



Doprava, zdraví a životní prostředí

Brno, 10.11. – 11.11.2014

Detekce toxických látek pomocí biosenzoru

**Martina Bucková¹, Roman Ličbinský¹, Blanka Šebestová²,
Jan Krejčí²**

¹Centrum dopravního výzkumu, v.v.i.

Líšeňská 33, 636 00 Brno

²BVT Technologies, a.s.

Strážek 206, 592 53 Strážek

Motivace projektu

Popis přístroje

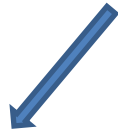
Princip měření

Výsledky a diskuze

Závěr

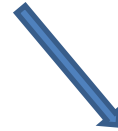
MOTIVACE PROJEKTU

KONTROLA KVALITY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ



Chemické analýzy

- velká časová náročnost
- nutnost vlastnit speciální přístrojové vybavení
- kvalitní odborná obsluha



Ekotoxikologické testy

Aplikace biosenzorů



- zjednodušení
- zrychlení
- nižší náklady
- předvýběr vzorků pro další analýzy

MOTIVACE PROJEKTU

NOVÝ BIOSENZOR

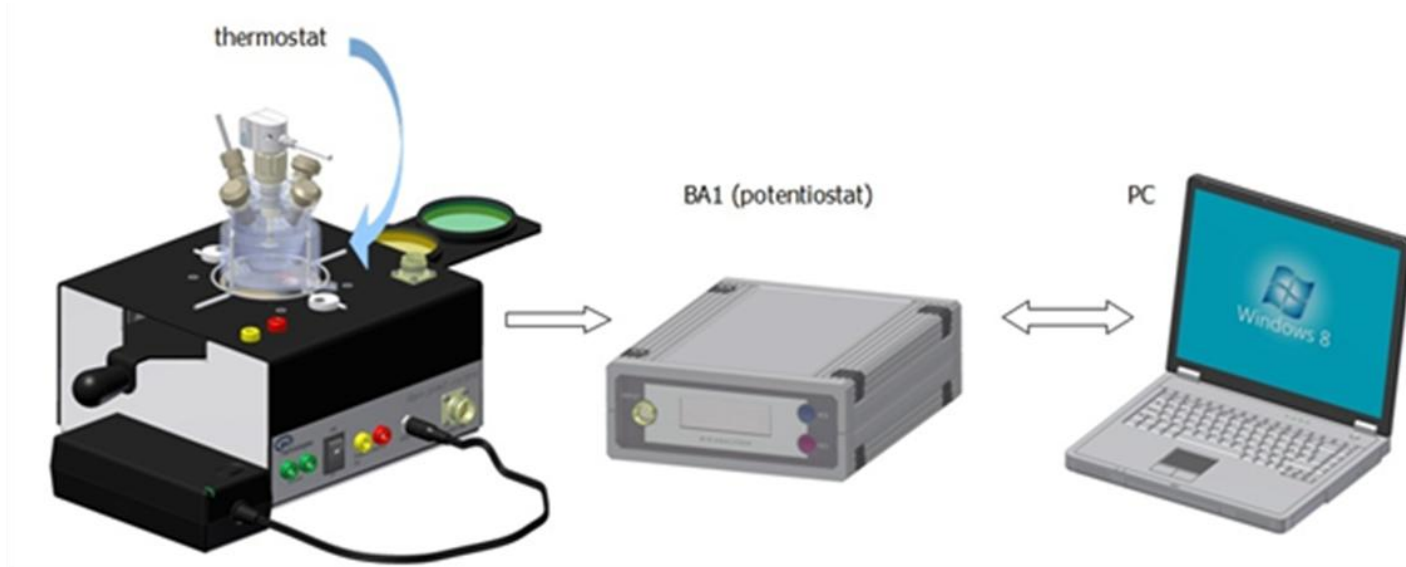
- vyvinut v rámci projektu VaV „Integrovaný systém sledování kontaminace životního prostředí dopravou“ č.TA02030179
- realizace - Centrum dopravního výzkumu, v.v.i. a BVT Technologies a.s.
- bioreceptor - **zelené řasy** (velmi citlivé organismy)
- srovnání se standardním testem popsáním **normou ISO 8692** (Zkouška inhibice růstu zelených sladkovodních řas)
- výsledky podle standardního postupu získány až za **72 hodin**

CÍLE

- zjednodušit a zrychlit standardní postup
- umožnit případně i práci v terénu
- vypracovat metodiku měření a ověřit ji v praxi

POPIS PŘÍSTROJE

Laboratorní vzorek zařízení



- Stojan s reakční nádobkou obsahující řasovou suspenzi (bioreaktor)
- Osvětlení - halogenová žárovka o napětí 12 V a výkonu 20 W
- Udržování teploty – napojení na externí vodní termostat

Kontaktní informace:

Martina Bucková, martina.buckova@cdv.cz, +420 549 429 302

POPIS PŘÍSTROJE

Skleněná (reakční) cela



- objem pracovního prostoru bioreaktoru je 2-10 ml
- optimální objem - 5 ml řasové suspenze

**Detail reakční nádoby s
míchadlem a kyslíkovou
elektrodou**



Otáčení míchadla

- zajištěn intenzivní přenos kyslíku k aktivnímu povrchu čidla
- minimalizován hydrodynamický šum

Kontaktní informace:

Martina Bucková, martina.buckova@cdv.cz, +420 549 429 302

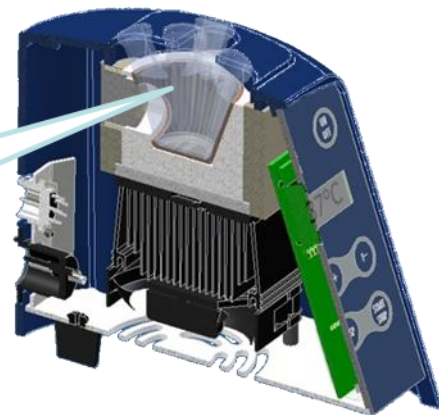
POPIS PŘÍSTROJE

Model minitermostatu



- malé rozměry
- potencionálně použitelný mimo laboratoř
- uživatelsky příjemný
- zajištění stálé teploty

Osvětlení vysoce
svítivou LED



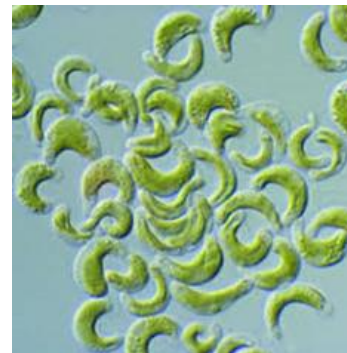
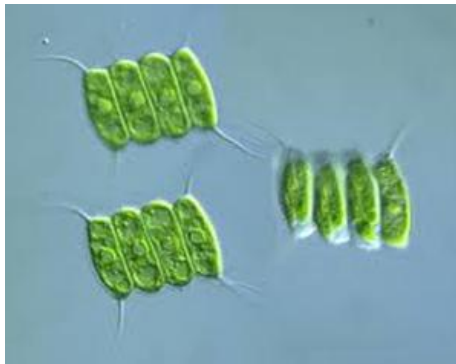
integrace reakční nádoby a
osvětlení do minitermostatu

PRINCIP MĚŘENÍ

- řasová suspenze **osvětlována a potom nechána ve tmě** v několika opakujících se cyklech
- během měření sledována **produkce kyslíku** (koncentrace kyslíku měřena s přesností 0,02%, 24 hodinová stabilita signálu 0,1%)
- **snížení produkce kyslíku** po aplikaci toxické látky
- vyhodnocení dat metodou synchronní detekce (program Syndet), export do Excelu
- **optimalizace podmínek měření** (optimální teplota, délka cyklu světla a tmy, otáčky míchadla, způsob předkultivace řas a druh řas)
- toxikant - **dusičnan stříbrný** (AgNO_3)
- teplota při měření **25°C**
- jeden cyklus - řasy **60s osvětlovány a 90s ponechány ve tmě**

PRINCIP MĚŘENÍ

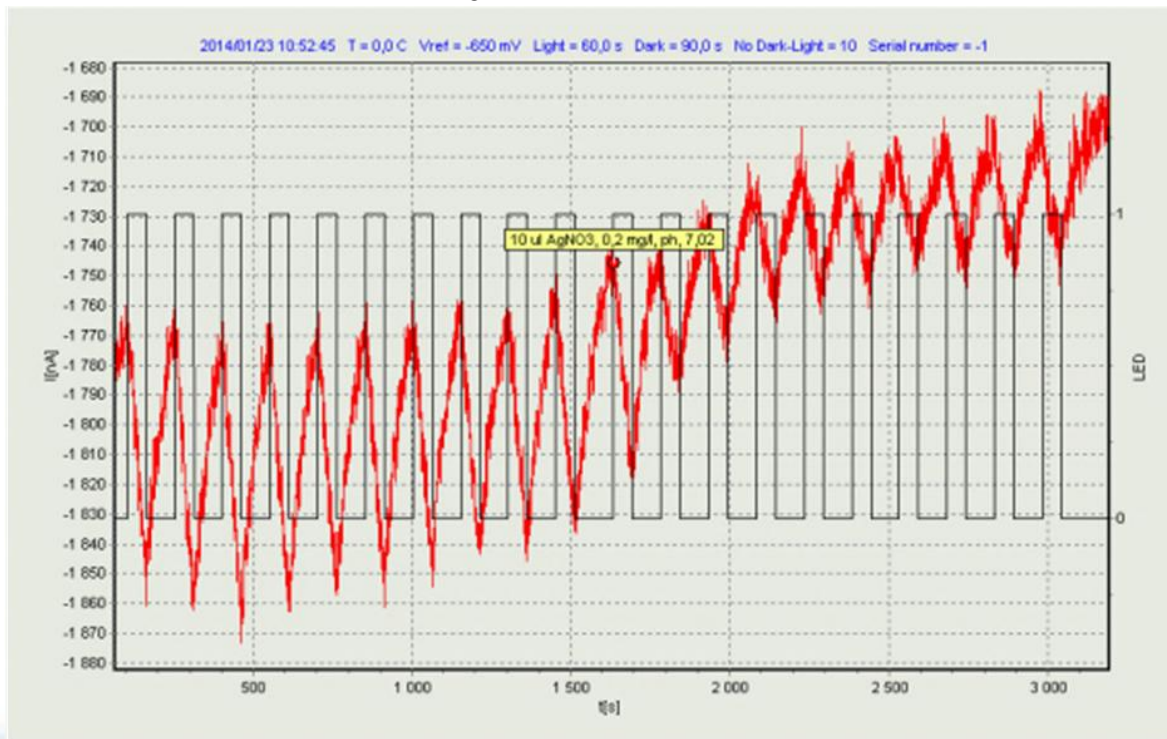
- doba trvání jednoho měření - **20 cyklů (50 min)** - prvních 10 cyklů měřena produkce kyslíku neovlivněných řas, poté aplikován přídavek AgNO_3 a dalších 10 cyklů měřen vliv toxikantu na produkci kyslíku
- měření na zelených řasách ***Scenedesmus quadricauda*** a ***Pseudokirchneriella subcapitata***



- Výsledky srovnávány s hodnotami **EC₅₀** získanými standardním postupem dle **normy ISO 8692**

VÝSLEDKY A DISKUSE

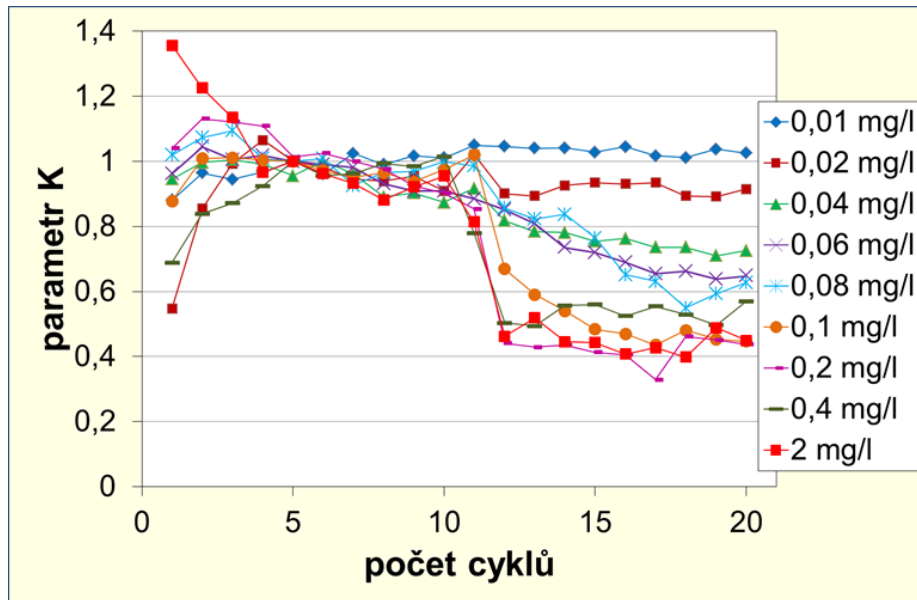
Záznam signálu po aplikaci AgNO_3 (0,2 mg/l)



Kontaktní informace:

Martina Bucková, martina.buckova@cdv.cz, +420 549 429 302

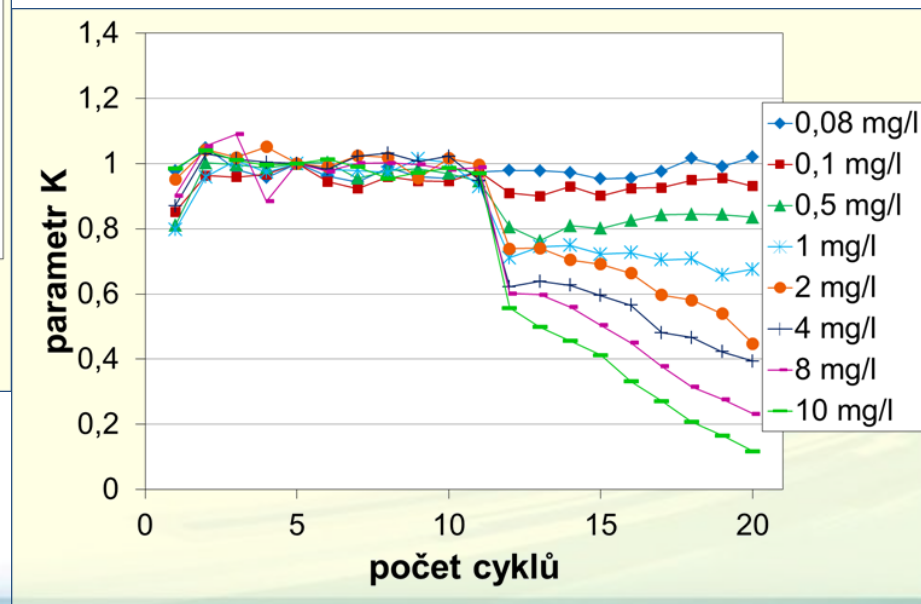
VÝSLEDKY A DISKUSE



Snížení produkce kyslíku po aplikaci AgNO_3 - *Scenedesmus quadricauda*

Snížení produkce kyslíku po aplikaci AgNO_3 - *Pseudokirchneriella subcapitata*

Parametr K - koeficient měřítka mezi odpovědí řas na světlo v přítomnosti inhibitoru s ohledem na odpověď bez inhibitoru



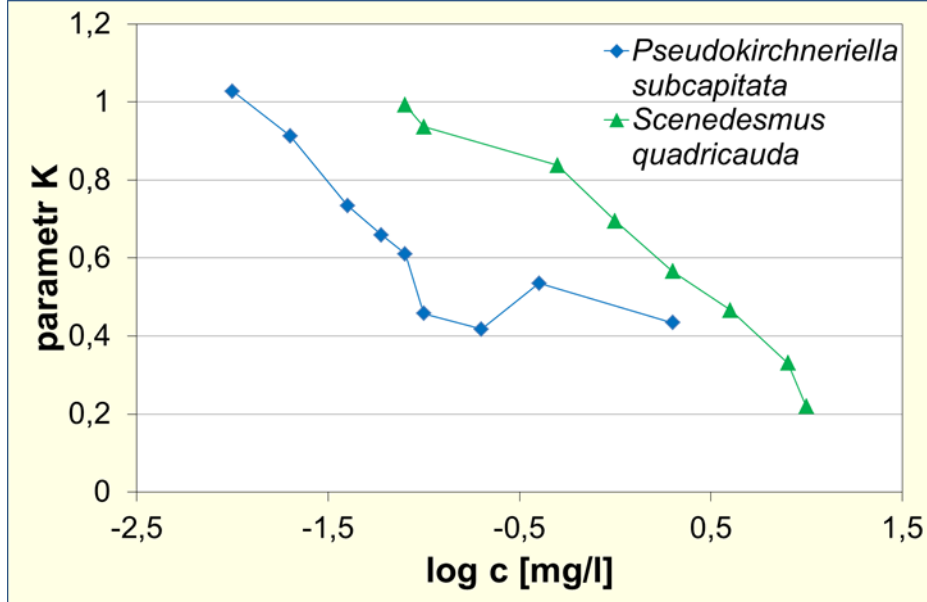
Kontaktní informace:

Martina Bucková, martina.buckova@cdv.cz, +420 549 429 302

VÝSLEDKY A DISKUSE

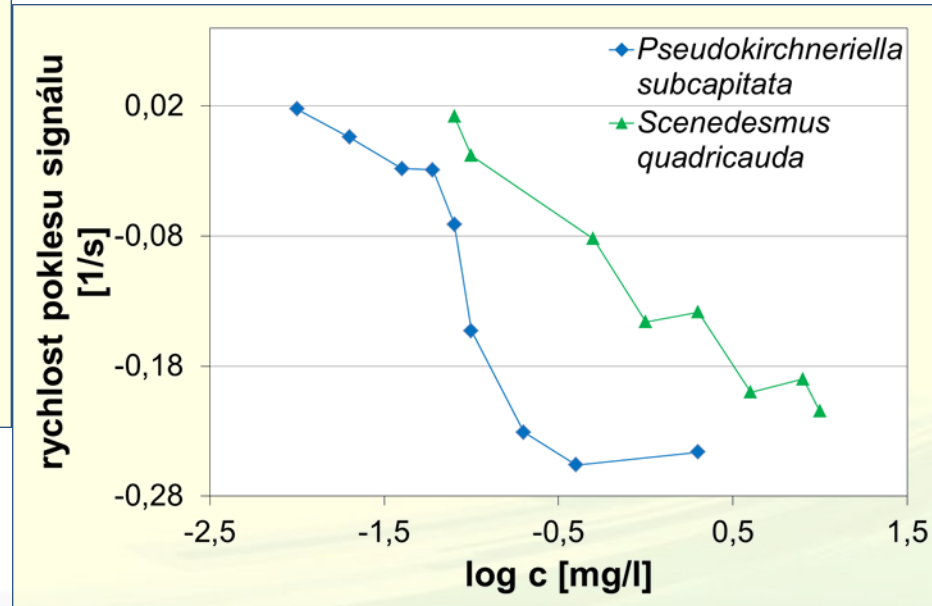
- inhibice při **nižších hodnotách AgNO_3** u řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* než u řasy *Scenedesmus quadricauda*
- **nižší hodnoty signálu** pro *Pseudokirchneriella subcapitata* (menší velikost buněk i chloroplastů, a tím i nižší produkce kyslíku)
- pro další měření **vybrána řasa *Scenedesmus quadricauda*** (vyšší hodnoty signálu umožní robustnější měření a lepší reprodukovatelnost výsledků)
- výsledky jednoho měření byly získány za **50 minut** (asi stokrát rychleji než je tomu v případě 72 hodinového testu dle ISO)
- Přístroj by umožnil detekci v těch případech, kdy by byla toxicita akutní a 72 hodinový test by poskytl výsledky příliš pozdě

VÝSLEDKY A DISKUSE



Rychlost poklesu parametru K v závislosti na koncentraci AgNO_3

Kalibrační křivka pro AgNO_3 a vybrané řasy



ZÁVĚR

- nový přístroj založený na principu **biosenzoru** (bioreceptor **zelené řasy**)
- možnost **zrychlení a zjednodušení standardního postupu měření** podle normy ISO 8692.
- výsledky jednoho měření získány za **50 minut** (72 hodin dle ISO)
- měřen **přímý toxický vliv na fotosystém II (PS II)**, výsledky nejsou přímo srovnatelné s ISO testem, kde je měřena růstová rychlost
- **limit detekce** pro nový přístroj a AgNO_3 **nepatrně vyšší** než hodnoty EC_{50} pro AgNO_3 stanovené standardním postupem ($\text{EC}_{50}=0,02$ mg/l pro *Pseudokirchneriella subcapitata*)
- srovnání citlivosti 2 řas k AgNO_3 a jejich vhodnost pro měření v biosenzoru - vhodnější řasa ***Scenedesmus quadricauda*** (produkce vyšších hodnot měřeného signálu)

Děkuji vám za pozornost!

Kontaktní informace:

Martina Bucková

martina.buckova@cdv.cz

+420 549 429 302

Centrum dopravního výzkumu, v. v. i.

Líšeňská 33a, 636 00 Brno

telefon: **+420 549 429 366**

email: **cdv@cdv.cz**

www.cdv.cz