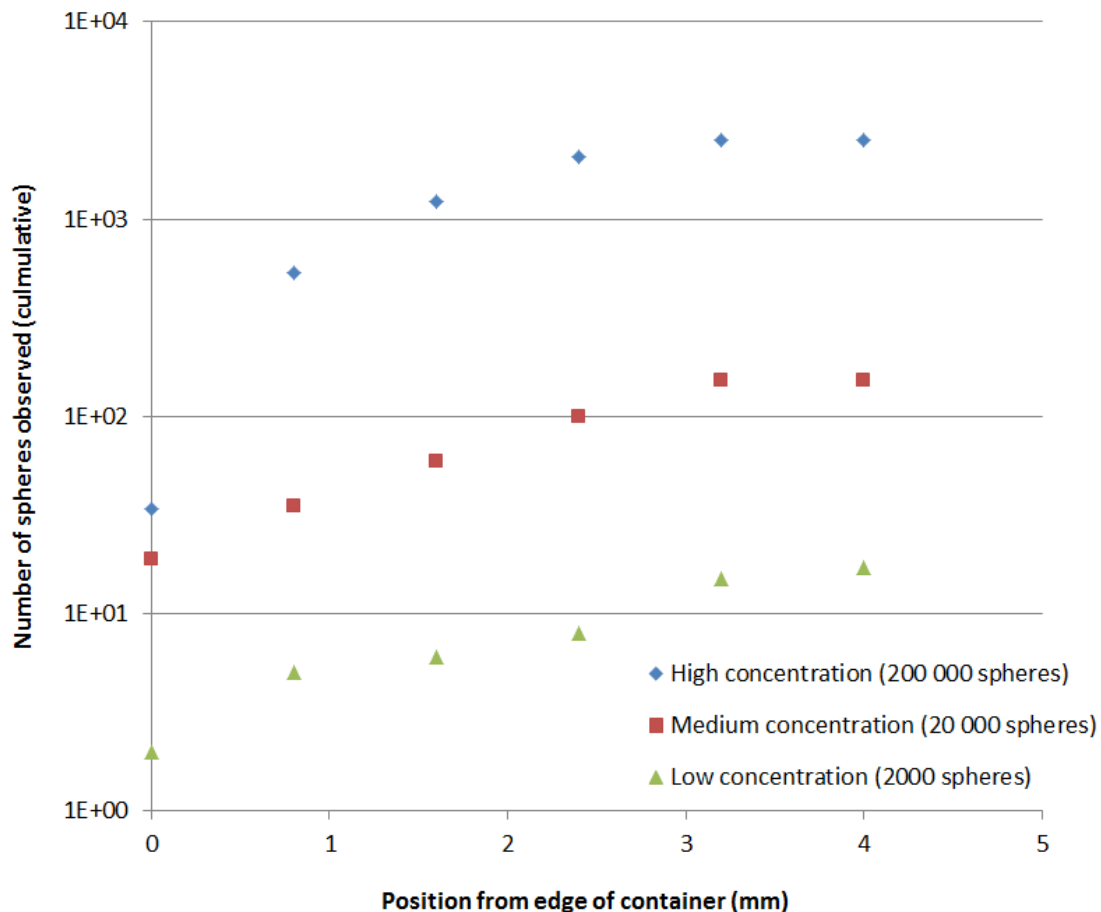


Figur 3 - Glasbeholder for bakterieseparering og detektering

Separering af bakterier og andre partikler blev fremmet ved brug af en kemisk flade i enderne af beholderen. Stoffet 'poly-l-lysine' har vist at forbedre vedhæftning af bakterier til glasoverflader [3], og det var forventet at dette kunne vedhæfte bakterierne efter de var adskilt ved centrifugering.

Separeringsprocessen blev testet ved brug af polystyrenreferencepartikler og derefter ved brug af *E. coli* bakterier med fluorescerende mærker. Til midten af alle prøver blev tilsat en dråbe (6 mikroliter) poly-l-lysine (fra Ted Pella Inc, produkt nummer 18026) og hver prøve blev spundet til enderne af beholderen med en centrifugeringshastighed på 3000 rpm i 180 sekunder, dette for at sikre bedre vedhæftning af adskilte partikler til enderne af beholderen.

I den første test, blev en prøve af polystyrenreferencepartikler (Fluoromax Blue B900 fra Thermo Scientific) med en diameter på 0,91 mikrometer fortyndet i 0,1 mL vand og placeret i beholderen og spundet i 600 sekunder med en centrifugeringshastighed på 3000 rpm. Efter afsluttet spinding blev enderne af beholderen undersøgt med et mikroskop for at observere polystyrenreferencepartiklerne. Mikroskopbilleder blev optaget fra forskelligt steder på tværs af enderne af beholderen, og antallet af referencepartiklerne i hvert billede blev talt ved brug af ImageJ computer software [4]. Tre koncentrationer af polystyrenreferencepartikler blev brugt, hvor koncentrationen blev reduceret med en faktor 10, som vist i figur 4. Dette indikerede, at centrifugeringsmetoden brugt til partikelseparering fungerede som forventet.



Figur 4 – Samlede kumulering af polystyrenreferencepartikler observeret på enderne af beholderen, vist på en logaritmisk skala, for tre koncentrationer af referencepartikler.

I den anden test, blev en prøve af fluorescensmærkede bakterier i 0,1 mL vand placeret i beholderen og spundet med samme centrifugeringshastigheder som i første test. En række bakteriekoncentrationer blev testet (fra 10^6 CFU/mL til 10^2 CFU/mL). For bakteriekoncentrationer større end 10^4 CFU/mL blev bakterier på enderne af beholderen undersøgt ved brug af et mikroskop. Bakteriekoncentrationer mindre end 10^4 CFU/mL var svære at undersøge ved brug af mikroskop på grund af de meget lave niveauer af bakterier i prøven. Et fluorescensdetekteringsystem med højere sensitivitet blev derfor udviklet for at måle mindre koncentrationer af bakterier. Dette system er beskrevet i kapitel 2.5.

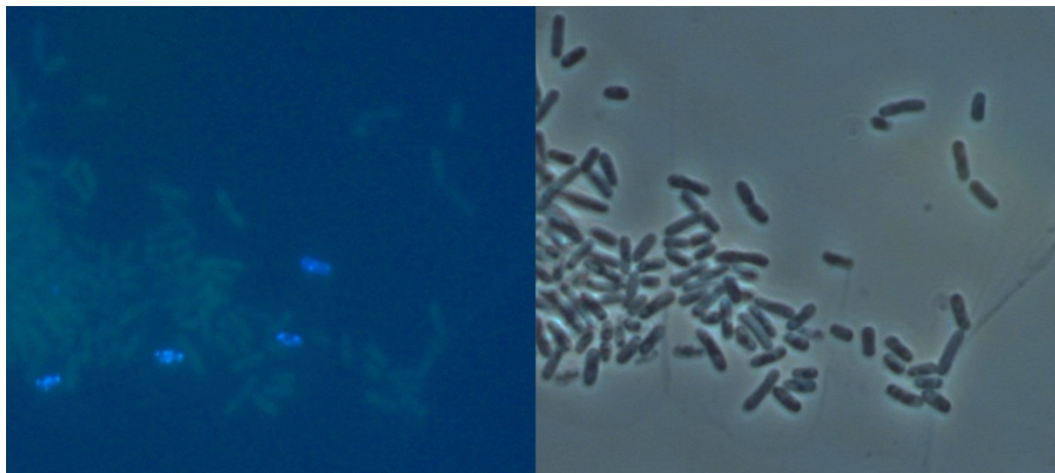
2.4 Fluorescensmærkning af bakterier

For at kunne detektere bakterier i dette system var der behov for at mærke de enkelte bakterier. Mærket var fluorescerende, hvilket betyder at når det blev udsat for lys af en særlig farve (også kendt som 'excitation') så responderede det ved at udsende lys af en anden farve (en proces kendt som 'fluorescens emission' [5]). Det udsendte fluorescerende lys kan måles præcist, og det varierer med mængden af mærkede bakterier, derfor kan en sensitiv og præcis måling af fluorescens bruges til at detektere forskellige kvantiteter af bakterier. Dette kapitel omhandler processen brugt til at vedhæfte fluorescerende mærker til bakterier og måling af processens effektivitet (dvs. hvor stor en del af bakterierne som blev mærket succesfuldt).

To typer fluorescerende mærker blev undersøgt, Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA) and Alexa 405. De to typer mærker blev vedhæftet bakterierne på forskellige måde. Alexa 405 bliver hæftet til overfladen af bakterierne, mens CFDA penetrerer bakterierne. De fluorescerende mærker blev undersøgt fordi projektsamarbejdspartneren havde erfaringer med CFDA, og fordi Alexa 405 passede med

fluorescensdetekteringssystemet udviklet til projektet. Detaljer ved fremgangsmåderne for vedhæftning af de to typer af fluorescerende mærker (kaldt 'protocols') er givet i Bilag 1.

Mærkningsprocessen blev testet med forskellige vandforhold for at undersøge processen under realistiske forhold. Vedhæftningen af de fluorescerende mærker til bakterierne blev observeret ved brug af et mikroskop. Der blev foretaget en sammenligning af billeder af fluorescerende lys med almindelige billeder ('bright field'). Et typisk eksempel er vist i Figur 5.



Figur 5 - Billeder af bakterier med fluorescerende mærker - (til venstre) fluorescerende billede, (til højre) 'bright field' billede.

Baseret på mikroskopbillederne blev antallet af mærkede og umærkede bakterier talt for forskellige vandforhold (for eksempel, med hårdt vand og vand med chlorid). Tabellen nedenfor (Tabel 1) viser detaljer om effektiviteten af mærkningen afhængig af anvendt mærke (CFDA, Alexa 405) og vandforhold.

Fluorescens mærker	Procent af bakterier vedhæft for forskellige vandforhold				
	Postevand	Deioniseret vand	Klorholdigt vand	Hårdt vand	Næringsrigt medium
CFDA	26	18	5	70	28
Alexa 405	7	4	7	18	52

Tabel 1: Effektivitet af bakterier mærkning ved brug af CFDA og Alexa 405 mærker i forskellige vandforhold

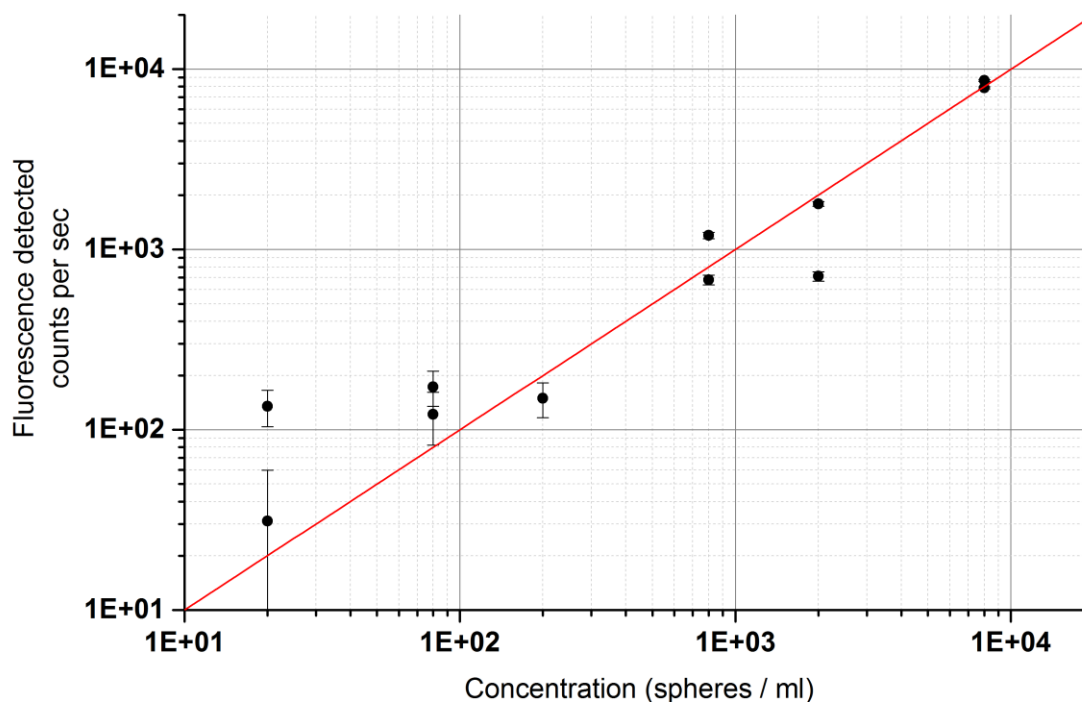
Fluorescensdetekteringssystemet blev udviklet for at kunne operere med de Alexa 405 fluorescerede mærker og maksimal mærkningseffektivitet blev målt som 52 % for en speciel type væske kaldt 'næringsrigt medium' brugt i laboratorier til eksperimenter med bakterier. Mærkningseffektiviteten var lavere for postevand (7 %), hvilket havde konsekvenser for det minimumniveau, som bakterier kunne detekteres ved. Dette er beskrevet nærmere i kapitler 2.5 og 3.

2.5 Detektering af bakterier

Detekteringen af bakterier blev opnået ved måling af ændringerne i lys fra prøven af bakterier med specielt kemisk mærker vedhæftet til dem (som beskrevet i kapitel 2.4), som producerede fluorescens lys. Lysets farve er defineret som 'bølgelængde'. Fluorescensdetekteringssystemet blev konstrueret ved brug af et fluorescerende mærke kaldet Alexa 405, som udsender lilla lys med en bølgelængde på 405 nanometer og udsender fluorescenslys med bølgelængder fra 420 nanometer til 500 nanometer (blå/grøn farve). Et diagram af systemet er vist i Bilag 2. Fluorescensprocessen blev startet (eller 'exciterede') med en laser lyskilde (fra Thorlabs Inc, produktnummer: CPS405), hvor laserlyset blev fokuseret på prøvebeholderen,

og fluorescenslyset fra prøven blev indsamlet ved brug af en optisk linse og sendt til en sensitiv lysdetektor (kendt som en photomultiplier tube, producerede af Hamamatsu Inc, produktnummer H10682-210). Optiske filtre blev brugt for at sikre, at de korrekte fluorescensbølgelængder blev detekteret (se Bilag 2 for detaljer).

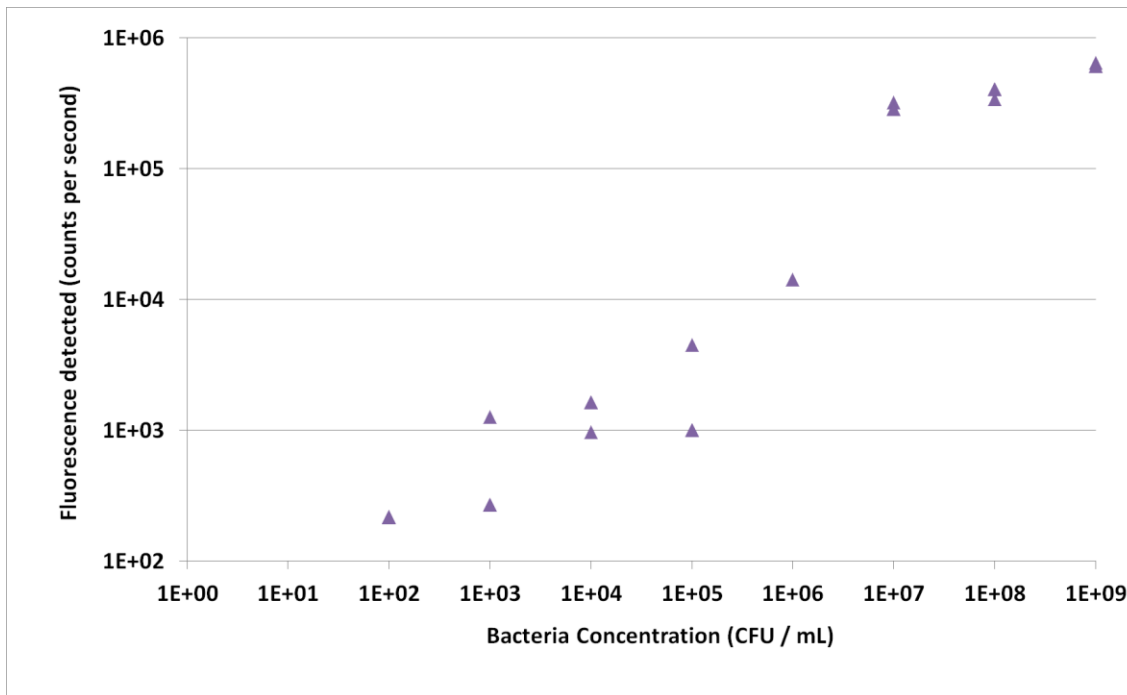
En grundlæggende test af fluorescensdetekteringssystemet blev lavet med prøver af fluorescerende referencepartikler (med en diameter på 2 mikrometer, produktnummer FP2045-2 fra Spherotech Inc) som en model for fluorescerende mærkede bakterier. Det detekterede fluorescenslys blev målt for forskellige koncentrationer af referencepartikler tørret på et objektglas som vist i Figur 6.



Figur 6 – Detekterede fluorescens fra varierende koncentrationer af fluorescerende referencepartikler

Resultaterne viser at systemet var i stand til detektering af fluorescens fra prøver med referencepartikelkoncentrationer på 200 referencepartikler per milliliter.

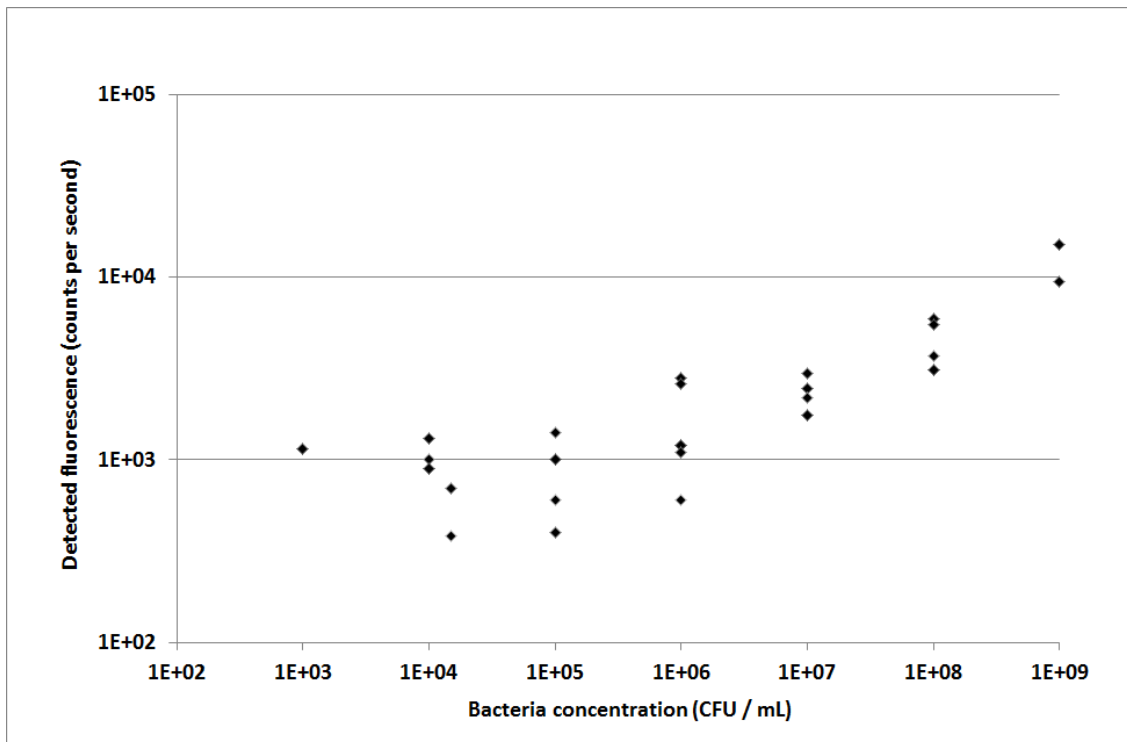
Yderligere tests blev lavet med *E. coli* bakterier som var mærkede med det fluorescerende mærke Alexa 405, som beskrevet i kapitel 2.4. Det første sæt målinger blev lavet med Alexa 405, som var vedhæftet til et punkt på bakterierenes overflade (kaldt 'non-specific' mærkning) og en sekvens af prøver med faldende bakteriekoncentration blev lavet og tørret på objektglas. Fluorescensmålinger fra disse prøver er vist i Figur 7.



Figur 7 – Detekterede fluorescens fra varierende koncentrationer af bakterier med 'non-specific' mærkning med Alexa 405.

Resultaterne fra Figur 7 viser at fluorescendetekteringssystemet var i stand til at detektere fluorescens fra en tørret prøve af bakterier ned til en koncentration på 100 CFU/mL, i tilfælde af at bakterierne havde 'non-specific' mærkning.

En ulempe ved 'non-specific' mærkning er, at anden kontaminering i vand kan være vedhæftet til Alexa 405 og forårsage et højere fluorescenssignal og dermed give en falsk indikation af tilstedeværelsen af *E. coli* bakterier. Derfor er en yderligere raffinering af mærkningsprocessen at vedhæfte Alexa 405 mærkerne med to ekstra kemiske komponenter, to proteiner kendt som 'antibodies' som kun vedhæftes *E. coli* bakterier. Mærkningsprocessen er beskrevet i Bilag 1. En yderligere test af fluorescendetekteringssystemet blev foretaget ved måling af forskellige koncentrationer af bakterier mærket med antibodies og Alexa 405. Prøven blev tørret på objektglas. Resultatet af testen er vist i Figur 8.



Figur 8 - Detekterede fluorescens fra varierende koncentrationer af bakterier med antibody-baseret mærkning ved Alexa 405.

Bakterierne mærket med antibody-baseret mærkning producerede et lavere niveau af fluorescens end før. Det betyder, at systemet var i stand til at detektere en bakteriekoncentration på minimum 10^5 CFU/mL. Der var en grænse for fluorescensdetektering af bakterier på grund af uønskede fluorescens signaler oprettet fra glas beholderen, som indeholdt bakterieprøven.

2.6 Automatisk måling proces

Et automatisk bakteriedetekteringssystem blev produceret ud fra de tre metoder beskrevet tidligere; bakterieseparering ved brug af centrifugering, fluorescerende mærkning af bakterier og fluorescensdetektering. Det kombinerede system er vist i Figur 9. Fluorescensdetekteringssystemet blev monteret på siden af det spin coater system som blev brugt til bakterieseparering. En mekanisk lukker tilføjet for at kontrollere lys i fluorescensdetekteringssystemet, og et kabinet blev placeret over hele systemet for at sikre mørke forhold under fluorescensmålingen.



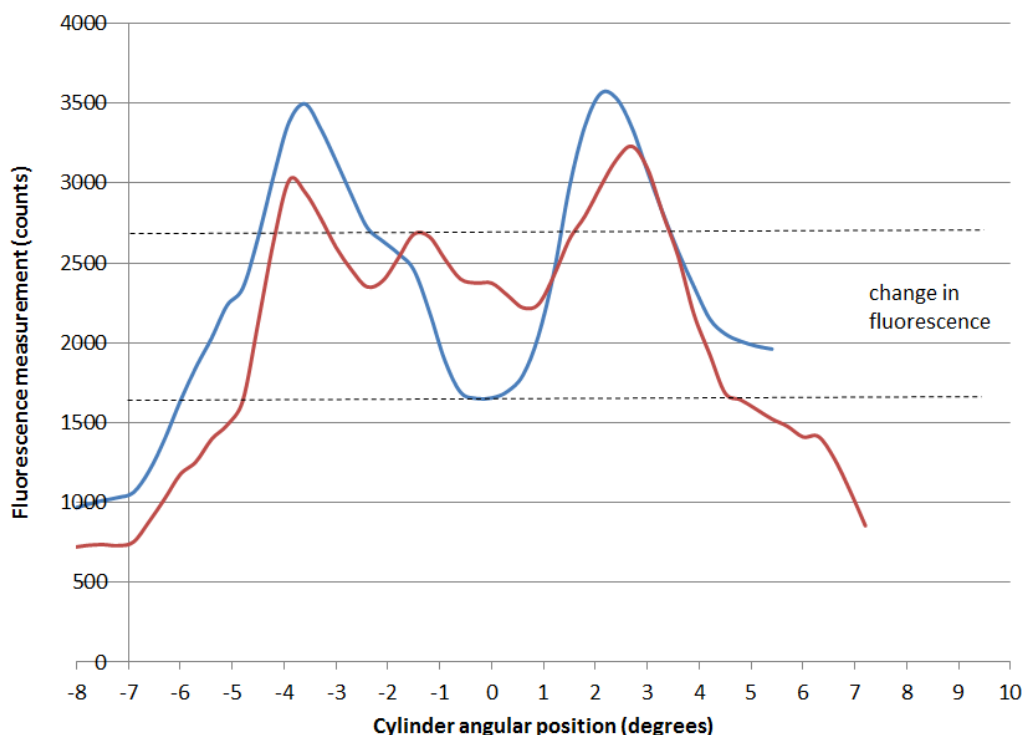
Figur 9 – (venstre) Kombinerede system for bakterier separering og fluorescens detektering (højre) systemet med et kabinet

En proces blev udviklet til at blande en prøve af vand og bakterier med fluorescerende mærker i beholderen, separerer bakterier fra vandprøven og endelig, til at måle fluorescens. Processen blev automatisk kontrolleret ved brug af elektronik-signaler fra diverse dele af systemet. Elektroniksignalerne blev sluttet sammen via elektronik (fra National Instruments Inc, produktnummer NI USB 6361) og processens sekvens blev kontrolleret ved in-house software skrevet med Labview software [6] som blev brugt på en bærbar. Dette software forudsatte, at fluorescensdetekteringsresultaterne indikerede tilstedeværelsen af bakterier i vandprøven.

Det automatiske system blev testet først med en prøve af vand og fluorescerende referencepartikler. Referencepartiklerne blev adskilt fra vandprøven og placeret på enderne af prøvebeholderen ved brug af centrifugalkraft som beskrevet i kapitel 2.3, med en forbehandling af enderne af beholderen med poly-l-lysine. Prøven blev spundet med en hastighed på 3000 rpm i 600 sekunder. Fluorescensmålinger blev automatisk lavet før og efter referencepartiklerne blev adskilt ved centrifugering. Prøvebeholderen blev spundet ved en hastighed på 1 rpm. Resultaterne er vist i Figur 10.

Resultaterne viser en ændring i fluorescens efter tilsætning af referencepartikler og separering ved centrifugering. Koncentrationen af referencepartikler i prøven var 4.5×10^5 partikler per milliliter. Ændringen i fluorescens (1028 counts) stemte overens med tidligere fluorescensmålinger fra prøver af referencepartikler med lignende koncentrationer.

Det automatiserede system blev testet i projektpartnerens laboratorium (Københavns Universitet) for at demonstrer separering og detektering af bakterier i en vandprøve, hvor bakterierne var fluorescensmærket før starten af målingen. Tre koncentrationer af bakterier blev testet (10^5 , 10^4 , 10^3 CFU / mL) og resultatet ved den højest koncentration gav et fluorescerende signal som forventet, men de to lavere koncentrationer opførte sig ikke som forventet. Efter undersøgelse ved brug af et mikroskop, blev det opdaget, at prøvebeholderen var kontamineret, hvilket påvirkede fluorescensmålingen.



Figur 10 – Fluorescensmålinger før tilsætning af referencepartikler til prøven (blå linje) og efter tilsætning af referencepartikler til prøven og adskillelse ved centrifugering (rød linje).

Et computerstyret væskesystem blev udviklet til at levere væskeprøver i den følgende sekvens:

1. En 6 mikroliter dråbe af bakterier vedhæftet stoffet poly-l-lysine
2. Bakterieprøve i vand (milliliter volumen)
3. En 100 mikroliter dråbe af fluorescerende mærke (Alexa405 med antibodies)
4. Skyllevand for brug efter trin 2 og 3
5. Rengøringsvæske til at fjerne bakterier og kemikalier brugt i trin 1 og 3

Væskesystemet blev integreret i det automatiske system. Funktionaliteten af systemet blev bevist for individuelle trin i sekvensen, men på grund af tidsbegrænsninger, var det ikke muligt at teste det for samlede system.

3. Konklusion

Vi har undersøgt en ny automatiseret teknik til at detektere *Escherichia coli* bakterier i drikkevand, ved at bruge en kombination af teknologier til separering af bakterier fra en vandprøve med efterfølgende detektering. En automatisk prototype er blevet udviklet til at udføre bakteriesepareringen ved brug af en kraft genereret under en spindingsbevægelse i et tilpasset centrifugesystem. Bakteriernes detektering skete ved sensitiv måling af lys produceret af fluorescerende mærker, som var vedhæftet bakterierne. En undersøgelse af processen for fluorescensmærkning er ligeledes udført i projektet.

En prototype blev succesfuldt anvendt til at detektere bakterier som var præ-mærket med et fluorescerende mærke. Systemet indsamlede og separerede bakterier fra en vandprøve med en volumen på 0,1 mL. Detekteringen af bakteriernes tilstedeværelse med en detekteringsbegrænsning på 10^5 'colony forming units per milliliter' (CFU per mL) foregik i et tidsrum på kun 20 minutter. Et computerstyret væskesystem blev udviklet til at automatisere processen der styrer leveringen af prøvevandet og relaterede kemikalier. Principielt kan systemet implementeres i en vandværkfacilitet for fjernstyret detektering af bakterieforurening i vandet.

Systemets specifikation blev designet til at indsamle og detektere *E. coli* bakterier fra en vandprøve på 100 mL og til at detektere en bakteriekoncentration af 1 CFU/mL. Under projektets forløb har det vist sig, at de anvendte teknikker ikke kunne opfylde denne specifikation. Der er tre områder, hvor systemet kan forbedres:

a) Fluorescens detektering

I tests udført i projektets startfase, kunne der fluorescensdetekteres en bakteriekoncentration på 100 CFU/mL. Den lavere detekteringsgrænse (10^5 CFU / mL) i prototypen er påvirket af uønsket fluorescenssignaler fra prøvebeholderen i systemet. Ligeledes var processen for at vedhæfte fluorescerende mærker kun optimeret til approx. 50 % effektivitet (under ideelle vandbetingelser). Fremtidigt arbejde bør adressere disse udfordringer. En løsning vil være at skifte de fluorescerende mærker ud med en ny type, som giver højere vedhæftningseffektivitet til *E. coli* bakterier, for eksempel en kvantum prik [7]. Dermed kan fluorescensen skiftes (dvs. man skifter fluorescensfarven), så problemet med baggrundsfluorescens fra prøvebeholderen reduceres.

b) Bakterieindsamling og separering

Teknikken til bakterieindsamling afhænger af at vandprøven kan spindes med høj hastighed. Til dette kræves særlige mekaniske komponenter for at holde prøven under selve spindingsprocessen. For at udføre bakterieindsamling i en vandvolumen på 100 ml, er det nødvendigt at forbedre beholderens design, f.eks. en holder fra et 'continuous flow centrifuge' system [8]. Der bør udvikles en sådan prøveholder, som tilpasses det eksisterende system for fluorescensmålinger.

c) Optimering af automatisk detekteringsproces

Det forbedrede system bør testes grundigt, og det automatiske væskesystem bør tilpasses realistiske måleforhold, for eksempel i en vandværksfacilitet.

Litteratur

- [1] Zhu P., Shelton D. R., Li S., Adams D. L., Karns J. S., Amstutz P., & Tang C.-M. (2011). Detection of *E. Coli* O157:H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay. *Biosensors & bioelectronics*, 30(1), 337–41
- [2] Schaff U. Y. and Sommer G. J. (2011) Whole blood immunoassay based on centrifugal bead sedimentation, *Clinical Chemistry* 57 (5), 753-761
- [3] Colville K., Tompkins N., Rutenberg A. D. and Jericho M. H. (2009) Effect of Poly-l-lysine substrates on attached *Escherichia coli* bacteria, *Langmuir* 26 (4), 2639-2644.
- [4] Image J website – se <http://imagej.nih.gov/ij/>
- [5] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006), Springer (Singapore)
- [6] Labview website – se <http://denmark.ni.com/labview>
- [7] Quantum dot provided by Life Technologies Inc.
Se <http://www.lifetechnologies.com/dk/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/qdot.html>
- [8] Se <http://www.scientificmethods.com/CFC2.html>

Bilag

1. Fluorescerende mærkning af bakterier

Labelling of bacteria with CFDA:

- a) Bacteria (1 ml) are harvested by centrifugation at 10,000x g for 2 min and 30 sec and resuspended in 1ml citric acid-phosphate buffer (pH 7).
- b) Add glucose (10 µl) and probe; CFDA-SE (10 µl). Keep tube covered with tin foil as the probe is light sensitive.
- c) Incubate for 37 °C for 30 min. Harvest bacteria at 10,000x g for 2 min and 30 sec. and resuspended in 1ml Citric acid phosphate buffer.

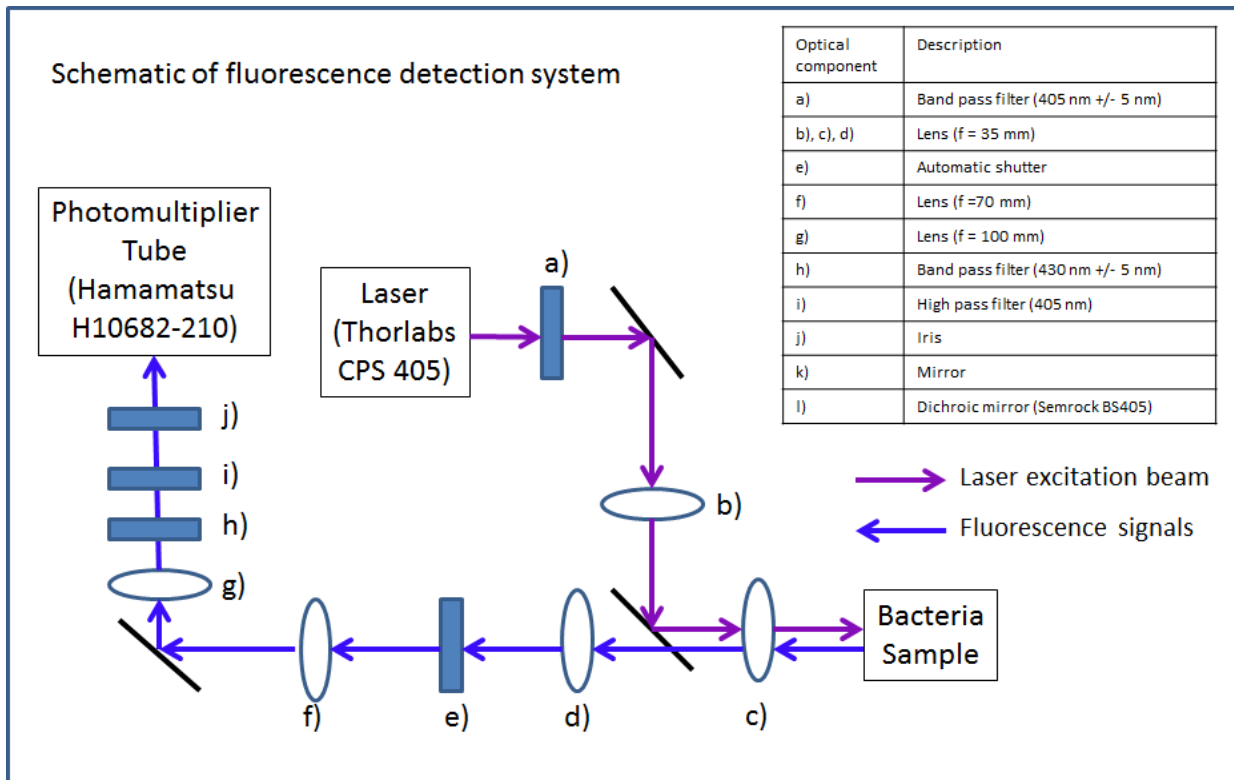
Labelling of antibodies with Alexa 405 fluorophores


- a) Dissolve ~10mg of the protein (antibody) in 1ml 100mM Borax buffer pH 8.3 (1-10 ng/µl)
- b) Dissolve the amine reactive dye in DMSO at mg/ml. Slowly add 50-100 µl of the Alexa 405 dye
- c) Incubate for 1 hour at room temperature. Equilibrate a 10x300mm gel filtration column (sephadex G-25) with PBS (Phosphate buffered Saline, pH 7.4)
- d) Separate the conjugate on the gel filtration column

Labelling of bacteria with Alexa405 bound to antibody

- a) Take 2 samples of bacteria, concentrations of bacteria ~10⁹ and ~10⁸
- b) Centrifuge 10min. at ~5000 g
- c) Remove supernatant, add 1ml borax (to wash pellet for amines from medium)
- d) Centrifuge 10min. at ~5000 g.
- e) Resuspended each in 1ml borax and use 100 µl of each concentration for labeling experiment.
- f) Add Alexa fluor 10 µl.
- g) Wrap in tin foil and leave at room temperature for 60min (can also be incubated at 37 deg C for 30 mins)

2. Diagram af system til fluorescens detektering





Naturstyrelsen
Haraldsgade 53
DK - 2100 København Ø
Tlf.: (+45) 72 54 30 00

www.nst.dk