

Schnellnachweis von unerwünschten Keimen in der Lebensmittelproduktion mittels Biochip

Rapid detection of bacteria during food production by biochips

B. HEIDENREICH, C. PÖHLMANN¹, M. SPRINZL¹ und M. GAREIS

¹Universität Bayreuth, Laboratorium für Biochemie

Zusammenfassung

Das Hygienerecht der EU verlangt die Kontrolle mikrobiologischer Kriterien während der gesamten Prozesskette der Lebensmittelherstellung. Klassische mikrobiologische Verfahren sind hierfür jedoch nur bedingt geeignet. Biosensoren in integrierten Analysesystemen könnten in Zukunft hierfür Verwendung finden und die Analytik beschleunigen und vereinfachen. Aus diesem Grund wurde die Eignung der elektrochemischen 16S ribosomalen RNA-Detektion mittels Biochip als Methode zum spezifischen Nachweis von Mikroorganismen in der Lebensmittelproduktion am Beispiel von *E. coli* und Fleisch untersucht. Die Optimierung der Probenvorbereitung und der Biochipmessung führte zu einem Gesamtanalyseprozess, bestehend aus Kurzanreicherung, RNA-Isolierung und Biochipmessung, der den spezifischen *E. coli* Nachweis von 1 KBE/ml Probe innerhalb von 7 Stunden ermöglicht und ist daher prinzipiell sehr gut für die Anwendung in der Lebensmittelproduktion geeignet.

Summary

According EU hygiene guidelines control of microbiological criteria has to be tested throughout the whole process of food manufacturing. While classical microbiological methods are less suitable for routine purposes, biosensors integrated in lab-on-a-chip systems could help to improve the situation in future. Therefore we tested the applicability of biosensors for the detection of bacteria in food by means of direct and specific electrochemical detection of microbial 16S ribosomal RNA. *E. coli* and meat matrix was used in this study. We developed an analysis procedure, including a short preenrichment step followed by an optimized RNA-isolation and biochip measurement that enabled *E. coli* detection of at least 1 cfu/ml sample within 7 hours. This diagnostic procedure is well suited for application in food production monitoring.

Schlüsselwörter Biosensor – ribosomale RNA – Detektion – Fleisch – *E. coli*

Key Words biosensor – ribosomal RNA – detection – meat – *E. coli*

Einleitung

Lebensmittelsicherheit und Prozesshygiene sind zentrale Anliegen der Lebensmittelindustrie. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Vermeidung von Kontaminationen mit hygienisch relevanten Keimen, wie z. B. *Escherichia coli* in der Nahrungsmittelproduktion. Dies gewann mit der Einführung des neuen gemeinschaftlichen Hygienerechtes am 01. Januar 2006 zusätzlich an Bedeutung.

Die derzeit in der Praxis verwendeten klassischen mikrobiologischen Methoden sind zeit- und kostenaufwändig und stellen insbesondere kleinere und mittlere Unternehmen (kmU) der Lebensmittelindustrie vor entsprechende Probleme, da wegen fehlender eigener Laborkapazitäten externe Dienstleistungsangebote angenommen werden müssen. Zudem bedingt die lange Dauer der klassischen mikrobiologischen Kontrolle eine Verzögerung der Prozesskette, was wiederum zu einer ver-

zögerten Produktfreigabe führt. Alternative immunologische und molekularbiologische Nachweisverfahren sind insbesondere in komplexen Matrices störanfällig und besitzen eine relativ hohe Nachweisgrenze oder benötigen kostenintensive Geräte, die nur von Fachpersonal bedient werden können.

Die Miniaturisierung immunologischer und molekularbiologischer Nachweismethoden mit Hilfe von Biosensoren ermöglicht die Integration des Nachweises von Bakterien in sogenannten Lab-on-a-Chip Systemen. Mit Hilfe solcher Systeme ist eine Automatisierungsstufe erreichbar, welche die Bedienung durch ungeübtes Personal ermöglicht. Biosensoren sind durch die direkte Verbindung eines biologischen Rezeptors mit einem physikalischen Transducer definiert. Der biologische Rezeptor kann hierbei vielfältiger Natur sein und beruht auf katalytischen oder Affinitäts-basierenden Rezeptoren oder auf Hybridisierung (Abb. 1).

Die Eignung eines derartigen Systems zum Nachweis von Bakterien während der Lebensmittelproduktion wurde in einem Kooperationsprojekt zum Schnelldurchweis für *Escherichia coli* auf allen Stufen der Lebensmittelproduktion über die direkte und spezifische Detektion bakterieller 16S rRNA untersucht.

Kernidee des Projektes war der direkte Nachweis 16S ribosomaler Ribonukleinsäuren (rRNA). Diese kommen als Bausteine der Ribosomen, den zellulären Produktionsstätten von Proteinen, in hoher

Zahl in jeder Bakterienzelle vor. Hierdurch sollen Amplifikationsschritte wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) vermieden werden. Die Detektion der 16S rRNA erfolgt elektrochemisch in einem Biochip mit Hilfe eines neuartigen Reporterenzym, der Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (PÖHLMANN *et al.*, 2007).

In dem über die AiF-FEI geförderten Forschungsprojekt (ZuTech-Forschungsvorhaben AiF 230 ZN) wurde eine 16S rRNA Nachweismethodik entwickelt sowie die biochemischen Parameter des Biochips und die Probenvorbereitung, bestehend aus RNA-Isolierung und einer Kurzanreicherung, optimiert.

Material und Methoden

Biochip-Detektion. Die entwickelte elektrochemische Nachweismethodik für 16S rRNA entspricht dem Prinzip einer Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung und wurde von PÖHLMANN *et al.*, 2009, detailliert beschrieben.

Die 16S rRNA Sequenz besteht aus alternierenden konservierten und variablen Regionen. Letztere unterscheiden sich oft bis auf Spezies Ebene und sind in der Regel mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad der Mikroorganismen ähnlicher zueinander. Das Detektionssystem besteht aus einem kurzen Molekül einzelsträngiger DNA, einem so genannten Oligodesoxynukleotid (ODN), das spezifisch an die variable Region fünf der *E. coli* 16S rRNA bindet, also hybridisiert.

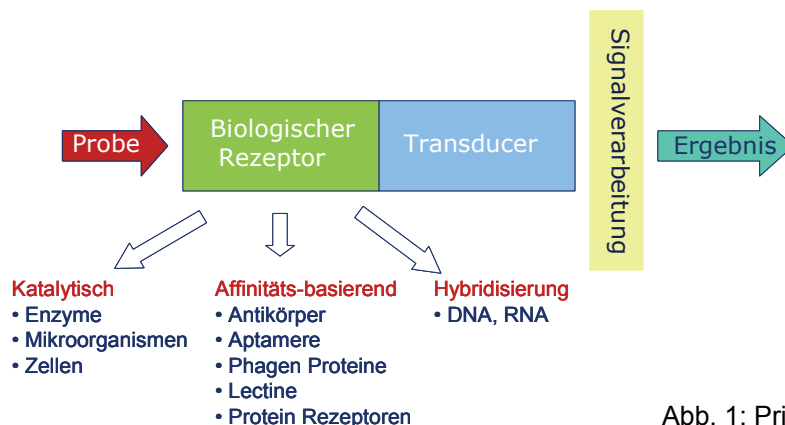


Abb. 1: Prinzip eines Biosensors

In der darauf folgenden konservierten Region wurden ein Detektor-ODN und ein Helfer-ODN entwickelt, welche an diese Bereiche hybridisieren. Das Detektor-ODN ist kovalent mit dem Reporterenzym Esterase 2 (EST2) verknüpft (vgl. Abb. 2).

Verwendet man isolierte Gesamt-RNA aus *E. coli*, enthält diese, neben anderen RNA Spezies, die 16S rRNA Zielmoleküle. Nach Fragmentierung der Gesamt-RNA wird diese zusammen mit den genannten Komponenten im Biochip hybridisiert. Der Biochip enthält vier Goldelektroden. Diese stellen die Biosensoren dar, an welche die biologischen Rezeptoren, die Fänger-ODNs für *E. coli* 16S rRNA gebunden sind. An diese Fänger-ODN binden die anderen Komponenten wie dargestellt und bilden ein Vier-Komponenten-Sandwich. Anschließend wird das Substrat p-Aminophenylbutyrat hinzugefügt, welches durch das Reporterenzym EST2 in das redox-aktive p-Aminophenol umgewandelt wird. Hierdurch entsteht ein Strom an der Goldelektrode, der gemessen wird.

RNA-Isolierung aus *E. coli*. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen), RNAqueous Kit (Ambion), PrestospinR Bug Kit (Molzym) und einer β -Version eines Nexttec RNA-Kits nach Angaben der Hersteller. Hierbei beinhaltete jedes Protokoll einen Lysozym-Verdau. Der Proteinase K Verdau wurde mit 10 μ l Proteinase K (>600 mAU/ml, Qiagen) für 10 min, 500 rpm bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ultraschallbehandlung in Verbindung mit dem RNeasy Kit erfolgte nach Zugabe des Lysepuffers für 1 min auf Eis in einem Sonoplus Ultraschallgerät (Bandelin) bei einer Amplitude von 100 %.

***E. coli* und Kultivierung.** Für die Experimente mit Reinkulturen und zur Inokulation von Fleischtropfsaft wurde *E. coli* 163, ein Isolat aus der MRI-Stammsammlung, verwendet. Ursprünglich wurde dieser Stamm aus Rohmilch Weichkäse isoliert. *E. coli* wurde über Nacht in Standard 1 (ST1) Bouillon (Merck, Darmstadt, Germany) bei 37 °C und 170 rpm kultiviert.

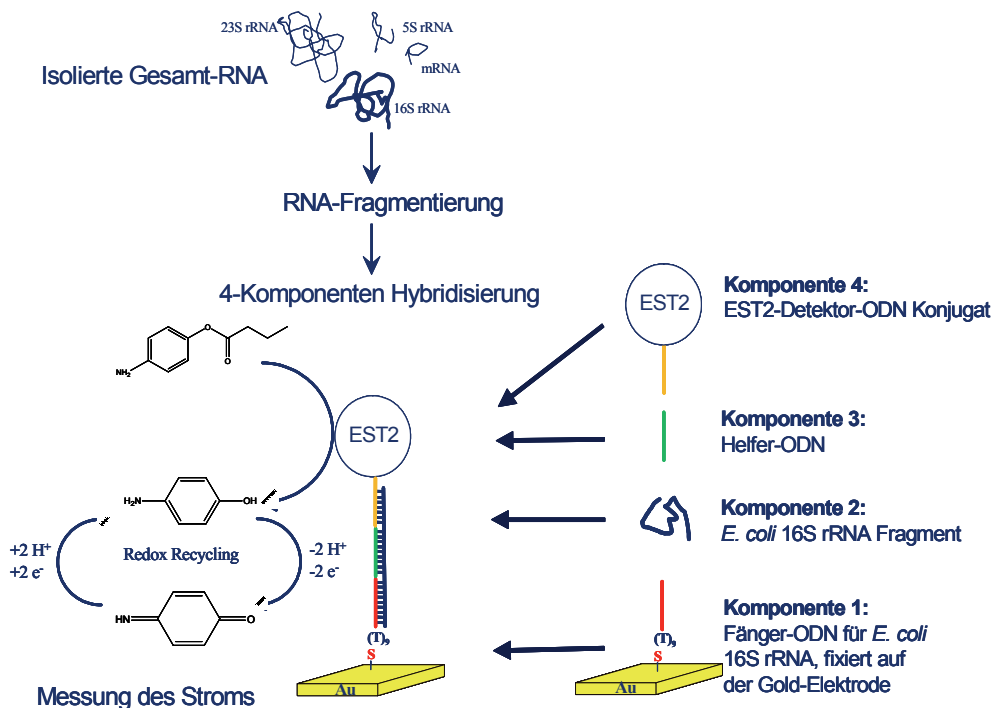


Abb. 2: Spezifischer Nachweis von *E. coli* 16S rRNA durch Vier-Komponenten-Hybridisierung und anschließender elektrochemischer Detektion mittels Biochip

Zur Herstellung einer exponentiellen *E. coli* Kultur wurde die Über-Nacht-Kultur 1:100 in frischer ST1 Bouillon oder gepuffertem Peptonwasser (BPW) (10,0 g Pepton-Casein, 5,0 g Natriumphosphat, 9,0 g Na₂HPO₄, 1,5 g KH₂PO₄, pH 7,2) verdünnt und 2 h wie beschrieben kultiviert. Die *E. coli* Keimzahl wurde durch Plattieren einer dezimalen Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl auf ST1 Agar Platten (24 h bei 7 °C) bestimmt. Pellets (10 min, 5000 xg, Raumtemperatur) von 1 ml Proben der Kulturen wurden direkt verwendet oder bis zur Bearbeitung bei -20 °C gelagert und auf Eis aufgetaut.

Fleischtropfsaft. Frischfleisch vom Schwein oder Rind wurde eingeschweißt in Plastikfolien für 3 bis 4 Tage bei 4 °C gelagert. Fleischtropfsaft wurde durch Einfrieren bei -20 °C für 24 h und Auftauen erzeugt. Der Fleischtropfsaft wurde entnommen und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Für Experimente zur RNA-Isolierung wurde der Fleischtropfsaft (900 µl) entweder mit *E. coli* (100 µl) versetzt oder natürlich mit *E. coli* kontaminierter Fleischtropfsaft verwendet und 1:10 bei 37 °C und 100 rpm für 5 Stunden in mTSB, Standard 1 Bouillon oder gepuffertem Peptonwasser (BPW) angereichert.

Mikrobiologische Methoden. Die Analyse der Bakterienpopulationen in Fleischtropfsaft und Anreicherungen erfolgte durch standardmikrobiologische Methoden. Die Gesamtkeimzahl wurde auf ST1 Agar nach 48 h Inkubation bei 30 °C bestimmt. Die Keimzahl für Coliforme und *E. coli* wurde mit Hilfe des ColiC Agar (Oxoid, 37 °C, 24 h) bestimmt. Milchsäurebakterien wurden auf MRS Agar (Merck, 30 °C, 48 h), Hefen auf Malzextraktagar (Merck, 25 °C, 3-4 Tage) und Pseudomonaden auf DHL Agar (Merck, 30 °C, 24 h) nach CO-Test, quantifiziert.

Ergebnisse

Selektivität des Biochips. Die Selektivität wurde anhand eines Biochips untersucht, dessen vier Goldelektroden jeweils mit Fänger-ODN für die nahe verwandten

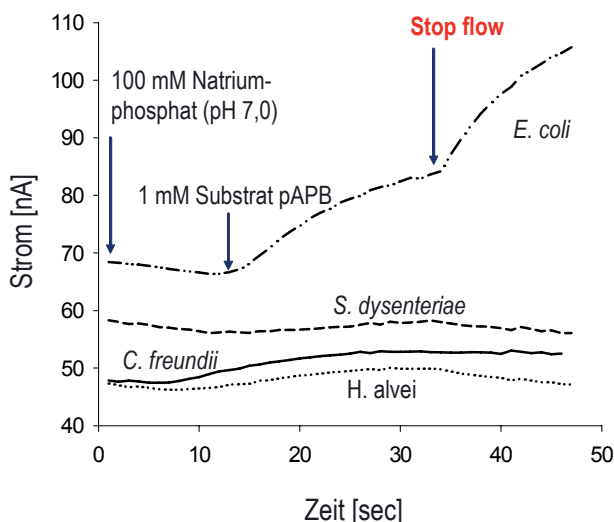


Abb. 3: Elektrochemische Detektion von *E. coli* 16S rRNA. Für die Negativkontrollen (*S. dysenteriae*, *C. freundii*, *H. alvei*) wurden keine Signale gefunden

Enterobakterien *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter freundii* und *Hafnia alvei* belegt waren. Nach Hybridisierung des Biochips mit *E. coli* Gesamt-RNA wurde die Detektionsreaktion durchgeführt. Nach kurzem Waschen mit Natriumphosphat wurde das Substrat im Durchfluss appliziert. Kurz bevor sich ein Gleichgewicht des Stroms einstellt, wird der Durchfluss gestoppt und es entsteht ein zweiter Anstieg des Stroms. Die Steigung dieses Anstiegs repräsentiert das Biochip-signal, angegeben als nA/s. Abbildung 3 zeigt, dass nur an der *E. coli* Goldelektrode ein messbarer Strom entstand, da mit *E. coli* Gesamt-RNA nur an dieser Elektrode Hybridisierungsereignisse stattgefunden haben. Hybridisierte man hingegen mit Gesamt-RNA der drei anderen genannten Enterobakterien war kein Stromanstieg an der *E. coli* Elektrode messbar. Diese Ergebnisse belegen, dass die entwickelte Hybridisierungsmethode einen hochspezifischen Nachweis für den gesuchten Keim ermöglicht.

Sensitivität des Biochips. Die Sensitivität der Biochip-Detektion wurde mit *E. coli* Reinkultur untersucht (Abb. 4). Hierzu wurde eine *E. coli* Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase dezimal verdünnt und anschließend die Gesamt-RNA mit der

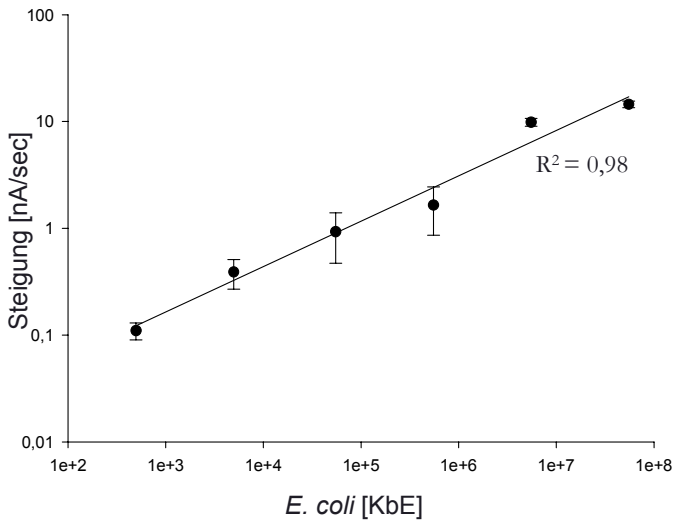


Abb. 4: Sensitivität des Biochips

Qiagen RNeasy Standardprozedur isoliert. Die Analyse dieser RNA im Biochip zeigte ein lineares Verhältnis zwischen mikrobiologischer *E. coli* Keimzahl und Biochip-signal mit einem Detektionslimit von 500 KbE. Dieses Detektionslimit bezieht sich auf die Menge Gesamt-RNA, die zur Hybridisierung im Biochip verwendet wurde.

Bezieht man den Schritt der RNA-Isolierung ein, wird in der Regel von 1 ml Probe die Gesamt-RNA isoliert. Diese RNA liegt letztendlich in einem Volumen von 50 µl vor, von dem jedoch nur 5 µl für die Hyb-

ridisierung im Biochip verwendet werden. Somit liegt die Nachweisgrenze des Biochips inklusive des RNA-Isolierungsschrittes bei 5000 KbE *E. coli* pro 1 ml Probe.

Vergleich von RNA-Isolierungskits. Die möglichst quantitative Isolierung der bakteriellen Gesamt-RNA aus einer Probe ist von großer Bedeutung für die Sensitivität des anschließenden Biochip Nachweises. Es findet sich eine Vielzahl kommerziell erhältlicher RNA-Isolierungskits auf dem Markt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an Gesamt-RNA von *E. coli* in der Lebensmittelmatrix Fleisch zu erzielen, wurden die Kits RNeasy (Qiagen), RNA-queous (Ambion), PrestospinR Bug (Molzym) und einer β-Version eines Nexttec RNA-Kits mit Fleischtropfsaft ($1,9 \times 10^6$ KbE), dem in dezimaler Verdünnung *E. coli* zugegeben wurde, verglichen (Abb. 5). Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach den Angaben der Hersteller, die in jedem Fall einen Lysozymverdau beinhalteten. Dieser Vergleich zeigte, dass mit Hilfe des RNeasy Kit die höchste Gesamt-RNA Ausbeute, sowohl im Fleischtropfsaft alleine, als auch im Fleischtropfsaft, der mit *E. coli* inokuliert wurde, erhalten wurde, obgleich die Standardabweichung teils erheblich war. Aus diesem Grund wurde der RNeasy Kit für alle weiteren Experimente verwendet.

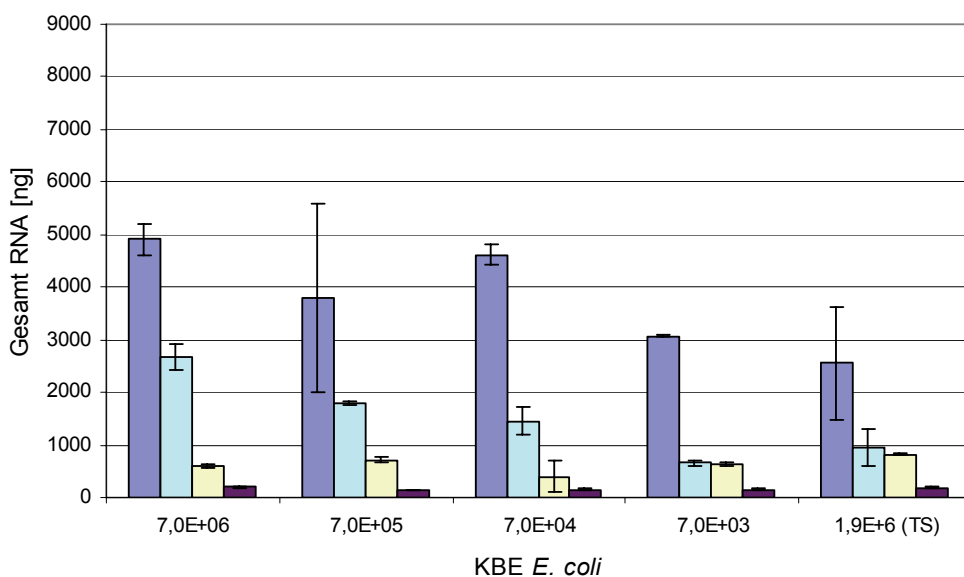


Abb. 5: Vergleich der RNA-Ausbeuten mit den RNA-Isolierungskits RNeasy (blau), Nexttec (türkis), RNAqueous (gelb) und PrestoSpin R Bug (rot) mit Fleischtropfsaft (Gesamtkeimzahl $1,9 \times 10^6$ KbE/ml) und Fleischtropfsaft, inokuliert mit 7×10^3 bis 7×10^6 *E. coli*

Durch Einbau eines Proteinase K Verdaus im Anschluss an die Lysozymbehandlung konnte die RNA-Ausbeute erheblich erhöht werden und die Reproduzierbarkeit bedeutend gesteigert werden.

Lyse durch Ultraschall. Ein kritischer Schritt einer möglichst quantitativen RNA-Ausbeute ist die Lyse der Bakterien. Zur Verbesserung der Lyse wurde in Vorversuchen eine Ultraschallbehandlung optimiert, die zur Isolierung intakter Gesamt-RNA führte. Hierbei stellte sich eine vorangegangene Lysozymbehandlung als unverzichtbarer Schritt heraus. Die drei Lyse-fördernden Behandlungen Lysozym, Proteinase K und Ultraschall wurden anschließend in unterschiedlichen Kombinationen in Verbindung mit dem Qiagen RNeasy Kit untersucht. Hierzu wurden zum einen *E. coli* Reinkultur in ST1 Bouillon und BPW verwendet. Zum anderen wurde Fleischtropfsaft mit *E. coli* inokuliert bzw. natürlich mit *E. coli* kontaminierter Fleischtropfsaft (2000 KbE/ml) für 4 h (37 °C, 100 rpm) in ST 1 oder in BPW angereichert.

Die relativen Ausbeuten (Tab. 1) zeigten, dass für eine hohe RNA-Ausbeute aus *E. coli* Reinkultur ein Lysozymverdau ausreicht, unabhängig von der Wahl des Anreicherungsmediums. In der Fleischmatrix zeigte der Lysozymverdau hingegen nur unbefriedigende Ergebnisse. Ebenso lieferten die Kombination von Lysozym und Ultraschall sowie aus Lysozym und Proteinase K keine konstante Ausbeuteerhöhung unter den drei untersuchten Bedin-

gungen. Die Triple-Lyse mit Lysozym, Proteinase K und Ultraschall erzielte hingegen unter jeder Bedingung die höchsten und gleichzeitig gut reproduzierbaren Ausbeuten und wurde in die Gesamtanalyseprozedur integriert.

Da es sich bei den Proben mit Fleischtropfsaft um Mischkulturen handelte, die neben *E. coli* die gesamte Hintergrundflora enthielten, wurde der verbesserte Aufschluss von *E. coli* durch spezifische Detektion der *E. coli* 16S rRNA mittels Biochip untersucht. Das Biochip Signal folgte im wesentlichen der Gesamt-RNA-Ausbeute und bestätigte somit einen erhöhten Aufschluss von *E. coli* und die durch die entwickelte Triple-Lyse resultierende Steigerung der Sensitivität.

Anreicherung. Der Ribosomengehalt von Bakterien hängt von deren physiologischem Zustand ab. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass sich der Ribosomengehalt in Abhängigkeit der Generationszeit erheblich unterscheidet. Bei einer Generationszeit von 100 min enthält eine *E. coli* Zelle ca. $3,8 \times 10^3$ Ribosomen (BREMER und DENNIS, 1996). Nahe der exponentiellen Wachstumsphase, bei einer Generationszeit von 24 min hingegen sind mit $4,3 \times 10^4$ Ribosomen je Bakterium das ca. 10-fache an Ribosomen und damit des Zielmoleküls 16S rRNA enthalten. Dies bedeutet für den 16S rRNA Direkt-Nachweis eine bis zu 10-fache Steigerung der Sensitivität. Da die Bakterien in dem Umfeld der Lebensmittelproduktion nicht die Bedingungen für eine exponentielle Vermeh-

Tab.1: Relative RNA-Ausbeute unterschiedlicher Kombination von von Lysozym, Proteinase K und Ultraschall mit *E. coli* in Reinkultur und in Fleischmatrix. Die höchste Ausbeute jedes Lyse-Experimentes wurde 100 % gesetzt

Probe	Medium	LZ	LZ/US	LZ/PK	LZ/PK/US
<i>E. coli</i> Reinkultur	ST1	80 ± 8	90 ± 11	77 ± 18	100 ± 2
	BPW	91 ± 18	85 ± 35	100 ± 13	83 ± 13
Mit <i>E. coli</i> inokulierter Fleischtropfsaft		60 ± 6	80 ± 17	82 ± 3	100 ± 4
Anreicherung von natürlich mit <i>E. coli</i> kontaminiertem Fleischtropfsaft	ST1	53 ± 7	51 ± 5	80 ± 4	100 ± 9
	BPW	60 ± 2	81 ± 3	65 ± 3	100 ± 8

LZ: Lysozym; LZ/US: Lysozym/Ultraschall; LZ/PK: Lysozym/Proteinase K; LZ/PK/US: Lysozym/Proteinase K/Ultraschall

rung vorfinden, wurde eine Kurzanreicherung optimiert, welche folgende Kriterien erfüllen sollte: a) *E. coli* liegt in der exponentiellen Wachstumsphase vor. b) Das Wachstum der Begleitflora ist gering oder wird unterdrückt. c) Die Anreicherungszeit ermöglicht den Nachweis von ca. 10 KbE *E. coli*/ml Probenmaterial. d) Es bilden sich keine Proteinaggregate, die die Weiterverarbeitung und eine Automatisierung erschweren.

Es wurde eine Anreicherungszeit von 4 bis 7 h in den Medien mTSB, ST1 Bouillon und gepuffertem Peptonwasser untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Parameter durch Anreicherung für 5 h bei 37 °C und 100 rpm in gepuffertem Peptonwasser erfüllt wurden.

Test des Gesamtsystems. Das Gesamtsystem, bestehend aus Kurzanreicherung, Triple-Lyse, RNA-Isolierung mittels RN easy Kit und abschließender Biochipmessung wurde an 25 Fleischproben aus dem

Handel untersucht. Hierzu wurde der Fleischtropfsaft der Proben gewonnen und jeweils in Triplikaten untersucht. Vor und nach Anreicherung erfolgte eine mikrobiologische Analyse. Aus jeweils 1,5 ml jeder Anreicherung wurde die RNA gewonnen und mit dem Biochip analysiert. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Analyse vor und nach Anreicherung (Abb. 6) belegen die spezifische Anreicherung von *E. coli* mit Hilfe der gewählten Bedingungen. Nach Anreicherung zeigten zwei Fleischproben sowohl mikrobiologisch als auch mittels Biochip einen negativen *E. coli* Befund. Es wurden somit keine falsch positiven Proben gefunden. Hingegen wurden mittels Biochip zwei falsch negative Proben gefunden, die < 1000 KbE *E. coli*/ml enthielten.

Die Gegenüberstellung der mikrobiologischen Ergebnisse und der Biochipwerte der restlichen 21 Proben zeigte eine gute Korrelation (Abb. 7).

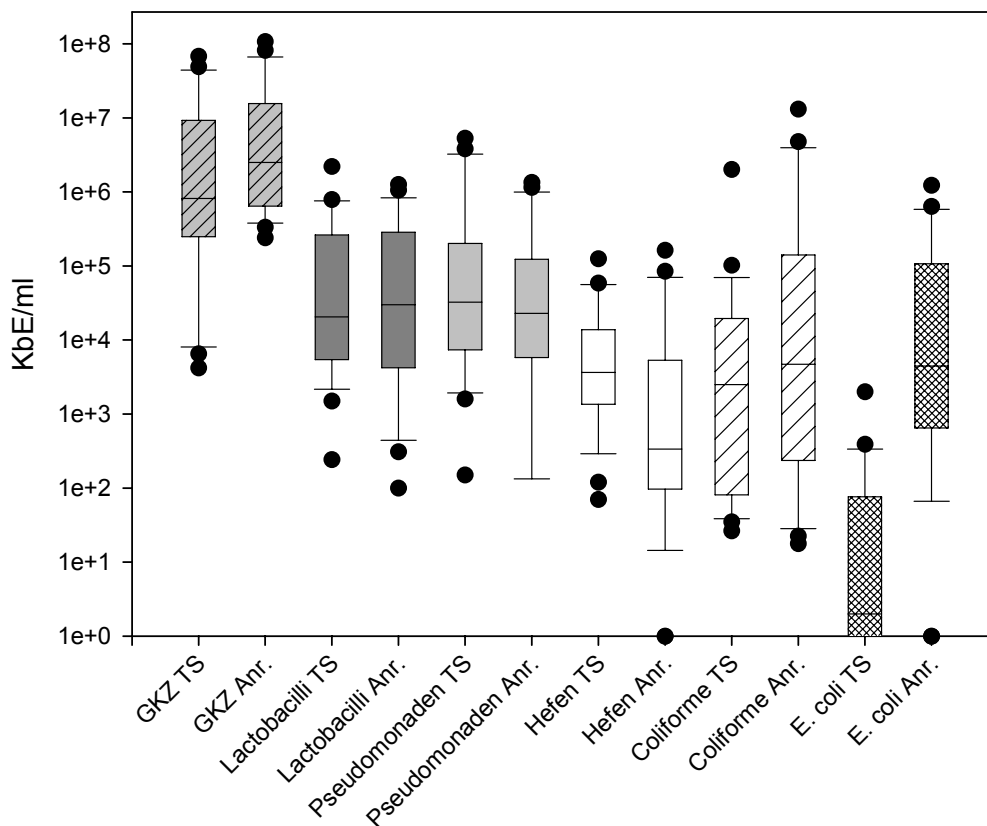


Abb. 6: Boxplot-Darstellung der Keimzahlen der 25 Fleischtropfsäfte vor (TS) und nach Anreicherung (Anr.)

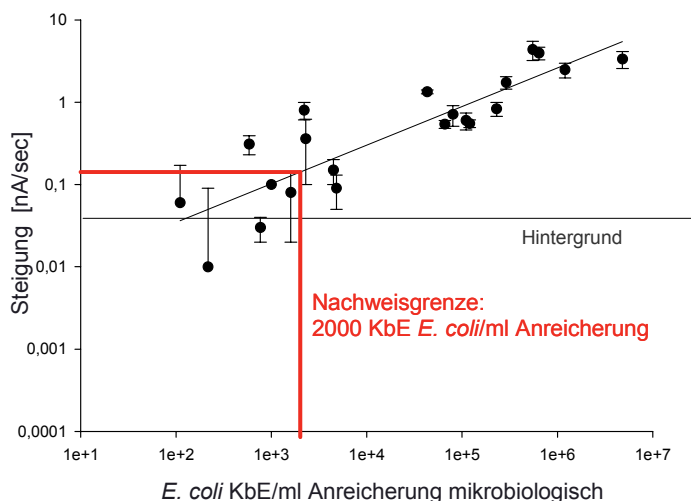


Abb. 7: Gegenüberstellung der mikrobiologischen Ergebnisse und der Mittelwerte der Biochipmessung für die untersuchten Fleischproben nach Anreicherung. Der Hintergrund ist definiert als der Mittelwert der Blindwerte, ermittelt mit Wasser, plus dreimal dessen Standardabweichung

Unter Einbezug des Hintergrundwertes des Biochips, ermittelt mit Wasser, belegen die Ergebnisse den gesicherten Nachweis von 2000 KbE/ml Anreicherung sowie die hohe Selektivität und Sensitivität der entwickelten Nachweisprozedur für *E. coli* von ≤ 1 KbE/ml Tropfsaft nach einer Anreicherung von 5 Stunden.

Schlussfolgerung

Das entwickelte Nachweissystem liefert Analyseergebnisse innerhalb von ca. 7 h, also innerhalb eines Arbeitstages, und ist daher prinzipiell sehr gut für die Anwendung in der Lebensmittelproduktion geeignet. Durch die Kurzanreicherung ermöglicht die Anwendung allerdings lediglich

eine ja/nein Antwort und beschränkt sich derzeit auf Fragestellungen, die dies erfordern wie z.B. der Nachweis von Lebensmittelsicherheitskriterien nach EU Verordnung 2073/2005.

Vorliegende Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine konsequente Weiterentwicklung der biochemischen Methodik und der Hardware eine Steigerung der Sensitivität um Faktor 100 bis 1000 ermöglicht. Hierdurch wäre eine Kurzanreicherung nicht mehr nötig und die Quantifizierung der Keimzahl ermöglicht.

Danksagung

Für die ausgezeichnete technische Assistenz bedanken wir uns bei Liane Weber.

Das Forschungsvorhaben (AiF 230 ZN) wurde im „Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.

Literatur

- Bremer, H. and Dennis P.P. 1996. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate, in *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*, Frederic C. Neidhardt (ed), 2nd ed. 1996, Washington DC, ASM Press, Washington DC
- Pöhlmann, C., Wang, Y., Sprinzl, M. 2007. Detection of nucleic acid: Electronic DNA chips [Nukleinsäuredetektion: Elektronische DNA-chips]. *Biospektrum* 13:159-161.
- Pöhlmann, C., Wang, Y., Humenik, M., Heidenreich, B., Gareis, M., Sprinzl, M. 2009. Rapid, specific and sensitive electrochemical detection of foodborne bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 24: 2766-2771, doi:10.1016/j.bios.2009.01.042