

Bakterielle Biosensoren zur Bestimmung von Arsen im Trinkwasser

Weltweit stellt Arsen eine der bedeutendsten anorganischen Verunreinigungen im Trinkwasser dar. Besonders alarmierend ist die Situation in Bangladesch, wo über eine Million Menschen schon heute an Arsenvergiftung leiden. Um jeden einzelnen der etwa neun Millionen Trinkwasserbrunnen in privaten Haushalten zu untersuchen, ist eine kostengünstige, zuverlässige und sensible Methode erforderlich. Aus diesem Grund hat ein Team der EAWAG einen neuen Biosensor für Arsen entwickelt. Der Papierstreifen-Test verwendet genetisch veränderte Bakterien, die sogar bei niedrigen Arsenkonzentrationen eine Blaufärbung produzieren. Die EAWAG hat für diesen Biosensor ein Patent angemeldet.

Anorganisches Arsen ist eine weltweit verbreitete Verunreinigung im Trinkwasser [1–3]. Gewöhnlich geochemischer Herkunft, kommen Arsenat und Arsenit im Grundwasser in Konzentrationen von bis zu 1 oder 2 mg pro Liter vor. Der zulässige Grenzwert für Arsen im Trinkwasser liegt in den meisten Ländern bei 10 µg oder 50 µg pro Liter. Bei anhaltender Belastung durch Arsen – selbst bei niedrigen Konzentrationen um 50 µg Arsen pro Liter – ist das Risiko, an einer Arsenvergiftung oder an einem durch Arsen ausgelöstem Krebsleiden zu erkranken, stark erhöht. Daher ist es wichtig, dass arsenhaltiges Wasser nicht als Trinkwasser verwendet wird. Unglücklicherweise haben jedoch gerade jene Regionen der Welt mit der höchsten Arsenbelastung im Trink-

wasser gleichzeitig die schlechteste wissenschaftliche Infrastruktur, so z.B. Bangladesch und Vietnam [1, 2]. Ausserdem ist die Trinkwasserversorgung in beiden Ländern sehr lokal organisiert, d.h., die einzelnen Haushalte haben alle ihren eigenen Brunnen mit Handpumpe. Es hat sich nun herausgestellt, dass ein einmaliger Nachweis der Trinkwasserbelastung durch Arsen in solchen Brunnen nicht ausreichend ist, da die Arsenkonzentrationen lokal und jahreszeitlich stark schwanken. Aus diesem Grund ist die regelmäßige Überwachung der Trinkwasserqualität eine wesentliche Strategie zur Linderung der durch Arsen hervorgerufenen Probleme, solange keine wirksamen Methoden der Arseneliminierung zur Verfügung stehen.

Bestimmung der Arsenkonzentration

Arsen wird herkömmlich mittels kolorimetrischer Verfahren bestimmt, etwa mit der Quecksilberbromid-Färbemethode. Diese Methode, die als Basis in mehreren kommerziellen Feldmessungskits verwendet wird, ist jedoch erwiesenermassen im Bereich um 70 µg Arsen pro Liter und darunter nicht genau genug. Ausserdem entstehen Arsingas und Schwermetallabfälle (Zn, Hg, Sn). Dagegen ist der Nachweis von Arsen durch die Atomabsorptions-Spektrophotometrie oder die Atomfluoreszenz-Spektroskopie sehr genau und zuverlässig, setzt aber den Einsatz beträchtlicher finanzieller Mittel voraus. Deshalb entwickelte die EAWAG ein einfaches, genaues und kostengünstiges Testsystem für Arsen, das genetisch veränderte Bakterien als Biosensoren einsetzt. Wie war das möglich?

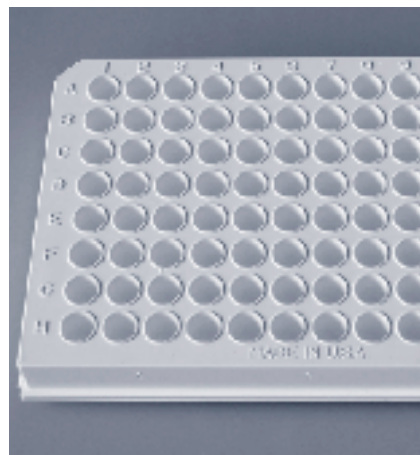
Die Abwehrstrategien von Bakterien gegen Arsen nutzen

Arsen ist nicht allein für Mensch und Tier schädlich. Selbst in einfachen Organismen wie Bakterien findet man eine Arsenunverträglichkeit. Bakterien wehren sich jedoch mit einigen relativ wirksamen biochemischen Strategien gegen Arsen, das in die Zelle eindringt (Abb. 1). Zwei gut bekannte

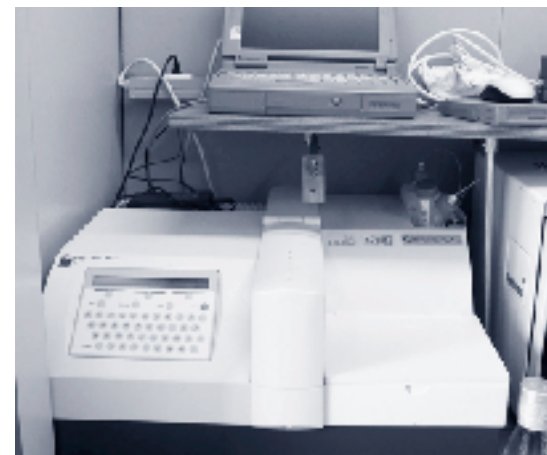


Fotos: J.R. van der Meer, EAWAG

Bakterienzellen des Licht produzierenden Biosensors müssen stets gekühlt aufbewahrt werden.



Beim Test werden die Zellen auf einer Mikrotiterplatte mit verschiedenen Wasserproben versetzt.



Im Luminometer wird die Stärke der Lichtemission und damit die Belastung der Wasserproben mit Arsen bestimmt.

vollständig, so dass kleine Mengen der ArsR, der Arsenatreduktase und der Arsenitpumpe stets vorhanden sind. Sobald Arsenit in die Zelle gelangt oder durch die Arsenitreduktase aus Arsenat gebildet wird, ändert ArsR sein Verhalten. Es heftet sich sofort an die Arsenverbindung und verliert damit die Affinität für die Andockstelle an der DNA mit dem Ergebnis, dass das Protein von der DNA «abfällt». Als Folge davon unterdrückt ArsR den Abwehrmechanismus nicht mehr und die Zelle produziert die Arsenpumpe und die Arsenatreduktase in grösseren Mengen.

Für die Entwicklung des Arsenbiosensors machten wir uns diese biochemischen Fähigkeiten von ArsR zunutze. Unser Interesse bestand allerdings nicht darin, dass der Abwehrmechanismus bei Anwesenheit von Arsen in der Zelle ausgelöst wurde, sondern darin, ein anderes, leicht messbares Protein oder Enzym zu erhalten. An dieser Stelle kommt die Gentechnologie ins Spiel, mit deren Hilfe Bakterienzellen soweit verändert werden, dass sie eine Lichtreaktion, ein Fluoreszenzsignal oder eine kolorimetrische Reaktion produzieren, wenn sie mit Arsenit in Berührung kommen [4]. Dazu verknüpften wir das Gen für das ArsR-Protein, die DNA-Bindungsstelle für das ArsR-Protein und das Reportergen, das für das Licht produzierende Enzym Luciferase

kodiert (Abb. 1). Nach Einschleusung dieser DNA-Konstruktion in *Escherichia-coli*-Bakterien lag der Biosensor im Prinzip fertig vor [5].

Ein präziser, Licht produzierender Biosensor

Wie wird der neue bakterielle Biosensor eingesetzt? In der einfachsten Variante werden die Biosensorzellen in flüssigem Nährmedium bis zu einer Dichte von etwa 2×10^8 Zellen je ml herangezüchtet. Die Bakterien werden abzentrifugiert, in einer glycerolhaltigen Salzlösung resuspendiert, in kleinere Portionen aufgeteilt und bei -80°C eingefroren. So behandelt, bleiben die Bakterien mehr als fünf Jahre lebensfähig. Für den Test werden die Zellen aufgetaut, zur Revitalisierung mit frischem Nährmedium verdünnt und mit der zu testenden Wasserprobe vermischt. Gleichzeitig wird eine Standardkalibrierung mit bekannten Arsenitkonzentrationen zwischen 0 und $0,5 \mu\text{M}$ (0 und $40 \mu\text{g}$ Arsen pro Liter) durchgeführt. Das Volumen der Untersuchungsmischung kann dabei mit $200 \mu\text{l}$ sehr gering sein, und knapp 100 Tests können gleichzeitig auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt werden. Für die Untersuchung inkubiert man die Zellen mindestens 30 Minuten bei 30°C . Ist die Wasserprobe mit Arsen belastet, wird die bakterielle Luciferase produziert. Nach der

Bakterienproteine sind gegen Arsenit- und Arsenationen im Einsatz: Das eine Protein funktioniert als Pumpe und befördert, eingebaut in die bakterielle Zellwand, jegliches Arsenit aus dem Zellinneren nach aussen, wo es keinen Schaden mehr anrichten kann. Das andere Protein ist die «Arsenatreduktase», die Arsenat zu Arsenit reduziert. Ausserdem ist ein weiteres Zellprotein nötig, um bei Anwesenheit von Arsen im Zellinneren die Abwehrreaktion auszulösen. Dieses als ArsR bezeichnete Protein ist ein Protein zur Arsenerkennung. Es hat zwei verschiedene Bindungskapazitäten. Ist kein Arsenit in der Zelle, heftet es sich an ein spezifisches Element der DNA und verhindert dadurch, dass die Gene für die Arsenabwehr vom Transkriptionsapparat abgelesen werden (Abb. 1). Die Unterdrückung ist jedoch nicht

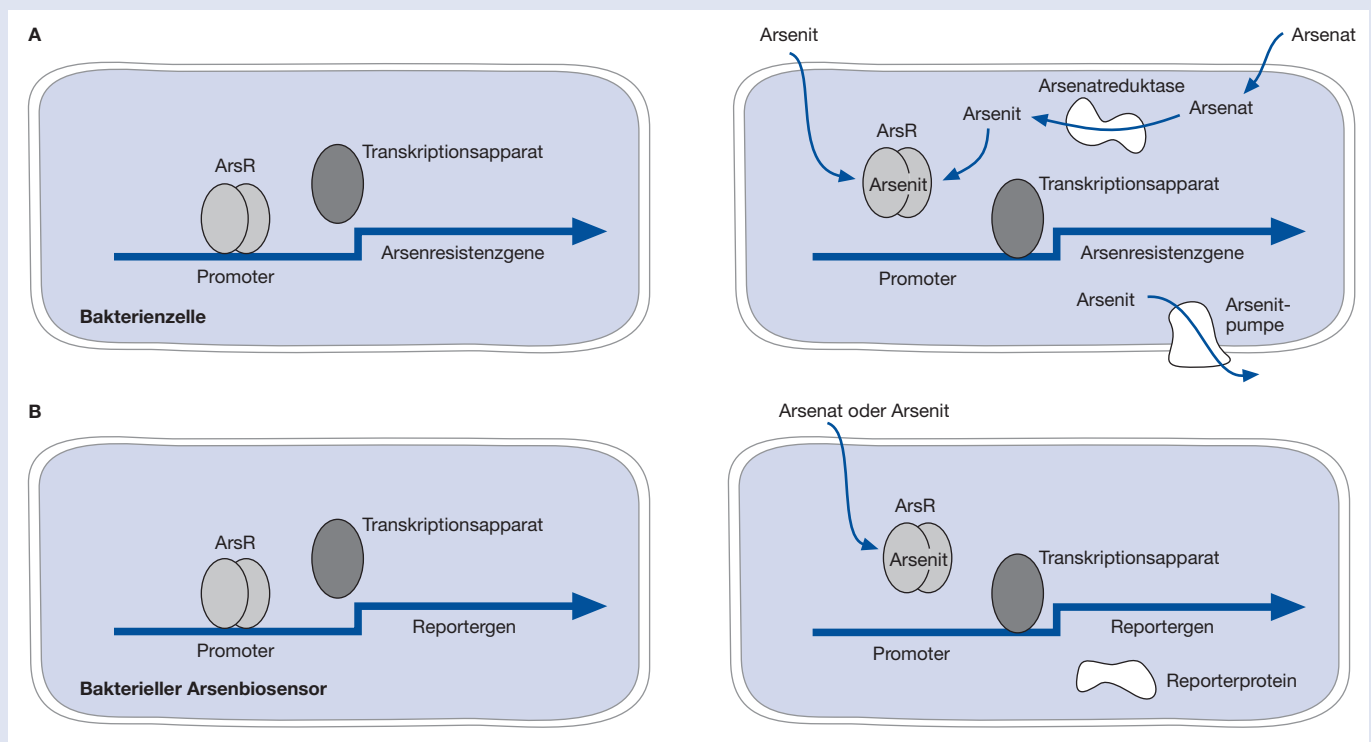


Abb. 1: Das Prinzip der bakteriellen Arsenabwehr (A) und des transgenen bakteriellen Arsenbiosensors (B). Bindet das ArsR-Protein an die DNA sind die nachfolgenden Arsenresistenzgene oder das Reportergen inaktiv. Sobald jedoch Arsenit in die Zelle gelangt oder aus Arsenat gebildet wird, heftet es sich an das ArsR-Protein, das daraufhin von der DNA abfällt. Damit kann der Transkriptionsapparat die vorher inaktiven Gene ablesen, so dass schliesslich die Arsenresistenzproteine (Arsenitpumpe und Arsenatreduktase) oder das jeweilige Reporterprotein (Luciferase, Grün-Fluoreszierendes-Protein oder β -Galaktosidase) gebildet werden.

Inkubation wird ein Tropfen Substrat für die bakterielle Luciferase (n-Dekanal) zugefügt, gemischt und die Lichtemission mit einem Luminometer gemessen. Die Eichkurve ist bei diesen Biosensorbakterien normalerweise zwischen 0 und 0,5 μM Arsenit linear (Abb. 2). Bei hohen Konzentrationen oder bei unbekanntenen Proben müssen verschiedene Verdünnungen getestet werden, um eine exakte Messung zu gewährleisten.

Ein einfacher Papierstreifen-Biosensor

Allerdings ist die Anwendung des oben beschriebenen Biosensors aus zwei Hauptgründen nicht einfach genug und bleibt ans Labor gebunden: Zum einen muss ein ziemlich teures Luminometer installiert werden, und zum anderen ist es bedenklich, im Feld mit flüssigen Bakterienkulturen zu hantieren. Daher versuchten wir, ein weiteres Biosensorsystem zu entwickeln, bei dem die genetisch veränderten Bakterienzellen auf kleinen Papierstreifen fixiert werden [5]. An Stelle des Luciferase-Reportergens, enthält dieses zweite System ein Gen für das Enzym β -Galaktosidase, das bei Anwesenheit von Arsen eine Farbreaktion hervorruft. Diese Biosensorzellen werden ebenso im Nährmedium gezüchtet, jedoch nach der Ernte mit einer Lösung gemischt, die verschiedene Zucker, Aminosäuren und Gelatine enthält. Geringe Mengen dieser Mischung werden mit einer Pipette auf Papierstreifen aufgebracht (Abb. 3) und vorsichtig bei kontrollierten Temperaturen und partiellem Vakuum getrocknet. Die Zellen auf dem Papierstreifen bleiben, gelagert bei Temperaturen zwischen -20 und 30 $^{\circ}\text{C}$, einen Monat lang aktiv. Für die Untersuchung wird ein Papierstreifen in ein Gefäß mit 1 ml Wasserprobe gelegt, 30 Minuten lang bei 30 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und herausgenommen. Ein Tropfen Substrat für das Enzym β -Galaktosidase wird auf den Papierstreifen

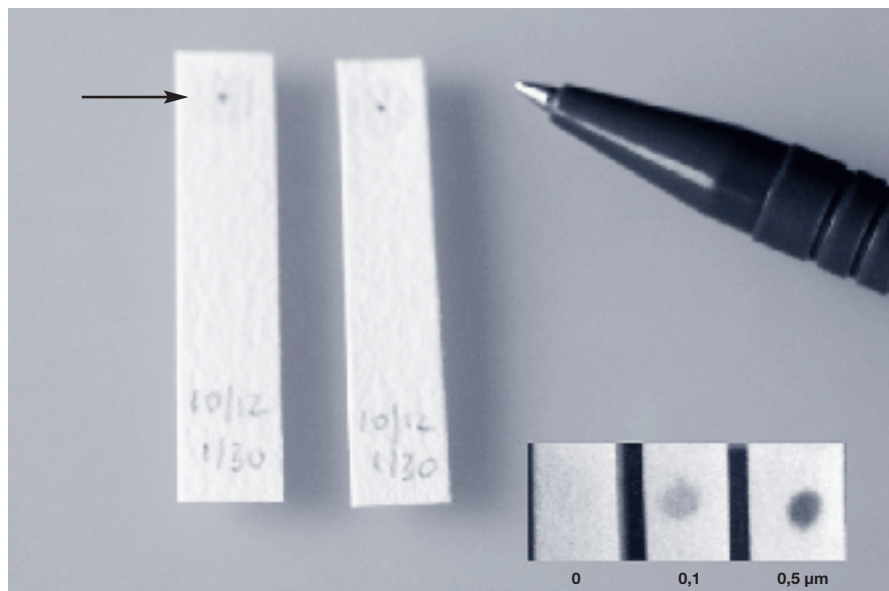


Abb. 3: Der Arsen-Papierstreifen-Test: Papierstreifen (4 cm x 0,5 cm) mit den aufgetragenen Bakterienzellen (Pfeil). Nach der Inkubation mit arsenithaltigen Proben produzieren die Zellen das Reporterprotein β -Galaktosidase. Die Aktivität dieses Enzyms kann durch Umwandlung eines Substrats in ein blaues Molekül sichtbar gemacht werden (unten rechts, hier als graublau Spots repräsentiert). Die Farbintensität hängt von der Arsenitkonzentration ab.

gegeben und – abhängig von der Menge an β -Galaktosidase – in ein blaues Produkt verwandelt. Die Farbintensität ist ein Mass für die Menge an Arsen, der die Zellen ausgesetzt waren. Im Vergleich mit einer Standardlösung von 10 μg oder 50 μg Arsenit pro Liter kann man beurteilen, ob die Arsenkonzentration über oder unter dem Grenzwert für Trinkwasser liegt (Abb. 3). Damit ist der Papierstreifen-Biosensor zwar weniger genau und hat eine kürzere Haltbarkeit als der flüssige Biosensor, ist jedoch für eine Anwendung im Feld besser geeignet.

Unbeantwortete Fragen

So weit die Laborpraxis. Viele wichtige Fragen und Probleme bleiben, ehe wir daran denken können, die Biosensoren ausserhalb des Labors routinemässig einzusetzen. Zum Beispiel: Wie kann die Qualität der Biosensorzellen (etwa ihr sofortiges Aktivationspotenzial) garantiert werden? Wie tauglich sind Biosensormessungen im Vergleich zu chemischen Verfahren? Beeinflusst die chemische Zusammensetzung der Wasserprobe die Reaktion des Biosensors? Wären lokale Behörden in Entwicklungsländern ausreichend qualifiziert, den Biosensortest zuverlässig durchzuführen? Was geschieht mit den genetisch veränderten Biosensorbakterien nach dem Test? Antworten auf diese Fragen können nur gewonnen werden, wenn man Schritt für Schritt vorgeht. Die EAWAG hat deshalb beim Europäischen Patentamt ein Patent für den Arsen-Biosensor beantragt und sucht derzeit nach möglichen Partnern in der Industrie, die sich für eine Lizenz der Arsen-

Biosensortechnologie interessieren und die Weiterentwicklung finanziell unterstützen würden.

Jan Roelof van der Meer, Portrait siehe Seite 8.

Koautorin: Judith Stocker

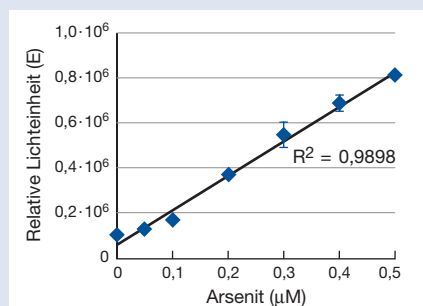


Abb. 2: Beispiel einer Eichkurve mit dem Licht produzierenden flüssigen Biosensor. Steigende Mengen Arsenit (in einem Bereich zwischen $0,05$ und $0,5$ μM) führen zu einer linearen Zunahme der Lichtproduktion durch die Biosensorzellen.

- [1] Hug S., Wegelin M., Gechter D., Canonica L. (2000): Nutzung von arsenhaltigem Grundwasser – katastrophale Folgen für Bangladesh. EAWAG news 49, 18–20.
- [2] Berg M. (2002): Arsen im Trinkwasser – neuer Brennpunkt Vietnam. EAWAG news 53, 12–14.
- [3] Pfeifer H.-R., Zobrist J. (2002): Arsen im Trinkwasser – auch ein Schweizer Problem? EAWAG news 53, 15–17.
- [4] Jaspers M.C.M., Totevova S., Demnerova K., Harms H., van der Meer J.R. (1999): The use of whole-cell living biosensors to determine the bioavailability of pollutants to microorganisms. In: Bavaye P., Block J.C., Goncharuk V.V. (eds.) Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 153–158.
- [5] Stocker J., Balluch D., Gsell M., Harms H., Feliciano J., Daunert S., Malik K.A., van der Meer J.R. (in press): Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid field measurements of arsenite and arsenate in potable water. Environmental Science & Technology.