



národní
úložiště
šedé
literatury

Optický vláknový biosensor pro detekci znečištění životního prostředí

Vrbová, H.
2011

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-81789>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 20.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

OPTICKÝ VLÁKNOVÝ BIOSENSOR PRO DETEKCI ZNEČIŠTĚNÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

OPTICAL FIBRE BIOSENSOR FOR DETECTION OF ENVIRONMENTAL POLLUTION

Hana Vrbová¹⁾, Marie Pospíšilová¹⁾, Gabriela Kuncová²⁾

1) České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, nám. Sítná 3105,
272 01 Kladno 2, e-mail: hana.vrbova@fbmi.cvut.cz

1) Czech Technical University in Prague, Faculty of Biomedical Engineering, nám. Sítná 3105,
272 01 Kladno 2, Czech Republic, e-mail: hana.vrbova@fbmi.cvut.cz

2) Ústav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6

2) Institute of Chemical Process Fundamentals AS CR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6,
Czech Republic

Abstrakt:

Biosenzor byl navržen pro on-line monitorování a včasnou detekci znečištění životního prostředí ve vzdálených a nepřístupných lokalitách. Citlivou část tvoří bioreportéry imobilizované do křemičité matrice na konci optického vláknového prvku (OVP). K experimentu byl použit bakteriální kmen *Pseudomonas putida* TVA8 produkující bioluminiscenci v přítomnosti benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenu (BTEX). Tímto biosenzorem bylo měřeno dvanáct reálných vzorků odpadních vod z České republiky. Aktivní vrstva zůstala stabilní po dobu tří týdnů.

Abstract:

The whole-cell optical fiber sensor is proposed as a real in-situ detector for on-line monitoring of the environmental pollution in remote localities. The sensitive part of the sensor consists from bioreporters immobilized into a silica matrix at the end of the optical fibre element (OFE). For the experiments, were used bacterial strain of *Pseudomonas putida* TVA8 which is capable to produce bioluminescence in the presence of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX). Twelve real samples of wastewater from the Czech Republic were measured with this biosensor. Active layer was stable for at least three weeks.

Klíčová slova:

Celobuněčný biosenzor, optický vláknový prvek, *Pseudomonas putida* TVA8, bioluminiscence, bioreportér, BTEX

Keywords:

Whole-cell biosensor, optical fibre element, *Pseudomonas putida* TVA8, bioluminescence, bioreporter, BTEX

Úvod

V závislosti na ekologických problémech způsobených průmyslovými a zemědělskými odpady dochází k rozvoji metod zjišťování toxicity. Jeden ze slibných přístupů, který začíná být využíván při konstrukci biosenzorů pro monitorování kontaminace, je založený na fúzích reportérových genů s promotorovými geny, které jsou indukovány, když jsou buňky stresovány toxickými chemikáliemi.

Citlivou část biosenzoru je aktivní vrstva nanosená na čelo optického vláknového prvku (OVP). Tato aktivní vrstva je tvořena imobilizovanými buňkami do křemičité matrice. Imobilizované živé buňky tvoří citlivý prvek biosenzoru reagující na výskyt určitého polutantu. Jedná se o tzv. bioreportéry - geneticky modifikované organismy, kterým byly vloženy geny zajišťující rozpoznání analytu (promotorové geny) a produkci měřitelného signálu (reportérové geny). Genetická úprava bioreportérů zajišťuje velmi vysokou specifitu stanovení analytu. Pro experimenty popsané v této práci byl použit bioreportérový bakteriální kmen *Pseudomonas putida* TVA8, který reaguje na přítomnost analytu měřitelným signálem - emisí viditelného světla, tzv. bioluminiscencí (BL) ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$). Tento bioreportér je citlivý na přítomnost BTEX.

Hlavní výhodou navrženého biosenzoru je jednoduchost a rychlost analýzy. Není nutná složitá příprava vzorku (zkonzcentrování, extrakce apod.). Také se jedná o metodu značně levnější, než je klasická chemická analýza v laboratoři, která vyžaduje odběr vzorku, speciální úpravu a drahé přístrojové vybavení (např. kapalinový chromatograf). O některých polutantech je známo, že se vyskytují ve vrstvách a nejsou homogenně rozptýleny v dané lokalitě, proto po odběru jednoho vzorku nemusí být znečištění odhaleno. Při použití biosenzoru v dané lokalitě je možné analyzovat více míst ve vzorku. Avšak s použitím bioreportérů je spojeno také mnoho nevýhod. Především je nutné zajistit vhodné podmínky pro přežití (teplotu, pH, kyslík, živiny apod.). Odezvy je dosaženo řádově v desítkách minut až několika hodinách, což je dáno transportem analytu do cytoplazmy buňky a expresí genů. Citlivost biosenzoru je nižší a analýza je méně přesná, zato lépe vystihuje biologickou dostupnost stanovované látky. Navržený optický vláknový senzor může sloužit pro on-line monitorování znečištění životního prostředí ve vzdálených a nepřístupných lokalitách.

Metodika

A. Kultivace *P. putida* TVA8

P. putida TVA8 byly kultivovány v LB médiu (trypton (10 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l)) s kanamycinem (60 mg/l). BL byla indukována v MSM médiu s toluenem (26,5 mg/l), případně neředěnými reálnými vzorky.

B. Imobilizace

Tetramethoxysilan (TMOS) (4,1 g) byl smíchán s deionizovanou vodou (2 ml) a zchlazen 5 min. při 4 °C. Poté byla pomalu přidána 0,1M HCL (0,5 ml). Tato směs byla ponechána 24 h při 4 °C.

Imobilizace na OVP:

Na čtverec Parafilmu® (3 x 3 cm) bylo pipetou nanášeno 100 µl suspenze buněk o koncentraci 10⁸/ml, vedle bylo nanášeno 100 µl předpolymerovaného TMOS a k němu přidáno 100 µl 0,05M NaOH. TMOS a NaOH byly rychle promíchány a smíchány s buňkami. Vzniklá směs byla pipetou přenesena na čelo OVP.

Vytvoření aktivní vrstvy v kádince:

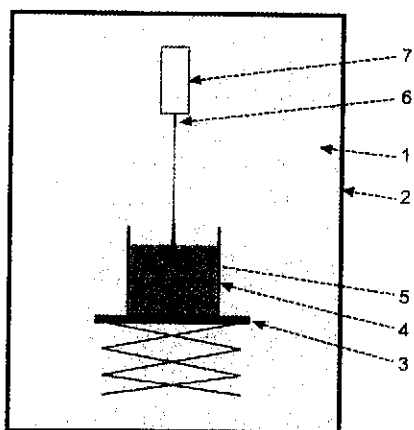
Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml předpolymerovaného TMOS a k němu přidáno 0,5 ml 0,005M NaOH. Směs byla rychle promíchána a byl přidán 1 ml suspenze buněk o koncentraci 10⁸/ml. Po důkladném promíchání byla směs vylita do 10ml kádinky a po zatuhnutí přelita sterilním 0,066M fosfátovým pufrům. Takto připravené aktivní vrstvy jsou vhodné k opakovanému měření vzorků. Mezi jednotlivými měřeními byly uchovávány zalité fosfátovým pufrům při 4 °C.

C. Měření

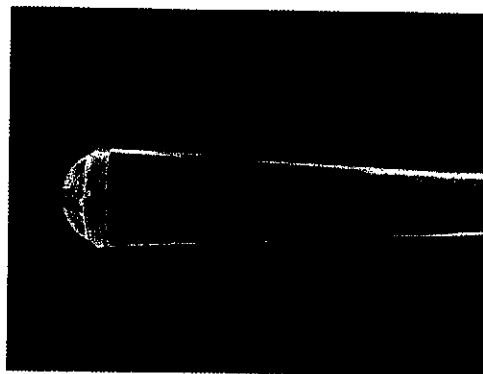
Všechna měření probíhala ve speciálním boxu, který byl upravený tak, aby bylo dosaženo minimální úrovně pozadí. Box byl dále stíněn překrytím černou plachtou (obr. 1). Konec OVP s imobilizovanými bioreportéry byl ponořen do kádinky s indukčním roztokem. Užší konec OVP nebo optické vlákno bylo připojeno SMA konektorem k detektoru (Perkin – Elmer MP 984).

D. Optický vláknový prvek (OVP)

Taperovaný OVP (obr. 2) byl připraven v Laboratoři optických vláken Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd ČR, v.v.i. z odkapu preformy z vysoce čistého křemene (Suprasil) na počátku tažení PCS vláken. Širší konec, určený pro imobilizaci buněk, byl postupně leštěn čtyřmi diamantovými brusnými kotouči od hrubého až po optickou kvalitu. Užší konec byl zaříznut vidiovým nožem na úpravu konců optických vláken. Použitý OVP je charakterizováno průměrem širšího ($d_{\max} = 8,75$ mm) a užšího konce ($d_{\min} = 0,89$ mm) a jeho délkou ($z_{\max} = 22$ cm).



Obr. 1: Uspořádání měřicího zařízení
a) schéma, b) snímek celku a detailu OVP
(1 - box, 2 - černá plachta, 3 - výškově nastavitelný stůlek, 4 - kádinka s indukčním roztokem, 5 - OVP, 6 - SMA konektor, 7 - detektor).

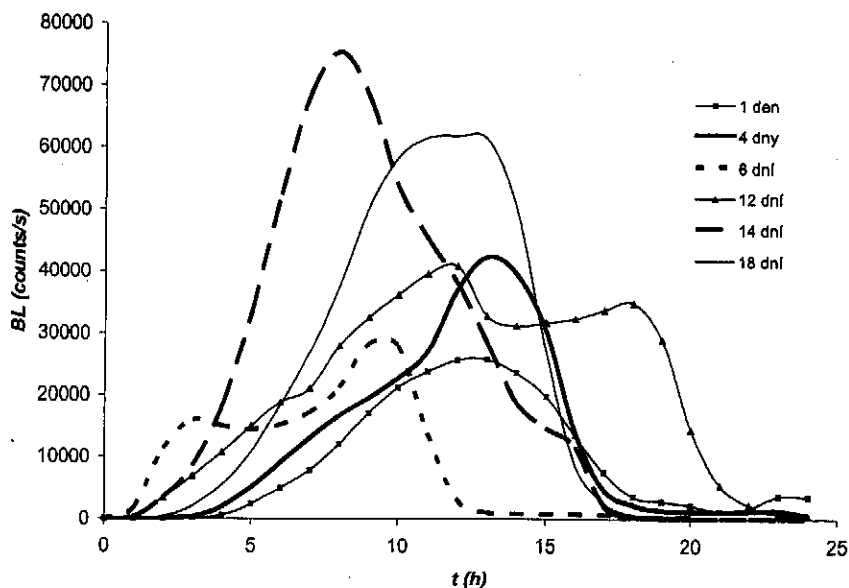


Obr. 2: Aktivní vrstva nanesená na OVP

Výsledky

Po indukci vytvořené aktivní vrstvy byla měřena BL v závislosti na čase. Maximální hodnoty BL bylo dosaženo mezi 7 - 13 h po ponoření OVP do média s induktorem.

Dlouhodobá stabilita byla testována opakovanou indukcí jedné aktivní vrstvy vytvořené na OVP v MSM médiu s toluenem (26,5 mg/l). Jednotlivé průběhy měření můžete vidět v grafu na obr. 3. Mezi jednotlivými indukcemi byla aktivní vrstva uchováována ponořená v 0,066M fosfátovém pufru při laboratorní teplotě.



Obr. 3: Graf dlouhodobé stability aktivní vrstvy

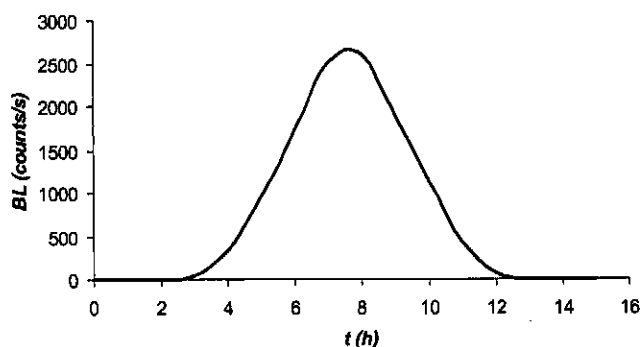
Reálné vzorky byly měřeny na aktivních vrstvách v kádinkách. Celkem bylo připraveno 36 aktivních vrstev v kádinkách s hmotnostní odchylkou menší než 5%. Každý vzorek byl měřen paralelně na dvou vrstvách. BL byla měřena na luminometru Berthold FB12. V tabulce č. 1 jsou uvedeny výsledky jednotlivých měření. Pokud došlo po šesti hodinách od indukce k nárůstu detekované BL v porovnání

s výchozí hodnotou, byl výsledek považován za pozitivní (+). Zůstala-li hodnota BL na stejné úrovni či se snížila, byl výsledek považován za negativní (-).

Tab. 1: Detekovaná BL při měření reálných vzorků odpadních vod

Vzorek	C_{toluen} ($\mu\text{g/l}$)	BL	Vzorek	C_{toluen} ($\mu\text{g/l}$)	BL
1	0	-	9	26	+
2	4,3	+	10	0	-
3	0	-	11	0	-
4	0	-	12	114	+
5	0	-	MSM+toluene	0	-
6	0	-	MSM médium	0	-
7	5,8	+	YEPS médium	0	-
8	65	+	Fosfátový pufr	0	-

Pro ověření funkčnosti navrženého laboratorního uspořádání biosenzoru byla vytvořena aktivní vrstva na OVP a byla indukována neředěným reálným vzorkem znečištěné odpadní vody s obsahem toluenu o koncentraci $26 \mu\text{g/l}$ a přítomností dalších polutantů (benzen ($25 \mu\text{g/l}$), ethylbenzen ($8,6 \mu\text{g/l}$), xyleny ($512 \mu\text{g/l}$), naftalen ($1020 \mu\text{g/l}$)). Výsledek tohoto měření je graficky znázorněn v grafu (obr. 4).



Obr. 4 : Časová závislost BL při měření reálného vzorku odpadních vod s koncentrací toluenu $26 \mu\text{g/l}$

Diskuze

Na reálných vzorcích byla ověřena funkčnost navrženého biosenzoru při detekci znečištění odpadních vod s obsahem BTEX. Z prvních experimentů vyplývá, že je možné stanovit přítomnost těchto látek ve vzorku. Možnost kvantitativního stanovení zatím nebyla potvrzena. V dalších experimentech se budeme zabývat vlivem ostatních chemikálií přítomných ve vzorku na detekovanou BL a možností monitorování životaschopnosti bioreportérů.

Závěr

V laboratorních podmínkách byl sestaven a testován model celobuněčného optického vláknového senzoru pro stanovení znečištění životního prostředí ve vzdálených a nepřístupných lokalitách. Citlivým prvkem biosenzoru byl bioreportérový bakteriální kmen *Pseudomonas putida* TVA8 reagující na přítomnost BTEX emisí bioluminiscenčního záření, které bylo detekováno.

Aktivní vrstva vytvořená na konci OVP zůstává stabilní minimálně 3 týdny a je schopná opakované indukce. Tímto biosenzorem bylo změřeno celkem 12 reálných vzorků odpadních vod a v případě přítomnosti BTEX ve vzorku byla vždy detekována bioluminiscence. Pokud vzorek BTEX neobsahoval, bioluminiscence zůstala na úrovni negativní kontroly (vrstva s pufrem).

Možnost využití navrženého uspořádání při reálném měření byla demonstrována při měření reálného vzorku aktivní vrstvou na OVP.

Poděkování

Práce byla vypracována v rámci řešení projektů Ministerstva školství a mládeže č. ME 892 a 893 a CZ.1.07/2.3.00/20.0092.

Literatura:

Adamová N. 2009. Vývoj biosenzoru s použitím *Pseudomonas putida* TVA8. Diplomová práce, VŠCHT, Praha.

Meighen E. A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55:123-142.

Vrbová H., Kuncová G., Pospíšilová M. 2010. Optický vláknový biosenzor s bioluminiscenčními buňkami. Sborník konference Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi III., Beroun.

Vrbová H. 2010. Vliv geometrie a aktivní vrstvy optického vláknového prvku na citlivost biosenzoru. Diplomová práce, ČVUT, Praha.

Bosch M. E., Sanchez A. J. R., Dohas F. and Bosch C. 2007. Recent Development in Optical Fiber Biosensors. *Sensores* 7:797-856.