

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В КАЧЕСТВЕ
БИОМАТЕРИАЛА ПРИ СОЗДАНИИ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ**

Кондрашова М. А. (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», 300012, г. Тула, пр. Ленина 92)

Научный руководитель - ассистент кафедры Химия Харькова А. С. (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», 300012, г. Тула, пр. Ленина 92)

Разработан медиаторный микробный биосенсор для определения интегральной токсичности водной среды. Биосенсор был протестирован на растворах ионов тяжелых металлов (Cu^{2+} , Pb^{2+}) и фенола. Исходя из полученных результатов было установлено, что использование дрожжей *S. cerevisiae* наиболее эффективно при создании амперометрического биосенсора для определения токсичности водной среды.

При определении качества водных объектов используют термин «токсичность», под которым понимают способность вещества вызывать нарушения физиологических функций организма, в результате чего возникают симптомы интоксикаций. Токсичность устанавливается с помощью методов биотестирования. Для осуществления надлежащего регулирования выбросов промышленных и сельскохозяйственных сточных вод созданы лабораторные модели анализаторов биотоксичности с использованием беспозвоночных, рыб и некоторых видов бактерий в качестве тест-организмов. Основным недостатком большинства стандартных методов биотестирования является большая длительность анализа, наличие специального крупногабаритного оборудования, необходимость в высококвалифицированном персонале. В связи с этим актуальной задачей является разработки и реализации методов оценки качества водной среды, которые упростят и ускорят анализ.

Разработан комплект оборудования, который позволяет сократить время анализа с 4 суток (стандартная методика) до 22 часов (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04). Биоанализатор имеет ряд недостатков: необходимость в высококвалифицированном персонале и в специальной серийной аппаратуре, высокая цена (275 000 р.). Однако при таком времени анализа (22 часа), прибор не подходит для экспресс-мониторинга токсичности водных объектов. Также известен коммерческий анализатор Microtox (ModernWater, Великобритания), основанный на снижении интенсивности биолюминесценции бактерий в присутствии токсикантов. В России данный прибор не востребован, так как его стоимость высокая (около 1 590 880 р.) и требуется периодическая поставка биоматериала из-за границы. Имеется отечественный аналог Биотокс-10М (379 900 р.). Оба прибора основаны на использовании биолюминесцентных бактерий, которые чувствительны к органическим веществам, однако менее чувствительны к тяжелым металлам. К недостаткам биолюминесцентного биосенсора можно также отнести то, что варьировать биоматериал, создавая биорецепторную систему, чувствительную как к металлам, так и к органическим веществам, достаточно сложно.

Основной целью исследования является разработка экспресс-анализатора определения токсичности, который позволит удешевить, упростить и автоматизировать процесс проведения анализа. Для решения поставленной задачи наиболее инновационным подходом является создание медиаторных биосенсоров. Медиатор электронного транспорта – это низкомолекулярное соединение, которое переносит электроны между клетками микроорганизмов и электродом. Амперометрические измерения проводят при потенциале равном редокс-потенциалу медиатора. Возможность работы при более низких потенциалах позволяет уменьшить влияние флуктуаций растворенного кислорода и электроактивных примесей на анализ.

Сопряжение биоматериала с электродом за счет медиаторов электронного транспорта позволяет использовать биоматериал, обладающий чувствительностью к большому

количеству токсикантов. В связи с этим первой задачей проекта являлся выбор биоматериала для формирования рецепторных элементов медиаторного биосенсора, который основывался на чувствительности микроорганизмов по отношению к вредным факторам окружающей среды. Для исследования выбраны следующие микроорганизмы: клетки бактерий активного ила *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302, бактерии *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ У-1173 и бактерии *Escherichia coli* К802. В качестве токсикантов были использованы ионы тяжелых металлов, которые являются модельными для различных тест-систем: тяжелые металлы (Cu^{2+} , Pb^{2+}) и фенол.

Биосенсорный анализатор состоит из потенциостата, регистрирующего зависимость силы тока от времени – «РС-micro» (НПО «Вольта», Россия), к которому подключаются электроды. Измерения проводятся при постоянном потенциале 250 мВ, соответствующему окислительно-восстановительному потенциалу медиатора-ферроцена. Для регистрации ответов биосенсора применяют двухэлектродную схему. Рабочим электродом служит угольно-пастовый, модифицированный медиатором ферроценом с иммобилизованными клетками, электродом сравнения – насыщенный хлоридсеребряный. Электроды во время измерения погружают в ячейку с 20 мМ калий-натрий-фосфатным буферным раствором, рН=6,8.

В медиаторных биосенсорах генерируемый стационарный ток связан с эндогенными процессами микроорганизмов, а при введении раствора токсиканта, ток снижается, вследствие изменений процессов в клетке из-за токсического действия вещества. Однако данный способ регистрации сигнала имеет ряд недостатков: снижение тока может быть связано с процессом разбавления; в пробе могут содержаться вещества, окисляемые клетками. И тогда вместо уменьшения силы тока будет наблюдаться увеличение. Поэтому аналитическим сигналом служил индекс ингибирования - это степень снижения скорости потребления глюкозы микроорганизмами в присутствии и отсутствие ингибитора. Стоит отметить, что время анализа низкое (примерно 8 минут), по сравнению с вышеперечисленными биоанализаторами, что позволяет проводить экспресс-мониторинг токсичности водных объектов в режиме реального времени. Кроме того, 20 электродов давали воспроизводимый сигнал, относительно стандартное отклонение ответа на глюкозу не превышало 7 %.

Найдены концентрации токсикантов (EC_{50}), вызывающие снижение активности рецепторного элемента биосенсора на 50%. Было установлено, что дрожжи *S. cerevisiae* обладают высокой чувствительностью к раствору фенола ($1,8 \text{ мг/дм}^3$) и к иону меди (II) ($2,7 \text{ мг/дм}^3$) по сравнению с другими исследуемыми микроорганизмами (*E. coli*, *P. veronii* и *P. yeii*). Поэтому использование бактерии дрожжи *S. cerevisiae* более предпочтительно при создании амперометрического биосенсора. Биосенсорная система ферроцен - *S. cerevisiae* имеет высокую чувствительность к токсикантам по сравнению с биосенсором, где тест-объектом служит люминесцентные бактерии. В целом, биосенсорные методы определения токсичности характеризуются меньшей чувствительностью к тяжелым металлам, чем при использовании ряски в качестве тест-объекта. Однако разработанная система по чувствительности к иону свинцу Pb^{2+} очень близка к данной работе ($6,1 \text{ мг/дм}^3$ и $5,5 \text{ мг/дм}^3$ соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанного биосенсорного анализатора для определения интегральной токсичности водной среды.