

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ И ОЦЕНКА ИХ ПРИМЕНИМОСТИ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

А. М. Кацев¹

Э. Р. Абдурманова¹

Н. Ф. Стародуб²

¹Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского, Симферополь

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

E-mail: nikstarodub@yahoo.com

Для проведения биоанализов осуществлена иммобилизация светящихся бактерий *Vibrio fischeri* F1, *Vibrio harveyi* Ms1 и *Photobacterium phosphoreum* F2, выделенных из Черного моря, и бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1 — из Азовского моря, на неорганических носителях, в частности на фосфате и карбонате кальция, оксиде и гидроксиде алюминия. Установлено, что при использовании фосфата кальция и гидроксида алюминия наблюдалось уменьшение суммарной интенсивности свечения в среде до 20–70%. В случае применения карбоната кальция и оксида алюминия в качестве сорбентов биолюминесценция возрастала до 120–160% относительно контрольных значений. Последние два носителя выбраны для дальнейших исследований и показано, что максимальный уровень адсорбции на них достигается в течение 2 ч при концентрации бактерий более $2,6 \cdot 10^8$ кл/мл. Бактериальные клетки достаточно прочно удерживаются на сорбентах и не смываются 3%-м раствором NaCl, а также сохраняют начальный уровень биолюминесценции в три раза дольше, чем бактериальная суспензия. В адсорбированном и свободном виде светящиеся бактерии проявляют сходную чувствительность к действию токсических факторов, что было показано с использованием хлорида цинка в качестве вещества для тестирования состояния биолюминесцентных систем.

Ключевые слова: биолюминесцентные бактерии, иммобилизация, неорганические носители, чувствительность к хлориду цинка, биосенсорные устройства.

В настоящее время для быстрого анализа биоцидности (токсичности) широко применяются биотестирование. Среди различных разработанных биотестов, использующих живые организмы в качестве чувствительных структур, особый интерес вызывают основывающиеся на морских светящихся бактериях, обладающих способностью излучать в результате жизнедеятельности свет в синезеленой области спектра. Биоцидность при этом определяется по уменьшению интенсивности бактериальной люминесценции в ответ на введение исследуемого объекта [1, 2]. С целью наиболее полного обеспечения требований практики сегодня активно разрабатываются биосенсорные устройства, позволяющие проводить простой, высокочувствительный и экспрессный анализ. Эти устройства находят применение во многих странах мира для контроля качества воды, оценки токсичности сточных вод, определе-

ния биологического действия новых лекарственных веществ [3, 4]. Основная проблема при их создании состоит в поиске подходов для эффективной иммобилизации бактерий на твердой фазе, составляющей чувствительный элемент биосенсора. В литературе описано применение широкого спектра сорбентов для иммобилизации микроорганизмов, включая поливиниловый спирт, агарозный, сефарозный и альгинатный гели, поликарбамоилсульфонат, микропористые фильтры, полимеры из сульфонатстирена, дивинилбензена и др. [5–11]. Однако многие из них не могут быть использованы для включения светящихся бактерий в биосенсор из-за критического уровня потери ими функциональных свойств. В частности, согласно нашим предварительным исследованиям среди указанных выше гелей лишь сформированный на основе сефарозы позволял в какой-то мере регистрировать биолю-

минесценцию клеток [12]. Поэтому поиск твердой фазы для включения клеток светящихся бактерий и создания на их основе оптических биосенсоров является весьма актуальной задачей. Целью настоящей работы явилось изучение функциональных характеристик светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей, после сорбции их на неорганических носителях, а также оценка применимости иммобилизованных таким образом бактерий для биотестирования.

Материалы и методы

В работе использованы морские светящиеся бактерии *Vibrio fischeri* F1 IMB B-7070, *Vibrio harveyi* Ms1 и *Photobacterium phosphoreum* F2 IMB B-7071, выделенные из Черного моря, а также бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1 — из Азовского моря [13]. Бактерии выращивали в течение 16–18 ч на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): пептон — 5; дрожжевой экстракт — 2,5; NaCl — 30; $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ — 15; $(NH_4)_2HPO_4$ — 0,5; $MgSO_4$ — 0,1; глицерол — 1 мл/л. Культивирование проводили при различных температурных режимах: *P. phosphoreum* — при 15–20° С, *V. fischeri*, *V. harveyi* Ms1 — 20–25° С, *P. leiognathi* Sh1 — 28–32° С.

В качестве носителей для сорбции бактерий использовали фосфат и карбонат кальция, оксид и гидроксид алюминия. Сорбенты предварительно промывали фосфатным буферным раствором (рН = 7,1). Навеску сорбента 50 мг смешивали с 0,9 мл питательной среды и 0,1 мл суточной бактериальной культуры. Систему помещали в термостат и инкубировали в течение 2 и 20 ч при оптимальной для каждого вида бактерий температуре: *P. phosphoreum* — 20° С; *V. fischeri* и *V. harveyi* — 25° С; *P. leiognathi* — 30° С. Контрольные образцы готовили без добавления сорбентов. Носитель с адсорбированными бактериями отделяли от среды центрифугированием в течение 10 мин при 1 000 об/мин с последующей трехкратной промывкой 3%-м раствором хлорида натрия.

Количество адсорбированных на носителе бактерий и их биолюминесценцию определяли по разности оптической плотности и интенсивности свечения суспензии в контрольном образце и в среде после отделения сорбента.

Стабильность полученных образцов оценивали по уменьшению интенсивности биолюминесценции во времени. Для этого бак-

терии, иммобилизованные на неорганических носителях, помещали в холодильник при температуре +8° С. Периодически, в течение нескольких дней, отбирали пробы и определяли интенсивность их биолюминесценции. В качестве контроля использовали суспензию светящихся бактерий, которую готовили так же, как и иммобилизованную культуру, и выдерживали в тех же условиях.

В процессе изучения применимости полученных иммобилизованных форм светящихся бактерий для биотестирования использовали хлорид цинка (действие Zn^{2+}) в качестве вещества, подлежащего анализу. Результаты биотестирования представляли в виде эффективной концентрации вещества, ингибирующей биолюминесценцию на 50%, — ЭК₅₀. Концентрацию бактерий определяли по оптической плотности суспензии при $\lambda = 600$ нм. Измерение биолюминесценции проводили на биолюцинометре БЛМ-8801 — СКТБ «Наука» (Россия).

Результаты и обсуждение

Установлено, что светящиеся бактерии при контакте с неорганическими носителями концентрируются на них, что сопровождается уменьшением числа клеток в жидкой фазе. При анализе оптической плотности жидкой фазы выявлено, что около 90% всех бактерий переходят на твердую фазу. Эта величина зависела от типа носителя и штамма светящихся бактерий (табл. 1). Интенсивность биолюминесценции бактерий в процессе адсорбции может как увеличиваться, так и уменьшаться. Так, при использовании фосфата кальция и гидроксида алюминия наблюдалось уменьшение суммарной интенсивности свечения в среде до 20–70%, а для карбоната кальция и оксида алюминия биолюминесценция возрастала до уровня 120–160% от контрольных значений.

Количество адсорбированных бактерий и их свечение не всегда коррелировали между собой, что свидетельствует о влиянии сорбента и процесса адсорбции на метаболические процессы в бактериальных клетках. Дальнейшие эксперименты проводили с использованием оксида алюминия и карбоната кальция, адсорбция бактерий на которых сопровождалась общим увеличением интенсивности их свечения.

Детальное изучение процесса адсорбции светящихся бактерий на выбранных неорганических носителях осуществляли, определяя зависимость биолюминесценции носителя с адсорбированными бактериями от

Таблица 1. Характеристики адсорбции светящихся бактерий на неорганических носителях

Штамм	Сорбент	Интенсивность биолюминесценции, %	Количество бактерий, %
<i>V. fischeri</i> F1	CaCO ₃	188,9	48,4
	Al ₂ O ₃	51,4	71,5
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	13,9	92,5
	Al(OH) ₃	14,5	75,9
<i>V. harveyi</i> Ms1	CaCO ₃	101,6	34,5
	Al ₂ O ₃	152,8	24,3
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	34,5	43,2
	Al(OH) ₃	25,4	27,9
<i>P. phosphoreum</i> F2	CaCO ₃	126,8	19,3
	Al ₂ O ₃	159,2	48,2
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	58,8	71,4
	Al(OH) ₃	5,4	77,2
<i>P. leiognathi</i> Sh1	CaCO ₃	116,8	14,5
	Al ₂ O ₃	83,8	71,9
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	43,6	42,8
	Al(OH) ₃	6,4	35,9

концентрации внесенных бактерий. Результаты представляли в виде изотермы адсорбции, дающей возможность оценить значение максимальной адсорбции и получить представление о толщине адсорбционного слоя. Дополнительный анализ изотермы может дать математическое описание процесса адсорбции. Для ее построения был выбран период инкубации бактерий в присутствии носителя в течение 2 ч, с тем чтобы достичь адсорбционного равновесия. Именно этот период, согласно нашим контрольным наблюдениям, был недостаточным для заметного роста бактериальной культуры. Как показали исследования, максимальный уровень адсорбции наблюдался при начальной концентрации бактерий от $2,6 \cdot 10^8$ кл/мл и выше (рис. 1). Отсутствие второго максимума на полученной кривой дает основание считать, что образуется только один адсорбционный слой (по аналогии с мономолекулярной адсорбцией Гиббса).

С увеличением времени инкубации носителя и бактериальной культуры до 20 ч для обеспечения роста бактерий в среде до стационарной стадии наблюдалось снижение количества адсорбированных бактерий и общей интенсивности биолюминесценции образцов. Процесс адсорбции в этих условиях усложнялся, уровень максимальной адсорбции сдвигался в область больших концентраций бактериальных клеток, а на изотерме

адсорбции появлялся дополнительный максимум. Судя по характеру кривой при 20 ч культивирования, можно предположить, что происходит адсорбция с формированием нескольких адсорбционных слоев. Первый слой образуется в течение первых 2 ч инкубации при концентрации бактериальных клеток в среде $2,6 \cdot 10^8$ кл/мл и выше. При большей концентрации клеток светящихся бактерий в среде происходит формирование следующего слоя, что приводит к затуханию биолюминесценции уже адсорбированных клеток и снижению общей интенсивности свечения образцов.

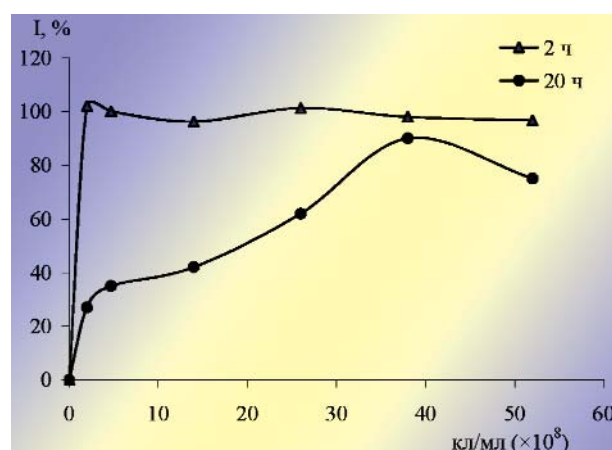


Рис. 1. Изотерма адсорбции *P. leiognathi* Sh1 на оксиде алюминия

Сформированные адсорбционные слои светящихся бактерий относительно прочно удерживались носителем, что было установлено при изучении десорбционных процессов на оксиде алюминия. При трехкратной промывке сорбентов 3%-м раствором NaCl концентрация бактерий и интенсивность свечения в надосадочной жидкости снижались в 2–2,5 раза за цикл, в то время как в твердой фазе оставались относительно постоянными.

Таблица 2. Изучение десорбции бактерий с оксида алюминия

Количество промываний	Интенсивность биолюминесценции в твердой фазе, %	Интенсивность биолюминесценции в надосадочной жидкости, %
0	100	100
1	100	40
2	97	15
3	93	6

При создании биосенсорных устройств на основе иммобилизованных светящихся бактерий важной задачей является сохранение чувствительности биологического элемента при биотестировании. Адсорбция бактерий на неорганических носителях, как отмечалось выше, может приводить к повышению общего уровня бактериальной люминесценции, что, очевидно, свидетельствует о благоприятных физиологических условиях. С целью определения стабильности полученных иммобилизованных форм бактерий была изучена зависимость интенсивности их биолуминесценции во времени (рис. 2). Исследования проводили с использованием носителей, выбранных на предыдущих стадиях работы: оксидом алюминия и карбонатом кальция. Как следует из приведенной гистограммы, иммобилизация светящихся бактерий способствовала значительному увеличению стабильности по сравнению с контролем. В качестве контроля использовали бактериальную суспензию на жидкой питательной среде, которую обычно применяют для биотестирования токсичности. Результаты показали, что полученные формы светящихся бактерий могут храниться в три раза дольше, сохраняя при этом высокую интенсивность биолуминесценции, в пределах 80% от начальных значений.

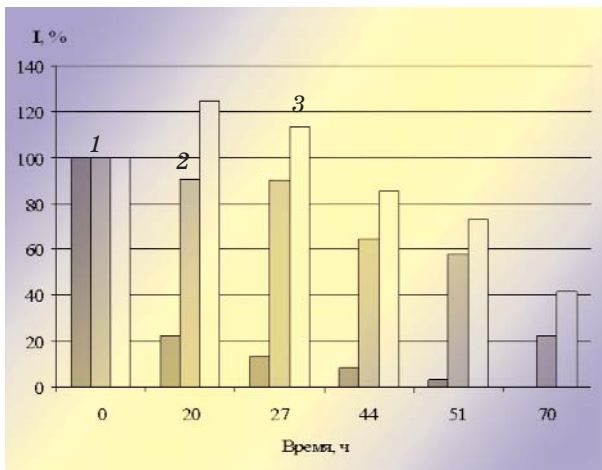


Рис. 2. Оценка стабильности биолуминесценции иммобилизованных препаратов:

1 — контроль (суспензия бактерий); 2 — бактерии, иммобилизованные на карбонате кальция; 3 — бактерии, иммобилизованные на оксиде алюминия

Увеличение стабильности и общей интенсивности биолуминесценции иммобилизованных образцов светящихся бактерий, на наш взгляд, может быть обусловлено таким их свойством, как quorum sensing (дистан-

ционные микроб-микробные взаимодействия). Заключається оно в том, что при низком содержании в среде (например, в морской воде) бактериальные клетки практически не излучают свет. При большой концентрации фотобактерий достигается пороговая концентрация аутоиндуктора, которая запускает экспрессию соответствующих генов, ответственных за их биолуминесценцию, и клетка начинает светиться. На частицах сорбента во время иммобилизации бактерий может происходить аналогичное явление. Клетки бактерий концентрируются на поверхности носителя, что приводит к высоким локальным значениям концентрации аутоиндуктора. Результатом этого является более высокая интенсивность бактериальной биолуминесценции. Бактерии, иммобилизованные на сорбенте, существуют и реагируют уже не как отдельные клетки, а как сообщество, что обуславливает и большую стабильность свечения образцов во времени.

В связи с выдвинутым предположением важным вопросом является чувствительность иммобилизованных бактерий к действию токсических факторов, что и будет определять перспективность их применения в составе биосенсоров. В качестве токсического фактора в работе был выбран хлорид цинка, часто используемый для проверки работоспособности коммерческих тест-систем на основе светящихся бактерий. При 15-минутном тесте эффективная концентрация сульфата цинка, приводящая к уменьшению уровня биолуминесценции на 50% ($ЭК_{50}$), согласно международным стандартам составляет 3,0–10,0 мг/л [14, 15].

Сравнение чувствительности различных штаммов светящихся бактерий, иммобилизованных на неорганических носителях, к действию ионов цинка, показало, что максимальные значения этого показателя наблюдались для *P. phosphoreum* F2 и *P. leiognathi* Sh1 при использовании в качестве носителя оксида алюминия. В целом сохранялась сходная чувствительность биотестов на иммобилизованных и свободных формах светящихся бактерий (табл. 3).

Таким образом, инкубация светящихся бактерий с неорганическими носителями позволяет получить их иммобилизованную форму для проведения биоанализов. Установлено, что при иммобилизации бактерий на карбонате кальция и оксиде алюминия их биолуминесцентные свойства усиливаются, а в случае использования фосфата кальция и гидроксида алюминия в качестве сорбента — снижаются. Максимальный

Таблица 3. Сравнение эффективной концентрации ($ЭК_{50}$) хлорида цинка в биолюминесцентных тестах на свободных и иммобилизованных светящихся бактериях

Штамм	$ЭК_{50}$ ($ZnCl_2$), мкг/мл					
	Контроль	$CaCO_3$	Al_2O_3	$Ca_3(PO_4)_2$	$Al(OH)_3$	Сред. знач.
<i>V. fischeri</i> F1	26,2	2,6	18,6	27,2	2	15,3
<i>P. phosphoreum</i> F2	0,9	3,8	4,0	1,9	1,3	2,4
<i>V. harveyi</i> Ms1	4,8	35,2	1,9	47,6	34,3	24,8
<i>P. leiognathi</i> Sh1	7,2	22,5	6,3	19,6	6,0	12,3
Среднее значение $ЭК_{50}$, мкг/мл	9,8	16,0	7,7	24,1	10,9	13,7

уровень адсорбции бактерий на неорганических носителях достигается в течение 2 ч при их начальной концентрации более $2,6 \cdot 10^8$ кл./мл. Бактериальные клетки относительно прочно удерживаются на сорбенте и не смываются при обычной промывке 3% -м раствором NaCl. Светящиеся бактерии, иммобилизованные на оксиде алюминия и кар-

бонате кальция, обладают в три раза большей стабильностью свечения, чем суспензия бактерий в жидкой среде. Светящиеся бактерии в адсорбированном и свободном виде проявляют подобную чувствительность к действию токсических факторов, что было показано на примере использования в качестве тест-агента хлорида цинка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Girotti S., Bolelli L., Roda A. et al. Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria // Anal. Chim. Acta. — 2002. — V. 471. — P. 113–120.
2. Girotti S., Ferri E. N., Fumo M. G., Maiolini E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria // Ibid. — 2008. — V. 608. — P. 2–29.
3. Mitchell R. J., Gu M. B. Characterization and optimization of two methods in the immobilization of 12 bioluminescent strains // Biosens. Bioelectr. — 2006. — V. 22. — P. 192–199.
4. Gomez-Hens A., Aguilar-Caballo M. P. Modern analytical approaches to high-throughput drug discovery // Trends Anal. Chem. — 2007. — V. 26, N 3. — P. 171–182.
5. Davis G. Advances in Biomedical Sensor Technology: a Review of the 1985 Patent Literature // Biosensors. — 1986. — V. 2. — P. 101.
6. Riedel K., Renneberg R., Kuhn M., Scheller F. A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensors // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1988. — V. 28 — P. 316–318.
7. Goldblum D. K., Holodnick S. E., Mancy K. H., Briggs D. E. Oxygen Membrane Electrode Used as a Toxicity Biosensor // Environ. Progr. — 1991. — V. 10. — P. 24–29.
8. Palmquist E., Kriz Ch. B., Khayyami M. et al. Development of a simple detector for microbial metabolism, based on a polypyrrole dc resistometric device // Biosens. Bioelectr. — 1994. — V. 9 — P. 551–556.
9. Kim M.-N., Kwon H.-S. Biochemical oxygen demand using *Serratia marcescens* LSY 4 // Ibid. — 1999. — V. 14. — P. 1–7.
10. Konig A., Riedel K., Metzger J. W. A microbial sensor for detecting inhibitors of nitrification in wastewater // Ibid. — 1998. — V. 13. — P. 869–874.
11. Семенчук И. Н., Таранова Л. А., Илясов П. В., Решетилов А. Н. Селективность микробного биосенсора при различных способах иммобилизации бактерий-деструкторов // Хим. технол. воды. — 1998. — Т. 20. — С. 649–655.
12. Starodub N. F. Biosensor control of acute total toxicity of water and soil polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons // NATO Proceedings «Mud Volcanoes, Geodynamics and Seismicity». — G. Martineli and B. Panahi, Eds. — Springer, 2005. — P. 221–226.
13. Кацев А. М., Макемсон Дж. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». — 2006. — Т. 19(58), № 4. — С. 111–116.
14. Microtox® bioassay *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 // Ocean Sci. J. — 2005. — V. 40, N2. — P. 91–100.
15. ASTM D5660–96. Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with Luminescent Marine Bacterium. — 2004. — 9 p.

ІММОБІЛІЗАЦІЯ БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ БАКТЕРІЙ НА НЕОРГАНІЧНИХ НОСІЯХ ТА ОЦІНКА ПРИДАТНОСТІ ЇХ ДЛЯ БІОТЕСТУВАННЯ

А. М. Кацев¹
Е. Р. Абдураманова¹
М. Ф. Стародуб²

¹Кримський державний медичний університет ім. С. І. Георгієвського, Сімферополь
²Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

E-mail: nikstarodub@yahoo.com

Для проведення біоаналізів здійснено іммобілізацію біолоюмінесцентних бактерій *Vibrio fischeri* F1, *Vibrio harveyi* Ms1 і *Photobacterium phosphoreum* F2, що виділені з Чорного моря, та *Photobacterium leiognathi* Sh1 — з Азовського моря, на неорганічних носіях, зокрема на фосфаті й карбонаті кальцію та оксиді й гідроксиді алюмінію. Встановлено, що в разі використання фосфату кальцію та гідроксиду алюмінію спостерігається зменшення загальної інтенсивності світіння в середовищі до 20–70%. У випадку застосування як сорбентів карбонату кальцію й оксиду алюмінію біолоюмінесценція зростала до 120–160% відносно контрольних значень. Останні два носії було вибрано для подальших досліджень і показано, що максимальний рівень адсорбції бактерій на них досягається протягом 2 год за початкової концентрації клітин понад $2,6 \cdot 10^8$ кл/мл. Бактеріальні клітини достатньо міцно тримаються на сорбентах і не змиваються з них 3%-м розчином NaCl. В адсорбованому й у вільному вигляді світні бактерії виявляють схожу чутливість до дії токсичних факторів, що було показано з використанням хлориду цинку як речовини для тестування стану біолоюмінесцентних систем.

Ключові слова: біолоюмінесцентні бактерії, іммобілізація, неорганічні носії, чутливість до хлориду цинку, біосенсорні пристрої.

IMMOBILIZATION OF BIOLUMINESCENT BACTERIA ON THE NONORGANIC SUBSTANCES AND ESTIMATION OF THEIR ABILITY FOR BIOTESTING

A. M. Katsev¹
E. P. Abduramanova¹
N. F. Starodub²

¹Crimean State Medical University named after S. I. Georgievsky, Simpheropol
²National University of Life and Environmental Science of Ukraine, Kyiv

E-mail: nikstarodub@yahoo.com

In order to fulfill biotesting it was accomplished the immobilization of bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* F1, *Vibrio harveyi* Ms1, *Photobacterium phosphoreum* F2 and *Photobacterium leiognathi* Sh1 isolated from Black and Azov seas on the nonorganic substances, namely: calcium phosphate and carbonate as well as alumina oxide and hydroxide. It was stated that the total intensity of bioluminescence decreased up to 20–70% when calcium phosphate and alumina hydroxide were applied. If calcium carbonate and alumina oxide were used as sorbents, bioluminescence increased up to 120–160% in comparison with the control level. Both last sorbents were chosen for the next investigations and it was demonstrated that the maximal level of bacteria adsorption may be achieved after 2 hours, when their concentration exceeded $2,6 \cdot 10^8$ cells/ml. Bacterial cells are relatively strong fixed and they do not remove under washing with NaCl solution (3%). Similar sensitivity to the influence of toxic substances of adsorbed and free bacteria have been shown. It was demonstrated in the experiments with zinc chloride as traditional test for investigation of bioluminescent systems state.

Key words: bioluminescent bacteria, immobilization, nonorganic sorbents, sensitivity to zinc chloride, biosensors.