

БАКТЕРИИ *PARACOCCLUS YEEI*, ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МЕТОДОМ, КАК ОСНОВА БПК-БИОСЕНСОРА

О.А. Каманина, Е.А. Ланцова, П.В. Рыбочкин

Тульский государственный университет, Тула, Россия

В течение последних лет качество поверхностных вод изменялось, поскольку работа промышленных предприятий приводит к увеличению загрязнения рек, озер, водохранилищ, морей [1]. Для обеспечения экологического контроля существуют различные методы и оборудование для чувствительной оценки степени загрязнения воды. Одним из наиболее широко используемых показателей для мониторинга загрязнителей в водной среде является биохимическое потребление кислорода (БПК). Методы определения БПК являются довольно сложными и трудоемкими процедурами, которые требуют значительных затрат времени. Разрабатываются экспресс-методы определения БПК с использованием биосенсорных анализаторов, основанных на применении микроорганизмов, способных метаболизировать различные органические соединения.

За последнее время было разработано значительное количество различных БПК-биосенсоров, предназначенных для сокращения необходимого времени измерения, в том числе основанные на определении бактериального дыхания, потреблении кислорода иммобилизованными бактериями, различных ферментативных реакций и биолюминесценции [2]. БПК-биосенсоры по виду применяемого биоматериала можно классифицировать на биосенсоры с использованием популяции микроорганизмов или с использованием индивидуальной культуры. Применение активного ила позволяет увеличить количество возможных биодegradируемых органических веществ, так как биосенсорные элементы будут адаптированы к химическому составу анализируемых сточных вод. Однако, данные сенсоры достаточно нестабильны в работе, так как биоценоз активного ила может изменяться в течение времени, характеризуются недостаточно высокими значениями воспроизводимости, операционной и долговременной стабильностями. Поэтому более эффективно применять чистую культуру микроорганизмов, выделенных из активного ила [3].

Однако, биоматериал в составе биорецепторного элемента биосенсора подвержен воздействию со стороны множества физико-химических факторов окружающей среды, что может вызвать потерю его активности и влиять на результаты проводимого анализа. Помимо этого, параметры природных объектов не стабильны и постоянно изменяются, что также отражается на активности биоагентов. На окислительную способность биологического материала могут оказывать влияние различные факторы: изменение pH, температуры, присутствие ионов тяжелых металлов, УФ излучение, ионная сила раствора. Для получения более стабильного и устойчивого к вымыванию, сохраняющего активность биоматериала, имеющего быстрое время отклика, применяются методы иммобилизации. По сравнению со свободными системами благодаря иммобилизации у биологического материала часто происходит увеличение показателей стабильности, устойчивости, активности и селективности [4].

Среди различных методов иммобилизации биоматериала (ферментов, клеток, антител, тканей) особенно выделяется инкапсулирование в золь-гель матрицы благодаря следующим своим преимуществам: простоте исполнения, экспрессности, нетоксичности, более высокой электропроводности получаемой матрицы по сравнению с традиционно используемыми органическими матрицами, постоянству занимаемого носителем объема вне зависимости от состава среды, сохранению биологической активности ферментов, низкой стоимости и доступности прекурсоров. [5] При использовании золь-гель технологии возможно более легкое и простое формирование электрохимических и оптических биосенсоров, которые можно применять для определения концентрации различных аналитов в тестируемых растворах. Также такой способ иммобилизации способен в некоторых случаях повышать термостабильность, механическую стойкость и устойчивость по отношению к растворенным веществам.

Ранее в нашем научном коллективе [6] была установлена возможность инкапсулирования дрожжей в органосиликатные матрицы с использованием золь-гель технологий, как способа получения стабильных гетерогенных биокатализаторов БПК – биосенсоров. Дрожжи участвуют в формировании архитектуры гибридного материала, и в определенных условиях образуется структура «клетки в оболочке». Чаще всего в качестве биоматериала используются дрожжи благодаря своей устойчивости к отрицательным факторам окружающей среды. Однако, с другой стороны, культуры дрожжей более подвержены воздействию загрязнения по сравнению с бактериальными. *Paracoccus yevei* ВКМ В-3302 возможно использовать для анализа БПК благодаря их широкой субстратной специфичности, способности обитать в условиях высокой солёности и функционировать в диапазоне температур 4–48 °С.

На первом этапе работы была проведена иммобилизация бактерий в матрицу на основе тетразтоксисилана (ТЭОС) и метилтриэтоксисилана (МТЭС) 50/50 и структуроуправляющего агента поливинилового спирта (ПВС). Исследование полученного биокатализатора проводили методом низкотемпературной адсорбции азота с целью изучения пористости и удельной поверхности образца. Полученная изотерма относится к IV типу, т. е. характерна для адсорбции в мезопористых телах и характерна для неорганических оксидов. Форма гистерезиса обусловлена формой и типом пор. При анализе изотермы наблюдается гистерезис типа H3 (согласно классификации IUPAC) между изотермами адсорбции и десорбции, следовательно, скорее всего образец имеет щелевидные поры. На основании модели Баррета-Джойнера-Халенды (БДХ) получено распределение пор по объему для биокатализатора на основе иммобилизованных бактерий в золь-гель матрицу с соотношением силановых прекурсоров ТЭОС\МТЭС: 50\50. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что в образце присутствует наибольшее количество пор в диапазоне от 4 до 40 нм, т. е. преобладают мезопоры (согласно классификации IUPAC). В мезопорах происходит капиллярная конденсация, на изотермах наблюдается характерная петля гистерезиса. Все это говорит о том, что микроорганизмы не способны вымываться из матрицы и надежно закреплены в золь-гель матрице, в то же время продукты их жизнедеятельности и субстраты диффундируют сквозь эти поры без затруднений.

На следующем этапе работы с помощью биосенсорного метода была изучена дыхательная активность иммобилизованных бактерий *P. yeii*. Была получена градуировочная зависимость биорецептора, которая описывается уравнением типа Михаэлиса-Ментен, т. к. биологический ответ в системе обеспечивается ферментативными реакциями. Были определены следующие характеристики: коэффициент чувствительности, диапазон определяемых концентраций, предел обнаружения и долговременная стабильность. Для определения БПК ранее применялась культура бактерий *P. yeii* ВКМ В-3302, которые были иммобилизованы в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном.

Таблица 1 Сравнение характеристик биосенсоров на основе клеток *Paracoccus yeii*, иммобилизованных в золь-гель матрицу с соотношением ТЭОС/МТЭС 50/50 (I) и в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном (II)

Характеристика	<i>Paracoccus yeii</i> ВКМ В-3302, иммобилизованные в	
	I	II
Коэффициент чувствительности, $10^{-3} \cdot \text{мин}^{-1}$	4,6±0,2	1,1
Диапазон определяемых концентраций, мг/дм ³	0,07–2,4	0,6–142
Долговременная стабильность, сутки	более 15	-
Относительное стандартное отклонение, %	7	8,3

Показано, что иммобилизация *P. yeii* в кремнийорганическую золь-гель матрицу позволила получить биорецептор, характеризующийся повышенной чувствительностью, более низкой нижней границей определяемых концентраций и меньшей величиной относительного стандартного отклонения по сравнению с клетками, иммобилизованными в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. Вероятно, это связано с наиболее эффективным удерживанием иммобилизованных золь-гель методом дрожжей *P. yeii*.

Разработанный рецепторный элемент возможно применять для анализа БПК относительно чистых речных и очищенных сточных вод без разбавления, а загрязненных речных и сточных вод с разбавлением пробы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–33–70078 и при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых ученых – кандидатов наук договор № МК-1349.2020.3.

ЛИТЕРАТУРА

- Gosse, Y. Ferro, Cl. Durrieu // Methods for evaluating the pollution impact of urban wet weather discharges on biocenosis: A review // *Water Research*. – 2016. – V. 89(1). – P. 330–354
- T. Yamashita, N. Ookawa, M. Ishida, H. Kanamori, H. Sasaki, Y. Katayose, H. Yokoyama // A novel open-type biosensor for the in-situ monitoring of biochemical oxygen demand in an aerobic environment // *Sci Rep*. – 2016. – V.6. -38552
- Н.Ю. Юдина, Т.Н. Абрамова, В.А. Арляпов // Создание биосенсора на основе бактерий, выделенных из активного ила, для экспресс-мониторинга водных сред // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. – 2018. – № 1
- I. Eş, J.D.G. Vieira, & A.C. Amaral, // Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – V. 99(5). – P.2065–2082.
- M. Blondeau, T. Coradin // Living materials from sol-gel chemistry: current challenges and perspectives // *Journal of Materials Chemistry*. – 2012. – V. 22(42). – P. 335–343.4.
- О.Н. Понаморева, и др. // Дрожжи *Debaryomyces hansenii* в органосиликатной оболочке как основа гетерогенного биокатализатора // *Журнал Биотехнология* 2017, Т. 33, No 4, С. 44–53
- Т.Н. Абрамова, и др. // Разработка БПК-биосенсора на основе бактерий *Paracoccus yeii*, выделенных из активного ила // *Сборник тезисов участников форума "Наука будущего – наука молодых"*. – 2017. – С. 248–250