

## **Biosenzori za praćenje teških metala i toksičnih spojeva u okolišu**

### ***Biosensors for monitoring heavy metals and toxic compounds in environment***

<sup>1</sup>Maja Karnoš, <sup>2</sup>Sanja Pisac, <sup>3</sup>Ana Marija Veić, <sup>4</sup>Nikola Sakač  
<sup>1,4</sup> Odjel za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Cara Hadrijana 8/A, Osijek  
<sup>2,3</sup> Međimursko veleučilište u Čakovcu, Bana Jelačića 22a, Čakovec  
e-mail: <sup>1</sup>karnasmaja@gmail.com; <sup>4</sup>nikola.sakac@gmail.com

**Sažetak:** *Praćenje zagađenja okoliša bitan je zadatak u njegovom očuvanju, a pojednostavljenje metodologije za praćenje polutanata imperativ. Teški metali i različiti toksični spojevi posebno su opasni jer se tijekom vremena akumuliraju u biljkama i životinjama. Iz tog su razloga razvijene različite metode pomoću kojih se određuje njihova koncentracija u okolišu. Biosenzori danas predstavljaju brzo i pouzdano rješenje za praćenje zagađenja okoliša uzrokovanog različitim toksičnim spojevima i metalima. Minijaturizacija senzora omogućila je in situ mjerenja, čime se isključuju dugotrajna i ponekad skupa mjerenja u laboratorijima. U radu je prikazan kratak pregled nekih biosenzora te njihova primjena u detekciji i praćenju teških metala i toksičnih spojeva u okolišu.*

**Ključne riječi:** *biosenzori, praćenje zagađenja, teški metali, toksični spojevi*

**Abstract:** *Monitoring pollution in our environmet is an important task in its preservation, and simplification of methodology for monitoring pollutants presents an imperative. Heavy metals and various toxic compounds are particularly dangerous because of their bioacummulation. Therefore, a wide range of methods was developed for determination of pollutant concentartion in environment. Today, biosensors have shown to be fast and reliable solution for monitoring environmental pollution caused by heavy metals and toxic compounds. Sensor miniaturisation has enabled in situ measurements thus excluding longterm and sometimes expensive measurements in laboratories. In this paper, short overwiev of some biosensors has been shown, including their application in detection and monitoring heavy metals and toxic compounds in environment.*

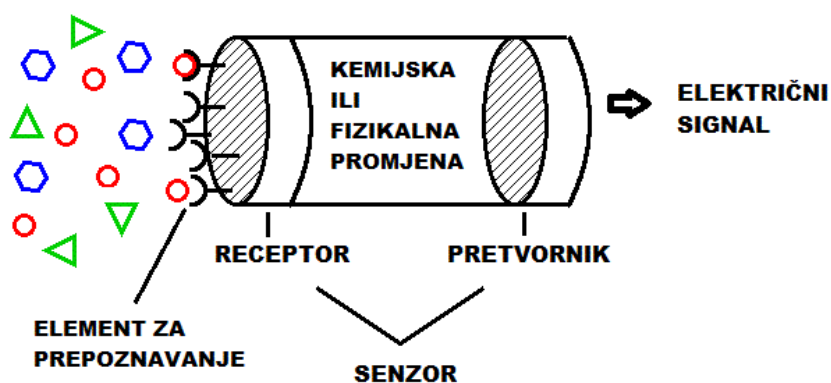
**Key words:** biosensors, pollution monitoring, heavy metals, toxic compounds

## 1. Uvod

Kemijski senzor definiran je kao mjerni uređaj koji pretvara kemijsku informaciju o uzorku (koncentraciju pojedinih komponenti uzorka ili njegov ukupni sastav) u analitički mjerljiv signal. Kemijska informacija može doći od kemijske reakcije analita ili od fizikalnih svojstava ispitivanog sustava.

Kemijski senzor sastoji se od dvije osnovne jedinice: receptora i pretvornika. Neki senzori koriste i separatore (različiti filteri i membrane). Receptor je odgovoran za selektivno i osjetljivo prepoznavanje analita. U pretvorniku kemijskog senzora energija oslobođena tijekom interakcije analita i receptora prevodi se u električni signal koji je pogodan za mjerenje (Hulanicki i sur., 1991.), što je vidljivo na Slici 1.

Slika 1. Shematski prikaz kemijskog senzora.



Izvor: Jenelten. U. Biosensors. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech Environ/BIOSEN/biosen.htm>

### 1.1. Biosenzori

Veliku podskupinu kemijskih senzora čine biosenzori. Biosenzor se prema IUPAC-u (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) definira kao samostalan integrirani uređaj koji je sposoban davati specifične kvantitativne ili semikvantitativne informacije koristeći biološki element za prepoznavanje (Thévenot i sur., 1999.).

Biosenzori mogu biti podijeljeni u nekoliko grupa, ovisno o staničnom signaliranju ili o principu biološkog prepoznavanja. Prema signalu biosenzori se kategoriziraju kao elektrokemijski, optički, piezoelektrični i termalni. Elektrokemijski biosenzori (između ostalog amperometrijski i potenciometrijski) najbolje su opisani u literaturi, dok su najčešće korišteni optički biosenzori. Prema principu biološkog raspoznavanja, biosenzori se dijele na enzimске, imunokemijske, cjelostanične i DNA biosenzore (Eggins, 2002.).

Najčešće korišteni biološki elementi su enzimi i antitijela. Enzimi su biokatalizatori koji kataliziraju kemijske reakcije. Njihov je zadatak karakterističnu tvar (supstrat) pretvoriti u produkt. Enzimi su visoko selektivni prema određenom supstratu što ih čini pogodnim senzorskim materijalom. Antitijela su proteini koje proizvodi imunološki sustav kao odgovor na neku stranu supstancu u tijelu. Glavna razlika između enzima i antitijela je ta što se antitijela čvrsto vežu za antigene pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa.

Osjetljivost i selektivnost biosenzora ovisi o svojstvima elementa za prepoznavanje na kojeg se veže analit. Pomoću genetičkog inženjerstva moguće je dobiti neograničen broj različitih elemenata za biološko prepoznavanje, ali i izmjenjivati svojstva postojećima u svrhu poboljšanja njihovih svojstava (Hock i sur., 2002.).

## **2. Biosenzori u praćenju okoliša**

Biosenzori nalaze primjenu u različitim područjima, od agrikulture, kontrole kvalitete namirnica, u medicini, vojsci i kontroli različitih procesa u okolišu. Za kontrolu i praćenje okoliša biosenzori mogu pružiti brzu informaciju o mjestu zagađenja. Osim toga, prednost biosenzora nad drugim analitičkim metodama jest i u prenosivosti što znanstvenicima omogućava mjerenje koncentracije polutanata *in situ* te u mogućnosti mjerenja bez dodatnih priprema uzoraka. Također, uz određivanje specifičnih spojeva mogu dati informaciju o njihovom biološkom učinku (npr. toksičnost nekog spoja) (Salgado i sur., 2011.). Najčešće korišteni biosenzori u praćenju okoliša su enzimski biosenzori, imunosenzori i senzori sa specifičnim reporter genima.

### **2.1. Enzimski biosenzori**

Enzimski biosenzori koriste princip enzima kao organskih katalizatora. Jednostavni i selektivni enzimski biosenzori prate enzimске aktivnosti izravno u prisutnosti supstrata. Neki enzimski biosenzori bazirani su na aktivaciji enzima uslijed interakcije s ciljnim analitom.

Primjer su teški metali u obliku anorganskih iona koji se vezanjem i aktivacijom enzima, mogu detektirati s obzirom na svoj sastav. Kao elementi za prepoznavanje teških metala najčešće se koriste metaloenzimi poput alkalne fosfataze, karboanhidraze, askorbat oksidaze i glutamin sintetaze. Biosenzori mogu uključivati i neenzimske proteine ili peptide kao elemente za prepoznavanje (Eggins, 2002.).

Enzimski biosenzori ponekad mogu unakrsno reagirati s nekoliko različitih metala. Također, na njih mogu utjecati neki okolišni čimbenici, poput temperature, pH vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika.

## **2.2. Biosenzori s reporter genom**

Reporter gen je gen dodan već postojećoj sekvenci drugog gena u svrhu prepoznavanja određene tvari. Kodiran je za mehanizam koji uzrokuje stanični odgovor kojeg je moguće detektirati. Gen mora imati izraženo svojstvo ili aktivnost koje je mjerljivo i koje se može jednostavno analizirati i reflektirati količinu kemikalije ili fizikalnu promjenu, a biosenzor ne smije sadržavati sličan ekspresivan gen ili aktivnost kako bi se izbjegli krivi rezultati mjerenja. Najčešće korišteni reporter gen je iz krijesnice *Photinus pyralis* koji učinkovito pretvara kemijsku energiju u svjetlost.

Mikroorganizmi su razvili sustav za detoksikaciju i izlučivanje otrovnih tvari. Ti se sustavi mogu koristiti kao komponente sa sensorima za kontaminaciju detekcijom tvari za koju su dizajnirani za detoksikaciju i izlučivanje. Takva komponenta u kombinaciji s reporter genima stvara biosenzore koji mogu identificirati otrovne tvari do vrlo niskih razina (Tauriainen i sur., 1998.).

## **2.3. Imunosenzori**

Imunosenzori su biosenzori koji koriste antitijela kao elemente prepoznavanja. Antitijela predstavljaju učinkovite detektore onečišćenja okoliša, pogotovo zbog napretka tehnologije. Snažno ciljaju analite što im je ujedno i glavni nedostatak, jer se analit nakon mjerenja ne može jednostavno osloboditi iz antitijela. Također, sinteza antitijela i daljnje testiranje često je dug, naporan i skup proces, može doći do pojave križne reaktivnosti s više analita, a na antigenu reaktivnost mogu utjecati pH vrijednost i temperatura.

### **3. Detektiranje teških metala i toksičnih spojeva**

#### **3.1. Pesticidi**

Široka upotreba pesticida i herbicida u poljoprivredi uzrok je njihove prisutnosti u okolišu. Zabrinutost oko njihove toksičnosti pokrenula je inicijativu za postavljanje graničnih koncentracija pesticida u različitim tipovima voda. Europska Unija izdala je direktivu 98/83/EC o kvaliteti vode za konzumaciju u kojoj su granice za pesticide 0.1 µg/l za pojedinačne pesticide i 0.5 µg/l za ukupnu koncentraciju pesticida.

Za detekciju pesticida najčešće korišteni su enzimski biosenzori. U literaturi se nalaze brojni senzori bazirani na inhibiciji enzima acetil kolinesteraze koji detektiraju različite organofosforne i karbamatne pesticide. Iako su osjetljivi, nisu dovoljno selektivni za korištenje u svrhu kvantificiranja ili određivanja vrste pesticida (Andres i Narayanaswamy, 1997.).

Jedan od zanimljivih indikatora toksičnog djelovanja određenih spojeva je i inhibicija fotosinteze. Zato su razvijeni biosenzori temeljeni na fotosistemu II koji mogu detektirati herbicide u okolišu. Oko 30% herbicida, među kojima su fenilurea, triazin i fenolni herbicidi inhibiraju fotosintetski tok elektrona što dovodi do promjene u fluorescenciji klorofila (Vedrine i sur., 2003.).

#### **3.2. Poliklorirani spojevi**

Poliklorirani bifenili sveprisutni su polutanti zbog široke primjene u industriji. Visoka toksičnost nekih bifenila predstavlja rizik za zdravlje ljudi, pogotovo zato što su, iako je njihova upotreba zadnjih godina značajno smanjena, još uvijek prisutni u okolišu. U skladu s time, razvijeni su biosenzori za njihovu detekciju, koji uključuju različite imunosenzore s fluorescencijskom i elektrokemijskom detekcijom (Salgado i sur., 2011.).

Osim polikloriranih bifenila veliki polutanti su i drugi poliklorirani spojevi poput dioksina. Oni se u okoliš ispuštaju kao nusproizvodi u raznim kemijskim procesima koji uključuju klor. Za njihovu detekciju razvijeni su različiti imunoeseji.

### 3.3. Aromatski spojevi

Zagađenjem tla i vode s različitim naftnim derivatima u okoliš dolaze mnogi štetni aromatski spojevi. To predstavlja ozbiljan zdravstveni problem jer su neki od njih topljivi u vodi (benzen, toluen, etilbenzen, ksileni). Biorazgradivi su, ali često zaostaju u prirodi. Zeleno fluorescirajući *Pseudomonas fluorescens* soj poslužio je za konstrukciju biosenzora zbog mogućnosti mjerenja benzena, toluena i etilbenzena u vodenim otopinama (Stiner i Halverson, 2002.).

### 3.4. Metali

Teški metali polutanti su koji predstavljaju najveći problem za okoliš. Nisu biorazgradivi tako da i u malim koncentracijama predstavljaju prijetnju za okoliš i čovjeka. Sveprisutni su u biosferi, mogu se u okolišu naći prirodno i djelovanjem čovjeka i visoko su toksični. Metali koji su najčešće praćeni u okolišu su olovo, krom, cink, živa, kobalt, kadmij i bakar (Verma i Singh, 2005.). Detekcija teških metala u okolišu, posebno bakra, kadmija, žive i cinka, važna je i zbog njihove sposobnosti akumulacije u živim organizmima.

Uobičajene analitičke metode za detekciju teških metala uključuju ionsku kromatografiju, induktivno spregnutu plazmu i polarografiju. Teški se metali mogu određivati i pomoću insko selektivnih elektroda. Iako učinkovite, ove metode ne mogu praviti razliku između dostupnih i nedostupnih frakcija metala za biološke sustave. U tome prednost imaju cjelostanični biosenzori u kojima stanice reagiraju samo s dostupnim frakcijama metala koje su za njih štetne (Rodriguez-Mozaz i sur., 2004.).

Za analizu teških metala u uzorcima iz okoliša razvijeni su cjelostanični bakterijski biosenzori koji koriste specifične gene odgovorne za bakterijsku otpornost na tražene elemente. Otpornost gena na metale pokreće se tek nakon prodiranja metala u citoplazmu bakterije. Pojedini specifični gena kodiraju bioluminescentne protein kao što je luciferin. U slučaju prisutnosti teškog metala dolazi do pojave luminescencije koja se može mjeriti fotometrima.

Za detekciju metalnih iona koriste se i enzimski biosenzori koji se baziraju na širokom spektru enzima koje specifično inhibiraju niske koncentracije određenih metala (Salgado i sur., 2011.).

#### 4. Zaključak

Detekcija i praćenje polutanata u okolišu osnovni su parameter zaštite okoliša. Pritom se veliki značaj daje detekciji teških metala i drugih toksičnih spojeva. Stoga su godinama razvijane i poboljšavane metode za njihovo pouzdano određivanje. Veliki broj tih metoda je dugotrajan, skup i zahtijeva dodatnu obradu uzoraka što je mana. Upotreba biosenzora u detekciji i praćenju polutanata pokazuje se kao pun pogodak, jer zaobilazi mane drugih metoda i znanstvenicima omogućava dobivanje informacija o stanju zagađenja u okolišu na licu mjesta. Budući da se baziraju na biološkim komponentama, biosenzori mogu pružati uvid i u utjecaj polutanata na živi organizam. Napretkom tehnologije, posebno genetskog inženjstva, poboljšavaju se svojstva bioloških elemenata za raspoznavanje, zbog čega se, uz postojeće prednosti, biosenzori mogu sve više očekivati u praćenju polutanata u okolišu.

#### Literatura

1. Andres, R. T.; Narayanaswamy, R. (1997). "Fibre-optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue", *Talanta* 44(8), 1335–1352.
2. Eggins B.R. (2002). „Chemical sensors and biosensors“, U: *Analytical Techniques in the Sciences (AnTS)* (ur. Anto D.J.), John Wiley & sons, LTD.
3. Hock, B.; Seifer, M.; Kramer, K. (2002) „Engineering receptors and antibodies for biosensors“, *Biosens. Bioelectron.* vol. 17(3), 239–249.
4. Hulanicki, A.; Glab, S. J.; Ingman, F. (1991). „Chemical sensors definitions and classification“. *Pure and Appl. Chem.*, vol. 83(9), 1247-1250.
5. Jenelten. U. Biosensors. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech Environ/BIOSSEN/biosen.htm> (20.09.2015.).
6. Rodriguez-Mozaz, S. i sur. (2004). "Biosensors for environmental applications: Future development trends", *Pure Appl. Chem.*, vol 76(4), 723–752.
7. Salgado, A.M.; Livia Maria Silva L.M.; Melo, A.F. (2011). „Biosensor for Environmental Applications“, U: *Environmental Biosensors* (ur. Somerset V.). <http://www.intechopen.com/books/environmentalbiosensors/biosensor-for-environmental-applications> (18.09.2015.).

8. Stiner, L.; Halverson, L. J. (2002). "Development and Characterization of a Green Fluorescent Protein-Based Bacterial Biosensor for Bioavailable Toluene and Related Compounds", *Appl. Environ. Microbiol*, vol.68(4), 1962–1971.
9. Tauriainen, S. i sur.(1998). „Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead“, *Biosensors and Bioelectronics*, 13(9), 931-938.
10. Thévenot, D. R. i sur.,„Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification“, *Pure Appl. Chem*, vol. 71, 2333-2348.
11. Védrine, C. i sur.(2003). „Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides“, *Biosens. Bioelectron.* vol. 18(4), 457–463.
12. Verma, N.; Singh, M. (2005). "Biosensors for heavy metals" *BioMetals*. vol. 18(2), 121-129.