

# Kolorimetrisches Sensorprinzip zur Detektion von Wert- und Schadstoffen in wässrigen Systemen

A. Blüher<sup>1</sup>, J. Jung<sup>1</sup>, G. Cuniberti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Werkstoffwissenschaft, TU Dresden, 01062 Dresden, Deutschland  
anja.blueher@tu-dresden.de

## Zusammenfassung

Zur Detektion von metallischen Ionen in wässrigen Systemen wurde ein Sensorprinzip auf kolorimetrischer Basis mit biofunktionalisierten Goldnanopartikeln (AuNP) entwickelt. Die kolorimetrische Detektion der Analyten erfolgte mit drei unterschiedlichen Oberflächenproteinen (S-Schichten) der Bakterienarten, *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12, *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 und *Sporosarcina ureae* ATCC 13881. Die Funktionalisierung von AuNP mit diesen S-Schichtproteinen wurde erfolgreich gezeigt. Mit den daraus resultierenden biohybriden, sensorisch aktiven Suspensionen wurden verschiedene Analytlösungen, wie unter anderem Yttrium(III)-chlorid, Kupfer(II)-nitrat, Kupfer(II)-sulfat und Tetrachlorogold(III)-säure, auf ihre Selektivität und Sensitivität der Anbindung der Metallionen untersucht.

**Keywords:** kolorimetrischer Sensor, bakterielle S-Schichten, Goldnanopartikel, AuNP, Metallionen

## Einleitung

Die sensorische Erfassung auch geringster Mengen an Wert- und Schadstoffen in unseren Wässern ist bedeutend für den Umwelt- und Ressourcenschutz. Das Ziel des Projektvorhabens BioSAM ist die Entwicklung hochselektiver Sensor-Aktor-Strukturen zum Zweck einer nachhaltigen Wasser und Ressourcennutzung. So sollen gering konzentrierte organische Schadstoffe aus Reinst- und Rohwässern eliminiert oder strategisch wichtige Metalle (wie Indium, Gallium, Seltene Erden) aus Bergbau- und industriellen Prozesswässern zurückgewonnen werden. Das hier vorgestellte Lösungskonzept zur Sensorik gering konzentrierter Wasserinhaltsstoffe basiert auf der Nutzung natürlicher bakterieller Isolate mit spezifischen Bindungsstrukturen. Eine Vielzahl von Bakterien besitzen als äußere Abgrenzung zur Umwelt Oberflächenproteine (S-Schichten) mit funktionellen Gruppen. Bedingt durch die Interaktion mit ihrer Umgebung bieten diese Anbindungsmöglichkeiten für Analyten, wie z.B. Ionen, Moleküle und Nanopartikel [1,2,3]. Die S-Schichten werden durch Bakterianzucht und Proteinaufreinigung gewonnen. Sie können zu Oligo- oder Monomeruntereinheiten aufbereitet und zur Biofunktionalisierung eingesetzt werden [4].

## Kolorimetrisches Sensorkonzept

Der Aufbau des kolorimetrischen Sensorsystems basiert auf der Wechselwirkung kolloidaler AuNP und den aus deren Plasmonenresonanz resultierenden optischen Eigenschaften. Sphärische AuNP-Lösungen absorbieren das Licht im grünen Wellenlängenbereich, wodurch die Lösung insgesamt rot erscheint. Durch die Destabilisierung der in der kolloidalen Lösung enthaltenen Nanopartikel, z.B. durch Zugabe von Salzen, werden die stabilisierenden elektrostatischen oder sterischen Kräfte zwischen den einzelnen AuNP stark verringert, was zur Agglomeration der Partikel in der Lösung und damit zu einem raschen Farbumschlag führt. Durch eine spezifische Wechselwirkung funktionalisierter AuNP erfolgt die Signalverschiebung durch die Überwindung der abstoßenden Kräfte durch höhere Bindungskräfte zwischen den Partikeln, z.B. durch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen [5]. Hierbei lässt sich die Sensitivität durch den Aufbau der funktionellen Schicht beeinflussen. Je nach Art und Konzentration des zugegebenen Analyten kommt es zur Agglomeration der AuNP, was ein Farbumschlag von rot nach blau signalisiert (siehe Abb.1).

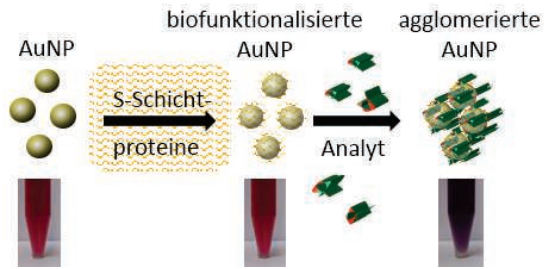


Abb. 1: Schematische Darstellung der Biofunktionalisierung der AuNP und des Sensorprinzips nach Zugabe der Analytlösung.

### Synthese und Charakterisierung der AuNP

Die sphärischen AuNP mit einem Durchmesser von 20-30 nm werden nach einer modifizierten Methode von Turkevich 1951 [6] synthetisiert. Dafür werden 100 ml einer  $0,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  unter ständigem Rühren zum Kochen gebracht. Dann werden 2 ml einer 1% Natriumcitratlösung zugegeben. Nach einigen Minuten erfolgt ein Farbwechsel von hellgelb über dunkelblau bis weinrot. Die Reaktion und Bildung der kolloidalen AuNP ist nach einer weiteren Stunde unter ständigem Rühren abgeschlossen. Die kolloidale Lösung wird langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit einem UV/Vis Spektrophotometer (Varian Cary 100 inc., Canterbury, Australien) gemessen. Das Absorptionsmaximum der AuNP mit einem Durchmesser von 20-30 nm liegt bei einer Wellenlänge von ungefähr 520 nm. Die Konzentration der Lösungen wird bei  $\text{OD}_{\max}$  auf 1 eingestellt (siehe Abb.4).

### Metallbindungsaktivität von Bakterien

Mikroorganismen können unter extremen Umweltbedingungen mit hohen Schadstoffkonzentrationen überleben und haben dafür verschiedene Strategien entwickelt, z.B. durch Anbinden toxischer Metalle an ihre S-Schichten [7]. Zur Untersuchung der Metalltoleranz von Bakterienarten werden diese mit verschiedenen Metallsalzlösungen inkubiert. Nach der Inkubation der Bakterienzellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12, *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 und *Sporosarcina ureae* ATCC 13881 in verschiedenen Analytlösungen (siehe Abb.2) wurde das Toleranzvermögen bzw. das Bindungsverhalten der unterschiedlichen Arten getestet. Die Metalltoleranz wurde mit Plattentests und dem Auszählen der gewachsenen Kolonien nach verschiedener Bebrütungszeit ausgewertet. Für das Metallbindungsverhalten wurden Zellproben nach der Inkubation mit Analytlösung für die

Rasterelektronenmikroskopie präpariert und untersucht (siehe Abb.3).

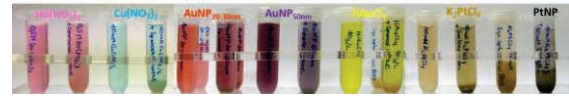


Abb. 2: Inkubation verschiedener Bakterienarten in unterschiedlichen Analytlösungen am Beispiel von *S. ureae* zur Untersuchung der Metalltoleranz und des Bindungsverhaltens.

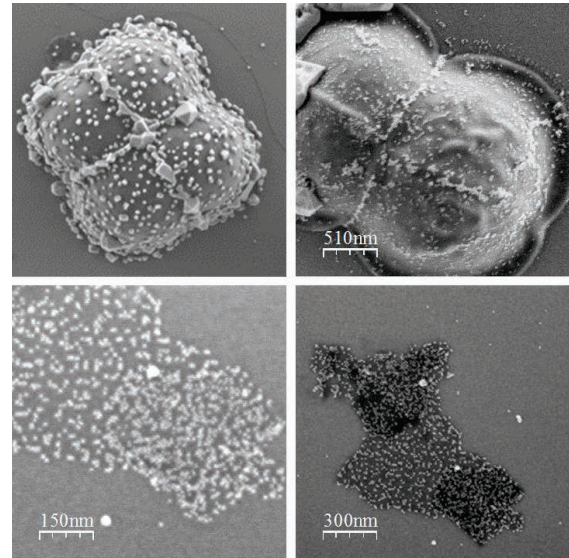


Abb. 3: REM Untersuchung zum Metallbindungsverhalten der Bakterien am Beispiel von *S. ureae*. Oben links: Bakterienzellen nach Inkubation mit AuNP-Lösung. Oben rechts: nach Inkubation mit Goldsalzlösung ( $\text{HAuCl}_4$ ). Die unteren beiden zeigen die dazugehörigen S-Schichten. Angebundene AuNP sind als helle Punkte deutlich sichtbar.

Die S-Schichten dieser Bakterienarten wurden umfassend charakterisiert und zur Funktionalisierung der Goldnanopartikel eingesetzt.

### Funktionalisierung und Charakterisierung der AuNP

Zur Herstellung der sensorisch aktiven Lösungen werden die zuvor synthetisierten AuNP mit den S-Schichten funktionalisiert. Die optimale Konzentration der Proteinmonerlösungen wird mit einem sogenannten Salzttest ermittelt [8]. Dazu werden jeweils 50  $\mu\text{l}$  unterschiedlicher Proteinkonzentration mit 100  $\mu\text{l}$  AuNP konstanter Konzentration ( $\text{OD}_{\max}=1$ ) vermischt, bevor jeweils 10  $\mu\text{l}$  einer 10%igen NaCl-Lösung dazugegeben werden. Nach mindestens 5 minütiger Inkubationszeit

lässt sich die minimale Proteinkonzentration ermitteln, welche die AuNP-Lösung nach Zugabe des Salzes noch effektiv stabilisiert. Diese sollte eine deutlich hellrote Färbung aufweisen, während unzureichend stabilisierte Lösungen blau gefärbt sind. Mit der ermittelten Proteinmenge der Monomerlösungen von Slp1 (*L. sphaericus* JG-B53), slfB (*L. sphaericus* JG-A12) und SslA (*S. ureae*) werden jeweils 10 ml AuNP-Lösung über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die ungebundenen Proteine durch 2-3maliges Zentrifugieren bei 3000 g für 30 min bei 4°C abgetrennt.

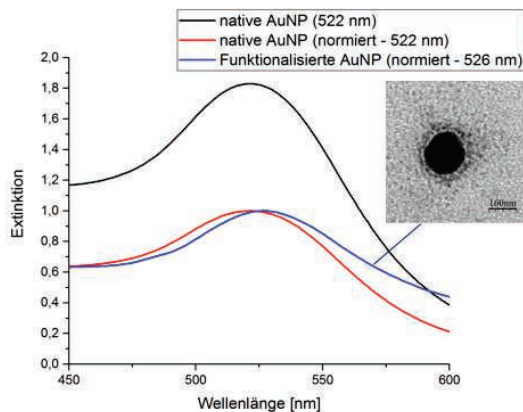


Abb. 4: UV/Vis Spektrum verschiedener AuNP-Lösungen. Frisch synthetisierte native AuNP mit  $OD_{522} = 1,8$ , Einstellung der AuNP auf  $OD_{522} = 1$  und nach erfolgreicher Biofunktionalisierung im Vergleich dargestellt. Insert: TEM Charakterisierung von SslA funktionalisierten AuNP mit Negativkontrastierung durch 2%iges Uranylacetat.

Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das Pelett aus funktionalisierten AuNP wird mit mit 0,1%igem Polyvinylalkohol (PVA) resuspendiert bis zur  $OD_{526} = 1$ . Die anschließende Charakterisierung der biofunktionalisierten AuNP erfolgt mit UV/Vis Spektroskopie und Transmissionselektronen-mikroskopie (TEM) (siehe Abb. 4).

### Sensorisch aktive AuNP-Suspensionen und Screening dreier S-Schichtproteine auf ihre Detektionskapazität verschiedener Analyte

Zur Untersuchung der biofunktionalisierten AuNP-Suspensionen werden diese mit unterschiedlichen Analytlösungen getestet. Hierzu werden Verdünnungsreihen der Analytlösungen hergestellt und jeweils gleiche Volumen von 20  $\mu$ l zur Referenzlösung (AuNP) und zu 100  $\mu$ l der biofunktionalisierten

Messlösungen (z.B.: slfB-AuNP oder SslA-AuNP) pipettiert. Bei einer Anbindungsreaktion ist nach kurzer Zeit (5 min) eine Farbänderung von hellrot nach lila oder blau sichtbar und spektroskopisch messbar (siehe Abb.5).

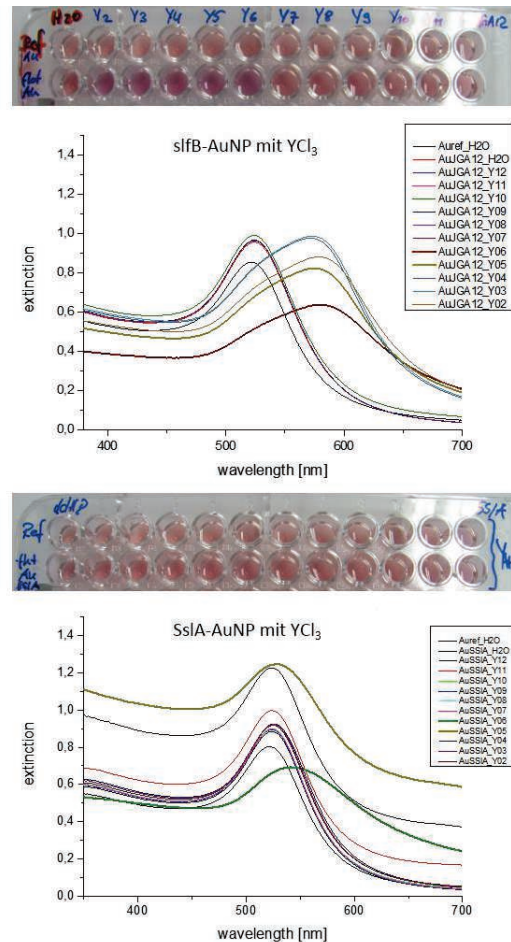


Abb. 5: Vergleich der Spektren sensorisch aktiver Suspensionen mit unterschiedlicher Biofunktionalisierung (slfB-AuNP oben; SslA-AuNP unten) mit den gleichen Verdünnungen der Analytlösung von  $YCl_3$ .

Mit dieser Methode lassen sich die unterschiedlich biofunktionalisierten AuNP auf ihre Bindungsreaktion zu verschiedenen Analytlösungen selektiv und sensitiv untersuchen. Die Detektion der Analyten wurde mit biofunktionalisierten AuNP der drei S-Schichten slfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12, Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 und SslA von *Sporosarcina ureae* ATCC 13881 untersucht. Die biohybriden, sensorisch aktiven Suspensionen wurden mit folgenden verschiedenen Analytlösungen getestet: Tetrachlorogold(III)-säure ( $H AuCl_4$ ), Kupfer(II)-nitrat ( $Cu(NO_3)_2$ ), Kupfer(II)-sulfat ( $CuSO_4$ ), Gallium(III)-nitrat ( $Ga(NO_3)_3$ ), Holmium(III)-nitrat ( $Ho(NO_3)_3$ ), Indium(III)-

chlorid ( $\text{InCl}_3$ ), Nickel(II)-chlorid ( $\text{NiCl}_2$ ), Kaliumtetrachloroplatinat(II) ( $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ), Samarium(III)-nitrat ( $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3$ ) und Yttrium(III)-chlorid ( $\text{YCl}_3$ ). Eine Reaktion der biofunktionalisierten AuNP auf den jeweiligen Analyten wird durch die Agglomeration der AuNP und einer resultierenden Farbänderung der Lösung von hellrot nach blau angezeigt. Die Untersuchungen zeigen verschiedene Reaktionsmuster (siehe Tab.1) und weisen ausserdem unterschiedliche Reaktionsbereiche auf. Daraus lassen sich selektive Bindungseigenschaften der unterschiedlichen S-Schichten für die getesteten Metallionen ableiten.

Tab. 1: Übersicht der kolorimetrischen Reaktionen für drei verschiedene S-Schichten und deren biofunktionalisierte AuNP-Lösungen mit 10 unterschiedlichen Analyten. Blau zeigt nach der Reaktion eine signifikante Farbänderung an, während hellrot keine Reaktion bedeutet.

Reference	Au (III)	Cu (II) ( $\text{NO}_3$ )	Cu (II) ( $\text{SO}_4$ )	Ga (III)	Ho (III)	In (III)	Ni (II)	Pt (II)	Sm (III)	Y (III)
<i>L. sphaericus</i> JG-B53 - Slp1	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>L. sphaericus</i> JG-A12 - slfB	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>S. ureae</i> ATCC 13881 - SslA	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue

Zum Vergleich und zum Beweis der Bindungsselektivität funktionalisierter AuNP wurde eine Referenzlösung von AuNP ohne Biofunktionalisierung mitgeführt, welche mit allen getesteten Analytlösungen keine Reaktion anzeigt. Die Biohybridsuspensionen reagieren dagegen mit verschiedenen Analytlösungen. Während SslA-AuNP mit allen Analyten eine Reaktion anzeigt, gilt dies für Slp1-AuNP nur für 4 und slfB-AuNP für 7 verschiedene Analyten. Das Vorhandensein von Ga(III)-Ionen wird nur von SslA-AuNP angezeigt während bei allen anderen Analyten mindestens 2 der verschiedenen S-Schichten eine Reaktion zeigen. Die beiden Analyten Au(III) und Cu(II)( $\text{SO}_4$ ) werden von allen 3 S-Schichtspezies detektiert. Interessant ist hierbei, dass Slp1-AuNP nicht mit Cu(II)( $\text{NO}_3$ ) reagiert. Dies bedeutet, dass auch die Form, in welcher die Ionen im Wasser vorliegen, einen Einfluss auf die Bindungsselektivität bestimmter S-Schichten hat. Auf diese Weise kann ein kolorimetrisches Screening für verschiedene Ionen im Wasser aufgebaut und zur Detektion genutzt werden.

## Ausblick

Der biotechnologische Einsatz von Bakterienzellen und Zellbestandteilen zur sensorischen Detektion und Akkumulation von Wertstoffen, wie Metallen und Seltenen Erden aus wässrigen Systemen ist durch die Bindungsaktivitäten der äußeren S-Schichten möglich. Dieser muss hinsichtlich der Selektivität und Sensitivität der verschiedenen Arten erforscht und optimiert werden.

## Danksagung

Die vorgestellten Ergebnisse entstanden in enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern vom Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR) und dem Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e. V. Meinsberg (KSI). Besonderer Dank gilt Manja Vogel, Sabine Matys und Mathias Lakatos. Dank geht auch an das BMBF für die Förderung des Projektes BioNEWS (FKZ:03WKCL03D) im Rahmen des Wachstumskerns BioSAM.

## Literaturnachweis

- [1] D. Pum, A. Neubauer, E. Györvary, M. Sara, U.B. Sleytr, *Nanotechnology* 11, 100-107 (2000); doi: PII S0957-4484(00)09528-3
- [2] M. Mertig, R. Kirsch, W. Pompe, H. Engelhardt, *The European Physical Journal D* 9, 45-48 (1999)
- [3] K. Pollmann, S. Matys, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1079-1085 (2007); doi: 10.1007/s00253-007-0937-5
- [4] A. Blüher, K. Ostermann, P. Jäckel, A. Clemens, B. Katzschner, G. Rödel, M. Mertig, *Engineering in Life Science* 00, 1-6 (2015); doi: 10.1002/elsc.201400182
- [5] M. Lakatos, *Dissertation TU Dresden* (2012)
- [6] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55-75 (1951)
- [7] K. Pollmann, J. Raff, M. Merroun, K. Fahmy, S. Selenska-Pobell, *Biotechnology Advances* 24, 58-68 (2006); doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.06.002
- [8] W.D. Geoghegan, G.A. Ackermann, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 25, 1187-1200 (1977)