

УДК 541.13:577.112.087

РОЗРОБКА СЕНСОРНОГО ЕЛЕМЕНТА БІОАНАЛІЗАТОРА ДЛЯ ЕКСПРЕСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІНДЕКСА БІОЛОГІЧНОГО СПОЖИВАННЯ КИСНЮ

Г. О. Сібгатуліна, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, В. В. Вембер

Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України;
03142, Київ, бульв. акад. Вернадського, 42;
Тел. (044) 424-19-19; Факс: (044) 424-80-78; tgruzina@mail.ru

Анотація

РОЗРОБКА СЕНСОРНОГО ЕЛЕМЕНТА БІОАНАЛІЗАТОРА ДЛЯ ЕКСПРЕСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІНДЕКСА БІОЛОГІЧНОГО СПОЖИВАННЯ КИСНЮ

Г. О. Сібгатуліна, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, В. В. Вембер

Створено та апробовано в реальних умовах сенсорний елемент біоаналізатора для визначення індекса біологічного споживання кисню. Основою сенсорного елемента є іммобілізований в агаровому гелі асоціат бактерій роду *Pseudomonas*. Вимірюваним параметром сигналу слугувала максимальна величина зміни концентрації кисню в середовищі виміру. Робочі характеристики сенсорного елемента БСК-аналізатора, а також умови визначення і алгоритм розрахунку індекса БСК, відпрацьовані на реальних зразках стічної води. Коefіцієнт кореляції даних, які були отримані з застосуванням традиційного методу (метод розбавлення) та біосенсорного аналізу, становив близько 0,95.

Ключові слова: сенсорний елемент, бактерії, іммобілізація, біологічне споживання кисню, біоаналізатор

Abstract

THE DEVELOPMENT OF BIOANALYZER SENSITIVE ELEMENT FOR EXPRESS DETECTION OF THE BIOLOGICAL OXYGEN DEMAND INDEX

G.A. Sibgatulina, L.S. Reznichenko, T.G. Gruzina, V.V. Vember

The sensitive element of bioanalyzer for detection of the biological oxygen demand (BOD) index has been developed and tested in real conditions. The immobilized in agar gel bacteria of *Pseudomonas* strains has been used as the basis of biological sensitive element. The measurable parameter of the signal was maximal value of oxygen concentration changing in the measuring medium.

The operating characteristics of the BOD-analyzer sensitive element as well as the conditions of determination and the algorithm of calculation of the BOD-index have been improved on the real samples of the waste water.

The correlation coefficient of the data, which were obtained as a result of standard method as well as the biosensor analyze, has been 0,95.

Keywords: sensory element, bacteria, immobilization, biological oxygen demand, bioanalyzer

Аннотация

РАЗРАБОТКА СЕНСОРНОГО ЭЛЕМЕНТА БИОАНАЛИЗАТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДЕКСА БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Г. А. Сибгатулина, Л. С. Резниченко, Т. Г. Грузина, В. В. Вембер

Создан и апробирован в реальных условиях сенсорный элемент биоанализатора для определения индекса биологического потребления кислорода.

Основой сенсорного элемента является иммобилизованный в агаровом геле ассоциат бактерий рода *Pseudomonas*. Измеряемым параметром сигнала служит максимальная величина изменения концентрации кислорода в среде измерения.

Рабочие характеристики сенсорного элемента БПК-анализатора, а также условия определения и алгоритм расчета индекса БПК отработаны на реальных образцах сточных вод.

Коэффициент корреляции данных, полученных с применением традиционного метода (метод разбавления) и биосенсорного анализа, был равен примерно 0,95.

Ключевые слова: сенсорный элемент, бактерии, иммобилизация, биологическое потребление кислорода, биоанализатор

Вирішення проблеми забрудненості водного басейну не можливе без розробки та впровадження новітніх експресних методів моніторингу [1]. Особливо актуальним є визначення органічних забруднювачів (поверхнево-активних речовин, фенолу та його похідних, ін.) у зв'язку з їх широким використанням у промислових процесах та побуті [2].

Здатність мікроорганізмів до утилізації широкого спектру органічних речовин-забруднювачів свідчить про їх принципову можливість бути використаними в якості сенсорного елемента у біосенсорному визначенні ступеню органічної забрудненості водного середовища.

Одним з ключових показників рівня загальної забрудненості води органічними поллютантами є індекс біологічного (біохімічного) споживання кисню (БСК). Визначення цього показника стандартними методами зазвичай триває 5 діб [3].

Тому актуальною є проблема розробки експресних та високочутливих аналітичних систем для моніторингу БСК водних середовищ різного рівня забрудненості.

Мета цієї роботи — розробка та апробація сенсорного елемента біоанализатора для визначення індексу біологічного споживання кисню.

Матеріали і методи

В роботі було використано бактеріальні штами: *Pseudomonas putida* K., *Pseudomonas sp.* B4251, *Pseudomonas fluorescens* B5040, *Pseudomonas*

fluorescens B4252, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fluorescens* Ac з колекції Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАНУ, та *Alcaligenes eutrophus* CH 34, *Alcaligenes eutrophus* AE 1239, *Alcaligenes eutrophus* DS308 з колекції лабораторії біотехнології VITO Бельгія.

Культивування клітин здійснювали на середовищі Luria-Bertani (LB-агарі та LB-бульйоні) протягом 24 годин при температурі 28-30 °С.

При вивченні деструктивної активності по відношенню до поверхнево-активних речовин (ПАР) клітини культивували в рідкому синтетичному середовищі M9 в колбах Ерленмейера на качалці при швидкості 130 об/хв. Концентрацію ПАР у середовищі визначали екстракційно-фотометричним методом відповідно з [4].

Для визначення здатності бактеріальних штамів до утилізації фенолу та його похідних біомасу нарощували на LB-бульйоні, який містив 50 мг/л органічних сполук.

В роботі було використано розчин мікроелементів наступного складу: K_2HPO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , MgSO_4 [3].

Для формування рецепторного елемента клітини осаджували із середовища культивування центрифугуванням при 5000 об/хв., 5 хв. із подальшим ресуспендуванням у фізіологічному розчині до кінцевої концентрації 1,0 мг/мл по сухій вазі, що відповідає оптичній густині $D_{540} = 1,2$.

Іммобілізацію мікробної біомаси здійснювали шляхом включення бактеріальних клітин

у 2% агаровий, 2% агарозний та кальцій-альгінатний гелі. Отримані іммобілізати фрагментували шляхом продавлювання крізь сито із розміром комірок 0,5 мм. Гранули використовували в якості сенсорного елемента біосенсорної системи.

Кінцева концентрація іммобілізованих клітин складала 5–6 мг сухої біомаси на 1 мл гелю.

Зберігання гранул іммобілізату здійснювали у фізіологічному розчині при +4 °С.

Визначення рівня життєздатності бактеріального асоціату у різних гелях проводили мікрокультуральним методом [5].

В якості аналітичного сигналу було використано показник рівня респіраторної активності клітин бактеріального асоціату у присутності аналіту — органічних забруднювачів.

Перетворювачем сигналу біосенсорного аналізатору слугувала амперметрична система кисень-чутливого електроду (тип Кларка, МО 128, “Mettler Toledo”, Швейцарія).

Стабільність сенсорного елемента вивчали шляхом вимірювання концентрації кисню у водних розчинах контрольних концентрацій відповідних органічних речовин через фіксовані проміжки часу (3 рази на добу).

Ефективність біосенсорного визначення БСК оцінювали шляхом порівняння отриманих величин БСК з даними традиційного методу (метод розбавлення) [3].

У роботі було використано: базове поживне середовище (“Gibco BRL”, Шотландія), трис-гідроксиметиламінометан (“Sigma”, США), а також реактиви вітчизняного виробництва (кваліфікації “хч” та “осч”).

Отримані результати обробляли статистично із використанням критерію Ст’юдента ($p < 0,05$) [6].

Результати та їх обговорення.

Індекс біологічного (біохімічного) споживання кисню відображає кількість кисню, яка поглинається 1 л проби при біохімічному окисленні органічних забруднювачів під дією мікроорганізмів. Тому необхідною умовою при конструюванні біологічно-чутливого елемента БСК-аналізатора є використання мікроорганізмів з широкою субстратною специфічністю.

У зв’язку з цим, нами було проведено скринінг колекційних бактеріальних штамів з метою визначення їх ефективності щодо утилиза-

ції основних класів органічних забруднювачів (поверхнево-активних речовин (ПАР), фенолу та його похідних).

На рис. 1 на прикладі алкілсульфонату приведено дані, які характеризують деструктивну активність досліджених штамів у відношенні до ПАР. Проведені дослідження дозволили виявити найбільш активні штами-деструктори, а саме: *Ps. sp.* B4251, *Ps. fluorescens* B4252, *Ps. fluorescens* B5040.

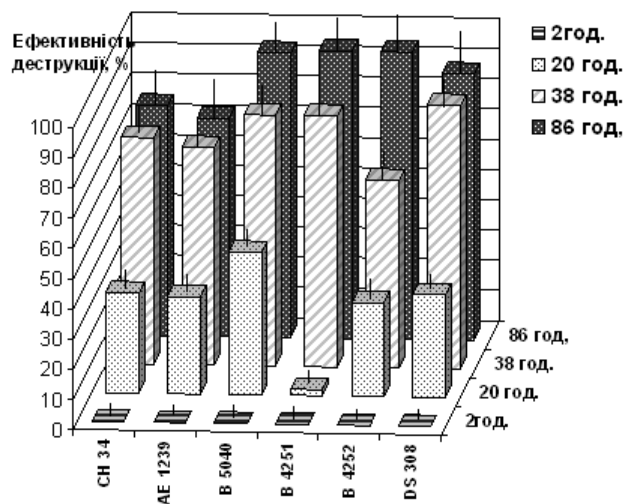


Рис. 1. Ефективність деструкції алкілсульфонату (100 мг/л) бактеріальними культурами

В результаті досліджень, виконаних нами раніше [7], було показано, що найбільш ефективними деструкторами фенолу та його похідних є бактеріальні штами роду *Pseudomonas*: *Ps. putida* K., *Ps. sp.* B4251, *Ps. fluorescens* Ac.

Отримані результати скринінгу дозволили сформулювати бактеріальний асоціат на основі найбільш активних бактеріальних культур-деструкторів органічних субстратів. До його складу у співвідношенні 1:1:1:1 за кількістю клітин увійшли наступні штами: *Ps. sp.* B4251, *Ps. fluorescens* B4252, *Ps. fluorescens* B5040, *Ps. putida* K., *Ps. fluorescens* Ac.

Відомо [8], що різні способи іммобілізації біологічного матеріалу впливають на стабільність та чутливість біосенсорного елемента. Це особливо актуально у випадку використання інтактних клітин мікроорганізмів. З метою оптимізації функціонування біологічного рецепторного елемента (асоціату мікроорганізмів) нами були використані різні матриці для іммобілізації бактеріальних клітин (включення їх у агарозний, агаровий та кальцій-альгінатний гелі). Для характеристики фізіологічного ста-

ну іммобілізованих мікробних клітин нами був використаний стандартний критерій життєздатності [5].

Було показано, що мають місце значні відмінності абсолютних величин відгуків БСК-аналізатору при використанні клітин асоціату, іммобілізованих у гелях, різних за природою та структурою. Найбільш придатною матрицею для іммобілізації клітин асоціату виявився 2% агаровий гель, життєздатність клітин в якому складала біля 81% (рис. 2).

Життєздатність клітин, %

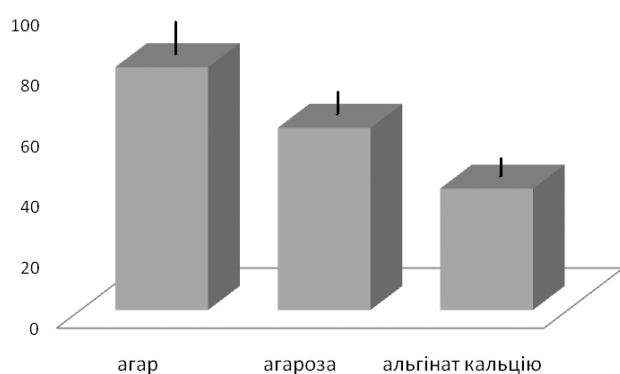


Рис. 2. Процент життєздатних клітин бактеріального асоціату при іммобілізації в різних гелях

У подальших експериментах було відпрацьовано робочі характеристики розробленого сенсорного елементу БСК-аналізатора, а також умови визначення та алгоритм розрахунку індексу БСК.

Встановлено, що для водного розчину 2,4-динітрофенолу при концентраціях 0,5-1 мМ стабільність клітинного сенсорного елементу без втрати активності складала 10 діб, а зниження активності на 50% відбувалося на 15-у добу.

В таблиці 1 наведено оптимізовані робочі характеристики розробленого сенсорного елементу. Відпрацювання цих характеристик було здійснено в модельній суміші глюкози та глютамінової кислоти з концентраціями 1,5 г/л, що відповідало за складом стандарту для контролю відповідності визначення індексу БСК.

В ході роботи було відпрацьовано умови вимірювання індексу БСК для комірки герметичного типу. Послідовність вимірювання складалася з наступних операцій:

1. Калібрування електроду відносно повітря.
2. Визначення рівня ендogenous дихання сенсорних клітин ($C_{\text{ендог}}$).
3. Калібрування електроду відносно проби води.

Таблиця 1

Робочі характеристики біосенсору на основі мікробного асоціату для експресного визначення індексу біологічного споживання кисню (БСК)

Робочі параметри мікробного біосенсору	Характеристика	Величина
Операційна стабільність	Стандартне відхилення по 20 послідовним вимірюванням	3 %
Стабільність біосенсору	Вимірювання концентрації кисню три рази на добу в модельному розчині 2,4-динітрофенолу	10 діб; падіння активності на 50% — на 15-ту добу
Чутливість, мг/лЧММ	Тангенс кута нахилу лінійного відрізка залежності відгуку біосенсора від концентрації субстрата	0,48
Діапазон визначення БСК, мг/л	—	2–1500
Експресність	Час одного вимірювання, хв.	10–15

4. Визначення кількості O_2 , спожитого сенсорними бактеріями ($C_{\text{субстр}}$).

5. Обчислення значення БСК у пробі за формулою:

$$\text{БСК} = C_{\text{субстр}} - C_{\text{ендог}} \text{ (мг/л } O_2\text{)}.$$

Оптимізація умов біосенсорного аналізу була проведена під час випробувань розробленого БСК-аналізатора на базі Центральної контрольно-дослідної проектно-вишукувальної лаборато-

рії комунального підприємства “Компанія “Вода Донбасу”” (м. Донецьк). Під час апробації в реальних умовах було визначено індекс біологічного (біохімічного) споживання кисню у зразках стічних вод різного ступеню очищення Селідівського виробничого управління водно-каналізаційного господарства та Донецьких очисних споруд (табл. 2). Коефіцієнт кореляції даних, отриманих традиційним методом (метод розбавлення) і біосенсорним знаходився в межах 0,95.

Індекс БСК, визначений у пробах класичним методом (метод розбавлення) та з використанням експериментального біосенсорного БСК-аналізатору.

Проба		Індекс БСК	
		Класичний метод, мг/л O ₂	Біосенсорний метод, мг/л O ₂
Селідівське виробниче управління водно-каналізаційного господарства	Поступаюча стічна вода	137±6,0	132±4,0
	I відстійник	84±5,0	86,7±3,0
	Вихідна вода	4,35±0,4	4,54±0,3
Донецькі очисні споруди	Поступаюча стічна вода	100,0±10,0	109,4±6,0
	I відстійник	70,0±5,0	76,0±4,0
	Вихідна вода	6,0±0,5	6,3±0,3

Результати достовірні ($p < 0,05$).

Таким чином, в результаті проведених досліджень розроблено сенсорний елемент БСК-аналізатору на основі іммобілізованого асоціату бактерій та оптимізовано його робочі характеристики в лабораторних умовах.

Випробування, проведені на реальних зразках стічної води, засвідчили високий рівень кореляції даних, отриманих біосенсорним аналізом та традиційним методом визначення БСК. Це вказує на можливість використання розробленого сенсорного елементу у складі БСК-аналізатору для експресного визначення рівня забрудненості води органічними поліюгантами. Перевагами розробленого БСК-аналізатора є швидкість аналізу (10-15 хв.) та можливість його використання в польових умовах в системах комплексного моніторингу водних середовищ.

Список літератури

1. Lei Yu, Chen W., Mulchandani A., Microbial biosensors // Anal. Chem. Acta. — 2006. — V.568. — P. 200-210.
2. Решетилів А.Н., Микробные, ферментные и им-

мунные биосенсоры для экологического мониторинга и контроля биотехнологических процессов // Прикл. биохим. и микробиол. — 2005. — Т.41, №5. — С. 504-513.

3. Определение органических загрязнений питьевых, природных и сточных вод / Под ред. Ю.Ю. Лурье. — М.: Химия, 1975. — 200 с.
4. Лурье Ю.Ю., Аналитическая химия промышленных сточных вод. — М.: Химия, 1984. — 447 с.
5. Семенчук И.Н., Таранова Л.А., Каленюк А.А. и др., Влияние различных способов иммобилизации на стабильность микробного биосенсора на основе *Pseudomonas rathonis* T при детекции поверхностно-активных веществ // Прикл. биохим. и микробиол. — 2000. — Т.36, №1. — С. 80-84.
6. Лакин Г.Ф., Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
7. Гутник Г.О., Задорожня А.М., Грузина Т.Г. та ін., Визначення кількості фенольних сполук за допомогою вільних клітин бактерій роду *Pseudomonas* // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т.79, №2. — С. 68-73.
8. Семенчук И.Н., Таранова Л.А., Ильясов П.В. и др., Селективность микробного биосенсора при различных способах иммобилизации бактерий-деструкторов // Химия и технология воды. — 1998. — Т.20, №6. — С. 649-655.