

Т.Г. Грузина, А.М. Задорожная, Г.А. Гутник, В.В. Вембер,
З.Р. Ульберг, Н.И. Канюк, Н.Ф. Стародуб

**БАКТЕРИАЛЬНЫЙ МУЛЬТИСЕНСОР ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ В ВОДЕ**

*Изучена возможность дифференцированного определения Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} в модельных водных средах в системе с культурами бактерий *Pseudomonas sp. B4251*, *Bacillus cereus B4368*, *E. coli 1257*. Разработан и создан мультибиосенсор на основе ёмкостных структур типа электролит – диэлектрик – полупроводник и ионочувствительного слоя нитрида кремния. Нижняя граница чувствительности метода составила: для цинка – 0,2, для кобальта – 0,05, для меди – 0,1 мг/дм³, что соответствует 1 – 3 мкМ по металлу.*

На сегодняшний день фактический уровень антропогенного влияния на окружающую среду достаточно высокий. Такое состояние может привести к существенным антропогенным последствиям из-за нарастающего загрязнения токсичными веществами различной природы. Особенно опасным является загрязнение водных бассейнов тяжелыми металлами. Эффективность охраны водной среды от загрязняющих веществ связана с разработкой и применением новых инструментальных биоаналитических методов их контроля.

Биосенсоры на основе клеток бактерий характеризуются рядом преимуществ по сравнению с биосенсорами, содержащими другие типы биологических чувствительных элементов (например, энзимными биосенсорами), а именно: доступностью, дешевизной, простотой получения биосенсорного датчика, а также интегральностью клеточного ответа [1 – 3].

Одновременное использование нескольких культур бактерий в качестве биологически чувствительных элементов даёт возможность получать более достоверную информацию по сравнению с моносенсорным анализом, способствует повышению чувствительности и расширяет диапазон измерения.

Цель данной работы – изучение возможности создания мультибиосенсора на основе клеток бактерий для определения Zn^{2+} , Co^{2+} и Cu^{2+} в модельных водных средах.

Методика эксперимента. В работе использованы штаммы бактерий *Pseudomonas sp. B4251*, *Bacillus cereus B4368*, *E. coli 1257* из коллек-

ции Института биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины, обладающие различной чувствительностью к определённым видам тяжёлых металлов.

Клетки культивировали в жидкой обогащенной *LB*-среде в колбах на качалках при 30° и 37°С.

Формирование биологически чувствительного элемента осуществляли путём включения бактериальных клеток в 2 % -ный агаровый гель [4].

В качестве аналитического сигнала регистрировали изменения рН среды в результате выброса H^+ из энергизованных клеток бактерий. Преобразователем служила потенциометрическая система мультибиосенсора, сконструированного совместно с сотрудниками Института физики полупроводников НАН Украины. Её основу составляли ёмкостные структуры типа электролит – диэлектрик – полупроводник и ионочувствительный слой нитрида кремния.

Проточная система мультибиосенсора представлена каналом с пятью отдельными измерительными ячейками, имеющими общий электрод, связь которого с кремниевой основой поддерживается с помощью алюминиевого контакта (рис.1).

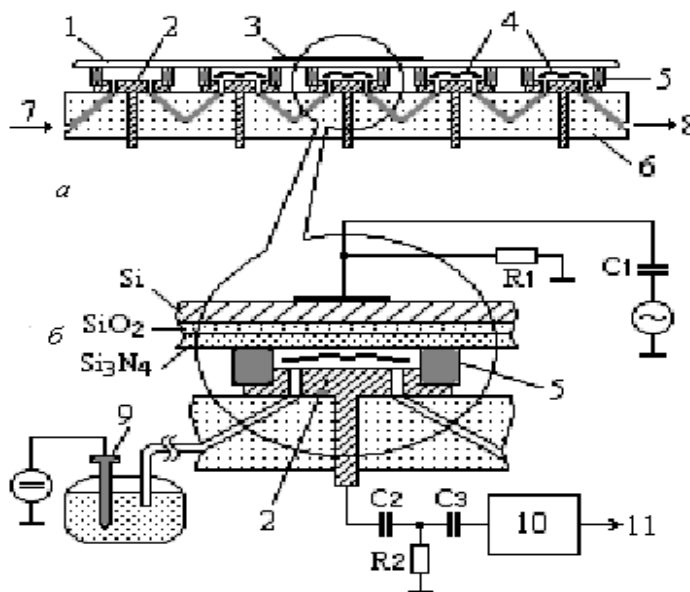


Рис. 1. Схема канала мультибиосенсора: а – 1 – чувствительные структуры, 2 – золотой противоэлектрод, 3 – клеточная мембрана, 4 – уплотняющее кольцо, 5 – оргстекло, 6 – пластиковое основание, 7 – вход, 8 – выход на измерительные структуры; б – 9 – референтный электрод, 10 – C/V- конвертор, 11 – выход на персональный компьютер

Данные экспериментов по ингибированию выброса протонов микробными клетками представлены в относительных единицах U/U_0 и выражены в процентах, где U_0 – интенсивность выброса протонов энергизованными клетками бактерий, а U – этот же параметр для энергизованных клеток в присутствии определённого металла. Интенсивность выброса H^+ рассчитана как тангенс угла наклона кинетических кривых для каждого штамма бактерий и соответствующего металла.

Непосредственно перед опытом бактериальные клетки истощали в течение двух суток в 5 мМ трис-НСI буфере (рН 7,8) при 5°С. Имобилизованные бактериальные клетки вносили в ячейки в виде агаровых блоков толщиной 1 – 1,5 мм. Одна ячейка служила контролем (агаровый блок без клеток). Растворы глюкозы и металлов готовили на 5 мМ трис-НСI буфере при рН 7,8.

Энергизацию клеток осуществляли путём введения в проточную систему глюкозы (конечная концентрация – 1%). Затем через измерительную ячейку пропускали индивидуальные растворы металлов при концентрации 1, 10 и 100, а также их смесь – 100 мкМ. Объём анализируемой пробы составлял 1 см³.

В работе использовали трис-гидроксиметиламинометан (Gibco RBL, Шотландия). Остальные реактивы были отечественного производства и имели квалификацию "х.ч".

На рис. 2 приведены средние значения параметров пяти независимых экспериментов. Представленные результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента ($p < 0,05$) [5].

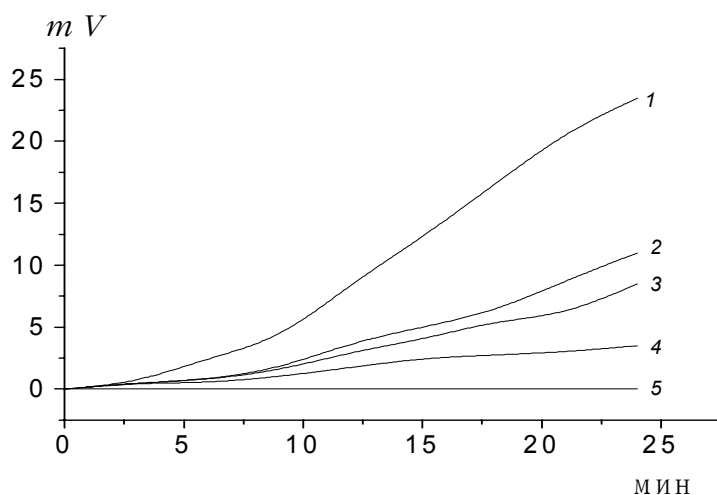


Рис. 2. Типичный характер откликов мультибиосенсора: 1 – *Pseudomonas sp. B4251* и 1% глюкозы; 2 – *E. coli* 1257 и 100 мкМ Cu; 3 – *Pseudomonas sp. B4251* и 100 мкМ Cu; 4 – *Bacillus cereus* B4368 и 100 мкМ Cu; 5 – контроль

Результаты и их обсуждение. Фундаментальные исследования коллоидно-биохимических особенностей взаимодействия бактерий с тяжелыми металлами выполнены в [6, 7]. Они открыли перспективу использования ряда клеточных реакций как основы создания клеточных биосенсоров для анализа тяжелых металлов [8]. Данные экспериментов свидетельствуют, что ингибирование тяжелыми металлами субстрат-стимулируемого выброса протонов (H^+ -экструзии) голодающими культурами бактерий может быть использовано в качестве биохимического параметра клеток, чувствительных к токсическому действию тяжелых металлов [9]. Интенсивность H^+ -экструзии находится в прямой зависимости от физиологического состояния клеток бактерий, уровня их энергизованности, что является результатом интенсивности протекания биохимических реакций обмена веществ. Через влияние на общий метаболизм тяжелые металлы проявляют своё действие и на скорость выброса протонов из клеток бактерий.

Разные штаммы бактерий имеют различную чувствительность к действию определённых тяжелых металлов и, соответственно, неодинаково реагируют изменением интенсивности протонной экструзии, которая может быть зарегистрирована емкостными структурами преобразователя.

Изложенное послужило основой для создания бактериальной мультисенсорной системы, позволяющей выявлять наличие ионов цинка, кобальта и меди в природных и техногенных водных системах.

На первом этапе исследований были оптимизированы условия, при которых проявлялась максимальная чувствительность реакции протонного выброса из бактериальных клеток по отношению к стимулирующему субстрату – глюкозе и тяжелым металлам как токсичным агентам.

Оптимум рН для регистрации этого параметра лежит в диапазоне 7,5 – 7,8 (буферная система – 5 мМ трис-НСI). Оптимальная концентрация клеток бактерий, включённых в агаровый гель, составляет 1,0 – 1,5 мг/см³ по сухой массе; максимальный уровень энергизации клеток достигается 1%-ным раствором глюкозы (конечная концентрация); температура измерения – 22 – 24 ± 2°С. Для формирования биосенсорного элемента определён оптимальный способ включения бактериальных клеток в 2%-ный агар-агар.

Типичные кинетические кривые сигналов отклика бактериального мультибиосенсора на добавку глюкозы и ионов меди показаны на рис. 2. Видно, что при энергизации глюкозой интенсивность протонного выброса из бактериальных клеток достигает максимального уровня и соответствует 24 мВ (кривая 2). Ход кривых 3 – 5 свидетельствует об ингибировании этого процесса у использованных в качестве биологически чувствительных элементов бактериальных штаммов при действии Cu^{2+} . Аналогичные по тенденции кинетические кривые получены и для Co^{2+} и Zn^{2+} .

В таблице суммированы данные по влиянию изученных металлов при различных концентрациях на интенсивность Н⁺-выброса из клеток трёх бактериальных культур. Как видно, клетки различных бактериальных штаммов в разной степени ингибируются тяжелыми металлами. Анализ влияния смеси металлов, взятых в эквимольных концентрациях, свидетельствует об адекватном реагировании бактериальных культур на присутствие Zn²⁺, Co²⁺ и Cu²⁺. Это дает возможность качественно и, с определенной степенью вероятности, количественно охарактеризовать пробы неизвестного состава на наличие тяжелых металлов.

Ингибирование интенсивности выброса протонов из клеток бактерий тяжелыми металлами

Бактерии C _{Me} , мкМ		<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> B4251	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> B4368	<i>E. coli</i> 1257
		Степень ингибирования, %		
Zn	1	8	5	21
	10	13	20	35
	100	47	44	70
Co	1	16	30	10
	10	24	58	41
	100	61	81	57
Cu	1	23	13	16
	10	75	59	51
	100	94	67	56
Смесь		93	82	70

Таким образом, предложенная схема детекции с использованием трех культур бактерий позволяет осуществлять дифференцированное специфическое определение тяжелых металлов в воде.

Резюме. Вивчено можливість диференційованого визначення іонів цинку, кобальту та міді у модельних водних середовищах у системі з трьома культурами бактерій *Pseudomonas sp.* B4251, *Bacillus cereus* B4368, *E. coli* 1257. Розроблено та створено мультибіосенсор на основі ємнісних структур типу електроліт–діелектрик–напівпровідник та іон-чутливого шару нітриду кремнію. Нижня межа чутливості методу складала: для цинку – 0,2, для кобальту – 0,05, для міді – 0,1 мг/дм³, що відповідає 1 – 3 мкМ за металом.

*T.G. Gruzina, A.M. Zadorozhnyaya, G.A. Gutnik, V.V. Vember, Z.R. Ulberg,
N.I. Kanjuk, N.F. Starodub*

BACTERIAL MULTISENSOR FOR HEAVY METALS DETERMINATION IN WATER

Summary

The possibility of zinc, cobalt and copper ions differential determination in the modal water mediums in the system with three bacterial cultures has been investigated.

Bacterial multisensor based on the capacitive electrolyte-dielectric-semiconductor structure type with ion-sensitive silicon nitride layer has been developed and produced. The lower sensitivity limit of this method is: 0,2 for zinc, 0,05 for cobalt, 0,1 mg/dm³ for copper, which corresponds to 1 – 3 mkM for the metal.

1. *Kurosawa M., Hiroano T., Nakamura K.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – **41**, N 4. – P. 556 – 559.
2. *Таранова Л.А., Семенчук И.Н., Ильясов П.В., Решетилов А.Н.* // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 2000. – **36**, № 2. – С. 204 – 208.
3. *Китова А.Е., Кувичкина Т.Н., Ильясов П.В.* // Там же. – 2002. – **38**, № 5. – С. 585 – 590.
4. *Вудворд Дж.* *Иммобилизованные клетки и ферменты: Методы.* – М.: Мир, 1988. – 364 с.
5. *Лакин Г.Ф.* *Биометрия.* – М.: Высш. шк. 1990. – 352 с.
6. *Грузина Т.Г., Балакина М.Н., Ульберг З.Р.* // *Микробиология.* – 1977. – **66**, №1. – С. 14 – 18.
7. *Грузина Т.Г., Балакина М.Н., Ульберг З.Р.* // *Укр. биохим. журн.* – 2000. – **72**, № 2. – С. 72 – 76.
8. *Карамушка В.И., Гэдд Д.М., Грузина Т.Г.* // *Коллоид. журн.* – 1998. – **66**, № 6. – С. 775 – 778.
9. *Грузина Т.Г., Чеховская Т.П., Вембер В.В., Ульберг З.Р.* // *Укр. биохим. журн.* – 2003. – **75**, № 3. – С. 95 – 98.

Ин-т биокolloид. химии
им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины;
Ин-т биохимии им. А.В. Палладина
НАН Украины, г. Киев

Поступила 27.04.2005