

Biosensorischer Schwermetallnachweis am Smartphone-Photometer

Matthias Schäfer, Roland Ulber

*Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern, Gottlieb Daimler Straße 49 67663
Kaiserslautern, Deutschland
matthias.schaefer@mv.uni-kl.de*

Zusammenfassung

Die Entwicklung und der Einsatz eines 3D-druckbaren Smartphone-Photometers zur Durchführung punktueller Absorptionsmessungen und Erfassung kinetischer Prozesse mit einer Messfrequenz von bis zu 20 s^{-1} wird vorgestellt. Als Lichtquelle des Smartphone-Photometers dient die smartphoneyeigene Blitzlicht-LED. Die Blitzlicht-LED ermöglicht, bedingt durch ihr inhomogenes Emissionsspektrum, Absorptionsmessungen in Wellenlängenbereichen von 425-560 und 625-675 nm. Durch den Einsatz einfacher Filterfolien lässt sich die Wellenlänge des zur Messung verwendeten Lichts problemlos der Probe anpassen. Die Erfassung der transmittierten Lichtintensität erfolgt durch den Umgebungslichtsensor des Smartphones. Die Positionierung der Proben in handelsüblichen Küvetten am Smartphone wird durch ein kompaktes, 3D-druckbares Gehäuse realisiert. Das Gehäuse sowie dessen Halterung lassen sich ohne mechanische Veränderungen an diverse aktuelle Smartphones anpassen. Durch die kompakte Bauform und den Verzicht auf elektronische Zusatzkomponenten bleibt die Mobilität des Gerätes unbeeinträchtigt, was beispielsweise bei der Messung von Umweltparametern vor Ort besonders relevant ist.

Als Modellsystem zur Evaluierung des Photometers anhand biosensorischer Messsysteme dient ein kolorimetrisches, ureasebasiertes Bioassay zum Schwermetallnachweis in Wasserproben. Die Auswertung des Bioassays erfolgt auf Basis kinetischer Messungen und wird durch eine halbautomatische Auswertung durch die eigens entwickelte Steuersoftware am Smartphone unterstützt.

In einfachen Probelösungen sind Konzentrationsbestimmungen einzelner Schwermetalle bis in den niedrigen mikromolaren Bereich möglich. In komplexen Proben mit verschiedenen Schwermetallen und nicht metallischen Inhibitoren erlaubt das System Rückschlüsse auf die Wasserqualität, die vergleichbar zu Daphnien- oder Fischlaichtests sind.

Keywords: Smartphonesensorik, Smartphonephotometer, Schwermetallnachweis, mobile Sensorik, Gewässermonitoring

Einleitung

Verschiedene Schwermetalle und Schwermetallverbindungen können in der Umwelt zu ernsthaften Beeinträchtigungen der Flora und Fauna führen [1,2]. Neben der Industrie und der Landwirtschaft sind auch Haushalte Quellen von Schwermetallemissionen in die Umwelt [3,4]. Schwermetallbelastungen von Grund- und Oberflächenwasser haben, wenn sie nicht rechtzeitig erkannt werden, auch beim Menschen schweren gesundheitlichen Auswirkungen. Gravierende Zwischenfälle wurden in der Vergangenheit unter anderem durch Blei- und Quecksilberkontaminationen in Gewässern und Versorgungssystemen hervorgerufen. Die Sensibilisierung der

Bevölkerung für die Risiken von umweltgefährdenden Stoffen und Produkten kann in diesem Zusammenhang dazu beitragen schwere Vorfälle zu verhindern oder zumindest frühzeitig zu erkennen und deren Auswirkungen einzudämmen. Dabei bieten Smartphones durch ihre vielseitige Ausstattung mit internen Sensoren, hoher Rechenleistung und hervorragender Darstellung von Messwerten die Möglichkeit vielfältige Analysetechniken einer breiten Nutzergruppe zugänglich zu machen. Bereits im nicht akademischen Bildungsbereich können mit angemessenen Analysemethoden wie dem Smartphonephotometer Auswirkungen von verschiedenen chemischen Verbindungen auf Organismen oder deren Enzymsysteme

anschaulich untersucht werden. Die Heranführung an Umweltanalytik mit nachvollziehbaren und kostengünstig realisierbaren Systemen kann einen wichtigen Beitrag zur Sensibilisierung der Bevölkerung für diese Aspekte leisten.

Material und Methoden

Die Erprobung und Evaluierung des Smartphone-Photometers erfolgt anhand vergleichender Messungen eine kolorimetrischen, ureasebasierten Bioassays an einem konventionellen UV/vis-Photometer und am Smartphonephotometer. Alle dargestellten Ergebnisse wurden mit dem Smartphonephotometer in Zusammenspiel mit einem LG G3 gewonnen.

Chemikalien und Instrumente

Chemikalien: AgNO_3 (99.999 %); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.5\%$); CoCl_2 (für Synthesezwecke); CuCl_2 ($\geq 99\%$); Ethanol (99,9 %); FeCl_2 ($\geq 98\%$); HgCl_2 ($\geq 99.998\%$); KCl ($\geq 99\%$); MnCl_2 ($\geq 99\%$); NaCl ($\geq 99.5\%$); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (für Zellkulturzwecke); $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ($\geq 99.99\%$); Phenolphthalein (Ph. Eur., 98-102 %); Urea ($\geq 98\%$); Urease, *Canavalia ensiformis*, (Type IX powder, 50 - 100 $\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{solid}}$, EC 3.5.1.5). Bezugsquelle aller Chemikalien ist Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Geräte: 3D-Drucker (Fortus 250mc, Stratasys, USA); Filterfolien (Steinigke Showtechnic, Deutschland); Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc., USA); Lichtwellenleiter (Solid S3, G&G Lichtdekor GmbH, Deutschland); Faseroptik Fluoreszenzspektrometer (PerkinElmer Inc., USA); Einwegküvetten, halbmikro (Semadeni AG, Schweiz); Spektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA); Spritzenvorsatzfilter ($0.2 \mu\text{m}$, Nylon, VWR, USA)

Smartphones: LG G3 (LG Corporation, Südkorea); Xperia Z3 compact (Sony Corporation, Japan)

Optischer Aufbau

Das Smartphone-Photometer wurde entwickelt um in Kombination mit aktuellen *Android* betriebenen Smartphones eine funktionelle Einheit zu bilden. Verwendet wird dabei die Blitzlicht-LED als Lichtquelle und der Umgebungslichtsensor zur Quantifizierung des transmittierten Lichts. Es werden keinerlei zusätzlichen elektronischen Komponenten benötigt.

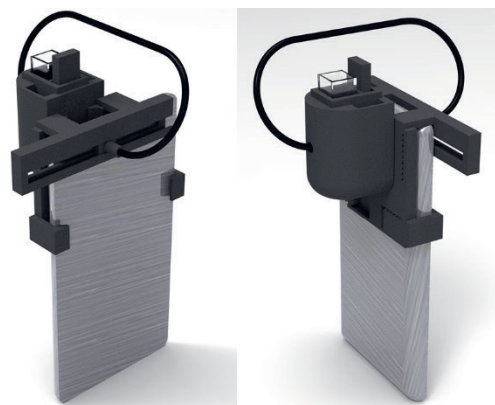


Abb. 1: Smartphonephotometer an einem Smartphone-Modell in Vorder- und Rückansicht.

Das Smartphonephotometer besteht aus zwei grundlegenden Baugruppen, einer anpassbaren Basisplatte und der Küvettenkammer. Die Küvettenkammer sorgt neben der Fixierung handelsüblicher Glas- und Einwegküvette für eine optimale Positionierung der Filterfolien und des Lichtwellenleiters. Die Basisplatte wird durch drei einstellbare Haken am Smartphone befestigt und positioniert. Der obere Haken dient weiterhin der Positionierung des Lichtwellenleiters vor dem Umgebungslichtsensor des Smartphones. Die Verbindung der Küvettenkammer und der Basisplatte wird durch eine Positionierungsschiene gewährleistet. Alle verwendeten Bauteile, mit Ausnahme des Lichtwellenleiters und der Filterfolien, sind 3D-druckbar und wurden aus Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) mit einer Auflösung von 0.048 beziehungsweise 0.178 mm hergestellt. Das komplette System, angebracht an einem Smartphone-Modell, ist in Abbildung 1 dargestellt.

Bioassay

Das verwendete ureasebasierte Bioassay wurde in Anlehnung an das "high throughput colorimetric assay for rapid urease activity quantification", veröffentlicht von Okyav und Rodrigues, 2013, entwickelt [5]. Auf Grund des geplanten Einsatzes im nicht akademischen Bildungsbereich wurde besonderes Augenmerk auf den Einsatz niedrigpreisiger Komponenten mit geringer Toxizität gelegt. Das Assay setzt sich in der praktischen Anwendung aus zwei Arbeitslösungen, einer salzfreien, und gepufferten Ureaselösung mit einer anpassbaren Aktivität von $50\text{-}200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ und einer Substrat-Indikatorlösung, zusammen. Die Substrat-Indikatorlösung enthält 1000 mM Urea und 4.5 mM Phenolphthalein, gelöst in 30% Ethanol/Reinstwasser. Verwendet wird die

Urease 3.5.1.5, gewonnen aus *Canavalia ensiformis*. Zur Schwermetallmessung in Gewässerproben werden je 100 µL der Arbeitslösungen mit 800 µL der Probe gemischt. Urease katalysiert die Spaltung von Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak im molaren Verhältnis von 1:2. Der Ammoniaküberschuss führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes in der Lösung. Die pH-Werterhöhung kann unmittelbar durch Phenolphthalein in eine kolorimetrische, für das Smartphonephotometer erfassbare, Änderung überführt werden. Die Reaktionsrate und damit die Geschwindigkeit des Farbumschlags wird durch die Anwesenheit verschiedener Schwermetalle reduziert.

Software

Zum Betrieb des Smartphone-Photometers wurde eine Software mit drei Subroutinen entwickelt. Die Software ermöglicht einfache Punktmessungen, kinetische Messungen mit hoher Messfrequenz und Verlaufsmessungen über lange zeitliche Intervalle. Zur Auswertung des Bioassays wurde die Funktion zur Aufnahme kinetischer Messungen verwendet.

Die Berechnung der Absorption (A) erfolgt auf Basis der transmittierten Lichtintensität (I), gemessen durch den Umgebungslichtsensor. Als Referenzintensität dient die transmittierte Lichtintensität zu Beginn der Messung (I_0). Die automatische Berechnung der Reaktionsrate (v) erfolgt unter den Annahmen, dargestellt in Gleichung (1) durch Linearisierung der Kinetik über einstellbare Intervalle. In dieser Untersuchung wurden Intervalllängen von 50 ms verwendet.

$$A = \log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \text{ mit } \frac{dA}{dt} \simeq \frac{\Delta A}{\Delta t} \sim v \mid \Delta t \simeq 0 \quad (1)$$

Nach der voreingestellten Messzeit von 30 s erfolgt die Ausgabe der maximalen Reaktionsrate automatisch.

Interpretation der Enzymaktivität

Im Fall des ureasebasierten Bioassays lassen sich inhibitorische Effekte durch eine Dose-Response Funktion (2) beschreiben [6].

$$v = v_{\min} + \frac{(v_{\max} - v_{\min})}{1 + 10^{(IC_{50} - c) \cdot p}} \quad (2)$$

Die Funktion wird durch die minimale und die maximale Reaktionsrate (v_{\min} , v_{\max}), der Inhibitorkonzentration (c), der Inhibitorkonzentration, bei der noch 50 % der ursprünglichen Enzymaktivität vorliegen (IC_{50}) und dem Steigungsparameter (p) beschrieben. Unter der Annahme, dass die Enzymaktivität durch die Anwesenheit hoher

Schwermetallkonzentrationen vollständig inhibiert wird vereinfacht sich Gleichung (2) zu:

$$v = \frac{(v_{\max})}{1 + 10^{(IC_{50} - c) \cdot p}} \quad (3)$$

Bei signifikanten Unterschiede im Steigungsparameter verschiedener Inhibitoren liegt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Inhibierungsmechanismen vorliegen, die sich gegenseitig nicht zwingend unmittelbar beeinflussen [7]. In diesem Fall ist es möglich die einzelnen Effekte (f_b) anhand der Bliss Unabhängigkeitstheorie (4) getrennt voneinander zu betrachten [7].

$$f_{b,n} = \prod_1^n \left(v_{\min} + \frac{(v_{\max} - v_{\min})}{v_{\max} (1 + 10^{(IC_{50} - c_i) \cdot p_i})} \right) \quad (4)$$

Unterscheiden sich die Steigungsparameter der einzelnen Inhibitoren nicht signifikant voneinander kann nicht von grundlegenden mechanistischen Unterschieden bei der Inhibierung der Enzymaktivität ausgegangen werden. In diesen Fällen können kommutative Effekte in Gemischen von Inhibitoren (f_i) durch die Loewe-Additivität beschrieben (5) werden [8].

$$f_{l,n} = \sum_1^n \left(v_{\min} + \frac{(v_{\max} - v_{\min})}{1 + 10^{(IC_{50,i} - c_i) \cdot p_i}} \right) \quad (5)$$

Im Gegensatz zur Bliss-Unabhängigkeitstheorie können bei der Loewe-Additivität die Anteile der einzelnen Inhibitoren am gesamten inhibitorischen Effekt nicht getrennt betrachtet und bestimmt werden.

Probematrizes

Zur Untersuchung der Reaktion des Bioassays auf verschieden komplexe Proben wurden unterschiedliche Schwermetalllösungen verwendet. Die Bestimmung der inhibitorischen Konstanten der einzelnen Schwermetalle erfolgte in Reinstwasserproben, die mit je einem wasserlöslichen Schwermetallsalz versetzt wurden. Kommutative inhibitorische Effekte wurden in verschiedenen Lösungen mit variierten Schwermetallgemischen sowie Proben aus Oberflächen- und Trinkwasser durchgeföhrt [9]. Die Oberflächenwasserproben wurden lediglich durch Filtration mittels 0.22 µm Spritzenvorsatzfilter vorbehandelt.

Ergebnisse und Diskussion

Alle vorgestellten Ergebnisse wurden mit dem Smartphone-Photometer in Zusammenspiel mit einem LG G3 (LG Corporation, Südkorea) gewonnen

Emissionsspektren

Das Emissionsspektrum der Blitzlicht-LED von Smartphones (Abbildung 2) bestimmt

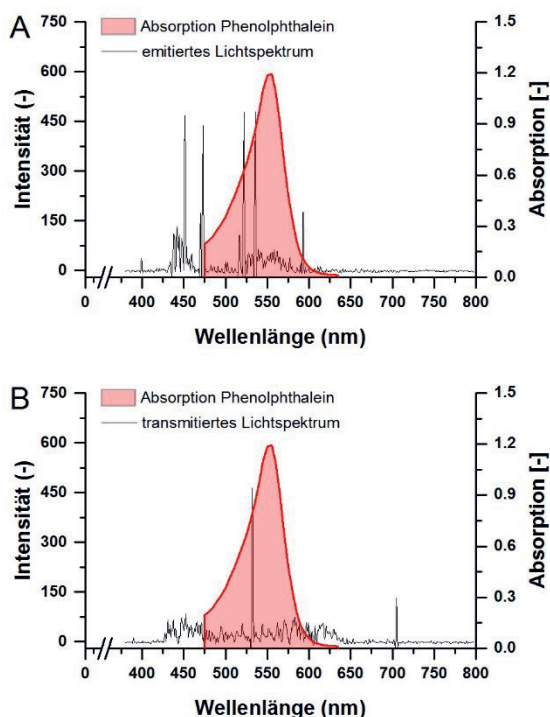


Abb. 2: **A:** Emissionsspektrum der Blitzlicht-LED eines LG G3; **B:** Transmissionsspektrum der Blitzlicht-LED nach Passage des Folienfilters; jeweils überlagert mit dem Absorptionsspektrum von Phenolphthalein bei einem pH-Wert von 9.0 (rot)

maßgeblich die Einsetzbarkeit als Lichtquelle für photometrische Anwendungen.

Das Emissionsspektrum der Blitzlicht-LED zeigt, charakteristisch für kombinierte Weißlicht-LEDs, eine starke Inhomogenität. Starke Emissionsintensitäten liegen in Wellenlängenbereichen von 425-560 und 625-675 nm. Der große Anteil des emittierten Lichts, dass durch die Absorption von Phenolphthalein, mit einem Maximum bei 552 nm, nicht beeinflusst wird führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Signal-Rauschverhältnisses (Abbildung 2 A). Durch den Einsatz entsprechender Folienfilter und die damit verbundene Einschränkung des Lichtspektrums kann dieses Verhältnis deutlich verbessert werden (Abbildung 2 B).

Einkomponentensysteme

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen des Bioassays sowie der Dose-Response Parameter verschiedener Schwermetallsalze wurden anhand von Probelösungen bestimmt, die je nur ein Schwermetallsalz enthalten.

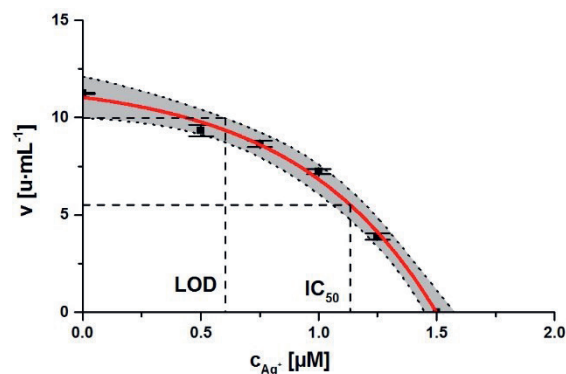


Abb. 3: Nachweisgrenze (LOD) und IC_{50} des ureasebasierten Bioassays ($5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) für AgNO_3 gemessen am Smartphone-Photometer; $n=5$; $p=0.05$

Die Nachweisgrenze wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0.05$; $n=5$ bestimmt. Verwendet wurden Assays mit einer variablen Enzymaktivität von $5\text{-}25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Als Modellverbindungen für wasserlösliche Schwermetallverbindungen dienten AgNO_3 (Abbildung 2), CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_2 , HgCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 und $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Die gewonnenen Inhibierungsparameter (Daten nicht gezeigt [9]) weisen deutliche Unterschiede in den Steigungsparametern der Dose-Response Funktion (p). Dies legen nahe, dass es sich bei den einzelnen Inhibierungsmechanismen um unabhängige Mechanismen handelt und die Annahme der Bliss-Unabhängigkeitstheorie möglich ist [10]. Von dieser Annahme sind FeCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und MnCl_2 auszunehmen.

Kumulative inhibitorische Effekte

Die Verwendung der Bliss-Unabhängigkeitstheorie, deren Annahme durch die Ergebnisse der Untersuchungen in Einkomponentensystemen unterstützt wird, wurde in Gemischen aus mehreren Schwermetallen weitergehend untersucht. Hierzu wurde die Konzentration von CuCl_2 in Lösungen, die verschiedene andere Schwermetalle in konstanter Konzentration enthalten, variiert. Die Ergebnisse dieser Kinetiken wurden mit den, nach Bliss-Unabhängigkeit und der Loewe-Additivität erwarteten Reaktionsraten verglichen. Als Basis der Erwartungswerte dienen die Dose-Response-Parameter der Einzelstoffuntersuchungen, die entsprechend Gleichung (4) und (5) in kumulative Effekte überführt wurden. Auszüge der Ergebnisse dieser Studie sind in Abbildung 4 dargestellt [9]. Bei der Untersuchung komplexer Schwermetallgemische (Abbildung 4 A) zeigt sich, dass reale kumulative Effekte von Schwermetallverbindungen auf Urease durch

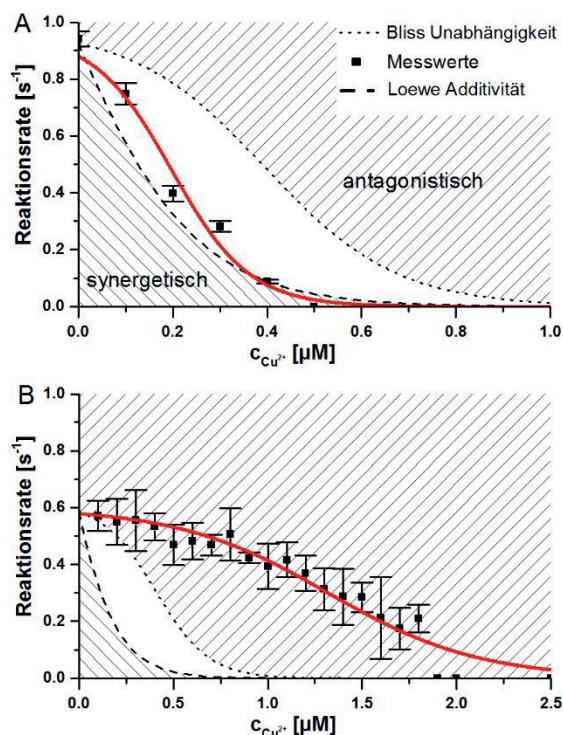


Abb. 4: Kumulative Inhibierungseffekte komplexer Gemische A: 10.0 nM CuCl_2 , 20 nM MnCl_2 , 20 nM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 20 nM NiCl_2 , 30 nM CoCl_2 ; B: 6 μM NiCl_2 jeweils unter der Zugabe von CuCl_2

keine der verwendeten Theorien vollständig beschrieben werden kann.

Die inhibitorische Effekt des Gemisches aus Schwermetallen übersteigt den erwarteten Wert bei Annahme der Bliss-Unabhängigkeitstheorie deutlich. Im Gegensatz dazu zeigt sich, dass die Anwesenheit von NiCl_2 den inhibitorischen Effekt von CuCl_2 auf Urease deutlich reduziert (Abbildung 4 B). Auf Basis der gegenläufigen

Tendenzen des Verhaltens von Schwermetallionen in komplexen Gemischen kann nicht davon ausgegangen werden, dass eine klare Identifizierung der Effekte einzelner Schwermetalle auf Urease vorgenommen werden kann. Auf Grund dieser Erkenntnisse Schein es nicht möglich genaue Konzentrationsangaben einzelner Komponenten in komplexen Wasserproben auf Grundlage des ureasebasierten Bioassays zu gewinnen. Trotz dieser Einschränkung ist eine allgemeine Untersuchung der Wasserqualität mit quantifizierbaren Messwerten problemlos am Smartphone-Photometer in Zusammenspiel mit dem vorgestellten Bioassay auf dem Niveau von Daphnien- oder Fischlaichtests möglich.

Ausblick

Im weiteren Verlauf der Forschungsvorhaben um das Smartphone-Photometer ist die stetige Weiterentwicklung des Systems sowie die Erschließung neuer Anwendungsgebiete geplant.

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die DBU, Deutsche Bundesstiftung Umwelt [Projektnummer 31993].

Literatur

- [1] F. Assche, H. Clijsters, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant, Cell Environ.* 13 (1990) 195–206. doi:10.1111/j.1365-3040.1990.tb01304.x.
- [2] E. Baath, Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review), *Water, Air, Soil Pollut.* 47 (1989) 335–379. doi:10.1007/BF00279331.
- [3] X. Li, C.S. Poon, P.S. Liu, Heavy metal contamination of urban soils and street dusts in Hong Kong, *Appl. Geochemistry*. 16 (2001) 1361–1368. doi:10.1016/S0883-2927(01)00045-2.
- [4] H. Pekey, The distribution and sources of heavy metals in Izmit Bay surface sediments affected by a polluted stream, *Mar. Pollut. Bull.* 52 (2006) 1197–1208. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.02.012.
- [5] T. Onal Okay, D. Frigi Rodrigues, High throughput colorimetric assay for rapid urease activity quantification, *J. Microbiol. Methods*. 95 (2013) 324–326. doi:10.1016/j.mimet.2013.09.018.
- [6] W.R. Greco, G. Bravo, J.C. Parsons, The search for synergy: a critical review from a response surface perspective., *Pharmacol. Rev.* 47 (1995) 331–385.
- [7] C.I. Bliss, THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY, *Ann. Appl. Biol.* 26 (1939) 585–615. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x.
- [8] S. Loewe, H. Muischnek, Über Kombinationswirkungen, *Arch. Für Exp. Pathol. Und Pharmacologie*. 114 (1926) 313–326. doi:10.1007/BF01952257.
- [9] M. Schäfer, V. Bräuler, R. Ulber, Bio-sensing of metal ions by a novel 3D-printable smartphone spectrometer, *Sensors Actuators B Chem.* (2017). doi:10.1016/j.snb.2017.08.207.

- [10] S. Chaperon, S. Sauvé, Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils, *Soil Biol. Biochem.* 39 (2007) 2329–2338.
doi:10.1016/j.soilbio.2007.04.004.