

# DEVELOPMENT OF NOVEL BIOSENSOR FOR RAPID MONITORING AND MAPPING OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION

## VÝVOJ NOVÉHO BIOSENSORU K RYCHLÉMU MONITOROVÁNÍ A MAPOVÁNÍ KONTAMINACE V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Šárka Bidmanová<sup>1)</sup>, Tomáš Rataj<sup>2)</sup>, Jiří Damborský<sup>1,3)</sup>,  
Martin Trtílek<sup>2)</sup>, Zbyněk Prokop<sup>1,3)</sup>

1) Loschmidt Laboratories, Department of Experimental Biology and Research Centre for Toxic Compounds in the Environment, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic, e-mail: sarka@chemi.muni.cz

2) PSI, s.r.o., Drásov 470, 664 24 Drásov, Czech Republic

3) Enantis, s.r.o., Palackého třída 1802/129, 612 00 Brno, Czech Republic

### Abstract:

Halogenated hydrocarbons belong to hazardous pollutants which may be toxic and affect human health and ecosystem functioning. Accurate monitoring of these compounds in the environment is therefore necessary. Newly developed optical biosensor EnviroPen is based on enzymatic reaction of haloalkane dehalogenases with halogenated chemicals, which is accompanied by the change of fluorescence of pH indicator. EnviroPen is useful tool for detection of halogenated contaminants in aqueous solutions in the pH range from 4 to 10 and in the temperature range from 4 to 50 °C. One of the main advantages of the biosensor is short measurement time, 1 min, which is necessary for determination of a target analyte and low cost of analysis, 1 € per sample. Furthermore, EnviroPen was successfully applied for detection of several significant halogenated pollutants: 1,2-dibromoethane, 3-chloro-2-(chloromethyl)-1-propene, 1,2,3-trichloropropane and 1,2-dichloroethane. EnviroPen is an attractive tool for continuous *in situ* monitoring of halogenated pollutants in the environment as well as for preliminary screening of the sites contaminated by halogenated compounds.

### Keywords:

Biosensor, EnviroPen, dehalogenases, halogenated contaminants, monitoring *in situ*, screening of contaminated sites

### Abstrakt:

Halogenované deriváty uhlovodíků patří mezi nebezpečné polutanty s nežádoucími dopady na životní prostředí a zdraví člověka. Proto je nezbytné, aby tyto látky byly systematicky sledovány. Nově vyvinutý optický biosensor EnviroPen je založen na enzymatické reakci halogenalkandehalogenas s halogenovanými látkami, která vede ke změně fluorescence fluorescenčního pH indikátoru. EnviroPen je vhodný pro stanovení halogenovaných kontaminantů ve vodných roztocích v rozmezí pH 4-10 a v rozsahu teplot 4-50 °C. Velkou výhodou biosensoru je krátká doba měření, 1 min, nutná pro stanovení cílového analytu a nízká cena analýzy, 25 Kč za analýzu jednoho vzorku. EnviroPen byl testován s několika významnými látkami: 1,2-dibromethanem, 3-chlor-2-(chlormethyl)-1-propenem, 1,2,3-trichlorpropanem a 1,2-dichlorethanem. EnviroPen představuje atraktivní nástroj pro kontinuální *in situ* monitorování halogenovaných polutantů v životním prostředí i pro předběžný screening lokalit kontaminovaných halogenovanými látkami.

### Klíčová slova:

Biosensor, EnviroPen, dehalogenasy, halogenované kontaminanty, monitorování *in situ*, screening lokalit

### Úvod

Zvyšující se množství cizorodých a potenciálně škodlivých látek uvolňovaných do životního prostředí představuje značný ekologický problém. Řada těchto polutantů jsou halogenované deriváty uhlovodíků pocházející z rozsáhlého využití v zemědělství i v průmyslu. Tyto látky jsou častými kontaminanty podzemních vod a bývají též součástí nebezpečných odpadů či výtoků ze skládek

(Vogel et al., 1987). Protože jsou velmi obtížně rozložitelné a často se vyznačují nežádoucími zdravotními účinky, je nezbytné sledovat jejich koncentraci v životním prostředí. Tradiční přístup monitorování životního prostředí je založen na vzorkování a následném transportu odebraných vzorků do analytické laboratoře, kde probíhají vlastní analýzy s využitím analytických metod jako je plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií. Tyto techniky vyžadují před vlastní analýzou extrakci a zakonzentrování vzorku. Přestože jsou chromatografické metody vysoce selektivní a přesné (Belkin et al., 2003), nejsou vhodné pro kontinuální měření přítomnosti polutantu *in situ*. Navíc jsou časově náročné, finančně nákladné a požadují vysoce kvalifikovanou obsluhu (Arkhylova et al., 2001; Eltzov et al., 2011).

Proto je užitečné vyvíjet jednoduché a rychlé zařízení, které umožní automatickou přímou analýzu. Biosensory založené na biorekogničním elementu, který je v těsném kontaktu s převodníkem, představují vhodnou alternativu nebo doplněk k tradičním analytickým metodám. Jejich hlavní výhodou je vysoká citlivost, jednoduchá obsluha, relativně nízké náklady a snadné přizpůsobení pro měření *on-line* a *in situ* (Rodriguez-Mozaz et al., 2004). Biosensory umožňující detekci halogenovaných derivátů uhlovodíků mohou být založeny na halogenalkandehalogenásách jako biorekogničních elementech. Reakce těchto enzymů s halogenovanými sloučeninami vede k odštěpení halogenidového substituentu za současného vzniku odpovídajícího alkoholu a protonu. Vzniklé produkty mohou být detekovány pomocí různých typů převodníků, nejčastěji elektrochemického nebo optického. Cílem tohoto projektu byl vývoj a využití optického biosensory založeného na purifikovaném enzymu halogenalkandehalogenase a fluorescenčním pH indikátoru pro detekci halogenovaných látek v životním prostředí.

### Výsledky a diskuse

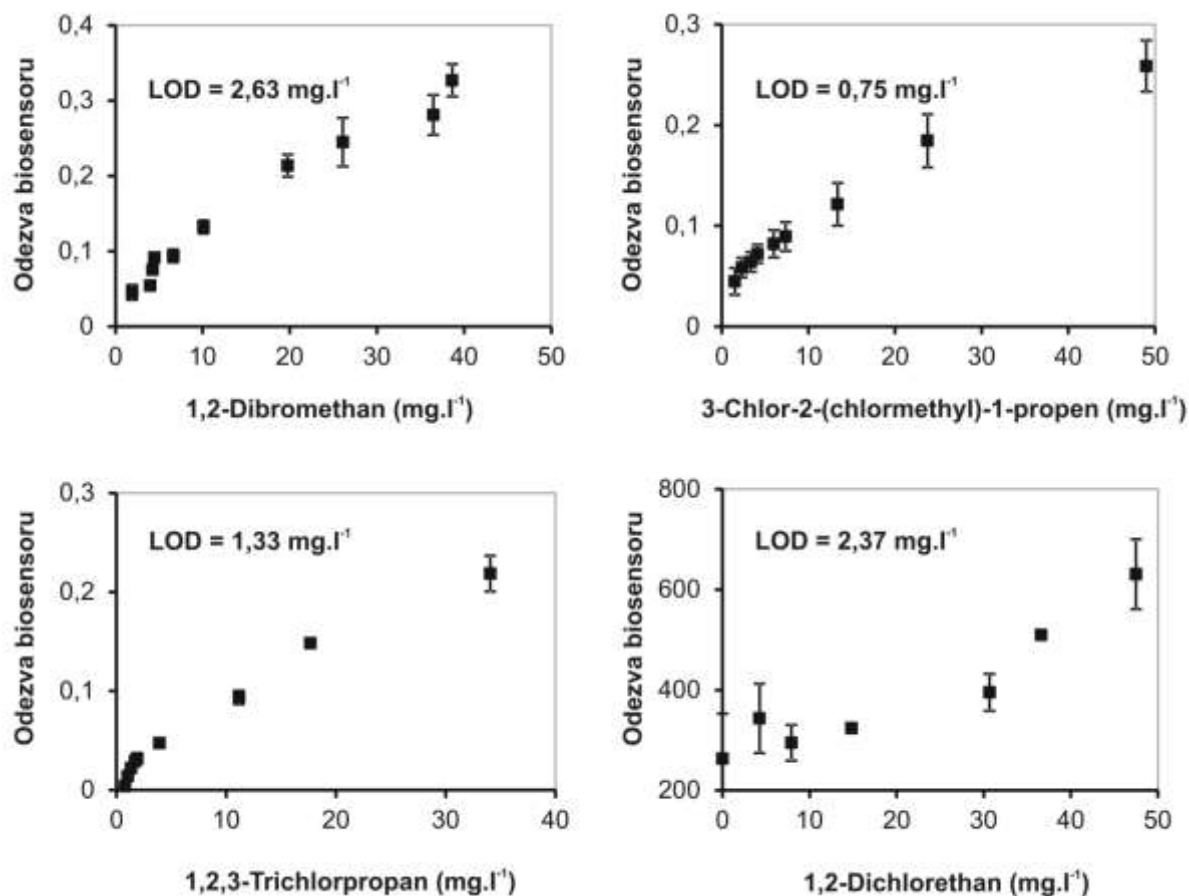
První prototyp optického biosensory (obr. 1a) využívá purifikovanou halogenalkandehalogenasu imobilizovanou v jedné vrstvě s fluorescenčním pH indikátorem. Jako převodník bylo zvoleno polymethylmethakrylátové optické vlákno, zdroj excitačního záření je halogenovaná lampa a detektorem emitovaného záření fotonásobič (Bidmanova et al., 2010). Mobilní příruční verze přístroje EnviroPen (obr. 1b) byla vyvinuta ve spolupráci Loschmidtových laboratoří Masarykovy univerzity ([www.muni.cz](http://www.muni.cz)) s firmami Enantis ([www.enantis.com](http://www.enantis.com)) a Photon System Instruments ([www.psi.cz](http://www.psi.cz)). Vychází z původního konceptu, avšak optoelektrická instrumentace byla výrazně vylepšena – fotonásobič byl nahrazen fotodiodou a optické vlákno skleněnou tyčinkou.



**Obr. 1:** Optické biosensory pro detekci halogenovaných kontaminantů založené na aktivitě halogenalkandehalogenas: **a)** první prototyp biosensory (25×7×25 cm), **b)** nově vyvinutý příruční biosensor EnviroPen (6×3×19 cm, [www.enantis.com](http://www.enantis.com)).

EnviroPen byl testován pro stanovení halogenovaných alifatických derivátů uhlovodíků ve vodných roztocích (tab. 1). Byl využit pro detekci několika významných halogenovaných derivátů uhlovodíků: 1,2-dibromethanu, 3-chlor-2-(chlormethyl)-1-propenu, 1,2,3-trichlorpropanu a 1,2-dichlorethanu (obr. 2). Pro tyto látky byly stanoveny následující detekční limity: 2,63; 0,75; 1,33 a 2,37 mg·l<sup>-1</sup>, což umožňuje aplikaci EnviroPen u sledování lokalit silně kontaminovaných halogenovanými látkami

nebo monitorování průběhu bioremediačních postupů. Důležitými parametry biosensoru jsou též reprodukovatelnost měření, doba měření a skladovací stabilita. Vyvinutý biosensor poskytuje odezvu se směrodatnou odchylkou do 10 %, což je srovnatelné s tradičními analytickými metodami. Velkou výhodou EnviroPenu je krátká doba měření, 1 min, která je nezbytná pro detekci halogenované látky (tab. 1) a nízká cena jedné analýzy, 25 Kč. Důležité je také uchovávání biosensoru, jeho stabilita je určována životností biorekogniční složky, enzymu. Biosensor může být dlouhodobě uchováván v pufru při 4 °C nebo nově lze materiál po lyofilizaci skladovat při laboratorní teplotě po dobu minimálně půl roku.



**Obr. 2:** Odezva EnviroPenu na 1,2-dibromethan, 3-chlor-2-(chlormethyl)-1-propen, 1,2,3-trichloropropan a 1,2-dichlorethan. Detekční limity pro jednotlivé halogenované kontaminanty (LOD) jsou uvedeny v kalibračních grafech.

Měření s biosensorem může být významně ovlivněno vlastnostmi místa měření, především teplotou a pH. Průměrná teplota podzemní vody ve střední Evropě je kolem 9,5 °C, zatímco teplota povrchových vod významně závisí na klimatických podmínkách a pohybuje se od 0 °C u vody pod ledem po 40 °C v horkých pramenech (Pitter et al., 2009). Běžné pH povrchových vod je od 6,5 do 8,5 (Hem, 1985) a u podzemních vod je pH od 6,0 do 8,5 (Hem, 1985; Jordana and Piera, 2004). Acidifikací však dochází k výraznému snížení pH ve vodách na hodnoty nižší než pH 5,5 (Scheidleder et al., 1999). Vyvinutý biosensor vykazuje odezvu na halogenované látky v rozsahu teplot od 4 do 50 °C a v rozmezí pH 4 až 10 (tab. 1).

Při monitorování halogenovaných kontaminantů v životním prostředí se může výrazně projevit vliv matrice. Vzorky z prostředí jsou obvykle komplexní a skládají se ze směsi proteinů, uhlodíků, lipidů a solí, které mohou významně ovlivnit signál biosensoru a poskytnout falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky měření (Long et al., 2009). Vliv matrice na odezvu biosensoru byl studován

ve vodných vzorcích odebraných z kontaminované lokality s přidaným 1,2-dibromethanem. Detekční limit biosensoru v reálných vzorcích byl 2,5krát vyšší než detekční limit pro 1,2-dibromethan stanovený v pufru. Biosensor EnviroPen právě prochází testováním pro detekci halogenovaných látek na kontaminovaných lokalitách (obr. 3).

**Tab. 1:** Srovnání parametrů laboratorního prototypu biosensoru s nově vyvinutým příručním biosensorem EnviroPenem.

Parametr	Laboratorní prototyp	EnviroPen
Prostředí	Vodný roztok	Vodný roztok <sup>a</sup>
Detekční limit (mg·l <sup>-1</sup> )	DBA: 24,99 CCMP: 1,75 TCP: n.t. DCE: n.t.	DBA: 2,63 CCMP: 0,75 TCP: 1,33 DCE: 2,37
pH rozsah	n.t.	4-10 <sup>b</sup>
Teplotní rozsah (°C)	n.t.	4-50 <sup>c</sup>
Doba měření (min)	30	1
Skladování	Na suchu nebo v pufru	Na suchu nebo v pufru
Velikost (cm)	25×7×25	6×3×19
Předpokládaná cena (€)	6000	1600

<sup>a</sup> Potenciál pro měření v plynném prostředí. <sup>b</sup> Zachováno více jak 60% odezvy biosenzoru. <sup>c</sup> Zachováno více jak 20% odezvy biosenzoru. Zkratky: n.t. – nebylo testováno, DBA – 1,2-dibromethan, CCMP – 3-chlor-2-(chlormethyl)-1-propen, TCP – 1,2,3-trichlorpropan, DCE – 1,2 – dichlorethan.



**Obr. 3:** Využití EnviroPenu pro stanovení halogenovaných derivátů uhlovodíků na kontaminované lokalitě (Neratovice, Česká republika).

### Závěr

Nově vyvinutý příruční biosensor EnviroPen představuje atraktivní nástroj pro spolehlivé, jednoduché, rychlé a levné sledování halogenovaných polutantů v životním prostředí *in situ* i pro předběžný screening lokalit kontaminovaných halogenovanými látkami. Použití EnviroPenu je obzvláště výhodné tam, kde je odběr vzorků obtížný nebo nebezpečný. Použití EnviroPenu umožňuje vytvoření mapy kontaminace v krátkém čase díky rychlému sběru dat spojenému se zanesením hodnot kontaminace daného bodu v lokalitě přímo do elektronické mapy s využitím GPS. Širší uplatnění EnviroPenu v praxi předpokládá systematické ověření funkčnosti zařízení v terénu a vývoj biorekogničních složek pro další významné polutanty.

## **Poděkování**

Tento projekt vznikl za finanční podpory Grantové agentury České republiky (P207/12/0775) a Evropského fondu regionálního rozvoje (CZ.1.05/2.1.00/01.0001 a CZ.1.07/2.3.00/20.0183).

## **Literatura:**

Arkhypova V.N., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Jaffrezic-Renault N., Jaffrezic H., Martelet C. 2001. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. *Talanta* 55, pp. 919-927.

Belkin S. 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, pp. 206-212.

Bidmanova S., Chaloupkova R., Damborsky J., Prokop Z. 2010. Development of an enzymatic fiber-optic biosensor for detection of halogenated hydrocarbons. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, pp. 1891-1898.

Eltzov E., Marks R.S. 2011. Whole-cell aquatic biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, pp. 895-913.

Hem J.D. 1985. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water, third ed., U.S. Geological Survey, Virginia.

Jordana S., Piera E.B. 2004. Natural groundwater quality and health. *Geol. Acta* 2, pp. 175-188.

Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., Quinn J., Chakraborty T., O'Kennedy R. 2003. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzym. Microb. Technol.* 32, pp. 3-13.

Long F., Zhu A., Sheng J.W., He M., Shi H.-C. 2009. Matrix effects on the microcystin-LR fluorescent immunoassay based on optical biosensor. *Sens.* 9, pp. 3000-3010.

Pitter P. 2009. Fyzikálně-chemické vlastnosti vody, v: P. Pitter (ed.), *Hydrochemie, VŠCHT, Praha*, pp. 5-28.

Rodriguez-Mozaz S., Marco M.-P., López de Alda M.J., Barceló D. 2004. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Appl. Chem.* 76, pp. 723-752.

Scheidleder A., Grath J., Winkler G., Stärk U., Koreimann C., Gmeiner C., Nixon S., Casillas J., Gravesen P., Leonard J., Elvira M. 1999. Groundwater quality and quantity in Europe, Office for Official Publications of the European Communities, Copenhagen.

Vogel T.M., Criddle C.S., McCarty P.L. 1987. Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21, pp. 722-736.