

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 4 (70). 2018. № 3. С. 208–218.

УДК 544.723.2:579.81.843.4:661.183

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА КАК НОСИТЕЛЯ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОМ ЭЛЕМЕНТЕ БИОСЕНСОРА

Морозкина Е. В., Шемшединова Э. Ш., Абдураманова Э. Р., Кацев А. М.

*Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение)
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: emorozkina@mail.ru*

Изучено влияние высокодисперсного кремнезема (ВДК) на биолюминесценцию морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1. Установлено, что контактное взаимодействие фотобактерий с ВДК в течение 30 мин не оказывает влияние на биолюминесценцию данных микроорганизмов. Были получены образцы *P. leiognathi* Sh1 иммобилизованные на кремнеземе. Показано, что при концентрировании *P. leiognathi* Sh1 на сорбенте увеличиваются показатели биолюминесценции в 3–3,5 раза и удельного свечения в 6–7 раз относительно свободных микроорганизмов. Рассчитана сорбционная емкость ВДК по отношению к морским светящимся бактериям. Обнаружено, что свободные и адсорбированные на ВДК микроорганизмы проявляют сходную чувствительность к действию токсических факторов: $K_2Cr_2O_7$, C_2H_5OH и $ZnSO_4$. Исследование частично выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-44-92035 p_a.

Ключевые слова: адсорбционная иммобилизация, *Photobacterium leiognathi* Sh1, биолюминесценция, высокодисперсный кремнезем, чувствительность.

ВВЕДЕНИЕ

В научных и прикладных исследованиях, связанных с биомониторингом, широко используются аналитические биосенсорные системы, в которых чувствительным элементом являются различные ферментные системы, живые клетки и микроорганизмы. Так, например, для анализа экотоксичности водных объектов применяются оптические биосенсоры на основе морских люминесцентных или генно-инженерных бактерий. Принцип их действия основан на том, что интенсивность свечения тест-бактерий служит количественным показателем реакции биологического объекта на внешнее воздействие [1].

Одной из важных задач при разработке оптических биосенсорных устройств является получение иммобилизованных на твердых подложках живых

фотобактерий, которые будут обладать оптимальными для анализа физиологическими и технологическими свойствами [2, 3]. В настоящее время существуют различные способы фиксации бактериальных клеток на поверхности или в объеме носителя, среди которых одним из наиболее простых и доступных является адсорбция и адгезия [4].

В данной работе изучаются свойства высокодисперсного кремнезема (ВДК), как носителя для иммобилизации морских светящихся тест-бактерий. В ряде работ [5, 6] показано, что особенности химической структуры поверхности ВДК позволяют использовать его в фармации и биотехнологии не только как вспомогательное вещество, но и как матрицу-носитель.

Целью данной работы было изучение адсорбционных свойств ВДК по отношению к морским люминесцентным бактериям *Photobacterium leiognathi* Sh1 и оценка возможности применения носителя для создания чувствительного элемента биосенсора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тест-культуры использованы морские светящиеся бактерии, выделенные из Азовского моря и идентифицированные ранее, как *Photobacterium leiognathi* Sh1 [7]. Бактерии выращивали в течение 20-24 ч при температуре 25° С на жидкой питательной среде (НIMEDIA, Индия). В качестве носителя для сорбции бактерий использовали ВДК – «Полисорб МП» (диоксид кремния коллоидный, АО «Полисорб» Россия, Челябинская обл., г. Копейск). Полисорб характеризуется высокой чистотой ($SiO_2 > 99,8\%$) и однородностью, обладает химической, термической, радиационной и микробиологической стойкостью, высокой адсорбционной активностью и физиологической безвредностью [5].

Образцы для изучения адсорбции бактерий готовили добавлением к сорбенту (ВДК 0, 30, 60 и 90 мг) 0,3 мл 0,1 М трис-НСl буферного раствора с рН=7,2 и 2,4 мл 3 % раствора хлорида натрия. После выдерживания полученных суспензий в течение 30 мин при температуре 25 °С для установления равновесия, в них вносили по 0,3 мл суточной бактериальной культуры, после чего образцы инкубировали 30 мин в режиме постоянного перемешивания (СВ-1, Россия). Контрольные пробы готовили без добавления сорбента. Носитель с адсорбированными бактериями отделяли от жидкой среды центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин с помощью центрифуги ОПН-3 («Дастан», Кыргызская республика).

Интенсивность биолюминесценции свободных и связанных с сорбентом фотобактерий регистрировали на биолюминометре БЛМ 8801 (Россия). Результаты биолюминесцентного анализа рассчитывали в %, как:

$$I = I/I_0 \times 100 \%,$$

где I – интенсивность биолюминесценции в присутствии ВДК; I_0 – интенсивность биолюминесценции в контроле.

Концентрацию бактерий в надосадочной жидкости оценивали по значению оптической плотности. Для пересчета значений оптической плотности в концентрацию бактериальных клеток использовали калибровочный график $y = 9 \cdot 10^{-10}x + 0,025$ описанный в работе [8]. Концентрацию бактерий на сорбенте

определяли по разности оптической плотности в контрольном образце и в среде после отделения сорбента. Измерения вели при 600 нм с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ЛОМО, Россия).

Изображения свечения фотобактерий были получены с помощью цифрового фотоаппарата Nikon D 5200 (Nikon, Япония) при диафрагме 7,1; выдержке 30 секунд; фокусном расстоянии 28 мм.

В качестве стандартных токсикантов (экоотоксиканты) для определения чувствительности полученных форм бактерий на сорбенте применяли 96 % этиловый спирт и водные растворы $K_2Cr_2O_7$ и $ZnSO_4$ (ч. д. а.) с исходными концентрациями 10 мг/мл и 0,25 мг/мл, соответственно. Результаты биотестирования представляли в виде зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации токсиканта.

Для сопоставления чувствительности микроорганизмов использовали характеристику $ЭК_{50}$ – эффективную концентрацию вещества, вызывающую 50 %-е снижение бактериальной биолюминесценции.

Все эксперименты проводили в трехкратных повторениях. Полученные результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важным этапом в создании чувствительного элемента биосенсора является подбор носителя, от которого зависят операционные характеристики сенсора, чувствительность. Используемый в работе сорбент ВДК характеризуется отсутствием пор, аморфностью, а также высокой дисперсностью (размер частиц 90 мкм, площадь удельной поверхности $300 \text{ м}^2/\text{г}$) [5]. Активные центры на поверхности частиц ВДК представлены в основном силанольными группами $\equiv Si-OH$, которые при $pH=7,2$ несут отрицательный заряд [7]. Согласно исследованиям [9, 10] удержание бактериальных организмов на поверхности кремнезема реализуется не только за счет действия физико-химических сил (в основном электростатического взаимодействия), но также обусловлено биологическими механизмами, в основе которых лежит адгезия. Данное свойство проявляется в способности микроорганизмов прикрепляться к различным поверхностям образуя клеточные скопления [11].

Поскольку данные по влиянию кремнезема на жизнедеятельность различных микроорганизмов немногочисленны и противоречивы [5, 12, 13], актуальным является изучение контактного взаимодействия *P. leiognathi* Sh1 с поверхностью ВДК. Для этого исходные образцы, содержащие бактериальную суспензию и различное количество сорбента (10, 20 и 30 мг/мл) инкубировали в течение 30 мин в режиме постоянного перемешивания. Биолюминесцентный анализ полученной суспензии показал, что интенсивность свечения морских фотобактерий в системе с ВДК практически не меняется. Это свидетельствует о том, что выбранный сорбент и возможный процесс сорбции не угнетают метаболическую активность фотобактерий (Рис. 1а).

После отделения осадка ВДК от жидкой среды был проведен повторный анализ, результаты которого показали, что интенсивность биолюминесценции надосадочной жидкости со свободными микроорганизмами уменьшается в среднем на 50 % по сравнению с контрольной суспензией бактерий без добавления сорбента (Рис. 1б). В то же время свечение фотобактерий, концентрированных на сорбенте, возросло примерно в 3–3,5 раза (Рис. 1в).

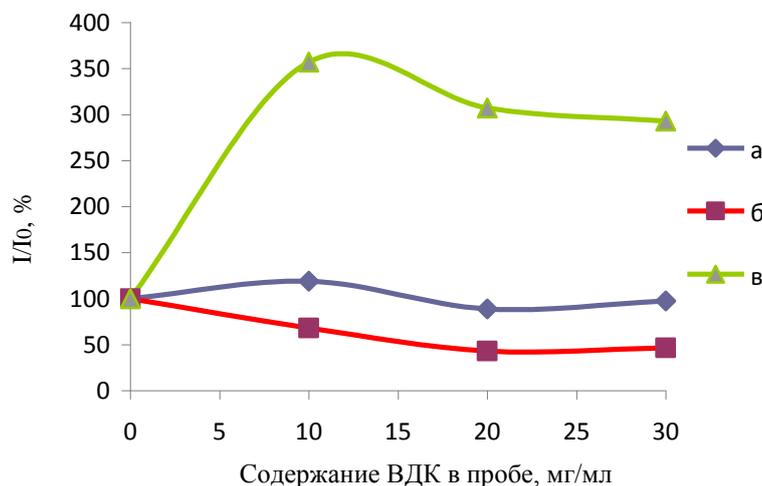


Рис. 1. Зависимость интенсивности биолюминесценции *P. leiognathi* Sh1 от количества ВДК в пробе: а – суспензии ВДК-фотобактерии после перемешивания; б – надосадочной жидкости; в – осадке ВДК-фотобактерии.

Визуальная оценка полученных образцов после разделения фаз показала, что биолюминесценция концентрируется в нижней части пробирок, во всем объеме сорбента (Рис. 2). Количество бактериальных клеток в надосадочной жидкости по результатам измерения оптической плотности ($\lambda=600$ нм) также снижалось с увеличением содержания ВДК в пробах (Рис. 3). Полученные данные согласуются с представленными выше результатами биолюминесцентного анализа.

Таким образом, было установлено, что люминесцентные бактерии адсорбируются на ВДК, что сопровождается их концентрированием и иммобилизацией на поверхности сорбента. С увеличением содержания ВДК в пробах, количество адсорбированных на кремнеземе клеток увеличивалось и достигало максимального значения $1,03 \cdot 10^8$, при содержании сорбента в количестве 30 мг/мл. Расчёты показали, что в зависимости от содержания ВДК в пробе, максимальное количество иммобилизованных бактериальных клеток составило 89,6 %, а сорбционная емкость – $1,14 \cdot 10^6$ – $1,67 \cdot 10^6$ кл/мг сорбента (таблица 1).

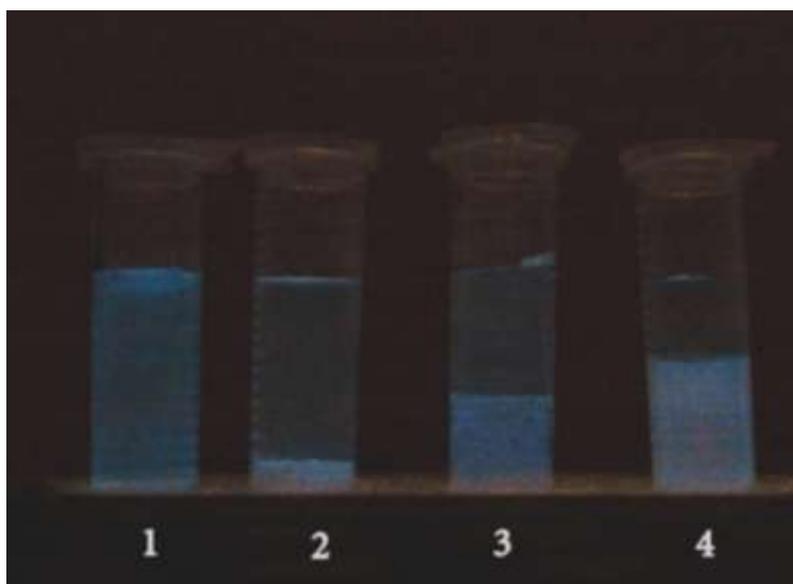


Рис. 2. Фотографическое изображение образцов, полученных в темноте под действием собственного излучения бактерий *P. leiognathi* Sh1, с различным содержанием ВДК (мг/мл): 1 – 0 (контроль); 2 – 10; 3 – 20; 4 – 30.

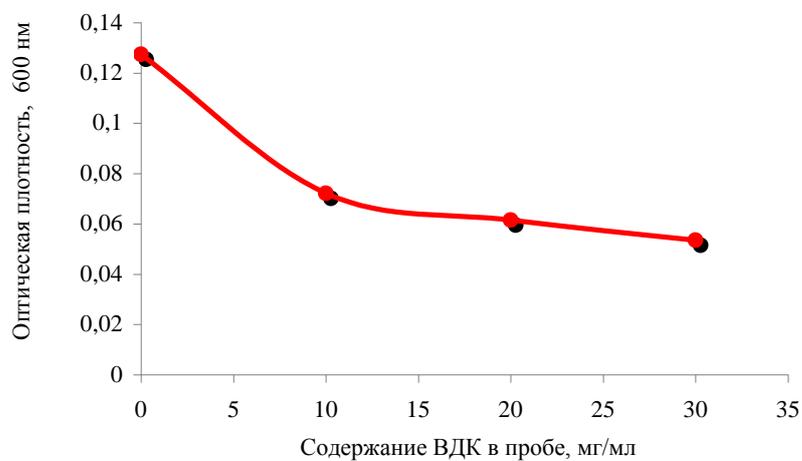


Рис. 3. Значения оптической плотности в надосадочной жидкости в пробах с различным содержанием ВДК.

Таблица 1

Характеристика свободных и связанных с ВДК *P. leiognathi* Sh1

Концентрация ВДК в пробе		Оптическая плотность	Кол-во бактерий, кл	Сорбционная емкость ВДК, кл/мг	Кол-во бактерий, %
Контроль без ВДК		0,1275	$1,15 \cdot 10^8$		
10 мг/мл	надосадочная жидкость	0,0721	$6,50 \cdot 10^7$		
	осадок		$5,00 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^6$	43,5
20 мг/мл	надосадочная жидкость	0,0615	$4,00 \cdot 10^7$		
	осадок		$7,50 \cdot 10^7$	$1,25 \cdot 10^6$	65,2
30 мг/мл	надосадочная жидкость	0,0535	$1,25 \cdot 10^7$		
	осадок		$1,03 \cdot 10^8$	$1,14 \cdot 10^6$	89,6

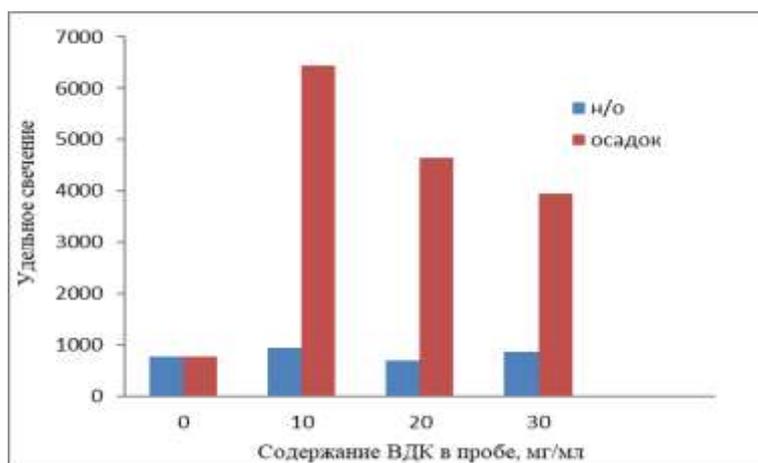


Рис. 4. Удельное свечение свободных и иммобилизованных бактерий

Оценка удельной биолюминесценции бактерий в процессе адсорбции показала, что удельное свечение иммобилизованных бактерий возрастает в 4–7 раз по отношению к свободным, в то время как удельная люминесценция свободных бактерий практически не меняется (Рис. 4). Этот факт, вероятно, связан с явлением

quorum sensing (QS). QS это процесс коллективной координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредующий специфическое поведение клеток, в частности, их способность к биолюминесценции [14]. Адсорбция фотобактерий на поверхности сорбента приводит к увеличению концентрации аутоиндукторов, которые запускают экспрессию генов в популяции бактерий, ответственных за биолюминесценцию. В результате чего интенсивность свечения в системе возрастает.

Ключевым параметром биосенсора, определяющим его операционные характеристики, наряду с удельным свечением, является чувствительность к действию токсикантов. Для оценки чувствительности полученных иммобилизованных форм бактерий было проведено сравнительное исследование со свободными фотобактериями в эксперименте по ингибированию биолюминесценции (тест на острую биотоксичность) тремя веществами с различным механизмом проявления токсичности: $K_2Cr_2O_7$, C_2H_5OH и $ZnSO_4$.

Результаты показали, что бихромат калия обладал более сильным действием на иммобилизованные бактерии (Рис. 5). При этом $ЭК_{50}$ ($K_2Cr_2O_7$) составила 0,4 мг/мл для свободных и 0,3 мг/мл для иммобилизованных. Для $ZnSO_4$ ингибирование свечения на 50 % наблюдалось при концентрациях 0,0045 мг/мл для свободных и 0,0064 мг/мл для иммобилизованных, соответственно (Рис. 6). В этих же условиях эффективная концентрация C_2H_5OH составила 0,113 мг/мл как для свободных, так и для иммобилизованных бактерий (Рис. 7).

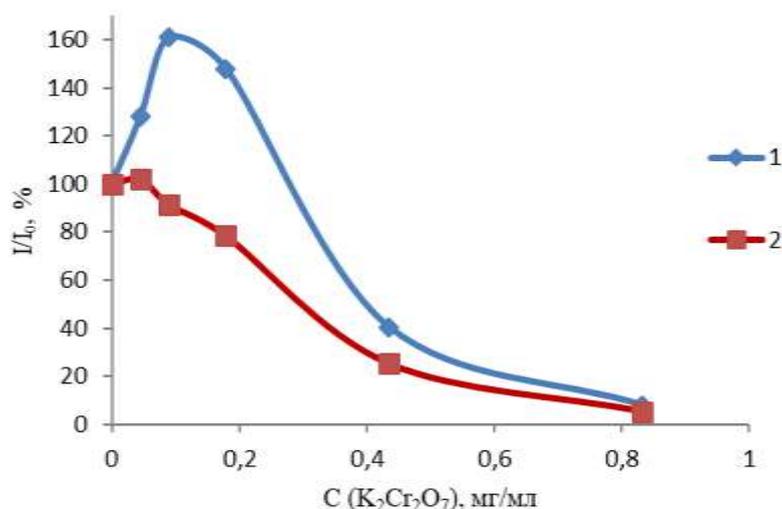


Рис. 5. Тушение свечения свободных (1) и иммобилизованных на ВДК (2) *P. leiognathi* Sh1 $K_2Cr_2O_7$.

Установлено, что кривые ингибирования свечения иммобилизованных бактерий при действии $K_2Cr_2O_7$, $ZnSO_4$ и C_2H_5OH в режиме 15-минутного эксперимента практически не отличаются от кривых затухания свечения свободных

клеток. Величины чувствительности к токсикантам иммобилизованных форм ($ЭК_{50}$) близки к значениям, полученным при применении в качестве тест-объекта свободных клеток. Отмечено небольшое различие кривых ингибирования свободных и иммобилизованных клеток $K_2Cr_2O_7$.

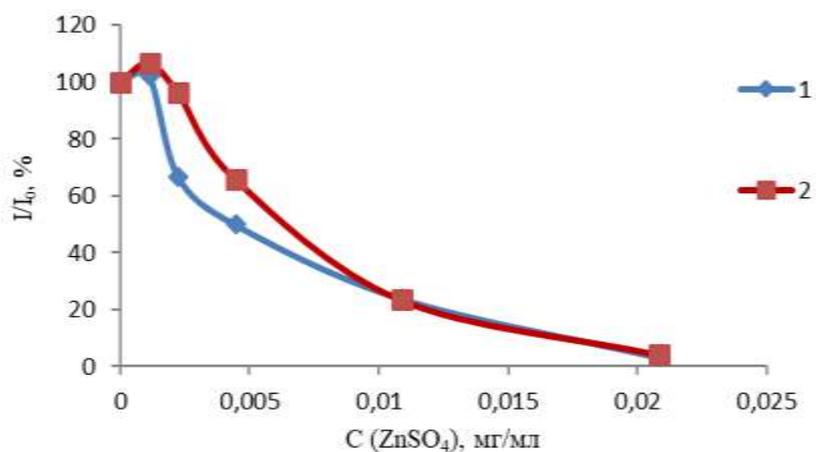


Рис. 6. Тушение свечения свободных (1) и иммобилизованных на ВДК (2) *P. leiognathi* Sh1 $ZnSO_4$.

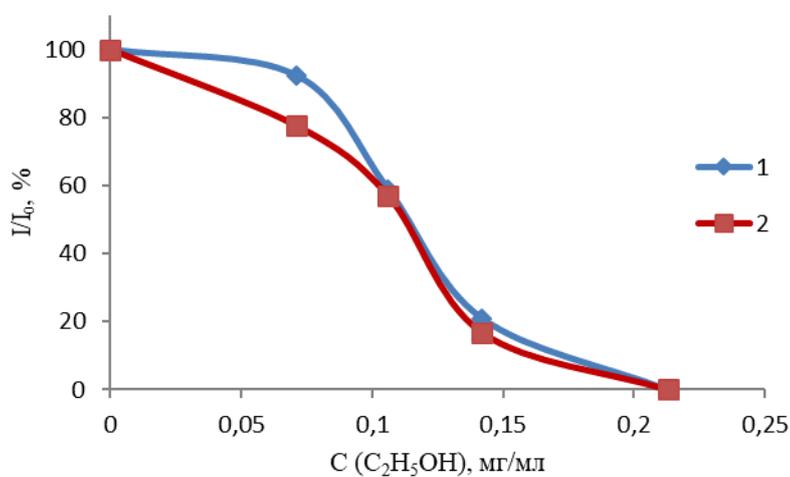


Рис. 7. Тушение свечения свободных (1) и иммобилизованных на ВДК (2) *P. leiognathi* Sh1 C_2H_5OH .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что при инкубировании фотобактерий с ВДК происходит адсорбционная иммобилизация светящихся бактерий на носителе.
2. Установлено, что при адсорбционной иммобилизации удельная люминесценция связанных бактерий возрастает в 4–7 раз.
3. Отмечено, что бактерии, иммобилизованные на ВДК, обладают схожей чувствительностью со свободными бактериями к таким токсическим факторам, как $ZnSO_4$, $K_2Cr_2O_7$, C_2H_5OH .

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-44-92035 p_a.

Список литературы

1. Дерябин Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 248 с.
2. Ефременко Е. Н. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* для биомониторинга экотоксикантов / Е. Н. Ефременко [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, №5. – С. 490–496.
3. Исмаилов А. Д. Фотобиосенсоры на основе светящихся бактерий / А. Д. Исмаилов, Л. Э. Алескерова // Биохимия. – 2015. – Т. 80, №6. – С. 867–881.
4. Кудряшов А. П. Биосенсорные устройства: Курс лекций / А. П. Кудряшов – Минск: БГУ, 2003. – 113 с.
5. Чуйко А. А. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / А. А. Чуйко – Киев: Наукова думка, 2003. – 415 с.
6. Погорелый В. К. Закономерности адсорбции природных биоактивных соединений на поверхности нанодисперсного кремнезема / В. К. Погорелый // Поверхность. – 2009. – Вып. 1 (16). – С. 322–349.
7. Кацев А. М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А. М. Кацев, Дж. Макемсон // Ученые записки ТНУ им. В. И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2006. – Т. 19, №4. – С. 111–116.
8. Абдураманова Э. Р. Функциональные характеристики свободных и иммобилизованных на неорганических носителях фотобактерий Черного и Азовского морей / Н. В. Наумова, Л. М. Дерзян, А. М. Кацев // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2018. – Т. 4 (70), №1. – С. 179–187.
9. Айлер Р. Химия кремнезема / Р. Айлер. – М.: Мир, 1982. Ч. 1. – 416 с.
10. Серегина Н. В. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии / Н. В. Серегина, Т. В. Честнова, В. А. Жеребцова, В. А. Хромушин // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. 15, №3. – С. 175–177.
11. Micheline E. Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes / Micheline E., Roda A. // Anal Bioanal Chem. – 2012. – Vol. 402. – P. 1785–179.
12. Alvarez G. S., Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices / M. L. Foglia, G. J. Copello, M. F. Desimone, L. E. Diaz [et al] // Appl Microbiol Biotechnol. – 2009. – Vol. 82. – P. 639–646.
13. Крупская Т. В. Взаимодействие кремнезема с клеточной поверхностью дрожжей и состояние межфазной воды в зоне их контакта / Т. В. Крупская [и др.] // Украинский химический журнал. – 2008. – Т. 74, № 2. – С. 84–91.
14. Mangwani N. Bacterial Quorum Sensing: Functional Features and Potential Applications in Biotechnology / H. R. Dash, A. Chauhan, S. Das // J. Mol. Microbiol Biotechnol – 2012. – №22. – P. 215–227.

**HIGH DISPERSED SILICA APPLICABILITY AS A CARRIER OF THE
BIOSENSOR SENSITIVE ELEMENT**

Morozkina E. V., Shemshedinova E. Sh., Abduramanova E. R., Katsev A. M.

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

E-mail: emorozkina@mail.ru

Recently a special attention to luminescent biosensors based on immobilized photobacterial cells has been paid. The selection of a carrier to immobilize luminous bacteria is an important step in the biosensor sensitive element creation. Highly dispersed amorphous silica is a perspective sorbent for the luminescent bacteria immobilization.

The aim of this work was to study the highly dispersed silica adsorption activity to the bioluminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* Sh1 and the applicability of this carrier for the biosensor sensitive element creation.

It has been established that highly dispersed silica does not affect the vital activity of bioluminescent bacteria. Samples of *P. leiognathi* Sh1 bound by a carrier of different concentrations were obtained. Concentration of photobacteria in highly dispersed silica was accompanied by an increase in their luminescence comparing to control. Photographic images of the luminescence of samples containing free and sorbent-bound luminescent bacteria were obtained. The visual evaluation of the obtained samples correlates with the data of the bioluminescence study and shows an increase in intensity of the light emission of the sediment relative to the control.

According to the difference in the optical density of the control sample and the superposition liquid of the obtained samples the concentration of bacteria on the sorbent and its sorption capacity in relation to this type of microorganisms were determined. Specific luminescence parameters based on the optical density and bioluminescence data were calculated.

The sensitivity of free and immobilized bacteria on highly dispersed silica to the $ZnSO_4$, $K_2Cr_2O_7$ and C_2H_5OH was studied. To assess the sensitivity of obtained samples the effective concentration of substance that causes 50 % reduction of bacterial suspension bioluminescence (EC_{50}) was determined. It was established that immobilized and free cells of luminescent bacteria indicate similar sensitivity to the selected toxicants.

Keywords: adsorption immobilization, *Photobacterium leiognathi* Sh1, bioluminescence, high-dispersed silica, sensitivity.

References

1. Deryabin D. G., *Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects*, 248 p. (Science, Moscow, 2009). (in Russ).
2. Efremenko E. N., Senko O. V., Aleskerova L. E., Alenina K. A., Mazhul M. M., Ismailov A. D., Biosensors based on the luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* immobilized in polyvinyl alcohol cryogel for the monitoring of ecotoxicants, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **50** (5), 477, (2014). (in Russ).
3. Ismailov A. D., Aleskerova L. E., Photobiosensors based on luminous bacteria, *Biochemistry*, **80** (6), 867, (2015). (in Russ).
4. Kudryashov A. P. *Biosensors device: Course of lecture*, 113 p. (BSU, Minsk, 2003). (in Russ).

5. Chuyko A. A. *Medical Chemistry and Clinical Application of Silicon Dioxide*, 415 p. (Naukova Dumka, Kiev, 2003) (in Russ).
6. Pogorely V. K., Patterns of adsorption of natural bioactive compounds on the surface of silica nanodispersed, *Surface*, **1** (16), 322 (2009)
7. Katsev A. M., Makemson J., Identification of luminous bacteria, isolated from Black and Azov seas, *Scientific Notes of V. I. Vernads TNU, series «Biology, chemistry»*, **19** (4), 111, (2006). (in Russ).
8. Abduramanova E. R., Naumova N. V., Derzyan L. M., Katsev A. M., Functional characteristics of free and immobilized photobacterial of Black and Azov seas, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University, series «Biology, chemistry»*, **4** (70), 179, (2018). (in Russ).
9. Iler R. *Chemistry of silica*, 416 p. (Mir, Moscow, 1982). (in Russ).
10. Seregina N. V., Chestnova T. V., Zherebtsova V. A., Khromushin V. A., Review of biophysical features of microbial adhesion, *Journal of New Medical Technologies*, **15** (3), 175, (2008). (in Russ).
11. Micheli E., Roda A., Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes, *Anal Bioanal Chem*, **402**, 1785, (2012).
12. Alvarez G. S., Foglia M. L., Copello G. J., Desimone M. F., Diaz L. E., Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices, *Applied Microbial Biotechnology*, **82**, 639 (2009)
13. Krupskaya T. V., Gunko V. M., Barvinchenko V. N., Turov V. V., Shulga O. V., Interaction of silica with cell surface of yeast and state of interphase water in the zone of their contact, *Ukrainian Chemical Journal*, **74**, (2), 84, (2008). (in Russ).
14. Mangwani N., Dash H. R., Chauhan A., Das S., Bacterial Quorum Sensing: functional features and potential applications in biotechnology, *Journal Mol Microbiol Biotechnol*, **22**, 215 (2012).