

ЧУТЛИВИЙ ЕЛЕМЕНТ БІОСЕНСОРУ ДЛЯ ОЦІНКИ МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН *Escherichia coli* ТА *Pseudomonas fluorescens* ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Джигірей К.А.¹, Кузнецов М.І.¹, Тананайко О.Ю.¹, Резніченко Л.С.², Грузіна Т.Г.²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01033, Київ, вул. Льва Толстого 12; e-mail: kuznetsov@knu.ua

²Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, 03142, Київ,
бульвар Академіка Вернадського 42; e-mail: ibcc.ukraine@gmail.com

Бактерії є найбільш поширеними та пристосованими для життя організмами. Живі клітини мікроорганізмів є перспективними індикаторними системами для оцінки токсичності об'єктів довкілля, продуктів харчування, а також мають широке застосування у фармацевтичному аналізі, зокрема для скринінгу антибактеріальних препаратів. Електрохімічний метод є перспективним шляхом дослідження вмісту електроактивних речовин в об'єктах, у тому числі складових поживного середовища бактерій, зокрема глюкози, завдяки простоті, портативності, експресності. Споживання глюкози пов'язане з активністю ряду бактеріальних клітин. Присутність токсичних речовин, зокрема антибактеріальних препаратів, пригнічує активність бактеріальних клітин, що уповільнює споживання ними глюкози. Отже, зміна концентрації глюкози в поживному середовищі клітин дозволяє встановлювати присутність антибактеріальних препаратів, токсикантів в досліджуваних об'єктах, в тому числі в об'єктах довкілля.

Визначення глюкози перспективно проводити ферментативно за продуктом її окиснення – гідроген пероксидом. Вольтамперометричному визначенню H_2O_2 заважають відновники, зазвичай присутні у досліджуваних об'єктах. Модифікація електроду наночастинками CuO дозволяє детектувати каталітичний струм відновлення CuO , що зростає пропорційно збільшенню вмісту H_2O_2 . Це відкриває можливості для підвищення селективності методики визначення глюкози. Закріплення ферменту на поверхні електроду також сприяє покращенню аналітичних характеристик методики визначення, спрощенню і прискоренню процедури аналізу [1].

Метою роботи була розробка чутливого елемента вольтамперометричного сенсора для визначення концентрації глюкози у поживному середовищі бактеріальних клітин для подальшого його використання в біологічних методах аналізу. Для цього було застосовано немодифікований друкований планарний вуглецевий електрод (SPCE) та електрод, модифікований наночастинками оксиду купруму (II) (nano-CuO) та ферментом глюкозоксидазою (GOx), метод аналізу – циклічна вольтамперометрія (ЦВА). Визначення глюкози на SPCE проводили після проходження ферментативної реакції у розчині за піком окиснення гідроген пероксиду ($E=1,0$ В). Час ферментативної реакції – 40 хв. Отримано градувальний графік для вольтамперометричного визначення глюкози у поживному середовищі. Лінійний діапазон (ЛД) становить: $2,5 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ М. При визначенні глюкози за допомогою SPCE-nano-CuO-GOx детектування проводили за зростанням катодного струму відновлення CuO у присутності гідроген пероксиду ($E=-0,7$ В). Оптимальний рН взаємодії – 5,7. Оптимальний час контакту електроду з розчином – 3 хв. Оптимальний час, необхідний для регенерації ферменту на поверхні електроду, – 5 хв. Отримано залежність

аналітичного сигналу від концентрації глюкози в модельному розчині. ЛД становить: $1,0 \times 10^{-3}$ - $5,0 \times 10^{-3}$ М. Отже, немодифікований SPCE характеризується ширшим лінійним діапазоном, проте значно більшим часом аналізу, в той час як SPCE-папо-CuO-GOx дає можливість суттєво спростити і прискорити визначення. Крім того, застосування модифікованого електроду дозволяє покращити селективність визначення завдяки детектуванню глюкози за струмом відновлення.

Ефективність використання SPCE в оцінці метаболічної активності бактеріальних клітин методом циклічної вольтамперометрії досліджували на прикладі штамів мікроорганізмів *Pseudomonas fluorescens* 4251, *Pseudomonas fluorescens* 5040 та *Escherichia coli* 4 з колекції ІБКХ ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України. Штами нарощували у рідкому поживному середовищі (МПБ) протягом 24 годин. Температура культивування $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ для штамів *P. fluorescens* і $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ для штаму *E. coli*.

Метаболічну активність штамів *P. fluorescens* 5040 та *P. fluorescens* 4251 визначали за присутності у середовищі культивування (МПБ) бактеріальних клітин у концентрації 2×10^9 КУО/мл та глюкози 1×10^{-3} М після 60 хв інкубації при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. За концентрацією глюкози, визначеною в середовищі інкубації методом ЦВА з використанням розроблюваного чутливого елемента, встановлено, що штам *P. fluorescens* 4251 не проявляє метаболічну активність по відношенню до глюкози, на відміну від *P. fluorescens* 5040.

Визначення метаболічної активності штаму *E. coli* 4 проводили за концентрації бактеріальних клітин у середовищі інкубації (МПБ) 4×10^8 КУО/мл та глюкози 1×10^{-3} М. Після 60 хв інкубації при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ було зареєстровано зменшення концентрації глюкози у середовищі, що свідчить про метаболічну активність клітин штаму *E. coli* 4.

Можливість використання розроблюваного чутливого елемента в оцінці активності антимікробних препаратів було визначено на прикладі вивчення характеру впливу хлоргексидину біглюконату (кінцева концентрація в середовищі інкубації 0,25 мг/мл) на метаболічну активність клітин штаму *E. coli* 4 (2×10^8 КУО/мл). Присутність хлоргексидину біглюконату в середовищі інкубації призводила до зниження метаболічної активності клітин пропорційно часу їх контакту з препаратом.

Отже, SPCE є перспективним чутливим елементом вольтамперометричного сенсора для визначення метаболічної активності бактерій *P. fluorescens* 5040 та *E. coli* 4 у поживному середовищі у присутності глюкози. Модифікований електрод може стати ще більш перспективним чутливим елементом через набагато більш швидкий та простий аналіз саме для подальшого використання в біологічних методах аналізу.

Наступним етапом дослідження є застосування модифікованого електроду SPCE-папо-CuO-GOx для вивчення метаболічної активності клітин за відсутності і у присутності антибактеріального препарату. Перспективність подібних досліджень полягає в простоті та швидкості аналізу і можливості створення портативного біосенсору для скринінгу екотоксикантів і протимікробних препаратів.

Література:

1. Kornii, A., Saska, V., Lisnyak, V. V., & Tananaiko, O. (2020). Carbon nanostructured screen-printed electrodes modified with CuO/Glucose oxidase/Maltase/SiO₂ composite film for maltose determination. *Electroanalysis*. doi:10.1002/elan.202000059