

A DEVELOPMENT OF ENZYMATIC BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF CHLORINATED PESTICIDES

VÝVOJ ENZYMOVÉHO BIOSENZORU PRO DETEKCI CHLOROVANÝCH PESTICIDŮ

Hradecký J.¹⁾, Mikelová R.^{1,2)}, Prokop Z.³⁾, Trnková L.²⁾, Damborský J.³⁾, Adam V.^{1,4)}, Petrlová J.¹⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²⁾Department of Theoretical and Physical Chemistry, ³⁾National Centre for Biomolecular Research, and

⁴⁾Department of Analytical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: JanHradecky@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Chlorinated pesticides such as derivatives of DDT, hexachlorobenzene and many others have been used to protect plants. It is a common knowledge that residues of these pesticides deposit in adipose tissues at animals and could be transferred from here to eggs or to breast milk of mammals. Moreover, a higher concentration of these compounds could be responsible for infertility and for tumour disease. Therefore a development of simple and accurate tool for detection of them is needed. Our suggested biosensor is based on a determination of chlorides on carbon paste and/or glassy carbon electrode both in stationary and flow system. We improved sensitivity and selectivity of the analysis through modification of the electrode by silver nitrate. We were able to determine chlorides in units of 10^{-8} M due to this modification. In addition dehalogenases were bacterial enzymes capable of dechlorinating chlorinated hydrocarbons. Thus, we could use dehalogenases to suggest a new biosensor for detection of chlorinated pesticides.

Keywords: Pesticides, Electrochemical determination, Dehalogenase, Carbon paste electrode.

ABSTRAKT

Chlorované pesticidy, jako například deriváty DDT, hexachlorbenzenu a řada dalších byly velmi hojně užívány v ochraně rostlin. Je známo, že rezidua těchto pesticidů se v živočišném i lidském organismu ukládají do tukové tkáně, a z ní mohou přecházet do vajec ptáků nebo mateřského mléka savců. Navíc ve větších koncentracích pak mohou způsobovat nádorová onemocnění či neplodnost. Proto je potřebné vyvíjet jednoduché a přesné nástroje k detekci takových pesticidů. Námi navržený senzor je založený na detekci chloridů na uhlíkové pastové elektrodě anebo elektrodě ze skelného uhlíku, jak ve stacionárním, tak průtokovém systému. Pro dosažení lepší senzitivity a selektivity bylo možné uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovat přísadkou dusičnanu stříbrného. Modifikací elektrody byl limit detekce chloridů snížen až na koncentraci 10^{-8} M. Dehalogenázy byly popsány jako bakteriální enzymy

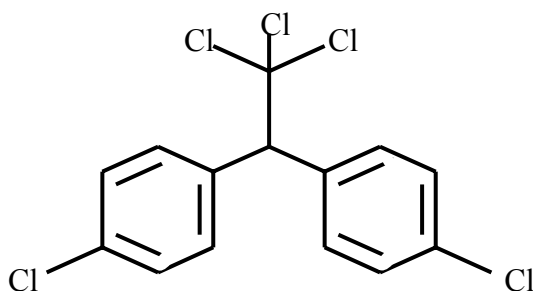
schopné odštěpovat z halogenovaných uhlovodíků právě halogen. Z tohoto důvodu bylo tedy možné dehalogenázy využít pro navržení nového biosenzoru k detekci chlorovaných pesticidů.

Klíčová slova: Pesticidy, Elektrochemické stanovení, Dehalogenáza, Uhlíková pastová elektroda.

ÚVOD

Základní rozdělení pesticidů je určeno podle cílové skupiny organismů proti kterým mají působit a chránit tak kulturní plodiny. Dnes známe 5 hlavních skupin těchto přípravků používaných zejména v zemědělské prvovýrobě. Jsou to: insekticidy-hmyz; fungicidy-houby; nematocidy-háďátka; rodenticidy-hlodavci; herbicidy-plevelné rostliny. Dále členíme pesticidy podle obsahu jedné či více účinných látek a případně dalších pomocných látek jako jsou smáčedla apod. Z chemického hlediska účinná látka může být jak anorganického tak organického původu. Používání **anorganických** pesticidů (sloučeniny na bázi mědi, síry, a dříve také rtuti a cínu) se výrazným způsobem omezuje, protože významně kontaminují životní prostředí. Avšak organické pesticidy jsou stále velmi hojně využívány v ochraně rostlin. **Organické** pesticidy jsou většinou organofosforové, organochlorové a karbamátové sloučeniny. Působí velmi intenzivně na celý organismus a většinou dlouhodobě. Významnou skupinu představují chlorované uhlovodíky, které jsou známé svými výraznými účinky na nervovou soustavu či dýchací řetězec, a přetrváváním reziduí v životním prostředí. Z důvodu zmíněných negativních vlastností bylo používání těchto účinných látek ve vyspělých zemích významným způsobem omezeno, zatímco v zemích třetího světa jsou stále intenzivně používány. Patří sem například skupina pesticidních látek zahrnující deriváty DDT (dichlordifenyiltrichlorethan) (suma DDT, DDT-p.p., DDD-p.p., DDE-p.p.), HCH (hexachlorcyklohexan), HCB (hexachlorbenzen), heptachlor, endosulfan, methoxychlor, aldrin, dieldrin a endrin. Jedná se o látky lipofilní povahy, které se mohou díky této vlastnosti vázat na lipidy v organismech, případně v nich přetrvávat a případně iniciovat vznik nádorového onemocnění či neplodnost u živočichů [1-3].

Obr. 1 DDT (4,4'- dichlordifenyiltrichlorethan)



Výhodou chemických opatření v ochraně rostlin je, že v krátké době můžeme moderními stroji ošetřit velké plochy, což umožňuje vykonat potřebné zákroky včas, tj. tehdy, kdy porosty nejvíce ohrožují houbové choroby, hmyz a jiní škůdci. Výraznou předností chemických metod ochrany zemědělských plodin je většinou velmi jednoduchý a poměrně levný způsob aplikace přípravku. Používání chemických sloučenin však přináší také celou řadu problémů: **i)** akumulace a distribuce reziduí pesticidů v ošetřovaných rostlinách; **ii)** vliv pesticidů na životní prostředí, dochází k porušení biologické rovnováhy v přírodě; **iii)** vznik rezistence na používanou účinnou látku, jak u hmyzu tak u rostlin; **iv)** negativní vliv na ostatní hmyz (včely) a rostliny (okrajová rostlinná společenstva); **v)** nebezpečí kontaminace vody a potravy člověka (vznik akutní otravy).

Proto je potřeba vyvíjet rychlé, velmi účinné a přitom ekonomicky málo náročné metody, pomocí kterých můžeme chloridy v životním prostředí efektivně stanovit [4-8].

MATERIÁLY A METODY

Chemikálie:

Reagencie ACS čistoty byly zakoupeny od Sigma Aldrich. Všechny roztoky byly filtrovány přes 0.45 μm teflonový membránový filtr (MetaChem, Torrance, CA, USA). pH bylo měřeno za použití WTW inoLab Level 3 instrument (Weilheim, Německo), řízený pomocí osobního počítače a programu (MultiLab Pilot; Weilheim, Německo). pH-elektroda (SenTix H) pro kalibraci byl použit set WTW pufrů (Weilheim, Německo).

Stacionární elektrochemický systém – AUTOLAB

Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku a pastová uhlíková, pomocná elektroda byla uhlíková tyčka a referenční elektrodou byla Ag/AgCl 3 M KCl. Všechny experimenty probíhaly za pokojové teploty. DPV parametry pro analýzu chloridů: počáteční potenciál -0,8 V, konečný potenciál 0,6 V, amplituda 25 mV, rychlost polarizace 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí – Coulochem III.

HPLC ED system byl sloužen z chromatografické pumpy pracující v rozsahu 0.001-9.999 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Model 583 ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), guard cely (Model 5020 ESA, USA), reakční smyčky (1 m) a elektrochemického detektoru. Elektrochemický detektor (ED) využívá analytické průtokové cely o objemu 50 μl (Model 5040, ESA, USA), ve které jsou umístěny elektroda ze skelného uhlíku jako pracovní elektroda, hydrogen-paladiová elektroda jako referenční elektroda a uhlíková elektroda jako pomocná. Vzorek (5 μl) byl injektován při pokojové teplotě přes dávkovací ventil manuálně. Data byla získávána pomocí programu

CSW 32. Parametry analýzy: průtok mobilní fáze 0,1 až 1,5 ml.min⁻¹, mobilní fáze byla tvořena 0,2 M acetátovým pufrům (pH = 5), potenciál v guard cele 0 mV, potenciál na pracovní elektrodě -200 až 300 mV, aplikovaný proud 200 µA.

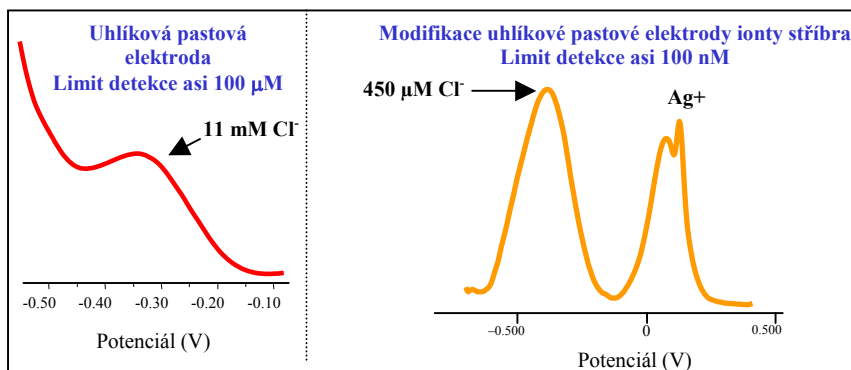
VÝSLEDKY A DISKUSE

V naší práci jsme studovali základní chování chloridů na uhlíkových elektrodách (CPE, CGE) [9-12]. Signál chloridů je ovlivňován složením základního elektrolytu. Testovali jsme vliv rozdílných pufrů (acetátový, fosfátový a borátový). Zjistili jsme, že nejvyšší odezvy byly pozorovány v acetátovém pufru. Navíc jsme studovali vliv různého pH acetátového pufru. Nejlepší elektrochemická odezva chloridů byla pozorována při pH 5. Za neoptimálnějších podmínek pak byla studována závislost na koncentraci s limitem detekce kolem 10⁻⁶ M. Protože v prostředí je koncentrace chlorovaných uhlovodíků velmi nízká, výrazně nižší než výše uvedený limit detekce, bylo nutno přistoupit k navržení nového postupu s cílem zvýšit senzitivitu. Z proto jsme navrhli unikátní postup u kterého využíváme interakce mezi:

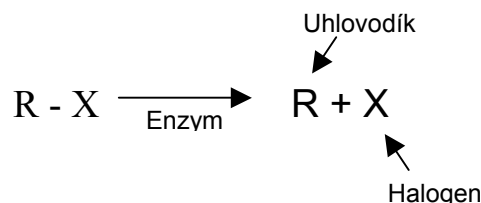


Uhlíkovou pastovou elektrodu jsme modifikovali přidavkem AgNO₃. Díky této modifikaci se podařilo snížit limit detekce chloridů na jednotky nanomolární koncentrace (10⁻⁹ M).

Obr. 2 Porovnání odezvy Cl⁻ na uhlíkové pastové elektrodě bez a s modifikací AgNO₃.



Abychom byli schopni detekovat chloridy z chlorovaného uhlovodíku (pesticidu), musí být halogen uvolněn z uhlovodíku. Je známo že řada druhů chemotrofních bakterií obsahuje enzymy umožňující štěpení těchto vazeb [13-19]. Proto jsme využili enzym dehalogenázy bakterie *Pseudomonas paucimobilis*, která chlorid uvolní z uhlovodíku.



Takto uvolněný halogen je možné analyzovat námi vypracovanou elektroanalytickou metodikou. Je známo, že aktivita enzymu je ovlivněna řadou faktorů, jako je složení pufru, jeho pH, iontovou silou a teplotou. V naší práci jsme převzali podmínky enzymového štěpení z laboratoře „Národního centra pro výzkum biomolekul na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně“. V našich experimentech však bylo potřebné modifikovat prostředí experimentu výměnou glycidového pufru za pufr fosfátový (pH = 7,55). Za těchto podmínek jsme sledovali štěpení modelového chlorovaného uhlovodíku (1-chlorhexan) enzymem dehalogenázou, při různých teplotách na elektrochemickém detektoru ve spojení s HPLC. Zjistili jsme, že aktivita enzymu striktně závisí na teplotě a nejintenzivnější štěpení (detekce chloridu) je při teplotách blízkých 39°C. Výsledky jsou v dobré shodě s daty zjištěnými jinými metodami používanými pro studium aktivity tohoto enzymu.

ZÁVĚR

Analýza chloridů je v současné době možná jen pomocí zdlouhavých laboratorních málo senzitivních metod [20,21]. Proto jsme navrhli nový postup pro sledování chlorovaných uhlovodíků za pomoci elektrochemie v kombinaci s bakteriálním enzymem.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, INCHEMBIOL 0021622412 a FRVŠ 2348/F4a.

LITERATURA

- [1] L. Guzzella, C. Roscioli, L. Vigano, M. Saha, S.K. Sarkar and A. Bhattacharya Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India, *Environment International* 31 (2005) 523-534.
- [2] I. Al-Saleh, N. Shinwari, P. Basile, I. El-Doush, M. Al-Zahrani, M. Al-Shanshoury and G.E.D. Mohammed DDT and its metabolites in breast milk from two regions in Saudi Arabia, *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 45 (2003) 410-427.
- [3] V. Turusov, V. Rakitsky and L. Tomatis Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, persistence, and risks, *Environmental Health Perspectives* 110 (2002) 125-128.
- [4] E. Heinisch, A. Kettrup, W. Bergheim, D. Martens and S. Wenzel Persistent chlorinated hydrocarbons (PCHC), source-oriented monitoring in aquatic media - 2. The insecticide DDT, constituents, metabolites, *Fresenius Environmental Bulletin* 14 (2005) 69-85.
- [5] A. Andrade-Eiroa, J.A. Erustes, R. Forteza, V. Cerda and J.L.F.C. Lima Determination of chloride by multisyringe flow injection analysis and sequential injection analysis with potentiometric detection, *Anal. Chim. Acta* 467 (2002) 25-33.
- [6] R.H. Taylor and J.W. Grate A flow injection analysis technique for the determination of chloride using reflectance detection, *Talanta* 42 (1995) 257-261.

- [7] E. Heinisch, A. Kettrup, W. Bergheim and S. Wenzel Persistent chlorinated hydrocarbons (PCHC), source-oriented monitoring in aquatic media. 1. Methods of data processing and evaluation, *Fresenius Environmental Bulletin* 13 (2004) 1461-1473.
- [8] P. Wegner, G. Kleinstauber, F. Baum and F. Schilling Long-term investigation of the degree of exposure of German peregrine falcons (*Falco peregrinus*) to damaging chemicals from the environment, *Journal of Ornithology* 146 (2005) 34-54.
- [9] I. Svancara, K. Vytras, J. Barek and J. Zima Carbon paste electrodes in modern electroanalysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 311-345.
- [10] I. Svancara, B. Ogorevc, S.B. Hocevar and K. Vytras Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry, *Anal. Sci.* 18 (2002) 301-305.
- [11] G. Pezzatini, I. Midili and G. Toti Determination of chloride in drinking water by differential pulse voltammetry on graphite, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 650-657.
- [12] S.D. Nikolic, E.B. Milosavljevic, J.L. Hendrix and J.H. Nelson Indirect determination of chloride by gas diffusion flow injection with amperometric detection, *Analyst* 116 (1991) 49-52.
- [13] A.J. Oakley, Z. Prokop, M. Bohac, J. Kmunicek, T. Jedlicka, M. Monincova, I. Kuta-Smatanova, Y. Nagata, J. Damborsky and M.C.J. Wilce Exploring the structure and activity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: Evidence for product- and water-mediated inhibition, *Biochemistry* 41 (2002) 4847-4855.
- [14] Y. Nagata, K. Mori, M. Takagi, A.G. Murzin and J. Damborsky Identification of protein fold and catalytic residues of gamma-hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase LinA, *Proteins-Structure Function and Genetics* 45 (2001) 471-477.
- [15] T. Bosma, J. Damborsky, G. Stucki and D.B. Janssen Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) 3582-3587.
- [16] V.A. Streltsov, Z. Prokop, J. Damborsky, Y. Nagata, A. Oakley and M.C.J. Wilce Haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: X-ray crystallographic studies of dehalogenation of brominated substrates, *Biochemistry* 42 (2003) 10104-10112.
- [17] Z. Prokop, M. Monincova, R. Chaloupkova, M. Klvana, Y. Nagata, D.B. Janssen and J. Damborsky Catalytic mechanism of the haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 45094-45100.
- [18] J. Kmunicek, K. Hynkova, T. Jedlicka, Y. Nagata, A. Negri, F. Gago, R.C. Wade and J. Damborsky Quantitative analysis of substrate specificity of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26, *Biochemistry* 44 (2005) 3390-3401.
- [19] Y. Nagata, Z. Prokop, Y. Sato, P. Jerabek, A. Kumar, Y. Ohtsubo, M. Tsuda and J. Damborsky Degradation of beta-hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26, *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005) 2183-2185.
- [20] S.D. Kumar, V.S. Tripathi, N. Shenoy and B. Maiti Chloride analysis in magnesium metal using ion chromatography with conductometric detection, *J. Chrom. A* 1046 (2004) 155-158.
- [21] M. Miro and W. Frenzel A novel flow-through microdialysis separation unit with integrated differential potentiometric detection for the determination of chloride in soil samples, *Analyst* 128 (2003) 1291-1297.