

БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

© 2009 А.А. Никашина¹, П.П. Пурыгин¹, А.Н. Решетилов²¹ Самарский государственный университет² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Статья получена 05.10.2009 г.

С целью выбора наиболее активных штаммов-нефтедеструкторов осуществлено культивирование микроорганизмов на средах с субстратами: дизельное топливо, моторное масло, компрессорное масло и трансмиссионное масло. Созданы лабораторные модели биосенсора на основе кислородного электрода, модифицированного штаммами-деструкторами углеводородов нефти. Получены ответы данных микробных биосенсоров на присутствие в водной среде исследуемых нефтепродуктов. Доказана возможность получения аналитических сигналов биосенсора мембранного типа на определенных марки нефтепродуктов.

Ключевые слова: экологический контроль, штаммы-деструкторы, нефтепродукты, биосенсоры

В последнее десятилетие показана высокая эффективность применения биосенсорного анализа для решения ряда практических задач. По статистическим данным основными областями наиболее успешного использования биосенсоров являются промышленная биотехнология, экология, пищевая промышленность, клиническая диагностика [1]. Распространенным и надежным типом аналитических устройств являются биосенсоры, основанные на электрохимических преобразователях. В данной работе для создания моделей микробных биосенсоров использован преобразователь электрохимического типа – полярографический электрод, измеряющий содержание кислорода в среде, модификация которого известна как кислородный электрод Кларка. Окисление нефтепродуктов микроорганизмами-деструкторами углеводородов нефти связано с потреблением кислорода. Использование комбинации «иммобилизованные микроорганизмы – кислородный электрод типа Кларка» позволяет избежать ряда ограничений, свойственных оптическим биосенсорам [2-5].

Актуальной проблемой использования биосенсоров для экологического контроля является детекция нефтепродуктов в почве и сточных водах промышленных предприятий. Клетки микроорганизмов обеспечивают широкие возможности по созданию биосенсорных аналитических устройств. Известно, что нефтяное загрязнение приводит к негативным изменениям в биоценозе. В результате разливов нефти почвы, а также побережья акваторий могут превращаться в типичные техногенные пустыни, в которых практически полностью подавлена жизнедеятельность биоты. Процесс

естественного самовосстановления загрязненной среды является очень длительным. В настоящее время выделены и описаны микроорганизмы, отнесенные к 70 различным видам, на примере которых показана возможность биодеградации различных нефтяных углеводородов. Наиболее активными деструкторами среди них являются представители родов *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*.

Экспериментальная часть. В работе были использованы нефтепродукты: дизельное топливо, моторное масло марки М14-В2, компрессорное масло марки КЗ-10Н и трансмиссионное масло марки ТАП-15В. Для создания биорецепторов использовали бактериальные штаммы *Microbacterium liquefaciens* ASh10(2), *Pseudomonas* sp. 22, *Pseudomonas* sp. 142 NF (pNF142), *Rhodococcus erythropolis* Sh5, *Rhodococcus erythropolis* 21, *Rhodococcus* sp. S67 из всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН. Микроорганизмы выращивали на жидкой питательной среде 5/5 следующего состава (г/л): аминокептид из гидролизата крови животных – 60,0 г, триптон – 50,0 г, экстракт кормовых дрожжей – 10,0 г, экстракт сои – 30,0 г.

Для приготовления агаризованных сред с диспергированным углеводородным субстратом (дизельное топливо и исследуемые масла) использовали ультразвуковой дезинтегратор MSE, Великобритания. Для этого в колбы объемом 300 мл вносили 2 г агара и 100 мл дистиллированной воды, стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм. в течение 30 мин. После стерилизации в еще горячую среду добавляли по 1 г каждого исследуемого углеводородного субстрата и диспергировали на ультразвуковом дезинтеграторе при максимальной амплитуде. Время диспергирования – 15 мин. Полученную таким образом агаризованную среду с диспергированным углеводородным субстратом сразу

Никашина Анна Анатольевна, аспирантка. E-mail: electropasos@mail.ru

Пурыгин Петр Петрович, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической, биологической и медицинской химии

Решетилов Анатолий Николаевич, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биосенсоров. E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

же разливали в чашки Петри. Посев микроорганизмов производили бактериологической петлей так же, как и на стандартные агаризованные среды.

При формировании микробных биосенсоров мембранного типа иммобилизацию клеток осуществляли их физической сорбцией на фильтрах из стекловолокна 3×3 мм² (тип GF/A, Whatman). Для этого 5 мкл клеточной суспензии наносили на хроматографическую бумагу с последующим высушиванием при комнатной температуре в течение 30 минут. Биорецептор (иммобилизованные на мембранах клетки) размером 3×3 мм² фиксировали на измерительной поверхности кислородного электрода типа Кларка. Измерения проводили в открытой кювете с помощью гальваностата-потенциостата IPC2L (ООО «Кронас», Россия) интегрированного с персональным компьютером (рис. 1). Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения сигнала (пА). Измерения проводили в кювете объемом 2 мл при комнатной температуре и постоянном перемешивании исследуемых растворов магнитной мешалкой со скоростью 400 об/мин. В качестве электролита использовали 50 мМ натрий-фосфатный буферный раствор, рН 7,1±0,02. В качестве субстратов использовали: 1 М раствор этилового спирта, 1 М раствор глюкозы, 1% водные эмульсии исследуемых масел и дизельного топлива (концентрация в ячейке 10 мМ). Водные эмульсии нефтепродуктов получали обработкой растворов высокочастотным ультразвуковым дезинтегратором MSE в течение 12 минут.

Обсуждение результатов. В процессе работы были изучены 6 штаммов-деструкторов углеводородов нефти из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К. Скрыбина

РАН на способность утилизировать дизельное топливо и определенные марки нефтепродуктов, используемые для заправки локомотивов на железной дороге, в качестве единственного источника углерода и энергии. Для выбора наиболее активных штаммов-деструкторов углеводородов нефти были использованы два различных подхода:

1. Культивирование микроорганизмов-деструкторов нефтепродуктов на агаризованных средах с субстратами: дизельное топливо, моторное масло марки М14-В2, компрессорное масло марки КЗ-10Н и трансмиссионное масло марки ТАП-15В в качестве единственного источника углерода и энергии при температуре 28°С.

2. Изучение возможности получения аналитических сигналов биосенсора мембранного типа на основе 6 штаммов-деструкторов углеводородов нефти на субстраты исследуемых нефтепродуктов.

С целью изучения способности микроорганизмов-деструкторов к росту на дизельном топливе и исследуемых нефтепродуктах произвели посев микроорганизмов в чашки Петри на поверхность агаризованных сред с помощью бактериологической петли. Культивирование проводили в течение 7 суток при температуре 28°С. Микроорганизмы-деструкторы различались по способности к росту на дизельном топливе, моторном масле марки М14-В2, компрессорном масле марки КЗ-10Н и трансмиссионном масле марки ТАП-15В (табл. 1). Полученные данные иллюстрируют избирательную способность микроорганизмов-деструкторов в отношении деградации исследуемых нефтепродуктов.

Таблица 1. Способность к росту на различных агаризованных средах исследуемых штаммов при температуре 28°С

Штамм	Мощность роста штаммов на различных агаризованных средах (субстратах)			
	дизельное топливо	моторное масло М14-В2	компрессорное масло КЗ-10Н	трансмиссионное масло ТАП-15В
<i>Rhodococcus</i> sp. S67	++	–	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. 142NF (pNF142)	+	–	+	+
<i>Microbacterium liquefaciens</i> ASh10(2)	+	–	++	++
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Sh5	++	–	++	++
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 21	++	–	++	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 22	–	–	+	++

Условные обозначения мощности роста штаммов: ++ умеренный или ограниченный рост (идущий полоской по проведенной черте); + скудный или слабый рост (дант еле заметную узкую черточку на поверхности); – отсутствие роста

Созданы лабораторные модели биосенсора на основе кислородного электрода, модифицированного выбранными штаммами-деструкторами нефтепродуктов, с целью определения возможности применения для детекции нефтепродуктов метода электрохимической регистрации сигналов микроорганизмов. Получены ответы данных микробных биосенсоров на

присутствие в водной среде представленных субстратов (дизельное топливо, моторное масло, трансмиссионное масло, этиловый спирт и глюкоза). По результатам биосенсорного анализа построили портрет субстратной специфичности исследуемых штаммов-нефтедеструкторов (рис. 1).

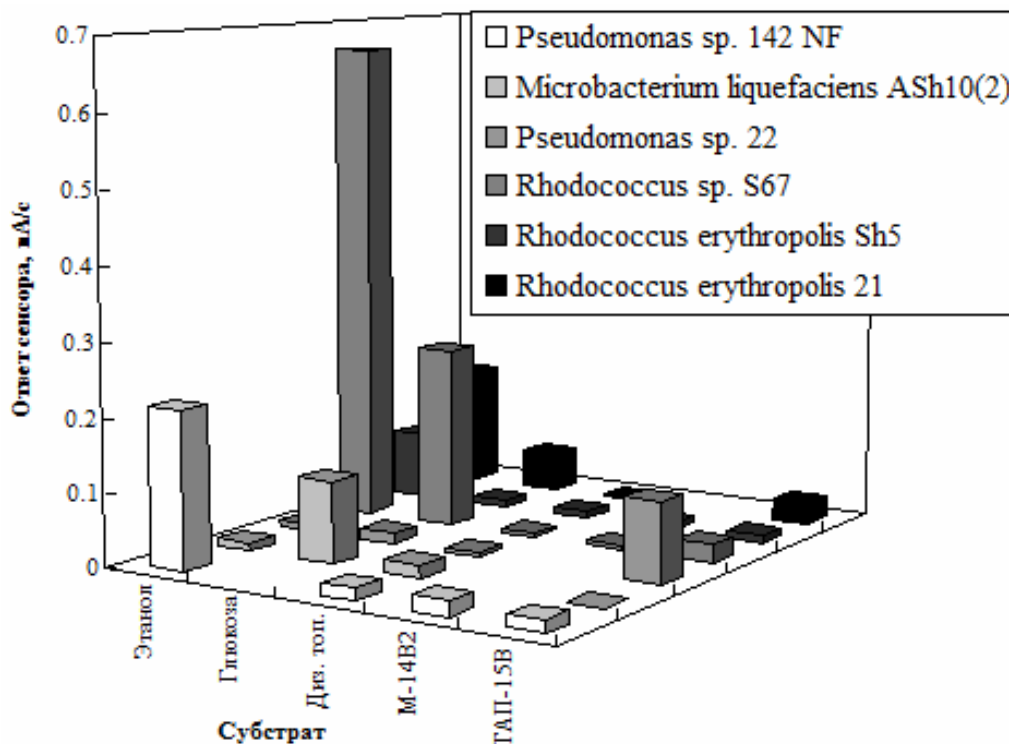


Рис. 1 Портрет субстратной специфичности биосенсора на основе штаммов деструкторов углеводов нефти

В ходе микробиологического тестирования выявлено, что исследуемые микроорганизмы не способны к росту на агаризованной среде с диспергированным углеводородным субстратом – моторное масло М-14В2 в качестве единственного источника углерода и энергии. В тоже время биосенсорное измерение показало, что штамм *Pseudomonas* sp. 142NF единственный проявил активность к данному субстрату.

По результатам биосенсорного анализа из всех протестированных штаммов наибольшую окислительную способность по отношению к дизельному топливу проявили штаммы *Pseudomonas* sp. 142NF и *Microbacterium liquefaciens* ASh10(2). Также установлено, что штаммы *Pseudomonas* sp. 22, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus erythropolis* 21 и *Pseudomonas* sp. 142 NF (pNF142) способны использовать трансмиссионное масло ТАП-15В в качестве единственного источника углерода и энергии.

Выводы:

1. По результатам эксперимента выявлено, что из всех протестированных углеводородокисляющих микроорганизмов наибольшую активность по отношению ко всем исследуемым нефтепродуктам проявил штамм *Pseudomonas* sp. 142 NF (pNF142).
2. Установлено, что биосенсорная детекция нефтепродуктов может быть использована для оценки состояния объектов окружающей среды на стадии экологического мониторинга, а также при использовании биотехнологических подходов в ремедиации объектов окружающей среды. В дальнейшем предполагается продолжить данное исследование как достаточно перспективного и интересного метода контроля окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Китова, А.Е. Амперометрические микробные и ферментные биосенсоры для детекции углеводов, спиртов и нитроароматических соединений. Диссертация на соискание ученой степени к.б.н. Пущино: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. - 2009.

2. Werlen, C. Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phase by use of a pseudomonas putida biosensor / C. Werlen, Marco C.M. Jaspers, J. Roelof. // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Jan. – P. 43-51.
3. Applegate, B.M. A chromosomally based *toxCDABE* whole-cells reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene / B.M. Applegate, S.R. Kehrmeier, G.S. Saylor // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – N 64. – P. 30-35.
4. Барышникова, Л.М. Биодegradация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде / Л.М. Барышникова, В.Г. Гриценков, М.У. Аринбасаров и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 5. – С. 542-548.
5. Суровцева, Е.Г. Разрушение ароматической фракции нефти ассоциацией грамположительных и грамотрицательных бактерий / Е.Г. Суровцева, В.С. Ивойлов, С.С. Беляев // Микробиология. – 1997. – Т. 66, №1. – С. 78-83.

BIOSENSORS FOR THE ECOLOGICAL CONTROL

© 2009 A.A. Nikashina¹, P.P. Purygin¹, A.N. Reshetilov², P.V. Ilyasov²

¹ Samara State University

² Institute of Biochemistry and Microorganisms Physiologies

named after G.K. Skryabin RAS

Article is received 2009/10/05

With the purpose of a choice of the most active strains oil-destructors it is carried out cultivation of microorganisms on environments with substrata: diesel fuel, engine oil, compressor oil and transmission oil. Laboratory models of a biosensor control on the basis of the oxygen electrode modified with strains oil-destructors are created. Answers of the given microbial biosensor controls to presence at the water environment of investigated mineral oil are received. The opportunity of reception of analytical signals of membrane type biosensor for the certain marks of mineral oil is proved.

Key words: *ecological control*, strains oil-destructors, *mineral oil*, *biosensors*

Anna Nikashina, Graduate Student. E-mail:
electronasos@mail.ru

Petr Purygin, Doctor of Chemistry, Professor, Head of the
Organic, Bioorganic and Medical Chemistry Department
Anatoliy Reshetilov, Doctor of Chemistry, Professor,
Chief at the Biosensors Laboratory. E-mail:
anatol@ibpm.pushchino.ru