

Barbara Kołwzan

## Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody

Degradacja środowiska naturalnego, będąca często skutkiem postępu cywilizacyjnego, wynika z oddziaływania różnorodnych czynników natury fizycznej, chemicznej i biologicznej, przy czym możliwe jest także powstawanie różnych związków szkodliwych na skutek działalności metabolicznej drobnoustrojów [1,2]. Zanieczyszczenia wprowadzane do środowiska mają bezpośredni lub pośredni wpływ na organizmy żywe zasiedlające poszczególne ekosystemy, w tym przede wszystkim na zdrowie człowieka. Jedną z ważnych dróg rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń w środowisku jest woda (tab. 1). Z tego względu stały monitoring stopnia jej zanieczyszczenia jest niezbędnym elementem kontroli jej jakości. Jakość wody, w tym także wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, zależy nie tylko od składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń chemicznych, ale także od obecności w niej drobnoustrojów. Bakterie, wirusy i inne mikroorganizmy są szeroko rozpowszechnione w środowisku wodnym, a niektóre z nich stanowią poważny problem zdrowotny [3]. Źródłem drobnoustrojów chorobotwórczych najczęściej są ścieki oraz spływy powierzchniowe. Możliwość zakażenia ludzi zmusza do stałej kontroli sanitarno-higienicznej zarówno wody przeznaczonej do spożycia, jak również wody w basenach kąpielowych, a także w zbiornikach wodnych mających znaczenie rekreacyjne [4].

W ostatnich latach szczególnego znaczenia nabiera obawa przed zastosowaniem drobnoustrojów chorobotwórczych i innych czynników biologicznych w atakach terrorystycznych [5]. Wykorzystane do tego celu mogą być bakterie, wirusy, pierwotniaki i toksyny (tab. 2). Podobnie jak w przypadku żywności, podstawą ochrony przed atakiem za pośrednictwem wody jest szczelny system nadzoru jej jakości na każdym etapie, tj. od ujęcia, poprzez układy oczyszczania i dystrybucji, aż do jej odbiorców. W tym celu należy dysponować możliwością wykonania szczegółowych analiz laboratoryjnych w krótkim czasie. Zagadnienie to nabiera szczególnie istotnego znaczenia z uwagi na propozycję Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wpisania do dyrektywy 98/83/WE obowiązku wdrożenia w przedsiębiorstwach wodociągowych tzw. planów bezpieczeństwa wody (Water Safety Plans) [6].

Klasyczne metody wykrywania skażeń chemicznych i mikrobiologicznych wody są drogie i czasochłonne, a w związku z tym ich przydatność jest ograniczona.

Dlatego poszukuje się nowych technik detekcji, do których należą czujniki (sensory) wykorzystujące metody biologiczne. Rozwój nauki, a przede wszystkim biotechnologii i nanotechnologii, pozwolił na konstrukcję nowego typu czujników o wysokiej selektywności, umożliwiających wykrywanie zarówno zanieczyszczeń chemicznych, jak i biologicznych w krótkim czasie. Są nimi czujniki biologiczne (bioczujniki, biosensory), łączące precyzję klasycznych metod analizy z szerokim wachlarzem rozwiązań konstrukcyjnych.

Zaletami biosensorów są wysoka czułość i selektywność, znikoma podatność na zakłócenia i miniaturowe rozmiary. Pomiar za pomocą bioczujnika najczęściej nie wymaga pracochłonnego przygotowania próbki. Poza tym czujnik biologiczny może być stosowany zwykle przez kilka tygodni, a nawet miesięcy, wykonując w tym czasie setki pomiarów, co sprawia, że koszt analizy jest bardzo mały [7]. Z uwagi na dużą czułość i prostotę użytkowania biosensory znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach analizy i diagnostyki. Przyrządy tego typu wykorzystywane są w analizie klinicznej i biomedycznej, w przemyśle spożywczym, wydobywczym i hutniczym, w inżynierii środowiska, a także w obronności [8].

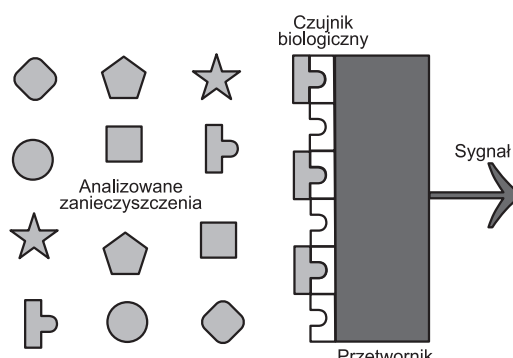
### Charakterystyka czujników biologicznych

Czujnik biologiczny jest urządzeniem analitycznym, które zawiera biologicznie aktywny materiał będący w bezpośrednim kontakcie z właściwie dobranym elementem przetwornikowym w celu detekcji (odwracalnie i selektywnie) stężenia lub aktywności chemicznej substancji w dowolnej próbce [9]. Biosensor złożony jest z biologicznego systemu rozpoznawania (mikroorganizm, enzym, przeciwciało, DNA) i przetwornika przekształcającego zjawiska biologiczne na sygnały elektryczne, przy czym rejestracja uzyskanych danych odbywa się elektronicznie (rys. 1). Połączenie elementów biologicznych i elektronicznych pozwala na szybkie, czułe i precyzyjne wykrycie nie tylko małych ilości związków chemicznych, ale także niebezpiecznych mikroorganizmów czy toksyn.

Ze względu na rodzaj zastosowanego do detekcji materiału biologicznego wyróżnia się biosensory wykorzystujące biokatalizatory oraz biosensory zaopatrzone w receptory. Pomiar zachodzących w czujniku zjawisk biologicznych może odbywać się za pomocą detektorów elektrochemicznych (potencjometrycznych, amperometrycznych i konduktometrycznych), optycznych, piezoelektrycznych (masowych) i termicznych [10].

Tabela 1. Drobnoustroje chorobotwórcze przenoszone drogą wodną [47]  
Table 1. Waterborne pathogens [47]

Rodzaj/gatunek	Jednostka chorobowa
Bakterie	
<i>Salmonella typhi</i> ( <i>S. enterica</i> var. Typhi)	dur brzuszny
<i>Salmonella</i> paratyphi	dur rzekomy
<i>Salmonella</i>	salmonelozy odzwierzęce
<i>Shigella</i> sp.	czerwonka bakteryjna
<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio cholerae</i> typ El Tor	cholera
Enteropatogenne: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Campylobacter (Vibrio) fetus</i> subsp. jejuni, <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i>	nieżyty żołądkowo-jelitowe
<i>Yersinia enterocolitica</i>	jersinioza
<i>Pasteurella (Francisella) tularensis</i>	tularemia
<i>Leptospira</i> sp.	leptospirozy
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Mycobacterium (M. balnei, M. phlei, M. marinum, M. kansasii, M. fortuitum, M. chelonae, M. gorgoniae)</i>	zakażenia skóry
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i>	bakteremia, zapalenie górnych dróg oddechowych, uszu, spojówek
Gram-ujemne pałeczki wodne (rodzaj: <i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Xantomonas</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i> )	stany gorączkowe (pirogeny)
<i>Legionella pneumophila</i>	choroba legionistów
Wirusy	
Poliowirusy	porażenia, zapalenie opon mózgowych
ECHO	zapalenie opon mózgowych, choroby układu oddechowego
Coxsackie A	herpangia, choroby układu oddechowego, zapalenie opon mózgowych
Coxsackie B	zapalenia mięśnia sercowego, wrodzone wady serca, zapalenie opon mózgowych, choroby układu oddechowego, pleurodynia
Enterowirusy	zapalenie opon mózgowych i mózgu, choroby układu oddechowego, ostre krwotoczne zapalenie spojówek
Wirus zapalenia wątroby typu A	wirusowe zapalenie wątroby
Wirus Norwalk	epidemiczne biegunki,
Parwowirusy	towarzyszą chorobom układu oddechowego (dokładnie nie ustalono)
Adenowirusy	choroby układu oddechowego, zakażenia oczu, biegunki
Rotawirusy	epidemiczne biegunki (głównie u dzieci)
Reowirusy	choroby dróg oddechowych
Pierwotniaki	
<i>Giardia lamblia</i> (wiciowiec)	giardioza
<i>Cryptosporidium parvum</i> (sporowiec)	kryptosporidioza
<i>Entamoeba histolytica</i> (korzenionóżka)	amebioza
<i>Acanthamoeba castellanii</i> (korzenionóżka) <i>Naegleria gruberi</i> (korzenionóżka)	pełzakowate zapalenie opon mózgowych i mózgu
<i>Balantidium coli</i> (orzęsek)	czerwonka balantydioza



Rys. 1. Schemat czujnika biologicznego  
Fig. 1. Biosensor

## Materiał biologiczny stosowany w biosensorach

### Biokatalizatory

Do konstrukcji biosensorów stosuje się materiały biokatalityczne, takie jak izolowane enzymy, frakcje subkomórkowe, preparaty komórkowe z bakterii, roślin i zwierząt. Najczęściej wykorzystywanymi biokatalizatorami są enzymy. Są to białka katalizujące reakcje biochemiczne we wszystkich żywych organizmach. Wyróżniają się wysoką selektywnością względem substratu i znacznie przyspieszają reakcje, co zwiększa czułość biosensorów. Biokatalizatory są immobilizowane na elemencie detekcyjnym. Analizowana substancja musi przeniknąć do warstwy naniesionego materiału biologicznego, który dokonuje jej przetworzenia na inne substancje, będące produktami reakcji mierzalnymi przez detektor. Obok bezpośredniego wykorzystania właściwości katalitycznych enzymów są one używane pośrednio do oznaczania substancji, które je inhibują. W charakterze detektorów stosowane są układy jednoenzymowe i wieloenzymowe. Układy jednoenzymowe pracują w oparciu o jeden enzym, katalizujący wybraną reakcję, natomiast w układach wieloenzymowych sygnał jest wzmacniany przez obieg analizowanej substancji czy też usuwanie produktów przeszkadzających w pomiarze. Niestety oczyszczone enzymy są drogie i niestabilne, wrażliwe na działanie czynników środowiskowych, takich jak pH, temperatura, siła jonowa czy obecność substancji toksycznych.

Ze względu na wysokie koszty oczyszczania enzymów poszukuje się materiałów alternatywnych o analogicznych właściwościach, ale znacznie tańszych. Mogą być nimi tkanki roślinne i zwierzęce zawierające określone enzymy, fragmenty komórek czy żywe mikroorganizmy oraz sztuczne enzymy [8]. Ich zaletą jest większa trwałość wynikająca z ochronnego działania pozostałych składników preparatów w stosunku do enzymu, natomiast wadą jest mniejsza selektywność wynikająca z obecności innych niż pożądany enzymów oraz stosunkowo długie czasy odpowiedzi. Duże potencjalne możliwości stwarza zastosowanie całych żywych komórek mikroorganizmów jako detektorów. Charakteryzują się one olbrzymią różnorodnością oraz stabilnością. Ponadto ich stosowanie nie wymaga skomplikowanych procedur przygotowawczych, a dostęp do surowca jest w zasadzie nieograniczony. Mikroorganizmy służą nie tylko do wykrywania pojedynczych związków chemicznych, ale także do określania złożonych właściwości środowiska, jak na przykład jego toksyczności, mutagenności czy też do oznaczania wskaźników uogólnionych, takich jak np. biochemiczne zapotrzebowanie na tlen [12,13].

Tabela 2. Czynniki biologiczne mogące mieć znaczenie terrorystyczne wg amerykańskiej agencji ds. zapobiegania i zwalczania chorób (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) [5]  
Table 2. Bioterrorism-related factors according to U.S. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [5]

Kategoria A czynniki o dużej zakaźności i śmiertelności	Kategoria B czynniki o umiarkowanej zakaźności i śmiertelności	Kategoria C patogeny nowo pojawiające się lub otrzymane na drodze inżynierii genetycznej
Wirus ospy prawdziwej <i>Variola vera</i>	Gorączka Q <i>Coxiella burnetii</i>	Gorączka krwotoczna – wirus Hanta
Laseczka wąglika <i>Bacillus anthracis</i>	Brucelozę bakterie z rodzaju <i>Brucella</i>	
Pałeczka dżumy <i>Yersinia pestis</i>	Nosacizna <i>Burkholderia mallei</i> (Glanders)	
Egzotoksyna <i>Clostridium botulinum</i> – jad kiełbasiany	Alfa wirusy: wenezuelskie zapalenie mózgu, końskie zapalenie mózgu	Malajskie zapalenie mózgu – wirus Nipah
Pałeczka tularemii <i>Francisella tularensis</i>	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoksyna gronkowcowa	
Wirusy wywołujące gorączki krwotoczne: – filowirusy: wirus Ebola wirus Marburg – arenawirusy gorączka Lassa wirus Junin	Bakterie wywołujące zakażenia jelitowe: <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Wirus żółtej febry
	Pierwotniak <i>Cryptosporidium parvum</i>	Wielolekooporne szczepy <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Trucizna pochodzenia roślinnego – ryцина	

## Receptory

Działanie receptorów w biosensorach polega na wykorzystaniu naturalnego powinowactwa właściwych białek lub fragmentów protein do specyficznych substancji zwanych ligandami dopełniającymi. W początkowej fazie działania tego typu sensorów nie zachodzą reakcje chemiczne, ale powstaje termodynamicznie stabilny kompleks. Do grupy najczęściej stosowanych receptorów należą przeciwciała. Są to białka produkowane przez organizmy żywe zdolne do wiązania wnikaających do ich wnętrza antygenów. Zaletą przeciwciała jest wysoka selektywność oraz niedroga i uniwersalna produkcja. Płyny fizjologiczne i wewnątrzkomórkowa cytoplazma komórek zwierzęcych, roślinnych czy bakterii są źródłem wielu innych naturalnych i selektywnych receptorów. Do związków biologicznie czynnych, zdolnych do wiązania określonych cząsteczek, należą inne związki niebędące przeciwciałami, takie jak hemoglobina czy konkanawalina A (z fasoli) wiążąca selektywnie cukry. W błonach komórkowych są natomiast ulokowane na przykład cząsteczki białkowe, selektywnie wiążące neuropeptydy, ich antagonistów oraz hormony [14]. Do selektywnego wiązania pewnych substancji na zasadzie interkalacji zdolne są także kwasy nukleinowe, a szczególnie DNA, który jest używany do wykrywania niektórych leków, związków chemicznych oraz mikroorganizmów. Unieruchomione fragmenty pojedynczej nici DNA z konkretnego fragmentu genu wykorzystuje się do komplementarnego wiązania materiału genetycznego z oznaczanego mikroorganizmu. Pracujące na tej zasadzie biochipy mogą zawierać wiele zintegrowanych biosensorów umożliwiających selektywne oznaczanie wirusów, patogennych bakterii, mutacji genów czy komórek rakowych [15].

## Typy detekcji w biosensorach

Odbiór sygnału z elementu biologicznego czujnika odbywa się poprzez przetworniki, które dokonują pomiaru zmian powstałych w wyniku połączenia części biologicznej czujnika z analizowanym zanieczyszczeniem; dochodzi wówczas do przekształcenia jednej formy energii w drugą.

Czujnik elektrochemiczny może stanowić elektroda jonoselektywna lub układ takich elektrod. Zadaniem elektrod jest rejestracja przemian badanej substancji, jakie zachodzą pod wpływem czynnika biologicznego osadzonego na elektrodzie. W przypadku czujników elektrochemicznych konieczne jest utworzenie zamkniętego obwodu elektrycznego, a więc co najmniej dwóch elektrod stanowiących ogniwo elektrochemiczne. Podczas procesu elektrochemicznego następują zmiany chemiczne na elektrodach, a ładunek jest przenoszony przez fazę międzyelektrodową (np. elektrolit). Przeniesienie ładunku w części przetwornikowej czujnika i wewnątrz układu pomiarowego, który jest częścią całego obwodu, jest zawsze elektryczne, natomiast przeniesienie ładunku w próbce może być elektronowe, jonowe lub mieszane. Wykorzystywane są elektrody różnych typów, np. inercyjne, aktywne chemicznie i modyfikowane. W zależności od sposobu pomiaru efektów reakcji elektrochemicznej sensory dzielą się na potencjometryczne, amperometryczne i konduktometryczne [9,16].

Zasada działania czujnika optycznego polega na pomiarach ilościowych zmian wielkości charakteryzujących promieniowanie świetlne. Najczęściej analizuje się takie parametry, jak amplituda (natężenie), częstotliwość czy polaryzacja. W zależności od charakteru i przyczyn zmian parametrów strumienia świetlnego rozróżnia się czujniki spektrofotometryczne, luminescencyjne i optotermiczne. Pomiar optyczny dokonywane są w sposób bezpośredni lub pośredni. Zmiany właściwości optycznych jednego ze związków podlegających reakcji z materiałem biologicznym naniesionym na czujnik analizowane są metodą bezpośrednią, natomiast w metodzie pośredniej stosowane są wskaźniki, które zmieniają właściwości optyczne na skutek przemian badanej substancji. W czujnikach optycznych często wykorzystywane są zjawiska pochłaniania, fluorescencji czy luminescencji. Konstrukcja miniaturowych czujników optycznych była możliwa dzięki zastosowaniu światłowodów [17].

W czujniku piezoelektrycznym wykorzystuje się zjawisko wysyłania sygnału elektrycznego przez kryształy podlegające naciskowi mechanicznemu oraz zjawisko drgań

mechanicznych kryształów zachodzące w zmiennym polu elektrycznym. Poszczególne kryształy piezoelektryczne mają własną częstotliwość drgań rezonansowych, mieszczącą się w zakresie mikrofalowym. Częstotliwość drgań zależy od masy kryształu, dlatego też przyłączeniu cząsteczek do powierzchni kryształu towarzyszy zmiana częstotliwości rezonansowej. Do detekcji tego typu zmian stosowane są najczęściej mikrowagi kwarcowe (QCM). Adsorpcja oznaczanej substancji na powierzchni piezoelektryka może także powodować zmianę prędkości rozchodzenia się fal akustycznych na jego powierzchni. Zjawiska te mierzone są za pomocą powierzchniowych rezonatorów akustycznych (SAW) [18].

Czujniki temperaturowe wykorzystują fakt, że każdej reakcji biochemicznej towarzyszy efekt cieplny. Działają na zasadzie pomiaru ilości ciepła wydzielanego (pochłanianego) podczas reakcji substancji oznaczanej z materiałem warstwy aktywnej czujnika biologicznego lub efektów cieplnych absorpcji światła przez roztwór zawierający wykrywany związek chemiczny. W zależności od zastosowanej techniki pomiarowej różniczą się czujniki kalorymetryczne i przewodnościowe [19].

## Biosensory stosowanie w monitorowaniu jakości wody

### Zanieczyszczenia chemiczne

Chemiczne techniki analityczne służące do kontroli zanieczyszczeń chemicznych są kosztowne, czasochłonne i ograniczone do testów laboratoryjnych. Koszt jest mniejszy, kiedy wymagane jest ilościowe określenie znanego zanieczyszczenia, jednak znacznie rośnie przy analizach jakościowych i ilościowych próbek wieloskładnikowych. Do stałego monitorowania jakości wody, w szczególności wody przeznaczonej do spożycia, można stosować dwa typy biosensorów, tj. specyficzne, służące do oznaczania wybranej substancji chemicznej oraz szerokozakresowe, zdolne do wykrywania ogólnych zmian chemicznych, wywołujących głównie zaburzenia w systemach biologicznych (tab. 3). Do monitorowania pojedynczych związków chemicznych najczęściej stosowane są biosensory enzymatyczne, ze względu na ich specyficzność i wysoką czułość. Biosensory wykorzystujące preparaty komórkowe z szerokozakresową czułością umożliwiają detekcję wskaźników uogólnionych, a także toksyczności, mutagenności czy rakotwórczości zanieczyszczeń, bez określenia ich składu jakościowego i ilościowego [20].

Biosensory enzymatyczne najczęściej współpracują z przetwornikami elektrochemicznymi. Materiał biologiczny, a więc odpowiedni enzym nanoszony jest na powierzchnię przetwornika (np. elektroda pH, elektroda O<sub>2</sub> lub CO<sub>2</sub> oraz elektrody jonoselektywne) i zabezpieczany membraną do dializy lub wiązany z powierzchnią elektrody za pomocą odpowiednich metod immobilizacji. Spadek aktywności immobilizowanego biokatalizatora może być mierzony jako zmniejszenie szybkości reakcji biokatalitycznej. Spadek ten jest proporcjonalny do stężenia właściwego zanieczyszczenia. Ogólnie, izolowany biokatalizator enzymatyczny może być użyty jako wskaźnik klasy związków, czego przykładem jest wykrywanie fosforanów organicznych poprzez detekcję inhibicji acetylocholinosterazy [21]. Reakcję enzymatyczną można monitorować elektrodą pH, przy czym szybkość reakcji jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia związków fosforoorganicznych [11]. Analogiczna metoda wykorzystywana jest do monitorowania

inhibicji także innych enzymów – ureazy za pomocą elektrody CO<sub>2</sub>, reduktazy azotanowej za pomocą elektrody amonowej czy hydrolazy za pomocą elektrody tlenowej [22]. Stosując modulację aktywności enzymu można oznaczyć wiele grup substancji, takich jak leki, metale ciężkie czy pestycydy.

W charakterze bioczuJNIKÓW stosowane są komórki bakterii lub ich konsorcja. Należą do nich mikroorganizmy zdolne do wykorzystywania różnych związków chemicznych w procesach metabolicznych. Promieniowiec z rodzaju *Rhodococcus* hydrolizuje pestycyd halogenowy z uwolnieniem z komórki jonów chlorkowych. Do monitorowania krótkołańcuchowych węglowodorów halogenowych wykorzystywany jest natomiast szczep *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 zdolny do syntezy dwóch typów halogenaz i wykorzystywania dichlorometanu jako źródła węgla i energii z wytworzeniem odpowiedniego alkoholu i jonu chlorkowego [23]. Elektrochemiczny mikrosensor wykrywający N<sub>2</sub>O wykorzystywany jest do analizy obecności kwasów tłuszczowych w środowisku beztlenowym. Zasada działania biosensora oparta jest na zastosowaniu szczepu *Stenotrophomonas*, który w warunkach beztlenowych w procesie denitryfikacji redukuje NO<sub>3</sub><sup>-</sup> do N<sub>2</sub>O, wykorzystując jako donory elektronów proste lotne kwasy tłuszczowe [24]. BioczuJNIKI amperometryczne kontrolujące procesy respiracyjne wykorzystywane są do wykrywania węglowodorów, np. szczep *Sphingomonas yanoikuyae* B1 stosowany jest do wykrywania naftalenu, natomiast optyczny fluoroimmunosensor stosowany jest do wykrywania benzo(a)pirenu [10,25].

Wskaźniki uogólnione, jak np. BZT, mogą być oznaczone za pomocą czujników amperometrycznych. W charakterze detektorów biologicznych wykorzystywane są żywe komórki pojedynczych szczepów mikroorganizmów lub w niektórych przypadkach osad czynny [26,27].

Specyficzne całokomórkowe biosensory wykorzystujące zjawisko luminescencji wykrywają węglowodory i metale ciężkie [28]. Biosensor toluenowy zawiera gen *lux* jako reporter, który ulega transkrypcji z promotora (Pu) znajdującego się pod kontrolą transkryptycyjnego aktywatora białkowego XylR. Połączenie aktywatora z toluenem lub jego pochodną aktywuje promotor oraz transkrypcję genu *lux*. W oparciu o geny, których transkrypcja podlega indukcyjnej regulacji skonstruowano biosensory wrażliwe na glin, arsen, antymon, kadm, chrom, miedź, żelazo, ołów, nikiel, rtęć i cynk. Do wykrywania związków przeciwbakteryjnych, genotoksyn czy promieniowania typu gamma stosowane są indukowane stresem biosensory całokomórkowe, zwane również biosensorymi semispecyficznymi. Zasada ich działania opiera się na transkrypcyjnej fuzji odpowiednich promotorów z genem reporterowym *gfp*, *lux*, *luc* lub *lacZ*.

### Zanieczyszczenia toksyczne

Zanieczyszczenie środowiska ma charakter niejednorodny, a przyczyną jego degradacji jest zwykle wiele czynników natury fizyczno-chemicznej. Ponadto możliwe jest powstawanie związków toksycznych na skutek działalności metabolicznej organizmów żywych, przy czym metabolity drobnoustrojowe są czasami bardziej toksyczne niż związki będące substratami pokarmowymi [2,30]. Charakterystyka składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń nigdy nie obrazuje w pełni szkodliwości zanieczyszczeń w stosunku do organizmów żywych. Obiektywną ocenę stopnia zagrożenia dają jedynie badania toksykologiczne [29].

Tabela 3. Czujniki biologiczne do wykrywania zanieczyszczeń chemicznych w wodzie [9–11]  
Table 3. Biosensors used to detect chemical water pollutants [9–11]

Wskaźnik	Element biologiczny czujnika	Przetwornik	Granica wykrywalności
Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen	Konsorcjum mikroorganizmów	elektrochemiczny (amperometryczny)	mierzalne minimum 0,088 gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>
Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen	<i>Pseudomonas putida</i>	optyczny	mierzalne minimum 0,5 gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>
Modulatory hormonalne (EDCs)	Receptor estrogenu	optyczny SPR	0,1 mg/m <sup>3</sup>
Modulatory hormonalne (EDCs)	Receptor estrogenu	elektrochemiczny (woltametryczny)	0,02 mg/m <sup>3</sup>
Daunomycyna	DNA	elektrochemiczny (chronopotencjometryczny)	0,3 g/m <sup>3</sup>
Polichlorowane bifenyle	DNA	elektrochemiczny (chronopotencjometryczny)	0,2 g/m <sup>3</sup>
Aflatoksyna	DNA	elektrochemiczny (chronopotencjometryczny)	10 g/m <sup>3</sup>
Alkilobenzenosulfoniary	Osad czynny	elektrochemiczny (amperometryczny)	<6 g/m <sup>3</sup>
Związki fenolowe	<i>Pseudomonas putida</i>	elektrochemiczny (amperometryczny)	100 mmol/m <sup>3</sup>
Chlorofenole	<i>Rhodococcus</i>	elektrochemiczny (amperometryczny)	0,004±0,04 mol/m <sup>3</sup>
p-Nitrofenol	<i>Arthrobacter</i>	elektrochemiczny (amperometryczny)	0,2 mmol/m <sup>3</sup>
Naftalen	<i>Sphingomonas yanikuyae</i> B1	elektrochemiczny (amperometryczny)	0,01±3 g/m <sup>3</sup>
Azotyny	<i>Nitrobacter vulgaris</i>	elektrochemiczny (amperometryczny)	>10 mmol/m <sup>3</sup>
Cyjanki	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	elektrochemiczny (amperometryczny)	0,15±15 μmol/m <sup>3</sup>
Lotne kwasy tłuszczowe	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	analyzer N <sub>2</sub> O	1 mmol/m <sup>3</sup>
Związki organofosforowe	Enzym (AChE)	optyczny	2 g/m <sup>3</sup>

Monitoring toksykologiczny wody powinien być prowadzony przy użyciu organizmów wskaźnikowych (biowskaźników, bioindykatorów) reprezentujących wszystkie poziomy troficzne i charakterystycznych w badanym ekosystemie [29]. W laboratoriach na całym świecie w standardowych biotestach wykorzystuje się olbrzymią liczbę gatunków wskaźnikowych. Klasyczne badania ekotoksykologiczne są bardzo pracochłonne, drogie i czasochłonne. Obecnie wprowadzane są szybkie gotowe testy, sprzedawane w postaci pakietów, pozwalające na ocenę toksyczności w krótkim czasie, nawet przez niewyspecjalizowany personel. Zaletą tych testów jest prostota i łatwość wykonania, duża wrażliwość używanych organizmów testowych i wiarygodność uzyskanych wyników.

W badaniach prowadzonych zestawem Toxkit przedstawicielami zooplanktonu są wrotki *Brachionus calyciflorus* (Rotoxkit F), wrotki morskie *Brachionus plicatilis* (Rotoxkit M), larwy słonowodne z rodzaju *Artemia* (Artoxkit M), skorupiaki *Daphnia magna* (Daphtoxkit F), *Ceriodaphnia dubia* (Ceriodaphtoxkit F), *Thamnocephalus platyurus* (Thamnotoxkit F), *Heterocypris incongruens* (Ostracodtoxkit F) oraz pierwotniaki *Tetrahymena thermophila* (Protoxkit F). Przygotowano także testy wykorzystujące glony *Selenastrum capricornutum* (Algaltoxkit F) [30]. Czas wykonania testów wynosi od kilku do kilkunastu dób, a wyniki monitoringu wody znane są z dużym opóźnieniem.

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem testu o nazwie IQ-Tox<sup>TM</sup> do wykrywania substancji toksycznych w wodzie przeznaczonej do spożycia. Organizmem testowym jest *Daphnia magna*, bezkręgowiec z dobrze wykształconym przewodem pokarmowym. W teście obserwuje się wpływ zanieczyszczeń chemicznych na odżywianie skorupiaka substratem (galaktoza) połączonym z markerem fluorogennym. Organizmy zdrowe rozkładają cukier z uwolnieniem fluorogennego markera, natomiast substancje toksyczne ograniczają możliwość wykorzystania cukru

jako pokarmu, co powoduje spadek świecenia. Technologia ta pozwala ocenić jakość wody w ciągu 75 min. W ramach amerykańskiego programu ETV (Environmental Technology Verification) wykazano, że testem IQ-Tox<sup>TM</sup> można wykryć zanieczyszczenia na poziomie 2÷20-krotnie mniejszym niż dawka śmiertelna dla człowieka.

Potencjalne możliwości przyspieszenia badań dają także takie testy, jak Microtox czy ToxAlert. Wykorzystują one do oceny toksyczności bakterie luminescencyjne zdolne do emitowania światła (*Photobacterium (vibrio) fisheri*, *P. phosphoreum* i *Beneckea harley*) [31]. W systemie transportu elektronów u tych bakterii lucyferaza katalizuje utlenienie zredukowanego substratu (zredukowanego mononukleotydu flawinowego, fosforanu ryboflawinowego lub dwunukleotydu flawinowo-adeninowego), a podczas tego procesu zachodzi luminescencja świetlna mierzona za pomocą fotometru. Pozostałe substraty uczestniczące w tej reakcji to tlen i długołańcuchowy aldehyd. Geny odpowiedzialne za luminescencję mogą być przenoszone za pomocą genu hybrydowego do innych bakterii powszechnie występujących w środowisku.

Wiele konstruowanych obecnie biosensorów wykorzystuje bakterie świecące do oznaczania toksyczności, a niektóre z nich zmienione genetycznie mogą monitorować pojedyncze zanieczyszczenia. Mikroorganizmy te mają wbudowany plazmid, którego geny kodują lucyferazę będącą pod kontrolą promotora rozpoznającego odpowiedni związek. Popularnym typem czujników wykorzystywanych w badaniach toksykologicznych są biosensory amperometryczne. W ich przypadku szybkość metabolizmu żywych komórek bakterii monitorowana jest elektrodą tlenową, a wzrost toksyczności związany jest ze spadkiem szybkości respiracji komórek immobilizowanych na elektrodzie i ilość pobranego tlenu w roztworze spada. Przykładem biosensora amperometrycznego jest Cellsense<sup>®</sup> wykorzystujący komórki bakterii *Escherichia coli* [32].

## Zanieczyszczenia mutagenne i rakotwórcze

Z badań epidemiologicznych wynika, że wiele związków występujących w środowisku wodnym może odgrywać ważną rolę w etiologii chorób nowotworowych u ludzi. Należą do nich uboczne produkty dezynfekcji wody [33,34]. Wykrywanie i ocena stopnia zanieczyszczenia środowiska tego typu substancjami staje się jednym z ważniejszych problemów związanych z ochroną stanu zdrowia człowieka [35,36]. Duże zróżnicowanie składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń utrudnia jednoznaczną ocenę zarówno istniejącego stanu zagrożenia, jak i przewidywanie skutków skażenia. Zastosowanie do tego celu metod analitycznych nastęrcza wiele problemów. Wynikają one z faktu, że niektóre zanieczyszczenia występują w środowisku w ilościach śladowych, a do ich wykrycia potrzebne są niezwykle czułe metody instrumentalne. Dlatego też poszukuje się metod alternatywnych, pozwalających na wykonanie takich badań w krótkim czasie (tab. 4). Metod tego rodzaju opracowano już wiele, wszystkie one opierają się w swoich założeniach na hipotezach wyjaśniających mechanizm kancerogenezy chemicznej lub na ilościowej ocenie pewnych efektów działania związków rakotwórczych. Wyniki badań pozwalają określić, czy związek lub jego metabolity są zdolne do wejścia w reakcje z DNA i wywołać uszkodzenie genetyczne. Do wstępnej analizy związków chemicznych wykazujących działanie mutagenne lub rakotwórcze stosuje się metody wykorzystujące bakterie, grzyby, rośliny lub owady, a także hodowle *in vitro* wybranych tkanek ludzkich lub zwierzęcych. Najprostszym modelem doświadczalnym są bakterie, ze względu na łatwość hodowli, szybki wzrost i możliwość uzyskania wyników badań w ciągu kilku dób [35,36]. Genetyka bakterii jest dobrze poznana, a w tym także mechanizm naprawy uszkodzonego DNA oraz związana z tym indukcja mutacji, co ułatwia prawidłowy dobór szczepów testowych. Badania prowadzone są zwykle na szczepach *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* [37,38].

Jednym z powszechnie stosowanych jest test opracowany przez Bruce'a Amesa [39]. Zasada testu Amesa polega na określeniu mutacji powrotnych z histydynowej auktrofii do prototrofii w wielu specjalnie skonstruowanych mutantach szczepów *Salmonella typhimurium* LT2. Szczepy

Tabela 4. Testy do szybkiego wykrywania substancji mutagennych w wodzie [30,40]

Table 4. Rapid tests for water mutagenicity determination [30,40]

Test	Organizm testowy	Czas analizy	Czułość
Test Ames	<i>Salmonella typhimurium</i>	48h	akceptowana
Mutatest	<i>Salmonella typhimurium</i>	24h	porównywalna z testem Ames
Vitotox	<i>Salmonella typhimurium</i>	3h	1000-krotnie większa od testu Ames
SOS-LUX-TEST	<i>Escherichia coli</i>	1+5h	porównywalna z testem Ames
Test <i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	48h	2+25-krotnie większa od testu Ames w zależności od mutagenu
Mutatox	<i>Vibrio fischeri</i>	24h	porównywalna z testem Ames
SOS Chromotest	<i>Escherichia coli</i>	24h	7-krotnie większa od testu Ames

testowe są mutantami żywieniowymi niezdolnymi do syntezy histydyny. Pod wpływem substancji o właściwościach mutagennych dochodzi do rewersji mutacji i przywrócona zostaje zdolność do syntezy histydyny. W postaci klasycznej test wykonuje się metodą płytkową, a pojawienie się kolonii rewertantów na podłożu bez histydyny jest miarą aktywności mutagennej badanego związku. W biosensarach wykorzystujących histydynozależne szczepy *Salmonella typhimurium* czujnik amperometryczny umieszczony w hodowli pozbawionej histydyny reaguje na mutagen spadkiem natężenia prądu wynikającego ze wzrostu respiracji komórek rewertantów. Komercyjną odmianą testu Ames są testy Mutatest i Vitotox bazujące na genach odpowiedzialnych za świecenie wprowadzonych do szczepów testowych. Synteza lucyferazy u tych szczepów podlega odblokowaniu (derepresji) pod wpływem substancji uszkadzających materiał genetyczny. Systemy pomiaru luminescencji są całkowicie automatyzowane, co zapewnia szybki pomiar genotoksyczności [40–43].

Innym często stosowanym testem bakteryjnym jest test reperacyjny – rec-assay. Metoda ta polega na badaniu zwiększonego działania śmiertelnego (letalnego) związków mutagennych na komórki mutantów bakterii *Bacillus subtilis* [36]. Mutanty te nie mają zdolności do reperowania uszkodzeń w DNA za pomocą rekombinacji (rec–), w przeciwieństwie do szczepu dzikiego (rec+). Reperacja rekombinacyjna jest jedną z metod naprawy stosowanych przez komórkę (obok fotoreaktywacji, reperacji przez wycinanie i SOS). Komórki pozbawione jej mają jednocześnie osłabione pozostałe systemy naprawcze, dlatego nawet stosunkowo niewielkie uszkodzenia DNA mogą powodować u nich zahamowanie wzrostu. A więc, w przeciwieństwie do testu Ames, w teście rec-assay badana próbka o właściwościach mutagennych nie powoduje mutacji w komórkach testowych lecz degradację DNA, która hamuje dalszy ich wzrost (komórka nie potrafi naprawić uszkodzenia). Szczep dziki natomiast jest w stanie rosnać, dopóki siła działania mutagenu nie przekroczy możliwości naprawczych komórek. W biosensarach elektrochemicznych opracowanych na bazie tego testu spadek liczebności bakterii jest mierzony za pomocą pomiaru respiracji komórek szczepów testowych osadzonych na elektrodach. Spadek respiracji jest natychmiast konwertowany na sygnał elektryczny, co umożliwia oznaczenie mutagenności w ciągu godziny. Czułość mikrobiologicznego sensora jest większa niż testu reparacyjnego rec-assay oraz testu Ames. Ilość wykrywanego aminofluorenu AF wynosiła w przypadku biosensora 1,6 µg/cm<sup>3</sup>, natomiast w przypadku testu rec-assay – 5,0 µg/cm<sup>3</sup>, a testu Ames – 106 µg/cm<sup>3</sup> [44].

W 1982r. opracowano nową metodę wykrywania związków zdolnych do uszkadzania DNA. Jest to test bakteryjny zwany SOS-Chromotest, w którym stosowane są odpowiednio przygotowane szczepy *Escherichia coli*. Test ten opiera się na indukcji funkcji genu *sfiA* należącego do systemu SOS przez związek uszkadzający DNA. Poziom indukcji oznaczany jest w prostym oznaczeniu kolorymetrycznym, jako aktywność β-galaktozydazy. Dzieje się tak na skutek fuzji operonów *sfiA* i *lacZ*; gen *sfiA* wchodzi w skład systemu reperacji SOS, natomiast gen *lacZ* odpowiedzialny jest za syntezę enzymu galaktozydazy biorącej udział w rozkładzie laktozy. System reperacji SOS jest systemem indukowanym, a nie konstytutywnym. Uruchamiany jest w komórce w momencie jej zagrożenia śmiercią. W normalnych komórkach bez uszkodzonego DNA system ten podlega represji przez białko *lexA*. Uszkodzenie DNA

powoduje zwiększenie poziomu produktu genu *recA+*. W wyniku indukcji następuje wzrost aktywności proteolitycznej białka *recA*, degradowane ono białko *lexA* i derepresjonuje system SOS. W rezultacie obserwuje się ekspresję operonu poddawanego fuzji *sfiA;lacZ*. Zwiększenie poziomu produktu genu *recA+* powoduje także, że wytworzone białko modyfikuje polimerazę DNA III, która replikuje DNA w sposób ciągły włączając na przeciw uszkodzonych fragmentów DNA dowolne zasady. Proces ten powoduje wzrost ilości mutacji, ale przeżywalność komórek wzrasta. Poza kilkoma wyjątkami, współczynniki indukcji oznaczone w teście SOS-Chromotest wykazują wysoką zależność ilościową z aktywnością mutagenną związków oznaczoną testem Ames. Ponadto ma on kilka istotnych zalet, m.in. prostotę wykonania, szybkie uzyskanie wyniku (kilka godzin), stosowanie tylko jednego szczepu testowego, przy czym wymagane jest przeżywanie tego szczepu. Z tego względu wydaje się, że test ten można szczególnie polecać do szerokiego stosowania w rutynowej ocenie właściwości genotoksycznych różnych związków chemicznych [30].

Oznaczenie genotoksyczności można wykonywać w sposób bardzo szybki w systemie opartym o biosensory SOS-LUX-TEST wykorzystując bakterie testowe *Escherichia coli* wzbogacone o operon *lux* pochodzący z *Photobacterium leiognathi*. Za pomocą mikroplótkowego luminometru wynik analizy można otrzymać już po 5 h. Bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri* są bezpośrednio stosowane do pomiaru genotoksyczności próbek środowiskowych. W teście Mutatox wykorzystuje się szczepy pozbawione zdolności świecenia. Substancje mutagenne powodują przywrócenie zdolności świecenia, jednakże czas przeprowadzenia testu jest dłuższy i wynosi od 16 h do 24 h [45].

### Zanieczyszczenia mikrobiologiczne

Drobnoustroje szeroko rozpowszechnione w wodach powierzchniowych, a także podziemnych mogą stanowić poważny problem zdrowotny. Wśród drobnoustrojów przenoszonych drogą wodną znajduje się wiele patogenów, które mogą zakazić człowieka podczas rekreacji, uprawiania sportu, mycia owoców i warzyw czy też picia wody wodociągowej. Do najbardziej typowych bakterii bezwzględnie chorobotwórczych pojawiających się w zanieczyszczonych wodach powierzchniowych należą pałeczki duru brzuszego *Salmonella typhi*, a także inne Gram-ujemne bakterie z rodzaju *Salmonella*, które są przyczyną różnorodnych zakażeń przewodu pokarmowego, objawiających się wymiotami i biegunką. Nieco rzadziej w zanieczyszczonych zbiornikach wodnych występują Gram-ujemne pałeczki z rodzaju, *Shigella*, które powodują czerwonkę bakteryjną. W wodach powierzchniowych w krajach tropikalnych często spotyka się bakterie z gatunku, *Vibrio cholerae*, czyli przecinkowce cholery. Wody powierzchniowe, do których odprowadzane są ścieki bytowo-gospodarcze mogą także zawierać inne drobnoustroje chorobotwórcze. Konieczne jest ustalenie wirusów wskaźnikowych oraz opracowanie metod pobierania niezbędnych objętości wody i sposobu jej zagęszczania w celu ich wykrycia. Zanieczyszczona woda może być także przyczyną schorzeń przewodu pokarmowego spowodowanych przez pierwotniaki. Większość pasożytniczych pierwotniaków produkuje cysty, które są w stanie przetrwać poza organizmem gospodarza w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Gdy warunki te ulegają poprawie z cyst rozwijają się tzw. trofozoity, postacie wegetatywne występujące u człowieka. Rutynowa analiza sanitarna wody nie obejmuje obecnie testów na obecność pierwotniaków chorobotwórczych. Przyjmuje

się za wystarczającą analizę stopnia skażenia wody bakteriami z rodzaju *Clostridium*. Przetrwalniki tych bakterii, tak samo jak cysty pasożytniczych pierwotniaków (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*), są bardzo odporne na działanie dezynfektantów. Wykrycie bakterii z rodzaju *Clostridium* jest technicznie bardziej proste od poszukiwania pierwotniaków pasożytniczych i daje dużą pewność, że woda oczyszczona jest wolna od pierwotniaków i jaj robaków chorobotwórczych (helmintów) [46].

Mikroorganizmy chorobotwórcze występują w ściekach i w wodach powierzchniowych w znacznie mniejszych ilościach niż pozostałe drobnoustroje. Z tego też względu jest je trudniej wykryć niż występujące masowo w wodzie bakterie saprofityczne, tym bardziej, że w celu ich identyfikacji konieczne jest stosowanie znacznie bardziej skomplikowanych metod diagnostycznych. Dlatego też badania rutynowe koncentrują się przede wszystkim na wykrywaniu bakterii wskazujących na kałowe zanieczyszczenie wody. Do oceny jakości sanitarnej wody przeznaczonej do spożycia najpowszechniej wykorzystywana jest *Escherichia coli* i paciorkowce kałowe (enterokoki), *Pseudomonas aeruginosa* w przypadku wody wprowadzanej do opakowań jednostkowych, wody w cysternach i zbiornikach, *Legionella sp.* w przypadku wody ciepłej, natomiast wodę poddawaną procesowi oczyszczania charakteryzują dodatkowo takie wskaźniki, jak bakterie grupy coli i laseczki z rodzaju *Clostridium*, bakterie redukujące siarczynę oraz ogólna liczba mikroorganizmów psychrofilnych i mezofilnych [47].

Do wykrywania organizmów wskaźnikowych stosowane są konwencjonalne metody wymagające selektywnej hodowli oraz wykonania charakterystyki biochemicznej i serologicznej. W niektórych przypadkach analiza jest wieloetapowa. Metody te są bardzo czułe i selektywne, ale czasochłonne – do osiągnięcia końcowych wyników potrzebne są nawet tygodnie. Wzrost publicznej uwagi skierowany na bezpieczeństwo środowiska prowadzi do poszukiwań technologii zdolnych do szybkiej identyfikacji źródła skażenia. Testy enzymatyczne oraz biosensory zaczynają odgrywać ważną rolę w środowiskowym monitoringu patogenów. Liczebność mikroorganizmów w próbce może być oznaczona poprzez monitorowanie metabolizmu mikroorganizmów. Za pomocą przetworników można analizować pobór tlenu oraz obecność lub brak metabolitów aktywnych elektrochemicznie. Czuły i specyficzny system detekcji patogenów i wirusów stanowi proliferacja kwasów nukleinowych oraz technologie detekcji oparte na reakcjach immunologicznych. Detekcja DNA jest bardziej specyficzna niż immunologiczna i jej czułość może być zwiększona dzięki metodzie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Sondy genetyczne znajdują zastosowanie w wykrywaniu mikroorganizmów chorobotwórczych w systemach wodociągowych, żywności lub w tkankach roślinnych, zwierzęcych i ludzkich. Detekcja immunologiczna z drugiej strony jest szybsza i może znaleźć zastosowanie do wykrywania nie tylko mikroorganizmów, ale także biotoksyn.

W sposób klasyczny organizmy wskaźnikowe, takie jak bakterie z grupy coli i *Escherichia coli* mogą być wykrywane przy wykorzystaniu metody fermentacyjno-probówkowej na podłożu płynnym lub metodą bezpośredniego posiewu poszczególnych rozcieńczeń wody na selektywne podłoże stałe oraz metodą filtracji membranowej [46]. Wadą tych oznaczeń jest głównie ich czasochłonność. Alternatywnymi w stosunku do metod konwencjonalnych są testy enzymatyczne. Testy enzymatyczne wykrywające *Escherichia coli* bazują najczęściej na reakcji hydrolizy substratu fluorogenego [48].

Komercyjnie używanych jest kilka tego typu testów. Metoda z zastosowaniem testu Colitag<sup>TM</sup> polega na wykrywaniu dwóch enzymów –  $\beta$ -glukuronidazy oraz  $\beta$ -galaktozydazy, które są charakterystyczne odpowiednio dla bakterii *E. coli* oraz organizmów typu coli. Liczebność bakterii z grupy coli oznaczana jest dzięki zastosowaniu substratu chromogennego, mianowicie orto-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu (ONPG). Po hydrolizie przez  $\beta$ -galaktozydazę ONPG przybiera wyraźny żółty kolor, potwierdzając obecność bakterii z grupy coli w próbce. Wykrywanie bakterii *E. coli* możliwe jest dzięki zastosowaniu fluorogennego MUG (4-metyloumbeliferylo- $\beta$ -D-glukuronian), swoistego w przypadku  $\beta$ -glukuronidazy. Uboczny produkt reakcji 4-metyloumbeliferon charakteryzuje się fluorescencją po ekspozycji na światło nadfioletowe. Test ten jest przeznaczony do badania próbek wody na obecność organizmów typu coli i/lub bakterii *E. coli* w ciągu  $24 \pm 2$  h i nie wymaga zastosowania kolejnych testów potwierdzających ani sprawdzających.

Test Colilert (AC) jest komercyjnie używany do oznaczania liczebności bakterii z grupy coli i *E. coli* w próbkach środowiskowych [49–51]. Zawiera on dwa substraty O-nitrofenylo- $\beta$ -D-glukuronian i MUC, specyficzne w badaniu odpowiednio całkowitej liczby bakterii grupy coli i *E. coli*. Testy okazały się wielkim sukcesem, ale mają także kilka mankamentów. Jednym z nich jest fakt, że nie wszystkie szczepy *E. coli* pochodzące z ludzkich odchodów są fluorogenne [52]. Ponadto mikroalgi i makrofity mogą produkować  $\beta$ -glukuronidazę i  $\beta$ -galaktozydazę które w dużych stężeniach mogą być przyczyną uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich [53]. Testy tego rodzaju mogą być używane zarówno jako testy jakościowe (obecne/nieobecne), jak i testy ilościowe. Przy czułości 1 mikroorganizm w  $100 \text{ cm}^3$  badanej próbki testy nie wymagają przygotowywania pożywek, filtrowania próbek ani potwierdzania wyników (tab. 5).

Tabela 5. Rodzina testów biochemicznych do oznaczania w wodzie mikroorganizmów wskaźnikowych  
Table 5. Biochemical tests for microbiological indicator determination in water

Test	Wykrywane mikroorganizmy	Czas analizy
Colilert <sup>®</sup>	bakterie grupy coli i <i>E. coli</i>	24 h
Colilert <sup>®</sup> -18	bakterie grupy coli i <i>E. coli</i>	18 h
Colisure	bakterie grupy coli i <i>E. coli</i>	24 h
Enterolert <sup>TM</sup>	enterokoki	24 h
Colitag <sup>TM</sup>	bakterie grupy coli i <i>E. coli</i>	24 h

Ostatnio coraz częściej wskazuje się na konieczność stosowania w charakterze wskaźników jakości sanitarnej wody mikroorganizmów patogennych oraz bakteriofagów sygnalizujących obecność wirusów, jednakże w tym ostatnim przypadku nie dopracowano się jeszcze odpowiednich metod. Do wykrywania patogennej *E. coli* O157:H7 opracowano wiele testów (tab. 6). Jest to szczep enterohemolityczny wywołujący choroby przewodu pokarmowego i moczowego, a przenoszony poprzez żywność oraz drogą wodną. W opracowanym sensorze enzymatycznym [54] bakteryjny antygen umieszczony został między dwoma przeciwciałami, przy czym jeden jest specyficzny dla *E. coli* O157:H7 i nieznakowany, a drugi znakowany fosfatazą. Po dodaniu substratu elektroaktywny produkt mierzony jest voltametrycznie. Czujnik jest w stanie w ciągu 80 min oznaczyć  $4,7 \cdot 10^3 \text{ kom./cm}^3$  [55].

Tabela 6. Metody wykrywania *Escherichia coli* O157:H7 [55]  
Table 6. Methods used to detect *Escherichia coli* O157:H7 [55]

Metoda/test	Cza uzyskania wyniku	Granica wykrywalności
Metoda płytkowa	1+7 d	1 jtk/100 cm <sup>3</sup>
Testy biochemiczne	1+7 d	1 jtk/100 cm <sup>3</sup>
Test immunoenzymatyczny (ELISA)	12h+2 d	10+100 jtk/cm <sup>3</sup>
Test bakteriofagowy fluorescencyjny	10 h	10+100 jtk/cm <sup>3</sup>
Immunoenzymatyczne testy chemiluminescencyjne	6+8 h	10 <sup>3</sup> +10 <sup>4</sup> kom./cm <sup>3</sup>
Immunotesty kapilarnie	7 h	0,5+1 jtk/cm <sup>3</sup>
Immunotesty fluorescencyjne	6 h	10+100 jtk/cm <sup>3</sup>
Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	2+24 h	10 <sup>2</sup> +10 <sup>5</sup> jtk/cm <sup>3</sup>
Wielokrotna łańcuchowa reakcja polimerazy (Multiplex PCR)	24 h	1+2 jtk/cm <sup>3</sup>
Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR)	6+12 h	10 <sup>7</sup> jtk/cm <sup>3</sup>
Laserowo indukowana fluorescencja	kilka godz.	pojed. org.
Biosensor światłowodowy	ok. 30 min	5,2×10 <sup>2</sup> jtk/g
Biosensor SPR (plazmowy rezonans powierzchniowy)	1 h	5×10 <sup>7</sup> jtk/cm <sup>3</sup>
Mikromacierzowa	<1 h	55 jtk/cm <sup>3</sup>
Molekularna	1+6 h	1+10 <sup>3</sup> jtk/cm <sup>3</sup>
Systemy zintegrowane (lab-on-a-chip)	16+45 min	10 <sup>2</sup> +10 <sup>4</sup> org./cm <sup>3</sup>

Do wykrywania *E. coli* O157:H7 w testach enzymatycznych jest również wykorzystywana technika ELISA, która gwarantuje detekcję na poziomie 100 jtk/cm<sup>3</sup> i wysoką czułość, lecz jej wadą jest rozwlekła procedura wstępnego namnażania badanych drobnoustrojów trwająca co najmniej 4 h [56].

W ostatnich latach rozwinęły się techniki bazujące na osiągnięciach biologii molekularnej. Sondy genetyczne łączą się z określonym mikroorganizmem lub jego specyficznym składnikiem, a powstający kompleks poddawany jest detekcji. Najczęściej stosowanymi sondami są kwasy nukleinowe do detekcji DNA lub RNA oraz cząsteczki przeciwciał do detekcji białek węglowodanów lub lipidów. Analizuje się, czy sekwencja zasad w sondzie jest komplementarna do sekwencji charakterystycznej w przypadku oznaczanego mikroorganizmu. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), umożliwiająca zwielokrotnienie DNA, jest techniką genetyczną wspomagającą identyfikację mikroorganizmów. Ta metoda wykrywania *E. coli* często wykorzystuje specyficzne geny. Na przykład geny *lacZ* lub *lamB* są zwielokrotniane za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy i oznaczane za pomocą sondy genetycznej. Wykorzystując PCR można wykryć *E. coli* w wodzie w ilości 1÷5 kom./100 cm<sup>3</sup> [57]. W innym typie łańcuchowej reakcji polimerazy do oznaczania *E. coli* używa się genu *uidA* kodującego  $\beta$ -glukuronidazę znajdującą się u *E. coli* i *Shigella*. Gen *uidA* jest wykrywany za pomocą sondy i wtedy w połączeniu z PCR można oznaczyć 1÷2 komórki, ale bez możliwości rozróżnienia *E. coli* i *Shigella* [58–60].



Multiplex PCR jest modyfikacją testu PCR przydatną do wykrywania żywych komórek *E. coli* O157:H7 w glebie i wodzie na poziomie detekcji 1 jtk/cm<sup>3</sup> w wodzie do picia i 2 jtk/g w glebie [61]. Ogólnie techniki genetyczne są skuteczną metodą detekcji, ale z drugiej strony także mają wiele wad, jak np. możliwość zwielokrotniania materiału genetycznego pochodzącego z obumarłych komórek, skomplikowana interpretacja danych oraz bardzo zawiła metodyka eksperymentu [55].

Obecność bakterii fekalnych z grupy coli w wodzie nie koreluje bezpośrednio z ilością przypadków zakażeń jelitowych u jej konsumentów. Dlatego też do oceny jakości bakteriologicznej wody wykorzystuje się także oznaczenie liczebności enterokoków. Stwierdzono, że są one naturalnymi mieszkańcami dróg pokarmowych ssaków i ptaków, czasami wykrywano je u owadów i gadów [62]. Ich cechą charakterystyczną jest wysoka oporność na antybiotyki i środki dezynfekcyjne [63,64]. Enterokoki są tak samo rozpowszechnione jak bakterie z grupy coli, nie namnażają się w wodzie, ale ich czas przeżywania jest znacznie dłuższy i pozostają w wodzie tak długo jak specyficzne patogeny. Czasami są trudne do wykrycia z powodu związania z osadem dennym, zooplanktonem czy piaskiem [65]. Dotychczas najlepszą metodą ich analizy jest metoda klasyczna, polegająca na filtracji wody przez filtr membranowy i hodowli na podłożu selektywnym. Czas trwania analizy wynosi 24÷48 h. Zastosowanie fluorogennego substratu zmniejsza czas analizy z 48 h do 24 h, ale jest drogie.

Enterolert<sup>TM</sup>, opracowany przez IDEXX Laboratories (Westbrook, ME, USA), jest półautomatycznym testem do oznaczania enterokoków metodą NPL. Enterolert<sup>TM</sup> może być wykorzystany do wykrywania obecności enterokoków, ale jedynie przy ich dużej liczebności w wodzie [58,66]. Ostatnio wykorzystuje się technikę PCR do oznaczania enterokoków w środowiskowych próbkach wody przez amplifikację segmentu 16S rRNA regionu [67]. Metoda ta daje dobre rezultaty przy liczebności bakterii wynoszącej >600 jtk/100 cm<sup>3</sup>, natomiast przy mniejszym skażeniu konieczne jest wstępne namnożenie drobnoustrojów. Ponadto enterokoki nie są wykrywane w próbkach o dużym skażeniu fekalnym z powodu obecności czynników inhibitujących. Niemniej jednak przy stosunkowo czystych próbkach czas analizy wynosi 3 h. Stwierdzona korelacja między PCR a metodą filtracji membranowej dowodzi, że PCR jest obiecującą techniką, ale wymaga dalszych badań [61].

Ostatnio zbudowano kilka biosensorów piezoelektrycznych do detekcji skażeń mikrobiologicznych. Wyniki oznaczania bakterii *Salmonella typhimurium* w płynnych próbkach przez immunosensor bazujący na fali akustycznej opublikowano w pracy [68]. Granica detekcji wynosiła około 100 kom./cm<sup>3</sup> w czasie poniżej 2 min. W badaniach [69] wykryto bakterie z gatunku *Salmonella enteritidis* i *Listeria monocytogenes* w rzeczywistym czasie używając sensora SPR (plazmowy powierzchniowy rezonans) bazującego na przeciwciałach immobilizowanych na powierzchni czujnika pokrytego złotem. Bakterie te były wykrywane w liczbie 10<sup>6</sup> kom./cm<sup>3</sup>.

Na użytek kontroli jakości wody, procesów przemysłowych oraz zagrożeń terrorystycznych budowane są kompleksowe systemy alarmowe oparte na biosensorach do wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych, a także biotoksyn. Firmą wiodącą w komercjalizacji techniki SPR wykorzystywanej w biosensorach jest Biacore (Pharmacia) ze Szwecji. Czujniki światłowodowe opłaszczone przeciwciałem stanowią podstawę systemu Analyte 2000,

gdzie stosując cztery sondy można dokonać analizy czterech próbek jednocześnie. Granica wykrywalności testu wynosi 3÷30 komórek bakterii w 1 cm<sup>3</sup>, a czas wykonania analizy – 20 min. System RAPTOR [70] jest już w pełni zautomatyzowany, o podwyższonej czułości, a przede wszystkim możliwy do wykorzystania w warunkach polowych. Pozwala na wykrycie nie tylko bakterii, ale także wirusów, pierwotniaków i toksyn drobnoustrojowych. Granica wykrywalności w przypadku cyst *Giardia* wynosi 5·10<sup>4</sup> w 1 cm<sup>3</sup> w ciągu 10 min. Przeprowadzenie badań genetycznych w warunkach polowych umożliwił RAPID – zautomatyzowany system, gdzie identyfikacji dokonuje się metodą RT-PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym) [71].

## Podsumowanie

Konieczność sprostania wymaganiom monitoringu jakości wody przeznaczonej do spożycia jest jedną z przyczyn wzrastającego zainteresowania nowymi metodami analizy jakości wody. Dotychczas stosowane metody opierają się na technikach czasochłonnych i pracochłonnych, a do ich przeprowadzenia konieczne jest wyspecjalizowane laboratorium. Duże nadzieje wiąże się z rozwojem metod, których narzędziami analitycznymi są czujniki biologiczne reagujące ze specyficzną sobie substancją obecną w środowisku reakcji. Mimo szybkiego rozwoju tej dziedziny większość urządzeń jest jeszcze na etapie badań laboratoryjnych. Badania prowadzone nad wykorzystaniem biosensorów w ochronie środowiska dotyczyły dotąd przede wszystkim monitorowania jakości wód powierzchniowych. Analiza jakości wody do picia wymaga znacznego obniżenia granicy detekcji poszczególnych związków, co jest trudne do osiągnięcia. Najczęściej do tego celu wykorzystywane są biosensory enzymatyczne lub powinowactwa charakteryzujące się dużą czułością i specyficznością. Sukcesem natomiast można określić rozwój urządzeń szerokok zakresowych, służących do monitorowania środowiska, a zwłaszcza określania toksyczności, mutagenności i rakotwórczości zanieczyszczeń zawartych w wodzie. W szacowaniu toksyczności bardzo wartościowymi narzędziami okazały się bakteryjne biosensory całokomórkowe. Do ich konstrukcji przyczyniły się współczesne techniki inżynierii genetycznej, które poprzez wprowadzenie obcego DNA do komórek bakterii poszerzają zdolności enzymatyczne biosensorów. Dowodem na to są liczne dostępne na rynku bioczujniki bakteryjne bazujące na zmodyfikowanych genetycznie bakteriach, takie jak test Microtox® wykorzystujący morskie bakterie *V. fischeri*, test SOS Chromotest z genem *lacZ* czy też test VITOTOX z genem *lux* z *V. fischeri*. Pozwalają one na ocenę jakości zdrowotnej wody bez oznaczania składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń. Rozwój tej dziedziny wiedzy budzi jednak sporo kontrowersji z uwagi na możliwość uwolnienia do środowiska zmienionych genetycznie mikroorganizmów zdolnych do szybkiego namnażania się.

Duży postęp notuje się także w rozwoju metod mikrobiologicznych pozwalających na ocenę zagrożeń wynikających z obecności w wodzie drobnoustrojów chorobotwórczych. Przyspieszona została znacznie diagnostyka mikrobiologiczna poprzez zastosowanie zminiaturyzowanych zestawów opartych na reakcjach chemicznych i biochemicznych, łącznie z systemami całkowicie zautomatyzowanymi. Ich wykorzystanie jest jednak czasochłonne i z tego też względu coraz większe zainteresowanie budzą

czujniki biologiczne. Należą do nich głównie biosensory immunologiczne oparte na charakterystycznym wiązaniu typu antygen–przeciwciało, szczególnie w postaci zminiaturyzowanych immunosensory w formie mikrochipów i mikromacierzy. Biosensory z zastosowaniem DNA należą do czujników selektywnych o niskim poziomie detekcji. Wykorzystanie immobilizowanych krótkich oligonukleotydowych specyficznych sond umieszczonych na powierzchni stałej pozwala na wykrywanie w próbkach środowiskowych kwasów nukleinowych odpowiadających sondzie DNA, co umożliwi wykrycie patogenu. Omawiane biosensory mogą znaleźć praktyczne zastosowanie dzięki niskiemu limitowi detekcji. Należy podkreślić, że głównym czynnikiem ograniczającym powszechne stosowanie biosensory jest ich niestabilność w czasie, spowodowana stopniowym zanikiem aktywności materiału biologicznego. Cennymi bioindykatorami skażenia wody są bakteriofagi. Zastosowanie metody plazmowego rezonansu powierzchniowego (SPR) oraz stosując komórki bakteryjne, jako warstwę detekcyjną uzyskano możliwość wykrycia wirusa po około 120 min [72]. Granica detekcji tej metody wynosi  $10^2$  cząstek wirusowych w  $1\text{ cm}^3$ . Konieczne są dalsze prace nad możliwością detekcji pierwotniaków chorobotwórczych w wodzie. Opracowanie systemów wieloczujnikowych przeznaczonych do stałego monitorowania, jakości wody oraz do analiz wykonywanych w czasie rzeczywistym jest zadaniem, które zapewni utrzymanie wymaganej jakości zdrowotnej wody przeznaczonej do spożycia i pozwoli na uniknięcie zagrożeń związanych z rozprzestrzenianiem zanieczyszczeń szkodliwych dla zdrowia drogą wodną.

## LITERATURA

- M. ŚWIDERSKA-BRÓŹ: Wybrane problemy w oczyszczaniu wody do picia i na potrzeby gospodarstwa. *Ochrona Środowiska* 1999, vol. 21, nr 3, ss. 7–12.
- S. BELKIN, M. STEIBER, A. TIEHM, F.H. FRIMMEL, A. ABELIOVICH, P. WERNER, S. ULITZUR: Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Environmental Toxicology and Water Quality* 1994, Vol. 9, pp. 303–309.
- M. ŁEBKOWSKA: Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 2, ss. 11–15.
- V.J. CABELLI, A.P. DUFOUR, L.J. McCABE, M.A. LEVIN: Swimming-associated gastroenteritis and water quality. *Am. J. Epidemiol.* 1982, Vol. 115, pp. 606–616.
- B. PUZANOWSKA, A. CZAUŻ-ANDRZEJUK: Bioterroryzm. *Przegląd Epidemiologiczny* 2001, nr 55, ss. 379–86.
- K. SZATKIEWICZ: Rewizja dyrektywy 98/83/WE w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, dotycząca oceny zagrożeń i zarządzania ryzykiem. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 3, ss. 41–44.
- M. FILIPIAK, K. FLUDRA, E. GOSCIMINSKA: Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode. *Biosens. Bioelectron.* 1996, Vol. 11, pp. 355–364.
- M. PRZYBYT, B. HAGGETT, R. DEMBZYŃSKI, T. JAN-KOWSKI: Biosensory. W: *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii* [red. M. JANKIEWICZ, Z. KĘDZIOR]. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu, Poznań 2003, ss. 253–321.
- Z. BRZÓZKA [red.]: *Mikrobioanalitika*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2009.
- M.K. BŁASZCZYK: *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, ss. 175–183.
- S. RODRIGUEZ-MOZAZ, M.J. LOPEZ DEALDA, M.P. MARCO, D. BARCELO: Biosensors for environmental monitoring. *Talanta* 2005, Vol. 65, pp. 291–297.
- D.Y. CHEN, B. LIU CAO, J. KONG: A BOD biosensor based on a microorganism immobilized on an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  sol-gel matrix. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, Vol. 372, pp. 737–739.
- M.V. GONCHAR, M. STRZELCZYK, M.M. MAIDAN, J. BIENI, A.A. SIBIRNY: Zastosowanie metody enzymatycznej do analizy formaldehydu w roztworach wodnych. *Ochrona Środowiska* 1998, vol. 20, nr 3, ss. 35–38.
- B. HOCK, M. SEIFERT, K. KRAMER: Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2002, Vol. 17, pp. 239–249.
- G. MARRAZZA, I. CHIANELLA, M. MASCINI: Disposable DNA electrochemical biosensor for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* 1999, Vol. 387, pp. 297–307.
- R. KIZEK, J. VACEK, L. TRNKOVA, B. KLEJDUS, V. KUBAN: Electrochemical biosensors in agricultural and environmental analysis. *Chem. Listy* 2003, Vol. 97, pp. 1003–1010.
- H.C. TSAI, R.A. DOONG, H.C. CHIANG, K.T. CHEN: Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Anal. Chim. Acta* 2003, Vol. 481, pp. 75–81.
- K. LANGE, B.E. RAPP, M. RAPP: Surface acoustic wave biosensors: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, Vol. 391, No. 5, pp. 1509–1519.
- B. FILANOSKI, G.K. MAKI: Ultrasensitive detection of bacterial toxin with silicon nanowire transistor. *Lab. Chip* 2008, No. 8, pp. 868–871.
- M. POHANKA, P. SKLADAL: Electrochemical biosensors – principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine* 2008, No. 6, pp. 57–64.
- J.W. CHOI, Y.K. KIM, I.H. LEE, J. MIN, W.H. LEE: Optical organophosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase/viologenhetero Langmuir-Blodgett film. *Biosens. Bioelectron.* 2001, Vol. 16 (9–12), pp. 937–43.
- C. ERCOLE, M. DEL GALLO, M. PANTALONE, S. SANTUCCI, L. MOSIELLO, C. LACONI, A. LEPIDI: Biosensor for Escherichia coli based on a potentiometric alternating biosensing (PAB) transducer. *Sens. Actuators B* 2002, Vol. 83, pp. 48–52.
- D.W. CAMPBELL, C. MULLER, K.F. REARDON: Development of fiber optic enzymatic biosensor for 1,2-dichloromethane. *Biotechnology Letters* 2006, Vol. 28, pp. 883–887.
- M. NIELSEN, L.H. LARSEN, M.S. M. JETTEN, N.P. REVSBECHE: Bacterium-based  $\text{NO}_2$ -biosensor for environmental applications. *Applied Environmental Microbiology* 2004, Vol. 70 (11), pp. 6551–6558.
- R.W. BOGUE: Biosensors for monitoring the environment. *Sensor Review* 2003, Vol. 23, No. 4, pp. 302–310.
- T.C. TAN, C. WU: BOD sensors using multi-species living or thermally killed cells of a BIOSEED microbial culture. *Sensors and Actuators* 1999, B54, pp. 252–260.
- G.J. CHEE, Y. NOMURA, K. IKEBUKURO, I. KARUBE: Stopped-flow system with ozonizer for the estimation of low biochemical oxygen demand in environmental samples. *Biosens. Bioelectron.* 2007, Vol. 22 (12), pp. 3092–3098.
- M. MATEJCZUK: Bakteryjne biosensory. *Postępy Mikrobiologii* 2004, vol. 43, nr 2, ss. 155–165.
- Z. KAŃSKA, M. ŁEBKOWSKA: Badania toksykologiczne dla kontroli jakości wód. *Biotechnologia* 1994, nr 2, ss. 98–113.
- B. KOŁWZAN: *Bioremediacja gleb wraz z oceną ekotoksykologiczną* Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
- G. NAŁĘCZ-JAWECKI, J. SAWICKI: Microtox – szybki system bioindykacyjny do oceny toksyczności wód i ścieków. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 1996, nr 2, ss. 47–51.

32. H. WANG, X.J. WANG, J.F. ZHAO, L. CHEN: Toxicity assessment of heavy metals and organic compounds using CellSense biosensor with *E. coli*. *Chinese Chemical Letters* 2008, Vol. 19, No. 2, pp. 211–214.
33. J. NAWROCKI: Uboczne produkty utleniania i dezynfekcji wody – doświadczenia ostatnich 30 lat. *Ochrona Środowiska* 2005, vol. 27, nr 4, ss. 3–12.
34. J. NAWROCKI: Nitrozoaminy – uboczne produkty dezynfekcji wody. *Ochrona Środowiska* 2007, vol. 29, nr 3, ss. 13–18.
35. B. KOŁWZAN: Badania nad bioindykacją metali ciężkich o właściwościach mutagennych i rakotwórczych w wodach powierzchniowych. *Ochrona Środowiska* 1988, vol. 10, nr 1, ss. 13–15.
36. B. KOŁWZAN, M. PAWLACZYK-SZPIŁOWA, W. ADAMIĄK: Bioindykacja zanieczyszczeń mutagennych i rakotwórczych w próbach środowiskowych. W: Człowiek – Środowisko – Zagrożenie [red. J. ZWOŹDZIAK], Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2002, ss. 165–181.
37. Y. ODA, S. NAKAMURA, I. OKI, T. KATO, H. SHINAGAWA: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research* 1985, Vol. 147, pp. 219–229.
38. P. QUILLARDET, M. HOFNUNG: The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutation Research* 1985, Vol. 147, pp. 65–78.
39. B.M. AMES, J. McCANN, E. YAMASAKI: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 1975, Vol. 31, pp. 347–364.
40. G. WĘGRZYN, A. CZYŻ: Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *Journal of Applied Microbiology* 2003, Vol. 95, pp. 1175–1181.
41. A. CZYŻ, J. JASIECKI, A. BOGDAN, H. SZPILEWSKA, G. WĘGRZYN: Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* 2000a, Vol. 66, pp. 599–605.
42. T.S. SUN, H.M. STAHR: Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test. *J. AOAC International* 1993, Vol. 76, pp. 893–898.
43. L. VERSCHAEVE, J. VAN GOMPEL, L. THILEMANS, L. REGNIERS, P. VANPARYS, D. VANDERLELIE: VITOTOX bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1999, Vol. 33, pp. 240–248.
44. I. KARUBE, E. TAMIYA: Biosensors for environmental control. *Pure & Applied Chemistry* 1987, Vol. 59, No. 4, pp. 545–554.
45. L.R. PTITSYN, G. HORNECK, O. KOMOVA, S. KOZUBEK, E.A. KRASAVIN, M. BONEV, P. RETTBERG: A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, pp. 4377–4384.
46. G. BITTON: *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, 1999.
47. B. KOŁWZAN, W. ADAMIĄK, K. GRABAS, A. PAWEŁCZYK: Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005, www.dbc.wroc.pl/publication/918.
48. R.W. TREPETA, S.C. EDBERG: Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1984, Vol. 19, pp. 172–174.
49. T.C. COVERT, E. W. RICE, S.A. JOHNSON, D. BERMAN, C.H. JOHNSON, P.J. MASON: Comparing defined-substrate tests for detection of *Escherichia coli* in wastewater. *J. Am. Water Works Assoc.* 1992, Vol. 84, pp. 98–105.
50. S.C. EDBERG, M.J. ALLEN, D.B. SMITH: Rapid specific autoanalytical method for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* from drinking water. *Water Science Technology* 1989, Vol. 21, pp. 173–177.
51. S.C. EDBERG, M.J. ALLEN, N.J. KRIZ: Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. *Applied Environmental Microbiology* 1990, Vol. 56, pp. 366–369.
52. G.W. CHANG, J. BRILL, R. LUM: Proportion of  $\beta$ -glucuronidase negative *Escherichia coli* in human fecal samples. *Applied Environmental Microbiology* 1989, Vol. 55, pp. 335–339.
53. R.J. DAVIES-COLLEY, R.G. BELL, A.M. DONNISON: Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliform in sewerage effluent diluted in seawater. *Applied Environmental Microbiology* 1994, Vol. 60, pp. 2049–2058.
54. A.G. GEHRING, J.D. BREWSTER, P.L. IRWIN, S.-I. TU, L.J. VANHOUTEN: 1-naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, Vol. 469, pp. 27–33.
55. A.K. DEISINGH, M. THOMPSON: Biosensors for the detection of bacteria. *Can. J. Microbiol.* 2004, Vol. 50, pp. 69–77.
56. P.M. FRATAMICO, T.P. STROBAUGH: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay, direct immunofluorescent filter technique and multiplex polymerase chain reaction for detection of *Escherichia O157:H7* seeded in beef carcass wash water. *Journal of Food Protection* 1998, Vol. 61, pp. 934–938.
57. A.K. BEJ, J. STEFFAN, L. DICESARE, L. HAFF, R.M. ATLAS: Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Applied Environmental Microbiology* 1990, Vol. 56, pp. 307–314.
58. M.T. MARTINS, I.G. RIVERIA, D.L. CLARK, B.H. OLSON: Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples in DNA probes and the recovery of toxin-bearing strains in minimal o-nitrophenol- $\beta$ -D92 galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide media. *Applied Environmental Microbiology* 1993, Vol. 58, pp. 3095–3100.
59. A.K. BEJ, J. STEFFAN, L. DICESARE, L. HAFF, R.M. ATLAS: Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Applied Environmental Microbiology* 1991, Vol. 57, pp. 1013–1017.
60. P. CLEUZIAT, J. ROBERT-BAUDOY: Specific detection of *Escherichia coli* and *Shigella* species using fragments of gene coding for  $\beta$ -glucuronidase. *FEMS Microbiology Letters* 1990, Vol. 72, pp. 315–322.
61. G.R. CAMPBELL, J. PROSSER, K. KILLMAN: Detection of *Escherichia coli O157:H7* in soil and water using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology* 2001, Vol. 91, pp. 1004–1010.
62. R.H. DEIBEL: The group D Streptococci. *Bacteriological Review* 1964, 3, pp. 330–366.
63. F.M. AARESTRUP, F. BAGER, J.S. ANDERSEN: Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers: epidemiological study and changes over time. *Microb. Drug. Resis.* 2000, Vol. 6, pp. 71–75.
64. F. BAGER, M. MADSEN, J. CHRISTENSEN, F.M. AARESTRUP: Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev. Vet. Med.* 1997, Vol. 31, pp. 95–112.
65. K.L. ANDERSON, J.E. WHITLOCK, V.J. HARWOOD: Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Applied Environmental Microbiology* 2005, Vol. 71, pp. 3041–3048.
66. K.F. ECKNER: Comparison of membrane filtration and multiple tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods

- for the detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. *Applied Environmental Microbiology* 1998, Vol. 64, pp. 3079–3083.
67. J.W.SANTO DOMINGO, S.C.SIEFRING, R.A.HAUGLAND: Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water. *Biotechn. Letters* 2003, Vol. 25, pp. 261–265.
  68. S.T.PATHIRANA, J.BARBAREE, B.A.CHIN, M.G.HARTELL, W.C.NEELY, V.VODYANOY: Rapid and sensitive biosensor for Salmonella. *Biosens. Bioelectron.* 2000, Vol. 15, pp. 135–141.
  69. V.KOUBOVA, E.BRYNDA, L.KARASOVA, J.SKVOR, J.HOMOLA, J.DOSTALEK, P.TOBISKA, J.ROSICKY: Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sens. Actuators B* 2001, Vol. 74, pp. 100–105.
  70. G.P.ANDERSON, C.A.ROWE-TAITT: Water quality monitoring using an automated portable fiber optic biosensor. RAPTOR, proc. SPIE 4206, 2001, pp. 58–63.
  71. R.A.GUY, P.PAYMENT, U.J.KRULL, P.A.HORGEN: Real-time PCR for quantification of Giardia and Cryptosporidium in environmental water samples and sewage. *Applied Environmental Microbiology* 2003, Vol. 69, No. 9, pp. 5178–5185.
  72. C.GARCÍA-ALJARO, X.MUÑOZ-BERBEL, A.T.JENKINS, A.R.BLANCH, F.X.MUÑOZ: Surface plasmon resonance assay for real-time monitoring of somatic coliphages in wastewaters. *Applied Environmental Microbiology* 2008, Vol. 74, pp. 4054–4058.

---

**Kolwzan, B. Use of Biosensors for the Assessment of Water Quality. *Ochrona Srodowiska* 2009, Vol. 31, No. 4, pp. 3–14.**

**Abstract:** Water quality assessments are based on the analysis of the physical, chemical and bacteriological parameters chosen, which requires customized apparatus and trained staff. Such analytical procedures differ in duration. For example, a bacteriological analysis with the relevant replications may take as long as several days. The need of supplying the user with water of the quality desired has triggered action to find new techniques that would enable the results of analysis to be obtained within a shorter time. Time is a crucial factor, as there is the potential risk that pathogens will be transmitted in the aquatic environment, which is also open to bioterrorist attacks. Recent advances in science and technology, and biotechnology in particular, have led to the design and construction of high-selectivity biosensors enabling the presence of chemical and biological water pollutants to be detected in a short time span. Biosensors combine the sensitivity and selectivity of classic analytical methods with a wide spectrum of advanced technological designs.

The study reported on in this paper is focused on examining the biological materials used as detectors in biosensors, as well as various types of biological phenomenon/electric signal converters. Particular consideration is given to the problem of how the sensitivity and selectivity of the biosensors compare with the sensitivity and selectivity of the classic analytical methods. It has been demonstrated that the use of biosensors is very promising for the determination of water quality variations, as they enable a quick detection not only of chemical substances but also pathogens (viruses, bacteria, protozoa) that are present in the water. This offers the possibility of producing quick assessments of both ‘single’ water quality parameters that are used in water analysis and ‘groups’ of water quality parameters (organic matter content, toxicity, mutagenicity, carcinogenicity), which have also found wide acceptance in analytics. The use of biosensors in the monitoring of water distribution systems will substantially upgrade the quality and safety of the water supplied for human consumption.

**Keywords:** Water quality, biosensor, chemical quality, biological quality.