



**Wydział
Chemiczny**

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

NCBR

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Program strategiczny
TECHMATSTRATEG



Perspektywy rozwoju bioreceptorowego mobilnego systemu do wykrywania zanieczyszczeń wody metalami ciężkimi

Dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. uczelni

Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków

XXV Kongres WOD-KAN-EKO 2022

**Politechnika
Warszawska**

17 listopada 2022 r. Łódź



Zainteresowania naukowe

2

Główna tematyka badawcza:

- białka oddziaływujące z kwasami nukleinowymi
- konstrukcja fuzyjnych multifunkcyjnych białek
- innowacyjne rozwiązania dla diagnostyki molekularnej:
 - nowe narzędzia (tzw. ,biotools')
 - nowe metody diagnostyczne
 - nowe cele molekularne



Alma Mater
Politechnika Gdańska



Aktualna jednostka naukowa
Politechnika Warszawska

Zanieczyszczenia wody metalami ciężkimi

- ME – jedno z najważniejszych zanieczyszczeń wód gruntowych.
- Źródła: urbanizacja i industrializacja, erozja minerałów w osadach, wyłukiwanie złóż i rud.
- ME* dostają się do łańcucha pokarmowego m.in. poprzez organizmy morskie (np. ryby), które następnie są konsumowane przez drapieżniki (ptaki, ssaki) oraz ludzi.

Zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi

- Źródło: pestycydy, nawozy, rudy kopalniane, osady ściekowe, wysypiska śmieci, wykorzystywanie w rolnictwie nieoczyszczonych wód ściekowych.
- ME obecne w glebie zmieniają jej właściwości (pH, kolor, strukturę).
- ME wchłaniane są przez rośliny. Przekroczenie progu tolerancji roślin na ME może powodować choroby, a nawet śmierć.

ME **nie ulegają rozkładowi** mikrobiologicznemu, ani degradacji chemicznej - **warto je monitorować.**

Dopuszczalne stężenia metali ciężkich w wodzie pitnej

| Lp. | Metal | PL | EPA USA | FSSAI | WHO | CODEX | EU | USFDA |
|-----|---------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. | Kadm | 0,005 | 0,005 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,005 | 0,005 |
| 2. | Arsen | 0,01 | 0,006 | 0,05 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| 3. | Ołów | 0,01 | 0,015 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,005 |
| 4. | Chrom | 0,05 | 0,1 | 0,05 | 0,05 | - | 0,05 | 0,100 |
| 5. | Cynk | - | - | 15 | 3,00 | - | 5,00 | 0,100 |
| 6. | Miedź | 2,00 | 1,3 | 1,5 | 2,00 | - | 2,00 | 1,000 |
| 7. | Żelazo | 0,2 | - | 0,3 | 2,00 | - | 0,2 | 0,300 |
| 8. | Rtęć | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,006 | 0,001 | - | - |
| 9. | Nikiel | 0,02 | - | 1,5 | 0,02 | - | 0,02 | 0,1 |
| 10. | Mangan | 0,05 | - | - | 0,4 | - | 0,3 | 0,05 |
| 11. | Antymon | 0,005 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,005 | 0,005 | 0,006 |
| 12. | Kobalt | - | - | - | 0,05 | - | - | - |
| 13. | Selen | 0,010 | 0,050 | | 0,040 | | | |
| 14. | Glin | 0,200 | | | | | | |
| 15. | Srebro | 0,010 | | | | | | |
| 16. | Uran | | | | 0,030 | | | |

Instrumentalne metody wykrywania metali ciężkich

5

Analiza instrumentalna:

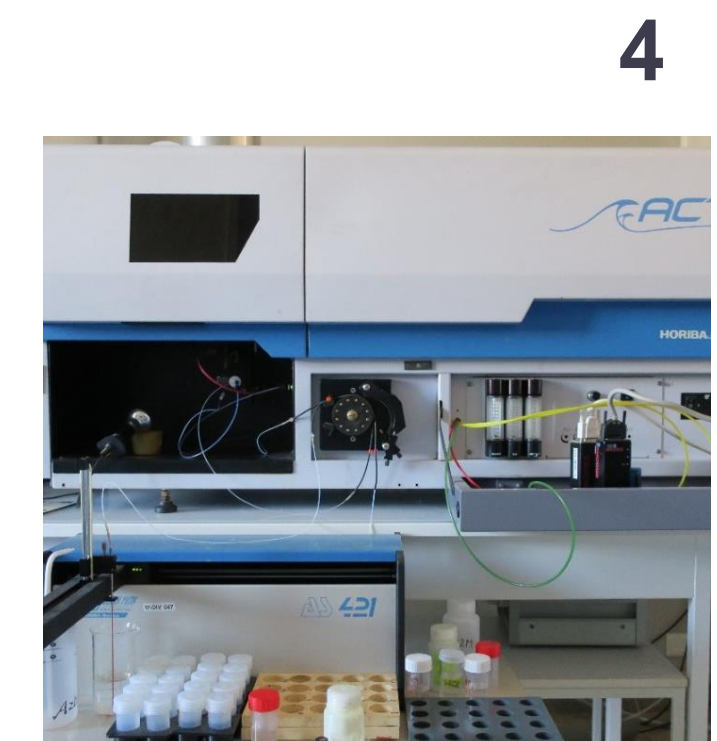
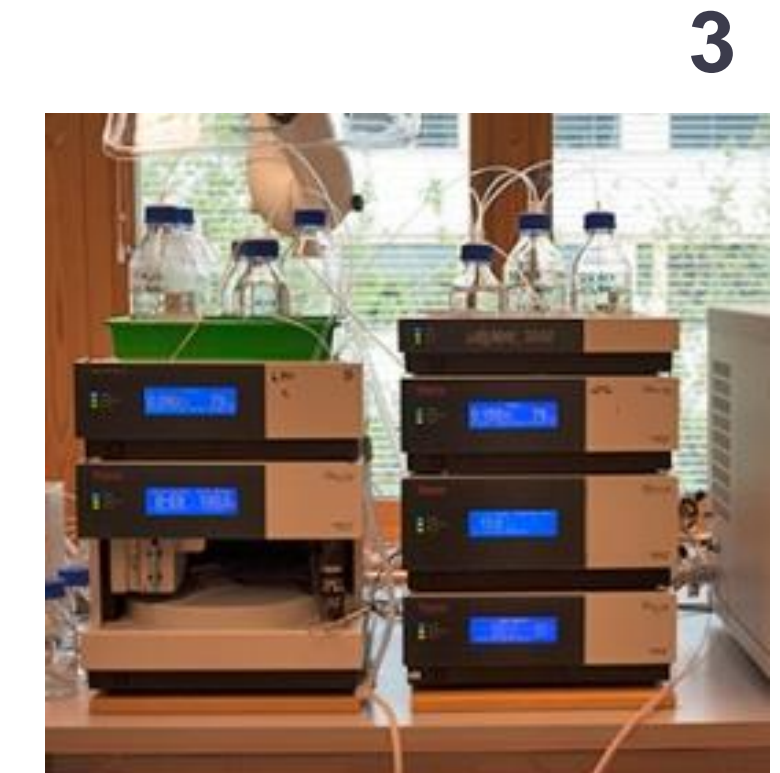
1. Chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas (GC-MS)
2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas (HPLC-MS)
3. Spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-MS)
4. Spektrometria emisji atomowej (ICP-AES)

Zalety:

- Wysoka czułość oznaczeń
- Wysoka dokładność oznaczeń
- **Metody referencyjne**

Wady:

- Bardzo drogi sprzęt
- Kosztowne analizy
- Wyszkolony personel
- Czasochłonne przygotowanie próbki
- Niemożliwe przeprowadzenie analizy *in situ*



Źródło:

1 – <https://www.ingenieria-analitica.com/analizador-gc-ms-ms-pesticidas.html>

2 – <https://www.su.se/geo/english/resources/list-of-all-equipment/list-of-analytical-equipment/hplc-ms-ms-1.380786>

3 – <https://scientificservices.eu/item/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometer-icp-ms/1325>

4 – <https://www.mines-stetienne.fr/spin/ressources/characterization-facilities/icp-aes/>

Sensory do wykrywania metali ciężkich

Applied Microbiology and Biotechnology (2020) 104:907–914
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10261-y>

MINI-REVIEW

Specific heavy metal/metalloid sensors: current state and perspectives

Hyojin Kim¹ · Geupil Jang² · Youngdae Yoon¹ 

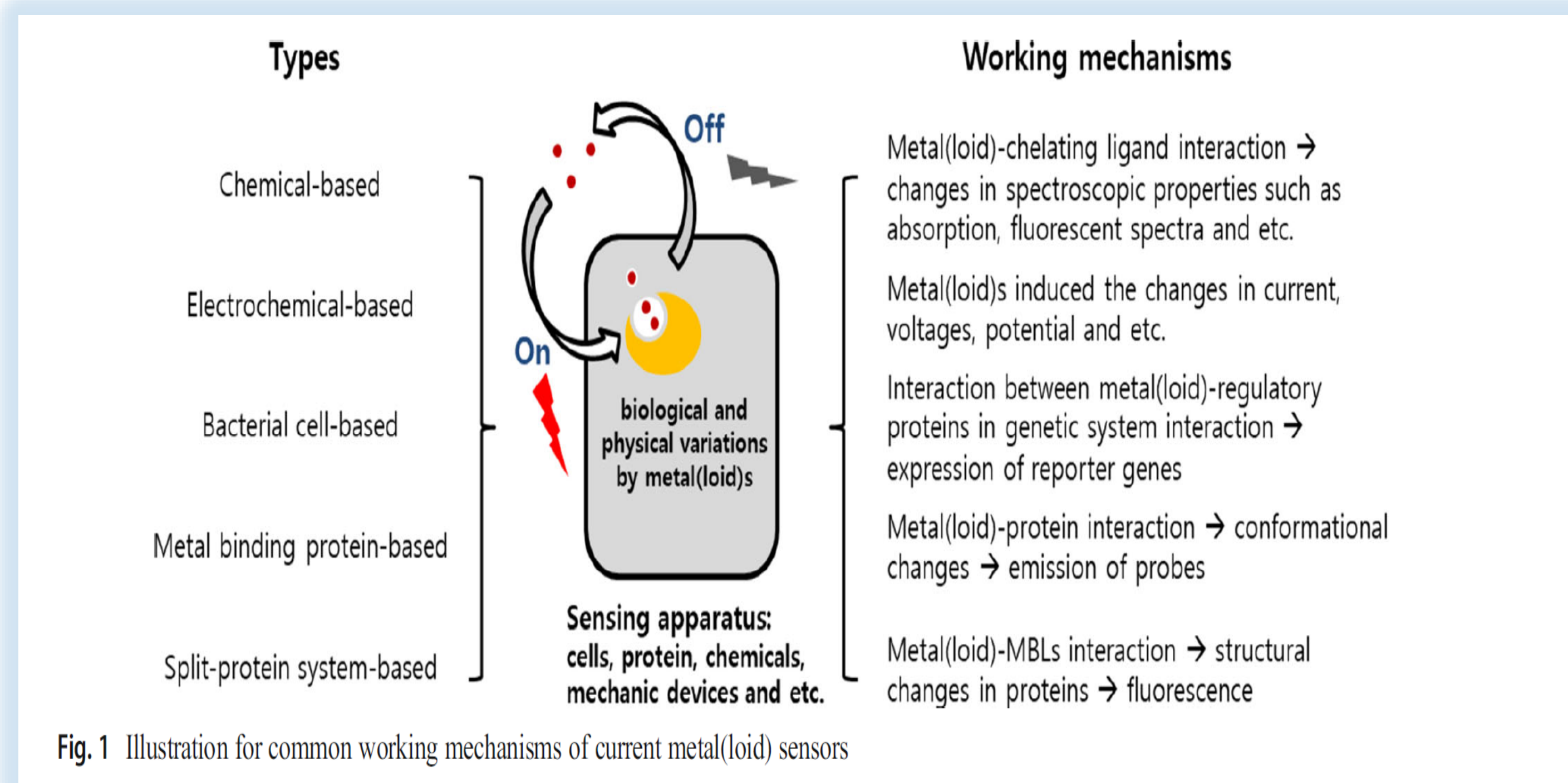


Fig. 1 Illustration for common working mechanisms of current metal(loid) sensors

Sensory do wykrywania metali ciężkich

7

Appl Microbiol Biotechnol (2020) 104:907–914

909

Table 1 List of metal/metalloid sensors classified by types of platforms

| Type | Target metal(loids) | Systems/responses | Detection limit | Reference |
|--|---------------------|---|----------------------------|-------------------------|
| Chemical-based | Cu ²⁺ | Chemicals/fluorescence | 100 nM | (Fabbrizzi et al. 1996) |
| | Zn ²⁺ | Dioxotetraaza-anthracene fragment | 10 nM | (Dujols et al. 1997) |
| | Pb ²⁺ | Rhodamine B hyrazide | 1.3 μM | (Xu et al. 2009) |
| | Cd ²⁺ | NBD-based TRPEN | – | (Kwon et al. 2005) |
| | | Rhodamine B derivative Anthryl tetra acid Rhodamine-alkyne derivative | – | (Choi et al. 2001) |
| Electrochemical-based | Cd ²⁺ | Diverse platform/electric parameters | 0.2 μg/L | (Riman et al. 2015) |
| | Pb ²⁺ | Bi ₂ O ₃ -SPEs(SWASV) | 0.1 μg/L | (Hao et al. 2016) |
| | Cu ²⁺ | MnO ₂ nanowire/nickel foam electrode (SWASV) | 1.0 μg/L | (Nie et al. 2010) |
| | Pb ²⁺ | Microfluidic devices (uPEDs) | 1.0 μg/L | (Reay et al. 1996) |
| | Cd ²⁺ | Microfabricated chips | | |
| Bacterial cell-based (<i>E. coli</i>) | Hg ²⁺ | Genetic system/reporter gene <i>merR/lux arsR/lux</i> <i>CDABE modified zntR/egfp modified zntR/mcherry</i> <i>cueR/egfp cadC/gfp</i> | 3.1 nM | (Harkins et al. 2004) |
| | As ³⁺ | | 12 μg/L, 140 μg/L | (Ivask et al. 2007) |
| | As ⁵⁺ | | 0.5 μM | (Kang et al. 2018a) |
| | Cd ²⁺ | | 0.5 μM 1.0 μM 10 nM/0.1 nM | (Kang et al. 2018b) |
| | Hg ²⁺ | | | (Liao et al. 2006) |
| | Cu ²⁺ | | | |
| | Pb ²⁺ | | | |
| Sb ³⁺ | | | | |
| Metal binding protein-based | Pb ²⁺ | Metal binding protein/DNA probe PbrR691 with pyrrolo-C labeled DNA probes CueR with pyrrolo-C labeled DNA probes | 2 μM | (Chen et al. 2005) |
| | Cu ²⁺ | | 50 nM | (Chen and He 2004) |
| | Ag ⁺ | | | |
| Split-protein system-based | Cd ²⁺ | Modified eGFP/fluorescence MBL modified eGFP. MBL-modified eGFP | | (Lee et al. 2019) |
| | Cd ²⁺ | | | (Kim et al. 2019) |
| | Hg ²⁺ | | | |



Rzeczpospolita
Polska



Projekt finansowany przez **Narodowe Centrum Badań i Rozwoju** w ramach
**Strategicznego Programu Badań Naukowych i Prac Rozwojowych „Nowoczesne
technologie materiałowe” – TECHMATSTRATEG III**

*„Materiały biopolimerowe o programowanej chemicznie i genetycznie selektywności do
metali ciężkich dla ultraczułych biosensorów nowej generacji”*

AKRONIM – ASTACUS

Nr Umowy: TECHMATSTRATEG-III/0042/2019-00

| | |
|--------------------------------|--|
| Beneficjent: | Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny |
| Kierownik projektu: | dr hab. inż. Marcin Olszewski |
| Wartość projektu: | 18 458 913,97 PLN |
| Wartość dofinansowania: | 18 362 616,32 PLN |
| Okres realizacji: | od 1 stycznia 2021 r. do 31 grudnia 2023 r. |

Wykrywanie metali ciężkich - ASTACUS

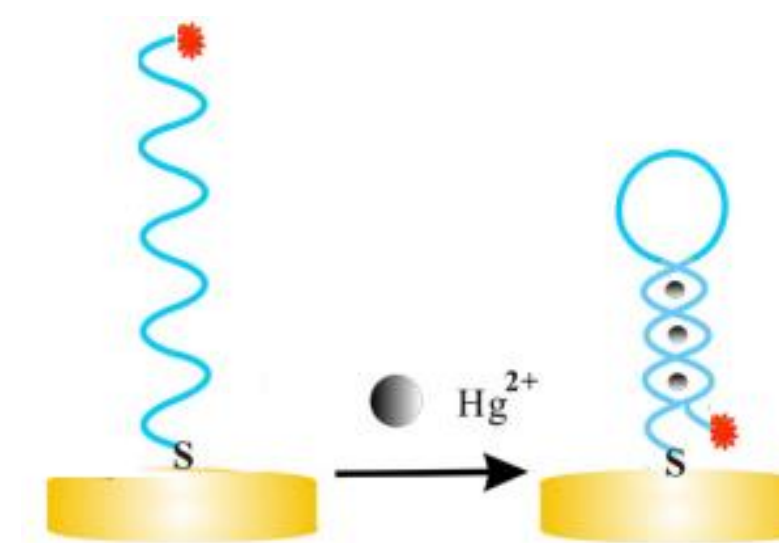
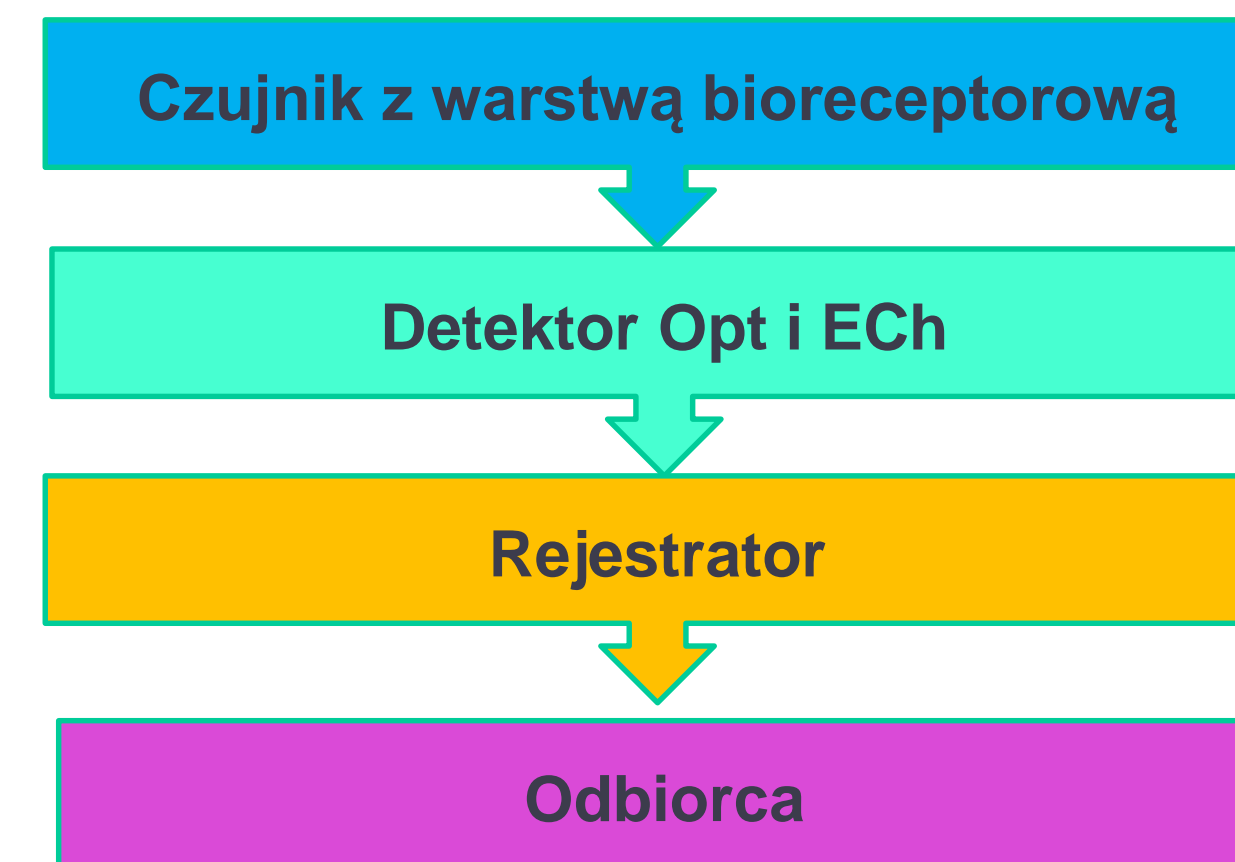
9

Opracowanie **pierwszego na świecie** mobilnego systemu do wykrywania ME w wodzie pitnej opartego na kilku warstwach **bioreceptorowych**:

- aptamery DNA
- aptamery peptydowe
- białka konkatameryczne
- modyfikowane **białka GFP**

System oparty o detekcję:

- optyczną
- elektrochemiczną



Wykrywanie metali ciężkich – ASTACUS

10

Konsorcjanci

Politechnika Warszawska:

- Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków,
- Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Medycznej,
- Wydział Elektroniki i Technik Informacyjnych, Instytut Mikroelektroniki i Optoelektroniki Zakład Technologii Mikrosystemów i Materiałów Elektronicznych



**Wydział
Chemiczny**

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Sieć Badawcza Łukasiewicz, Instytut Mikroelektroniki i Fotoniki,

- Zakład Szkieł

IMiO

Instytut Mikroelektroniki i Optoelektroniki
Politechniki Warszawskiej

Instytut Biotechnologii i Medycyny Molekularnej:

- Pracownia Phage Display,
- Pracownia Syntezy Peptydów,
- Pracownia Syntezy Białek Konkatomerycznych



WYDZIAŁ ELEKTRONIKI
I TECHNIK INFORMACYJNYCH

IBMM

INSTYTUT BIOTECHNOLOGII I
MEDYCYN Y MOLEKULARNEJ



ProScience – partner biznesowy

**Politechnika
Warszawska**



Łukasiewicz

Instytut Mikroelektroniki
i Fotoniki

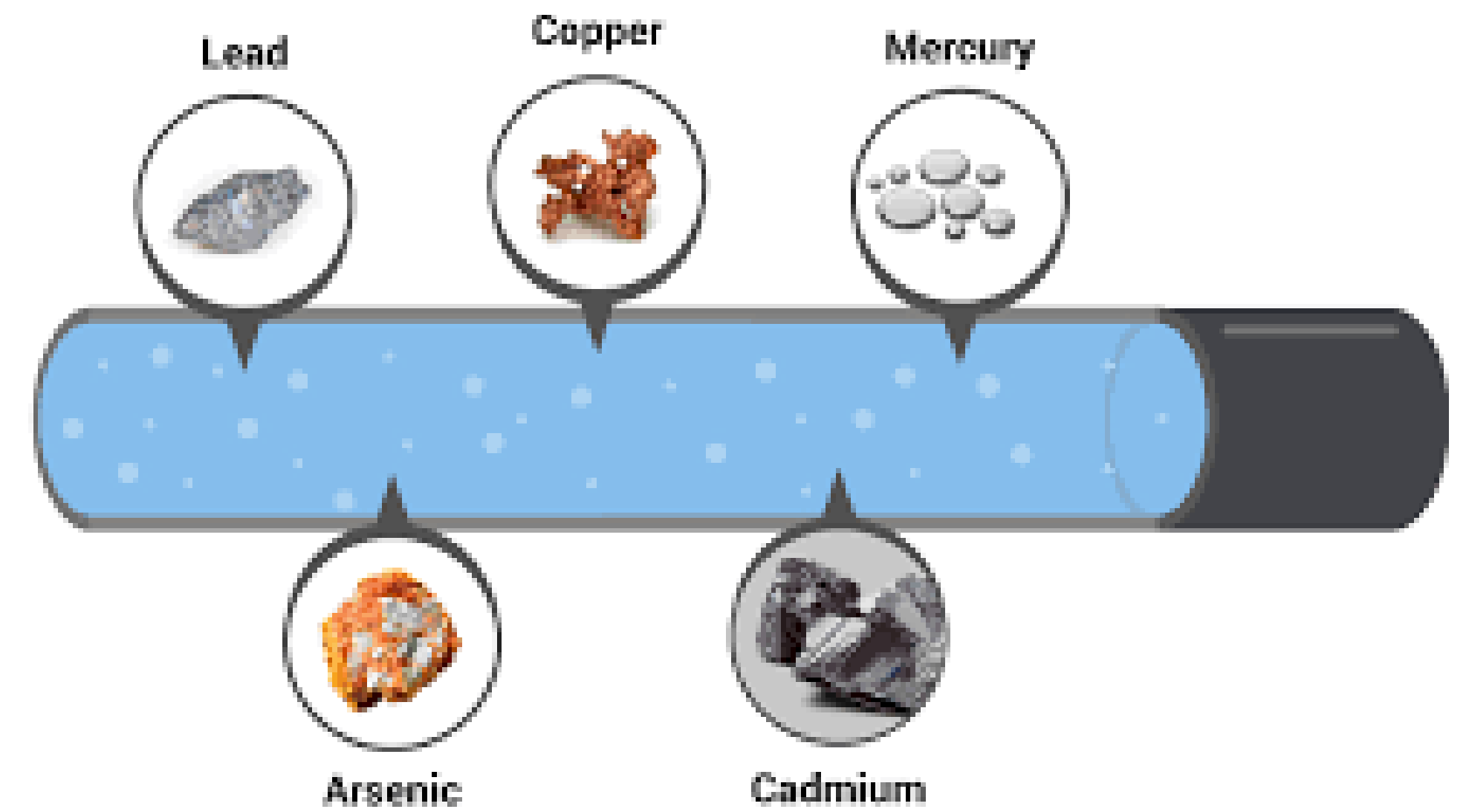
pro-science.eu
life-science's solutions

Wykrywanie metali ciężkich - ASTACUS

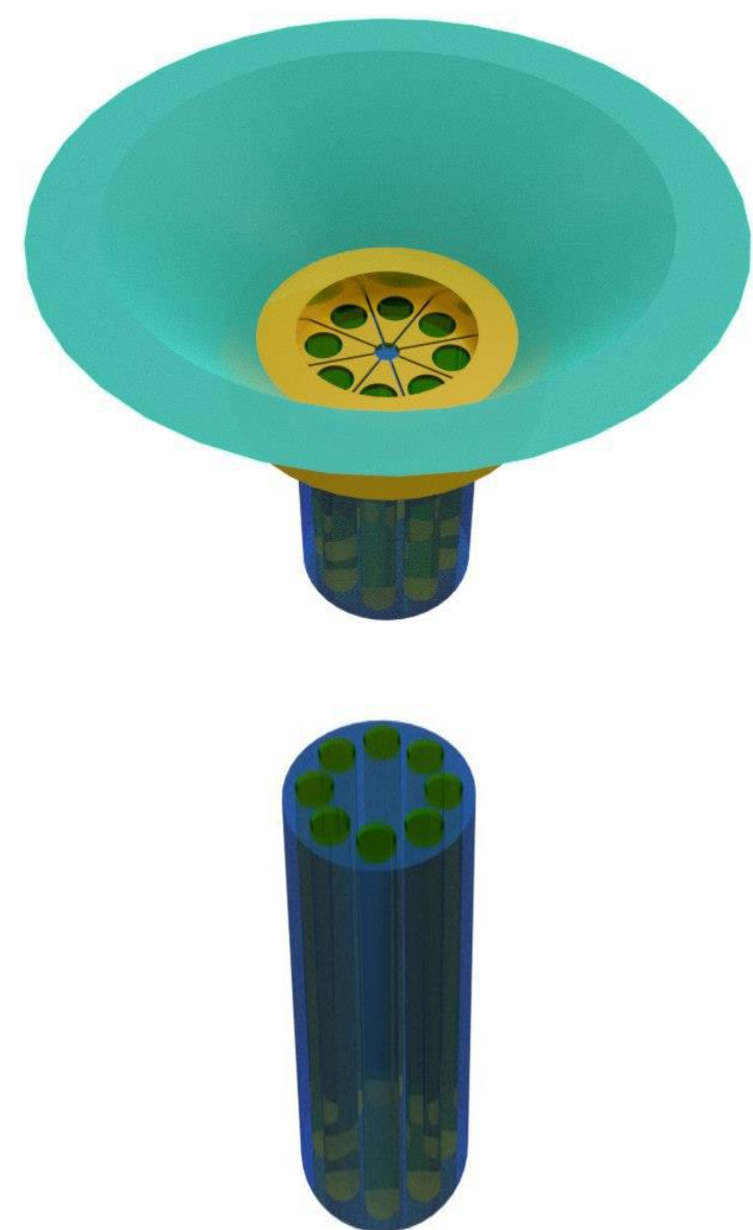
11

Zalety systemu

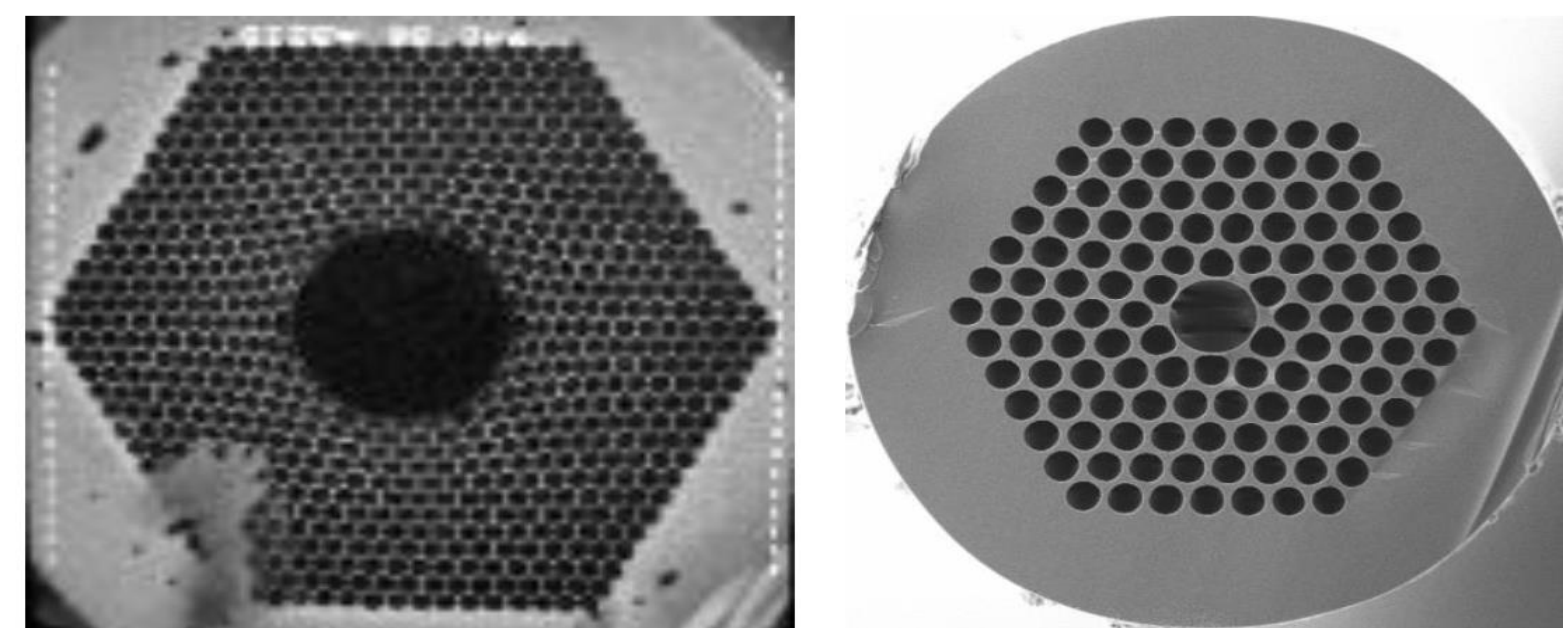
1. Wykrywanie co najmniej 8 ME jednocześnie.
2. Wysoka czułość, selektywność i liniowość.
3. Małe rozmiary.
4. Mobilność.
5. Możliwość pomiarów w terenie.
6. Potrzeba niewielkiej próbki wody, ok. 100 ul.
7. Niska cena czujnika (do 10\$) i detektora (do 500\$).
8. Krótki czas pomiaru - do kilku minut.
9. Zastosowanie 2 układów detekcyjnych.
10. Rejestrator = smartfon, tablet, laptop.



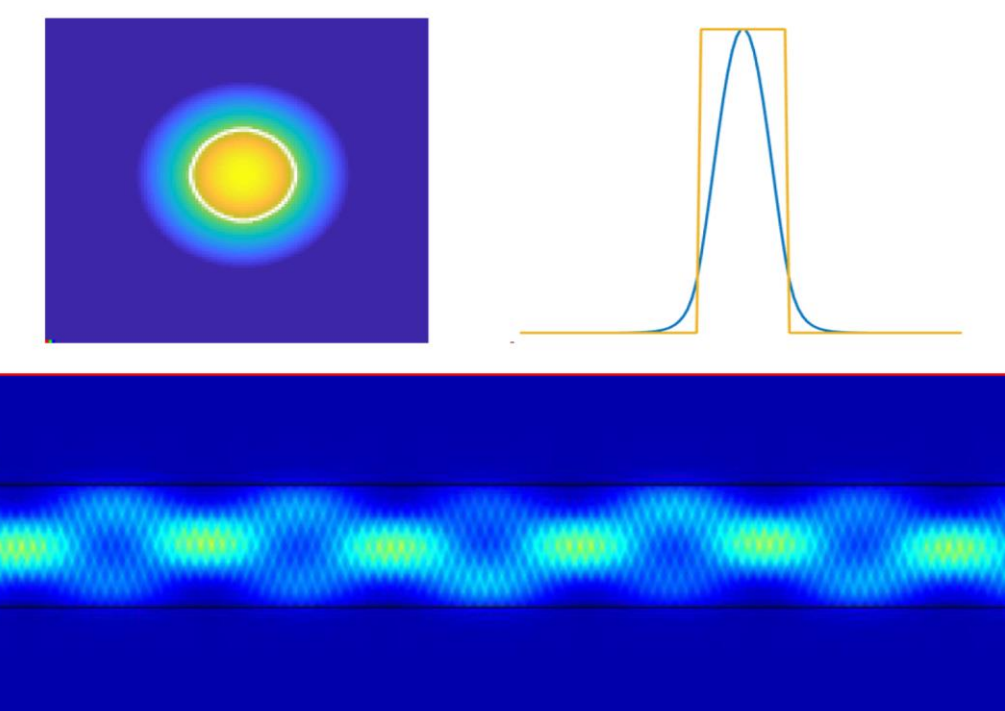
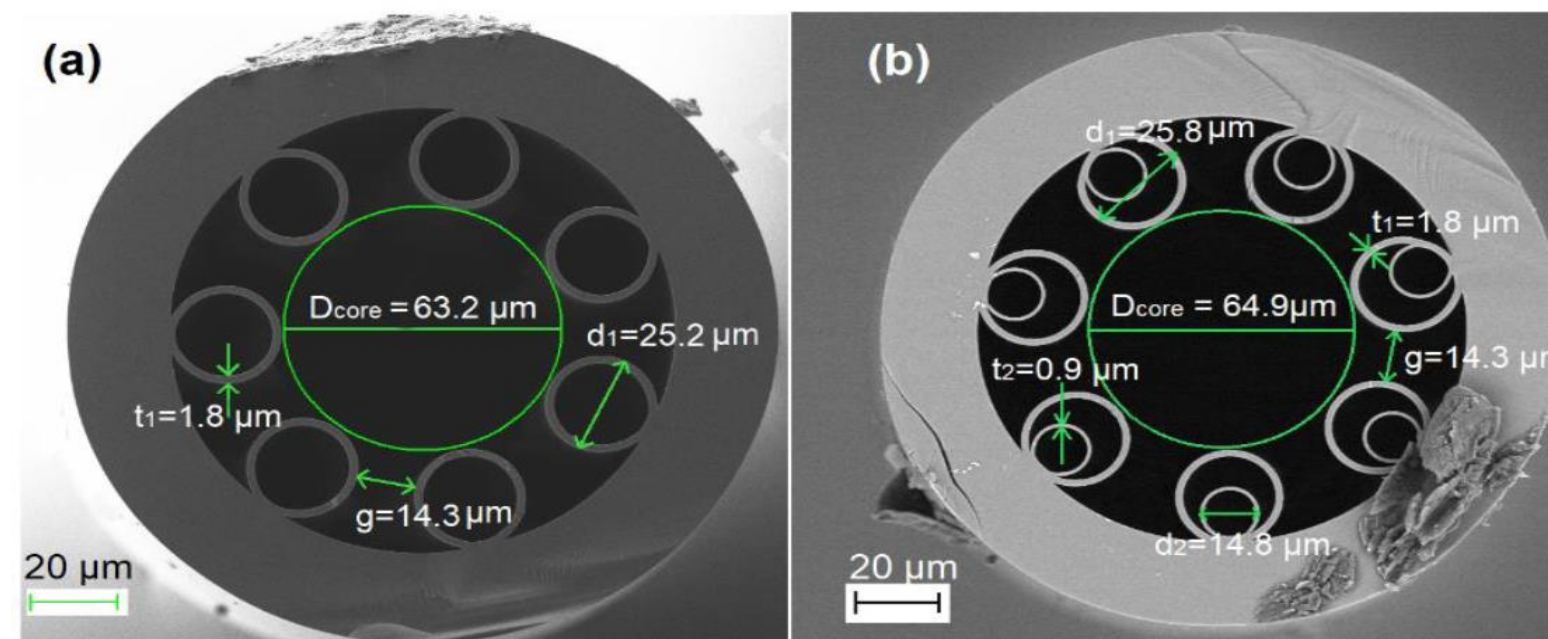
<http://water-purifiers.com/heavy-metal-contamination-in-drinking-water/>



Światłowody z przerwą wzbronioną



Światłowody antyrezonansowe



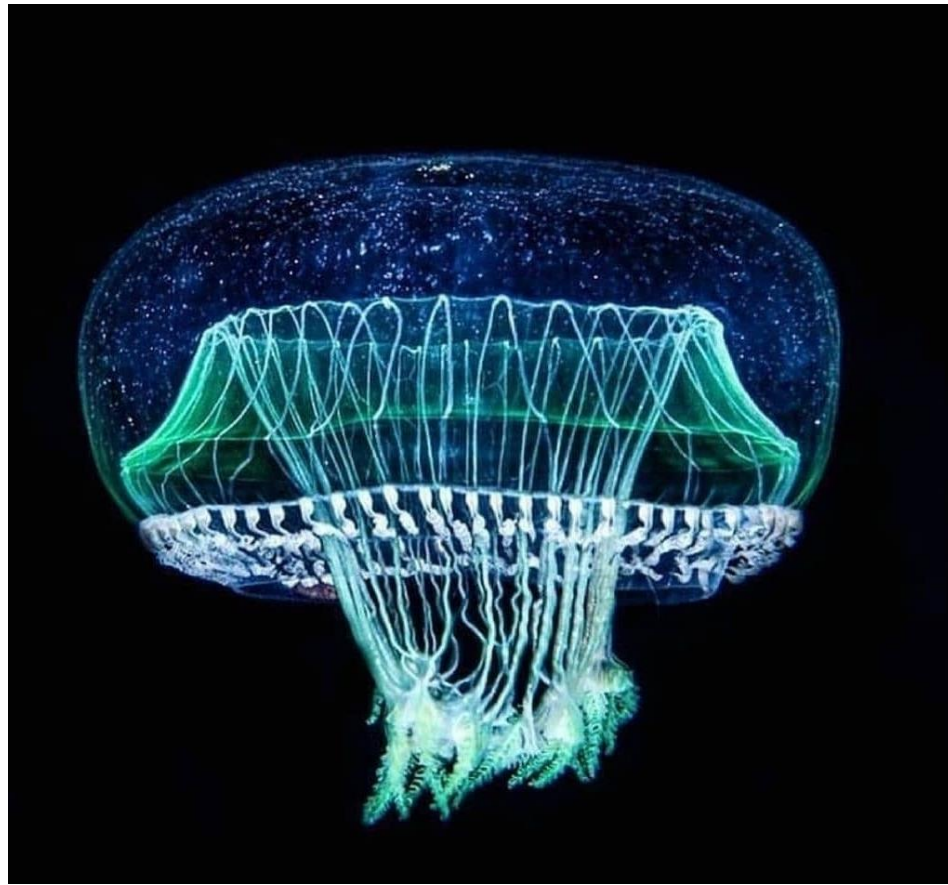
Wykrywanie metali ciężkich – ASTACUS

Wytwarzanie światłowodów



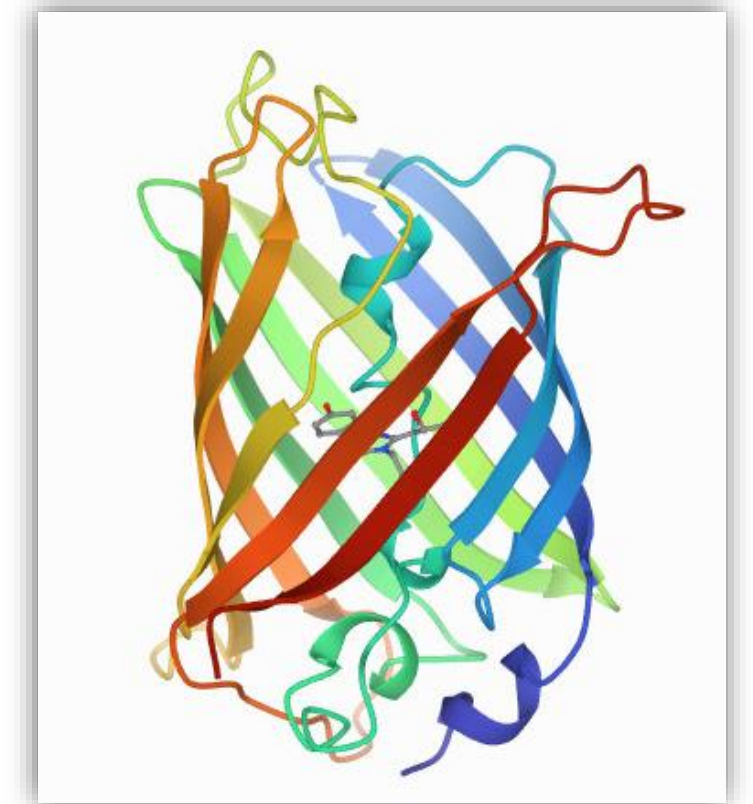
Białko GFP jako znacznik

14



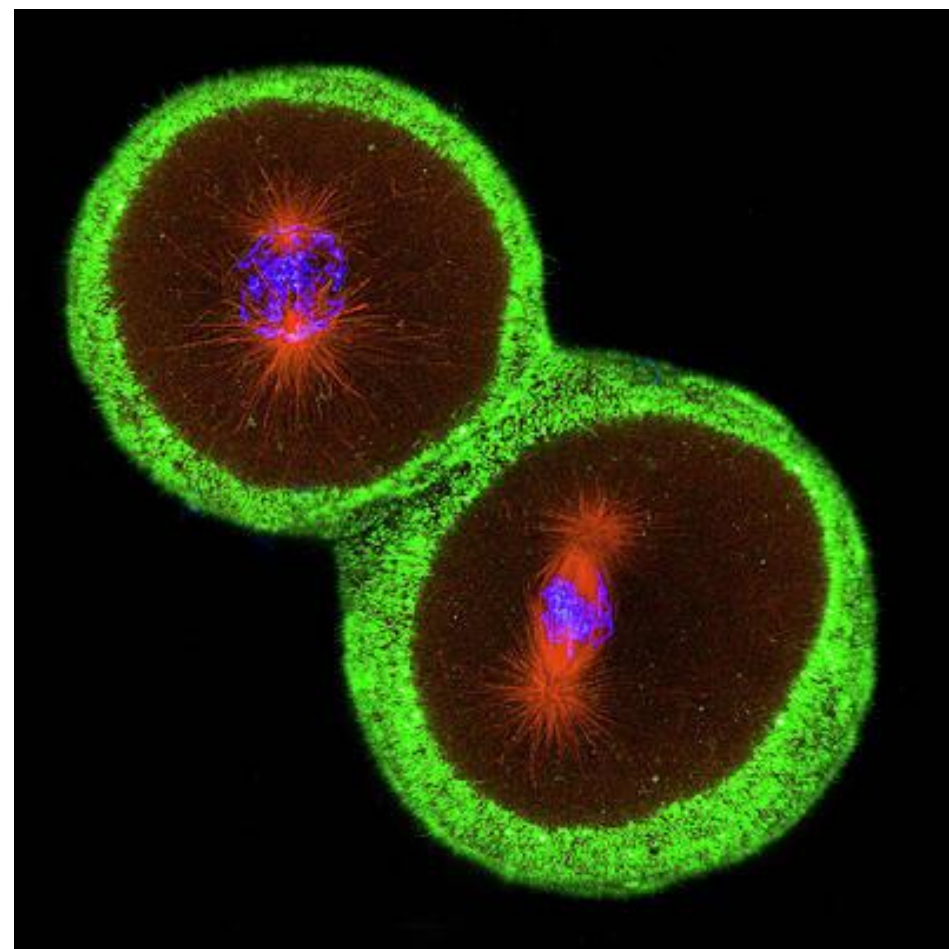
Białko GFP:

- Wyizolowane w latach 60. z meduzy *Aequorea victoria*.
- Nagroda Nobla w dziedzinie chemii w 2008 r. dla **Osamu Shimomura**, **Martin Chalfie** i **Roger Y. Tsien** za odkrycie i rozwój zielonych białek fluorescencyjnych



Wykorzystanie białka GFP:

- znakowanie struktur komórkowych,
- lokalizowanie białek w komórce,
- obserwacja przemian komórkowych,
- analiza ekspresji genów,
- konstrukcja biosensorów.



Podział komórki jeżowca,
Teresa Zgoda



Biosensory oparte na komórkach bakteryjnych

(ang. whole-cell bioreporters, WCB)

15

- Wykorzystują mechanizmy odpowiedzi na stres w organizmach żywych.
- Składają się z **domen detekcyjnych** i **domen receptorowych**.
- Metaloregulatory jako domeny detekcyjne np. MeR, GoIS, CueR, ZntR i PbrR.

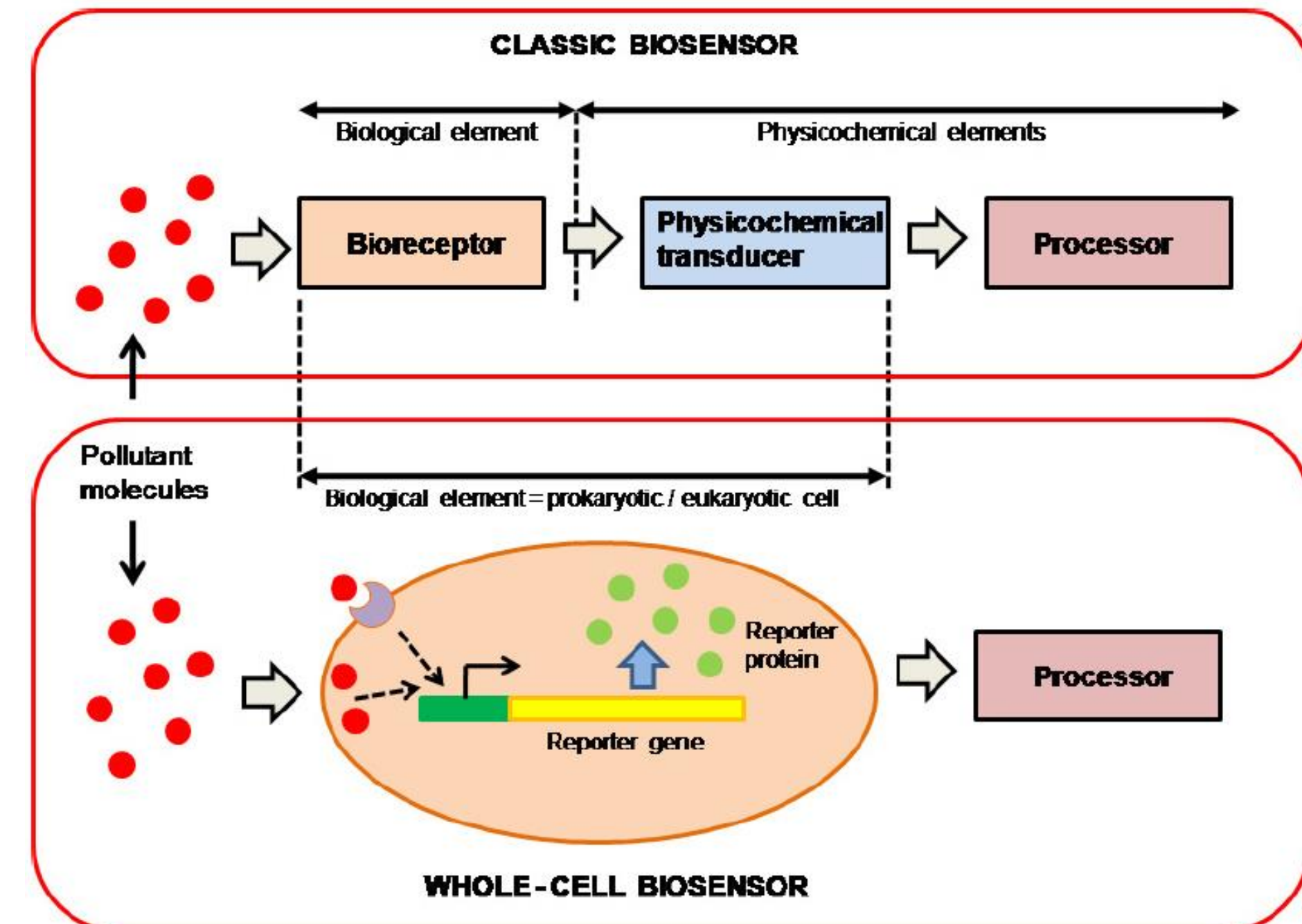
Zalety:

- Prostota
- Tańsza budowa, utrzymanie, eksploatacja
- Ilościowe określenie zanieczyszczeń

Wady:

- Względny pomiar biodostępności
- Brak mechanizmu specyficznego na jeden czynnik stresowy
- Konieczność modulowania selektywności i czułości na jony metali/metaloidów przez inżynierię genetyczną

- **Czas analizy!!!**



Wykrywanie metali ciężkich - ASTACUS

16

Bakterie *E. coli* ze zmodyfikowanym białkiem GFP zawierającym domenę rozpoznania dla **kadm**:

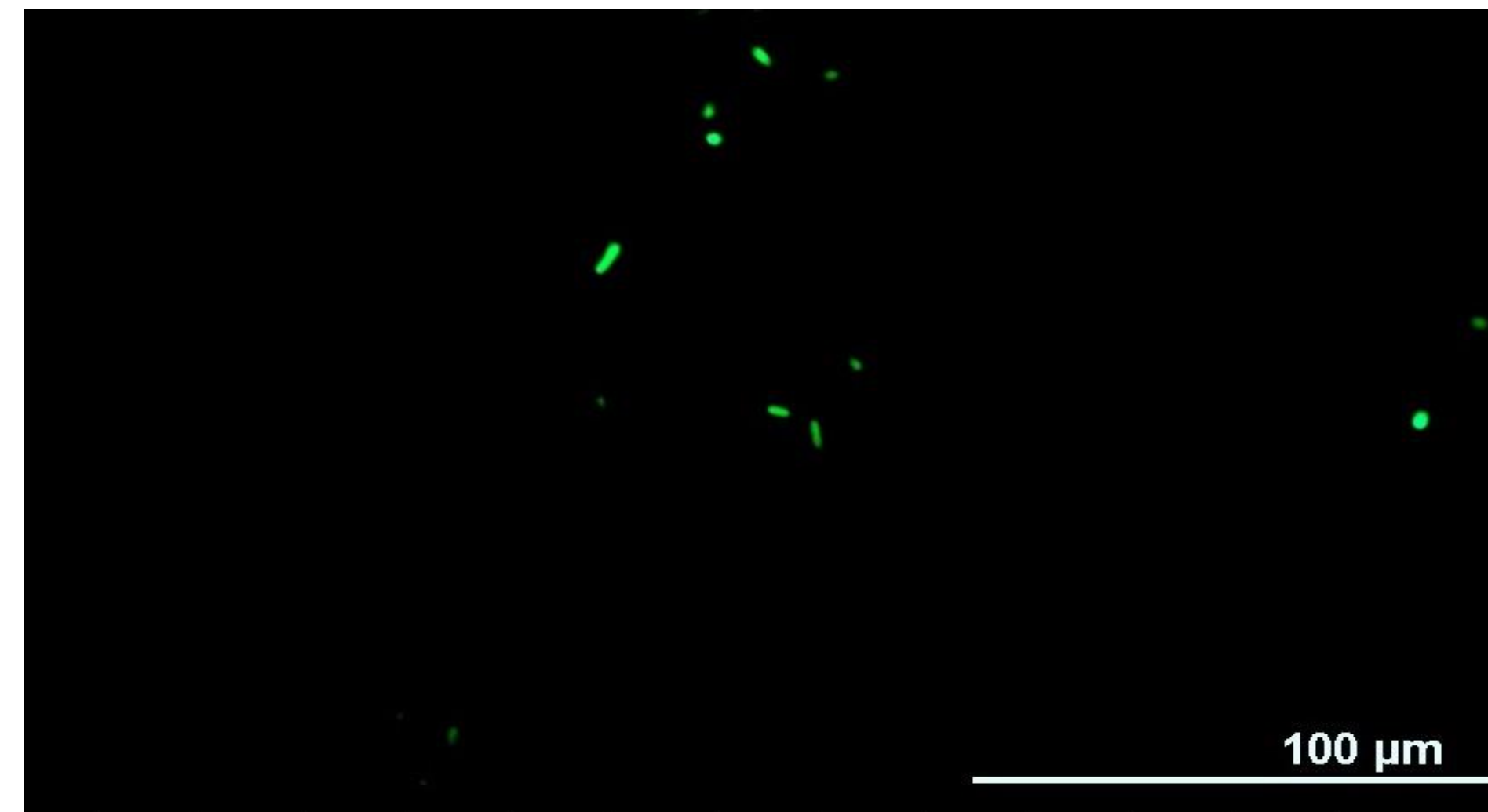
A – obraz uzyskany w kontraście Nomarskiego i w epi-fluorescencji

B – obraz uzyskany w epi-fluorescencji

A

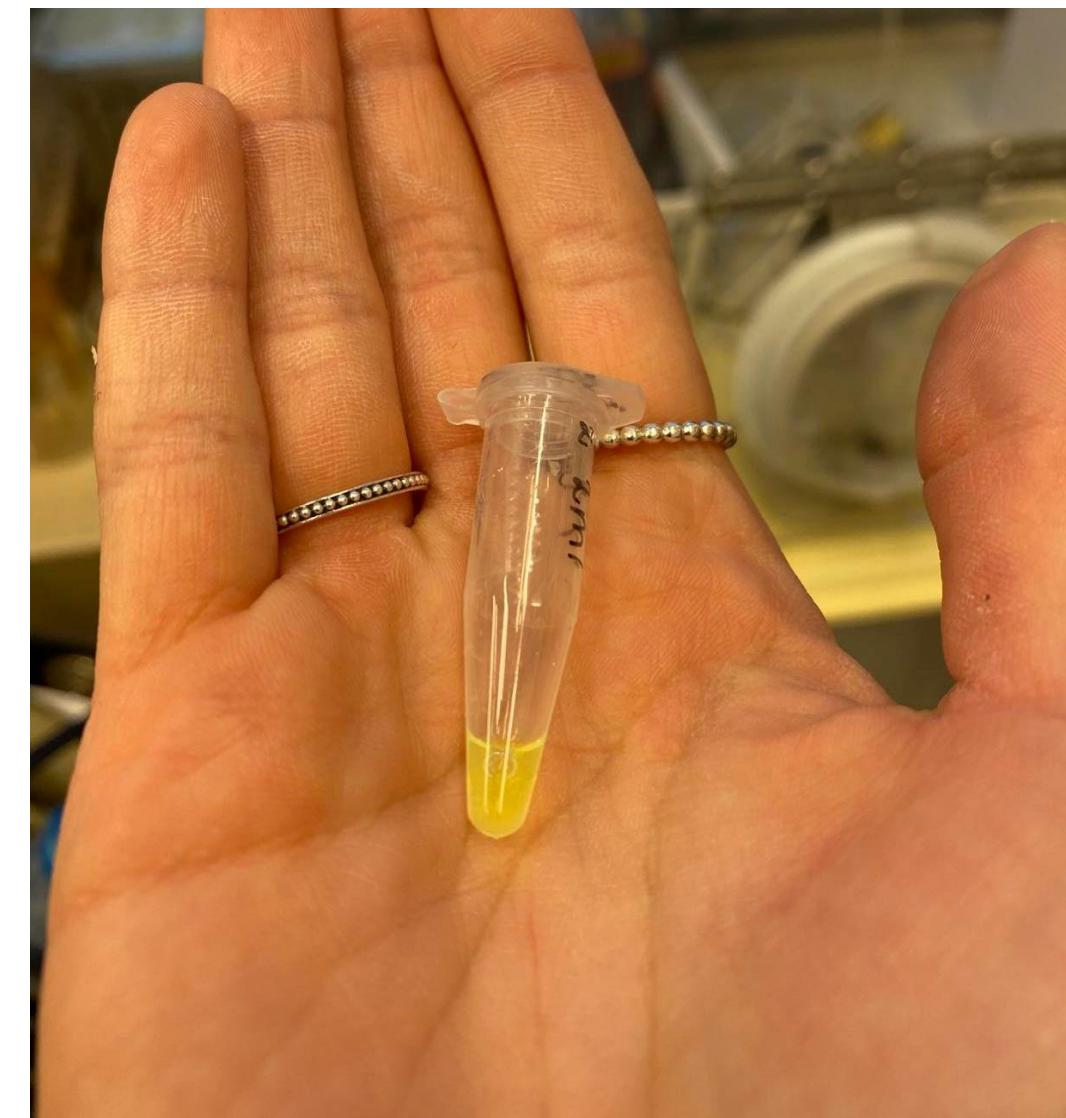


B



Produkcja oraz oczyszczenie białka GFP i jego wariantów wiążących ME

17



Opracowanie szybkiej i bardzo taniej metody – zgłoszenie patentowe

Zespół Biotechnologii Molekularnej

18

Badania modyfikowanych białek GFP

Dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. uczelni

Dr Katarzyna Szymańska

Mgr inż. Klaudia Marlicka

Mgr inż. Katarzyna Serafin

Inż. Julia Cieślicka

Inż. Natalia Gehrke

Karolina Sobiecka

Katarzyna Biernat

Dominika Baran



Dziękuję za uwagę

