

УДК 543.399

ПРИМЕНЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ *ESCHERICHIA COLI* K802 И *PARACOCCLUS YEEI* ВКМ В-3302 ДЛЯ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД

Лепикаш Р.В. (Тульский Государственный университет)

Научный руководитель – к.х.н., ассистент кафедры химии Харькова А.С.

Сформированы биорецепторные элементы на основе «медиатор ферроцен – бактерии *P. yeei*», «медиатор ферроцен – бактерии *E. coli*». Была проведена оценка чувствительности биорецепторных элементов на образцах четырех тяжелых металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) и фенола. Исследуемые биорецепторные элементы были апробированы с помощью метода биотестирования на хлореллу.

Введение

В настоящий момент времени человечество столкнулось с практически повсеместным загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами, пестицидами, нефтепродуктами. Для определения поллютантов в объектах окружающей среды используют физико-химические методы анализа, которые позволяют точно определить содержание загрязнителей в образцах, но не могут определить токсическое влияние веществ на природную экосистему.

Для установления токсического влияния используют методы биотестирования, в которых в качестве тест-объектов используют организмы разных трофических уровней: рыбы, растения, беспозвоночные микроорганизмы. Однако почти все методы имеют такие недостатки, как высокую длительность анализа и низкую воспроизводимость, что ограничивает возможность раннего предупреждения загрязнения воды. Поэтому в настоящее время актуальной задачей является создание устройства, которое способно заменить стандартные методы биотестирования за счет простоты применения и снижения времени, которое требуется на анализ.

Переход к биосенсорному экспресс-анализу возможен благодаря использованию микроорганизмов, что позволяет существенно упростить анализ и снизить стоимость из-за простоты культивирования и экспрессности. Известно, что биолюминисцентные микроорганизмы используют для биотестирования. В коммерческих целях используется прибор «Биотокс-10М», принцип работы которого основан на регистрации интенсивности биолюминесценции бактерий в контрольном образце и анализируемой пробе, а затем в расчете индекса токсичности. Прибор обладает высокой экспрессностью (около 10 минут), однако к недостаткам можно отнести то, что на аналитический сигнал может влиять мутность и цветность воды.

Для оценки токсичности уделяют особое внимание электрохимическим медиаторным микробным биосенсорам за счет быстрой регистрации аналитического сигнала рецепторной системы, хорошей чувствительности к токсикантам, низкой стоимости и миниатюризации. В зарубежной литературе известна система (Wang X. et al., 2013), в которой используются медиатор п-бензохинон и микроорганизмы *Psychrobacter sp.* Однако данный сенсор обладает низкой чувствительностью к токсикантам, что при анализе образцов воды может приводить к занижению результатов.

Основная часть

Суть решения данной проблемы заключается в амперометрической регистрации аналитического сигнала, который формируется в результате переноса электронов с ферментного центра при окислении субстратов микроорганизмами на медиатор, который в свою очередь переносит электроны на поверхность электрода. При добавлении в кювету смеси субстрата и токсиканта аналитический сигнал снижается из-за ингибирования ферментативных систем микроорганизма поллютантом.

В работе были использованы бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 и *Escherichia coli* K802, которые ранее применялись для создания БПК-сенсора.

Для формирования рабочего электрода использовали графитовую пасту, которая была модифицированная медиатором. В качестве медиатора использовали ферроцен. Содержание медиатора составляло 10% от общей массы графитовой пасты. Затем на поверхность электрода наносили используемые в исследовании микроорганизмы с титром 330 мг/см^3 в количестве 10 мкл. В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод, насыщенный KCl. Оба электрода были подключены к потенциостату – «IPSMicro» (НПО «Вольта», Россия). Измерения проводили при постоянном потенциале – 250 мВ, при котором происходит наиболее полное окисление-восстановление медиатора ферроцена. Во время измерения электроды погружались в 20мМ натрий-калий-фосфатный буферный раствор (рН = 6,8). Аналитическим сигналом индекс ингибирования IC.

Для оценки чувствительности биорецепторных элементов строили зависимости индекса ингибирования ICот концентрации токсиканта. По полученным результатам найдены концентрации токсикантов (IC₅₀), вызывающие снижение активности рецепторного элемента биосенсора на 50% - индекс ингибирования равен 50⁰%, которые были определены для четырех ионов тяжелых металлов (Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺) и фенола. Для системы «медиатор ферроцен – бактерии *P. yeii*» концентрации тяжелых металлов и фенолов составили 21,1 мг/дм³, 47,5 мг/дм³, 9,9 мг/дм³, 18,2 мг/дм³ и 9,9 мг/дм³ соответственно. Для системы «медиатор ферроцен – бактерии *E. coli*» значения составили 47,6 мг/дм³, 46,4 мг/дм³, 0,8 мг/дм³, 8,9 мг/дм³, 17,6 мг/дм³ для Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ и фенола соответственно.

На основании ингибирующих кривых были выбран референтный токсикант – ионы Cu²⁺, по которому оценивали работоспособность биорецепторных элементов. В ходе работы определяли степень обратимости взаимодействия биоматериала с токсикантами, для чего электроды находились в растворе токсиканта с концентрацией, вызывающей снижение ответа на 50%. Было выявлено, что после промывания активность была восстановлена, что свидетельствует об обратимом воздействии ионов Cu²⁺ на ферментативные системы микроорганизмов. Долговременная стабильность была определена путем измерения степени ингибирования микроорганизмов с течением времени. При использовании в качестве референтного токсиканта ионов Cu²⁺ для системы «ферроцен – *P. yeii*» и «ферроцен – *E. coli*» составила 9 дней и 3 дня соответственно. Для определения операционной стабильности использовалась амплитуда силы тока при ответе биосенсора на смесь глюкозы и токсиканта. Для системы «ферроцен – *P. yeii* – Cu²⁺» и «ферроцен – *E. coli* – Cu²⁺» операционная составила 4,9% и 6,9% соответственно. Воспроизводимость аналитических сигналов биорецепторных элементов для системы «ферроцен – *P. yeii* – Cu²⁺» составила 4,5%, а для системы «ферроцен – *E. coli* – Cu²⁺» - 7,0%.

Для апробации биорецепторных элементов были отобраны образцы из рек Упа, Тулица и из Щегловского ручья. Пробоподготовка и анализ проводились согласно методике ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04. Для проведения анализа с помощью биосенсора в подготовленную пробу добавляли глюкозу, конечная концентрация которой составила 0,1 моль/дм³. В ходе исследования было выявлено, что наиболее перспективными является система «медиатор ферроцен – бактерии *E. coli*», показавшая сходные с методом биотестирования величины ТКР.

Выводы

Таким образом, для системы «ферроцен – *E. coli*» были получены согласуемые с биотестированием результаты ТКР, поэтому можно заключить, что разрабатываемый биосенсор может быть использован для определения интегральной токсичности водных сред. Сенсор может быть использован для дополнения или замены стандартных методов биотестирования в экологических лабораториях, на промышленных предприятиях для оценки токсичности сточных вод.

Благодарности

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор №МК-4815.2022.1.4