

КИНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ФОРМИРОВАНИЮ ДВУХМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОСЕНСОРОВ НА ПРИМЕРЕ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ИНДЕКСА БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

В.А. Арляпов, А.С. Харькова, А.С. Илюхина

Тульский государственный университет, Россия

Биосенсорные технологии достаточно часто используются в экологическом мониторинге, так как позволяют проводить быстрый, точный анализ качества окружающей среды [1]. Зачастую стандартные методы не относятся к экспрессным, так как требуют длительной инкубации, например, при оценке биохимического потребления кислорода (БПК) [2], чем и обеспечивают высокий спрос на разработку биосенсоров. Исходя из особенностей определения индекса БПК для формирования биорецепторов используют целые клетки микроорганизмов. Обнаружение органических загрязнителей в сточных водах может быть выполнено с использованием электрохимических биосенсоров. Наиболее успешное сопряжение выбранного биоматериала с электродом реализуется в амперометрических медиаторных биосенсорных системах [1]. Микробные амперометрические медиаторные биосенсоры представляют собой аналитические устройства, содержащие клетки микроорганизмов, электрический контакт которых с преобразователем биосенсора осуществляется с помощью медиаторов электронного транспорта. Медиатор обладает электрохимической активностью и способен восстанавливаться под действием микроорганизмов, осуществляя перенос электронов на электрод. Использование данного подхода позволило разработать портативные экспресс-системы оценки БПК [3–4]. Однако существенное ограничение данной технологии состоит в том, что ее возможно использовать преимущественно с бактериальными клетками. Дрожжевые клетки имеют толстую клеточную стенку, содержащую полисахариды и белки. Сигнализирующие системы – цитохромы дрожжей расположены в митохондриях, а трансмембранные белки – в клеточной мембране, окруженной клеточной стенкой. Следовательно, чтобы получить электрохимический сигнал от дрожжевых клеток, медиатор должен пройти через клеточную стенку и осуществить взаимодействие с мембраной и/или с внутриклеточными компонентами, такими как НАД⁺/НАДН [5]. Таким образом, использование одномедиаторных систем совместно с дрожжевыми клетками характеризуется низкой эффективностью. При этом следует учитывать, что с точки зрения экспресс-мониторинга БПК дрожжи являются перспективным биоматериалом: они способны метаболизировать широкий спектр субстратов, характеризуются устойчивостью к негативным факторам окружающей среды (высокая соленость, колебания температуры и pH среды) [1,2].

Использование двухмедиаторной системы позволяет повысить чувствительность анализа. В исследовании [6] было показано использование дрожжей *Debaryomyces hansenii* совместно с медиаторами ферроценом и метиленовым синим. Нижняя граница определяемых концентраций БПК для биосенсора составила 2,5 мг/дм³, при этом в одномедиаторной системе анализ можно было проводить только с образцами, имеющими индекс БПК не менее 5.1 мг/дм³. Следует отметить, что применение двухмедиаторных систем не всегда приводит к улучшению характеристик биосенсора [7]. Для того, чтобы передача электронов в двумедиаторной системе шла последовательно и оба медиатора не конкурировали между собой, необходимо обеспечить разницу в скоростях взаимодействия как с биоматериалом, так и с электродом. Идеальным является реализация такой схемы, при которой один медиатор с высокой скоростью взаимодействует с электродом и обладает низкой скоростью при взаимодействии с биоматериалом. При этом второй медиатор должен иметь высокую скорость при взаимодействии с биоматериалом и низкую – с электродом [6]. В данной работе изучается обоснованность выбора двухмедиаторных систем с точки зрения кинетики биоэлектрохимических реакций и предлагается основа по созданию на этом принципе биосенсора для определения БПК.

Для нахождения корреляции результатов определения БПК с использованием биосенсорного и стандартного методов анализа необходимо, чтобы разработанный биосенсор мог регистрировать окисления как можно более широкого спектра органических субстратов. В качестве биоматериала в работе были использованы бактерии *Escherichia coli* K-802, дрожжи *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677 и *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559. Дрожжевые клетки *O. polymorpha* и *B. adeninivorans* обладают широким спектром окисляемых органических соединений.

Штамм *B. adeninivorans* ВКМ У-2677, принадлежащий Всероссийской коллекции микроорганизмов, используется в качестве производственной культуры на гидролизных заводах и характеризуется высокой солетолерантностью [8]. Дрожжи *O. polymorpha* активно применяют в биотехнологии для получения определенных белков, а в биосенсорной технологии они используются при создании биодатчиков для определения метилового и этилового спиртов. Бактерии *E. coli* присутствуют в природных и сточных водах, а также являются одним из компонентов инокулята в стандартном методе анализа, что повышает чувствительность определения БПК₅ при их включении в рецепторный элемент. Выбор эффективного биокатализатора был осуществлен по субстратной специфичности рецепторного элемента на основе систем «микроорганизм-медиатор». Оценка субстратной специфичности была проведена по 32 субстратам, относящимся к различным классам органических соединений (рис. 1). В качестве субстратов были выбраны органические вещества, наиболее часто встречающиеся в стоках различных производств. Попадание таких веществ в водоемы приводит к существенному увеличению индекса биохимического потребления кислорода.

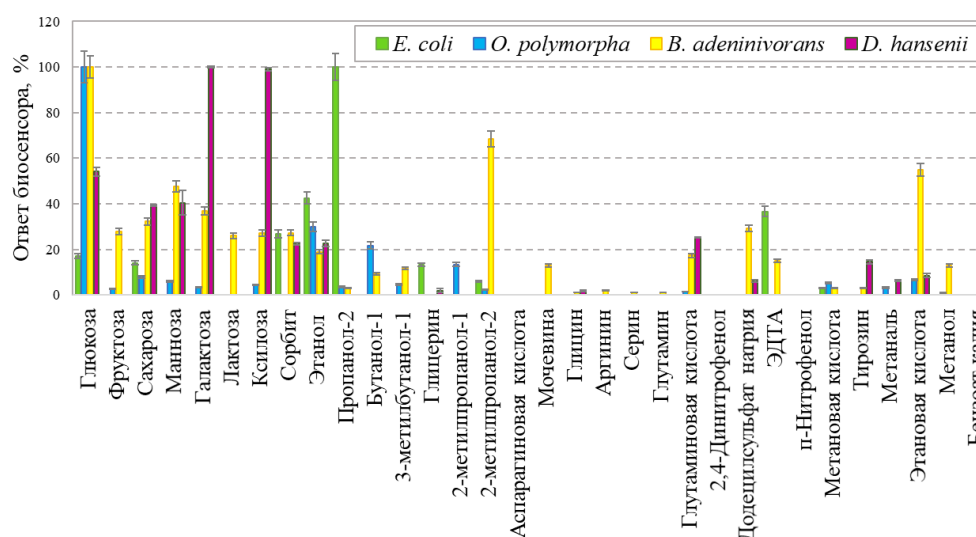


Рис. 1. Субстратная специфичность бактерий *E. coli*, дрожжей *O. polymorpha*, *B. adeninivorans* в присутствии медиатора ферроцена.

Таким образом, большее число окисляемых субстратов можно зарегистрировать при использовании медиатора ферроцена и дрожжей *B. adeninivorans* (23 субстрата). Субстратная специфичность аналогичного биосенсора на основе исследованных ранее гало-, осмоотолерантных дрожжей *D. hansenii* составляла всего лишь 14 субстратов [6]. Таким образом, на основе субстратной специфичности, а также приспособленности клеток *B. adeninivorans* к негативным факторам окружающей среды, а именно, благодаря гало- и осмоотолерантности, для дальнейшей работы были выбраны дрожжи *B. adeninivorans*.

Выбор медиатора электронного транспорта соединений, относящихся к различным классам, проводили по результатам сравнительной оценки эффективности биоэлектродокаталитического окисления глюкозы дрожжами *B. adeninivorans*. При регистрации циклической вольтамперограммы в присутствии глюкозы происходит увеличение анодного тока за счет электродокаталитического окисления субстрата дрожжами. Для того, чтобы медиатор был эффективным акцептором электронов для исследуемого биоматериала необходимо, чтобы константа скорости взаимодействия микроорганизмов с медиатором имела наибольшее значение, в этом случае медиатор будет успешно конкурировать с природным акцептором электронов – растворенным кислородом и при эксплуатации биосенсора не будет требоваться деаэрация ячейки. Предполагая, что ферментные системы дрожжей *B. adeninivorans* находятся в восстановленном состоянии из-за высокой концентрации субстрата можно найти константу взаимодействия дрожжей с исследуемыми медиаторами с помощью уравнения Николсона и Шайна [9].

Для определения констант скорости были получены зависимости отношения предельных анодных токов в присутствии и в отсутствии субстрата (I_k/I_d) от величины $1/v^{1/2}$; по тангенсу угла наклона линейной регрессии находили k_{B3} : $\sqrt{\frac{k_{B3}[E]RT}{nFv}}$ где I_k – предельный ток в присутствии субстрата (А), I_d – предельный ток в отсутствии субстрата (А); k_{B3} – константа скорости взаимодействия медиатора и биоматериала ($\text{дм}^3/\text{мг} \times \text{с}$); R – универсальная газовая постоянная, Дж/моль $\times$ К; T – температура, град. Кельвина К; $[E]$ – титр клеток ($\text{мг}/\text{дм}^3$); v – скорость развертки (В/с); n – количество перенесенных электронов; F – постоянная Фарадея (Кл/моль).

Полученные значения констант взаимодействия медиаторов с дрожжами *B. adeninivorans* представлены в таблице 1. В целом можно отметить, что растворимые медиаторы взаимодействуют с клетками намного быстрее, чем ферроценом, что вероятно связано со способностью медиаторов феназинового и фенатиозинового ряда проникать в клетку, обуславливая высокие скорости взаимодействия. Следует отметить, что дрожжи *B. adeninivorans* являются достаточно перспективным биоматериалом для их дальнейшего использования в медиаторном биоэлектрокатализе, так как в ряде случаев константы взаимодействия дрожжей с медиаторами превосходят аналогичные константы для системы на основе бактерий *P. yeai*, выделенных из активного ила [10]. Для формирования рецепторной системы БПК-биосенсора был выбран медиатор нейтральный красный, так как он обладает наибольшей константой взаимодействия с исследуемыми дрожжами (наибольшей скоростью), а также медиатор ферроцен, который превосходит другие используемые медиаторы по скорости передачи электрона на угольно-пастовый электрод; для него константа гетерогенного переноса электронов на угольно-пастовый электрод составляет 0.4 ± 0.1 см/с [10].

Как уже отмечалось, один из подходов позволяющий увеличить эффективность переноса электронов, предусматривает использование двухмедиаторных систем. Для этого необходимо, чтобы один из медиаторов быстро взаимодействовал с микроорганизмом, а второй переносил электроны на электрод. Исходя из исследований, описанных в [10], ферроцен превосходит другие используемые медиаторы по скорости передачи электрона на электрод, в связи с чем он был выбран в качестве одного из компонентов системы. Для выбора второго медиатора для формирования рецепторной системы протестированы четыре медиатора: метиленовый синий, гексацианоферрат (III) калия, тионин, нейтральный красный; константа взаимодействия с биоматериалом для них более чем в девять раз превышает константу взаимодействия медиатора ферроцена с исследуемыми эукариотами и на порядок уступает по константе гетерогенного переноса электронов (таблица 1). Эффективность переноса электронов в двухмедиаторной системе будет зависеть от скорости взаимодействия двух медиаторов – высокое значение данной константы не вызовет лимитирования процесса передачи электронов при эксплуатации биосенсоров в данных условиях. Кроме того, высокое значение константы взаимодействия медиаторов и низкое значение гетерогенной константы переноса электронов для акцептора электронов от биоматериала будет обеспечивать последовательность переноса электронов, а не конкуренцию двух медиаторов. Для того, чтобы оценить данную константу было использовано моделирование Николсона-Шайна (таблица 1).

Таблица 1. Кинетические характеристики, сформированных двухмедиаторных систем.

Медиатор	Константа (k_1) взаимодействия дрожжей <i>B. adeninivorans</i> с медиаторами, $\text{дм}^3/\text{г} \times \text{с}$	Константа (k_2) взаимодействия медиатора с ферроценом, $\text{дм}^3/\text{моль} \times \text{с}$	Константа (k_3) гетерогенного переноса электронов на электрод, $\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$ [32]
Метиленовый синий	0.092 ± 0.004	1950 ± 90	0.025 ± 0.009
Тионин	0.123 ± 0.007	7790 ± 80	0.022 ± 0.005
Нейтральный красный	0.681 ± 0.009	14200 ± 100	0.017 ± 0.005
Гексацианоферрат (III) калия	0.620 ± 0.008	13170 ± 70	0.0067 ± 0.0009
Ферроцен	0.011 ± 0.005	-	0.4 ± 0.1

Представленные результаты свидетельствуют о том, что нейтральный красный обладает наибольшими константами взаимодействия как с биоматериалом, так и с медиатором ферроценом, что позволяет обеспечить последовательный перенос электронов в двухмедиаторной системе (рис. 3). Таким образом, были сформированы три рецепторные системы на основе дрожжей *B. adeninivorans*: одномедиаторные системы на основе нейтрального красного и ферроцена, а также двухмедиаторная, включающая совместное использование данных медиаторов.

Для исследуемых биосенсоров были получены градуировочные зависимости аналитического сигнала от индекса БПК₅ (рис. 2).

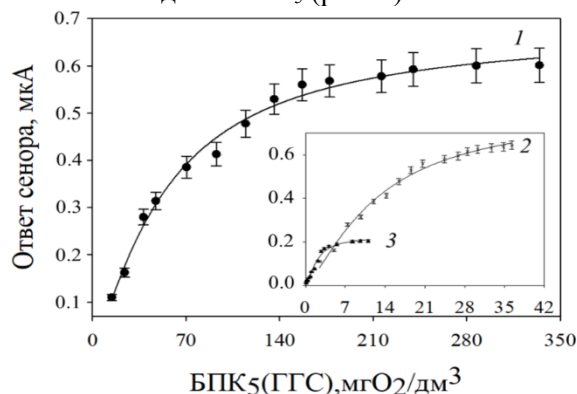


Рис. 2. Зависимость ответа биосенсоров от БПК₅ измеряемой пробы: 1 – одномедиаторная система на основе медиатора нейтрального красного; 2 – одномедиаторная система на основе медиатора ферроцена; 3 – двухмедиаторная система на основе комбинации медиаторов «ферроцен-нейтральный красный»

Электрохимический ответ биорецепторного элемента на основе целых клеток обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов, поэтому обработку экспериментальных данных проводили по уравнению Михаэлиса-Ментен. В табл. 2 представлены основные аналитические и метрологические характеристики одно- и двухмедиаторных биосенсоров на основе дрожжей *B. adeninivorans*.

На основании анализа метрологических и аналитических характеристик, приведенных в таблице 4, можно сделать вывод о том, что ответ биосенсора более стабилен при использовании двухмедиаторной системы – относительное стандартное отклонение составляет 1.5 %. По долговременной стабильности оба биосенсора работают в среднем в течение 30 суток, что говорит о возможности достаточно длительного срока эксплуатации биосенсоров без замены рецепторного элемента. Время единичного анализа не превышает 5 минут, что позволит увеличить производительность анализа проб.

Таблица 2. Характеристики биосенсора на основе дрожжей *B. adeninivorans* одно- и двухмедиаторной системы

Характеристика	Нейтральный красный	Ферроцен	Ферроцен – нейтральный красный
Операционная стабильность, %	7.6	6.6	1.5
Долговременная стабильность, сутки	31	5	26
Длительность единичного измерения, мин	4–5	4–5	4–5
Коэффициент чувствительности, нА·дм ³ /мг О ₂	5±1	25±6	52±5
Линейный диапазон определяемых значений БПК ₅ , мг О ₂ /дм ³	14.5–71	2.5–21	0.16–2.7
Субстратная специфичность, число окисляемых субстратов из 32	27	23	30

Для анализа природных вод, для которых значение БПК₅ может быть довольно низким и составлять ~2 мг/дм³ (чистые природные воды), одномедиаторная система на основе нейтрального красного мало пригодна, т. к. нижняя граница биосенсора достаточно высока и составляет 14.5 мг/дм³; чувствительность одномедиаторной системы на основе ферроцена также ограничивает аналитические возможности биосенсора. Поэтому для природных вод целесообразно применять двухмедиаторную систему, так как нижняя граница биосенсора позволяет производить оценку более низких значений БПК₅.

Таким образом, биорецепторный элемент на основе двухмедиаторной системы ферроцен-нейтральный красный и дрожжей *B. adeninivorans* по таким параметрам как чувствительность и селективность наиболее пригоден для создания БПК-биосенсора. Разработанный медиаторный БПК-биосенсор на основе двухмедиаторной системы ферроцен – нейтральный красный не только не уступает известным аналогам, но превосходит их по значению нижней границы определяемых концентраций, а предложенный кинетический подход создания рецепторной системы на основе дрожжей *B. adeninivorans* и двухмедиаторной системы ферроцен-нейтральный красный позволил сформировать более чувствительную систему, превышающую по характеристикам одномедиаторные аналоги, а также разработанную ранее для дрожжей *D. hansenii* [6].

Для апробации двухмедиаторного биосенсора были отобраны пробы 10 образцов поверхностных вод. Статистическая обработка полученных данных показывает, что результаты анализа стандартным методом разбавления и методом с использованием биосенсоров незначимо различаются между собой. Коэффициент корреляции составил $R = 0.9693$ при анализе 10 образцов воды. Таким образом, разработанный двухмедиаторный биосенсор на основе дрожжевых клеток *B. adeninivorans* и системы медиаторов ферроцен-нейтральный красный можно эффективно использовать для анализа различных образцов воды.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания МИНОБРНАУКИ РФ № FEWG-2020-0008

Литература

- Ejeian F., Etedali P., Mansouri-Tehrani H.A., Soozanipour A., Low Z.X., Asadnia M., Taheri-Kafrani A., Razmjou A. Biosensors for wastewater monitoring: A review //Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – V. 118. – PP. 66–79.
- ISO 5815-1:2003, 2003. Water Quality – Determination of Biochemical Oxygen Demand after N Days (BOD_N) – Part 1: Dilution and Seeding Method with Allylthiourea Addition.
- Niyomdech S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkula P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in aporous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2017. – V. 241. – P. 473–481.
- Hu J., Li Y., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Biosensor Based on Immobilized *B. Subtilis* on Three-Dimensional Porous Graphene-Polypyrrole Composite //Sensors. – 2017. – V. 17. – №. 11. – P. 2594.
- Rawson F, Gross A, Garrett D, Downard A, Baronian K. Mediated electrochemical detection of electron transfer from the outer surface of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* //Electrochemistry Communications. – 2012. – V. 15. – №. 1. – P. 85–87.
- Zaitseva A.S., Arlyapov V.A., Yudina N. Yu., Alferov S.V., Reshetilov A.N. Use of one – and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* // Enzyme and Microbial Technology. – 2017. – V. 98. – P. 43–51.
- Gao G., Fang D., Yu Y., Wu L., Wang Y., Zhi J. A double-mediator based whole cell electrochemical biosensor for acute biotoxicity assessment of wastewater //Talanta. – 2017. – V. 167. – P. 208–216.
- Chan C., Lehmann M., Tag K., Lung M., Kunze G., Riedeld K., Gruendige B., Renneberg R. Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl)sulfonate (PCS). Part II: Application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions. // Biosens Bioelectron. – 1999. – V.14. – I. 3. – PP. 295–302.
- Nicholson R.S., Shain I. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems //Analytical Chemistry. – 1964. – V. 36. – №. 4. – P. 706–723.
- Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Turovskaya A.D., Shvets V.I., Reshetilov A.N. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity. // Enzyme and Microbial Technology. – 2020. – V. 132.