

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *HERBASPIRILLUM LUSITANUM* P6-12 ДЛЯ  
ДЕТЕКЦИИ SDS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКОГО  
ДАТЧИКА

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы

направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Ждановой Елизаветы Сергеевны

Научный руководитель:

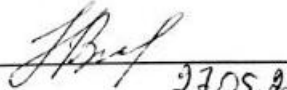
канд. биол. наук

  
27.05.2022

М. В. Каневский

Научный консультант:

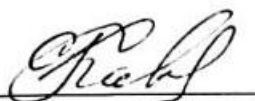
канд. биол. наук

  
27.05.22

Н. С. Величко

Зав. кафедрой:

профессор док. биол.наук

  
30.05.2022

С.А. Коннова

Саратов 2022

**Введение.** Поверхностно-активные вещества (ПАВ) представляют собой потенциальные токсиканты. В частности, современные классификации токсичности определяют анионные ПАВ как вредные химические вещества. Исследования показывают, что ПАВ оказывают негативные эффекты и на растения, и на животных. Совокупное мировое потребление поверхностно-активных веществ (анионных, катионных и неионных) оценивалось в 15 миллионов тонн в 1989 году, и продолжает расти. Так, к 2020 году суммарное потребление ПАВ может составить до 24 миллионов тонн. Необходимость разработать быстрые и эффективные методы для обнаружения ПАВ исходит из их высоких пенообразующих и токсичных свойств, которые могут вызвать повреждения или летальный исход у биологических объектов. Существующие методы детекции не обладают необходимой чувствительностью, а также требуют дорогостоящего оборудования и продолжительное время для отклика.

Объект исследования – грамотрицательный микроорганизм *Herbaspirillum lusitanum*, являющийся удобным модельным объектом благодаря пластичному метаболизму, применяемый при исследовании растительно-бактериальных взаимодействий. В рамках данной работы использовались штамм *Herbaspirillum lusitanum* P6-12.

Додецилсульфат натрия (SDS) – вещество, относящиеся к группе анионных ПАВ. Широко используется в предметах личной гигиены и бытовых моющих средствах, и в иных промышленности, таких как косметологическая, машиностроительная, медицинская и так далее. Выбор данного соединения в качестве объекта исследования обусловлен его популярностью из-за простоты производства и физико-химических свойств.

Цель данной работы заключалась в оценке возможности использования *H. lusitanum* P6-12 в качестве сенсорного элемента для детекции SDS с применением метода электрооптического анализа.

Для реализации цели решались следующие задачи:

1. Определение способности штамма к росту на среде с SDS, как единственного источника углерода;

2. Оценка влияния SDS на микробные клетки методом электрооптического анализа клеточных суспензий при варьировании времени воздействия;

3. Обнаружение предела чувствительности типового штамма *H. lusitanum* P6-12 к SDS;

4. Выявление оптимального времени специфического взаимодействия вещества с клетками, приводящее к выраженному изменению величины электрооптической экстинкции клеточных суспензий.

Исследование проводилось с использованием методов, адекватных поставленным задачам. Производилось культивирование микроорганизмов в двух вариантах: оптимальные условия для роста и в присутствии SDS как единственного источника углерода. Оценка интенсивности роста культуры осуществлялась с помощью оптических методов. Концентрацию SDS в среде культивирования измеряли методом анализа активного вещества в присутствии метиленового синего. Измерение электрооптического сигнала проводилось на электрооптическом анализаторе ELUS.

**Структура бакалаврской работы.** Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 177 источников и включает в себя следующие вопросы: характеристика бактерий рода *Herbaspirillum*; общие сведения о ПАВ (структура и классификация, влияние на биологические объекты, распространение и использование); общие сведения о SDS (структура, синтез, влияние на биологические объекты, распространение, существующие методы детекции и деградации).

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В работе были использованы бактерии *H. lusitanum* P6-12 выделенные из бобовых растений, находящиеся в коллекции ИБФРМ РАН (Саратов, Россия <https://collection.ibppm.ru/>).

Культивирование микроорганизмов проводилось на синтетической малатно-глюкозной среде, солевой основы, малата натрия и глюкозы в

качестве источника углерода и хлорида аммония в качестве источника азота. При помощи NaOH (40 г/л) реакцию среды доводили до pH 7.2-7.4. Для культивирования бактерий в присутствии SDS в среду не добавились малат натрия и глюкоза, SDS был единственным источником углерода. Непосредственно перед стерилизацией в среду добавляли раствор витаминов (тиамин, биотин, пиридоксаль) из расчета 1мл на 1 л среды. В среду вносили также раствор хелата железа из расчета 10 мл на литр среды.

Среду стерилизовали 30 минут при 121°C.

Для экспериментов без культивирования в присутствии SDS использовалась стандартная среда. SDS растворяли в дистиллированной воде и вносили к заранее осажденным клеткам.

Культивирование микроорганизмов проводилось при постоянном помешивании на виростенде при  $t=30^{\circ}\text{C}$ . Оптическая плотность вносимой культуры составляла  $A_{600\text{nm}} \sim 0,1$ , что соответствовало  $1,2 \times 10^9$  клеток  $\times$  мл<sup>-1</sup>.

Рост культуры в присутствии SDS определялся оптическим методом на первые сутки культивирования. Результаты показали, что при концентрации ПАВ более 0,8 мг/л происходит частично или полное ингибирование роста культуры.

При исследовании активности роста культуры в присутствии SDS измерения плотности культуры проводились на первые и пятые сутки. Минимальный прирост бактерий отмечался при максимальной исследуемой концентрации – 0,6 мг/л. При добавлении SDS в количестве 0,2 и 0,4 г/л отсутствовали достоверные различия с контролем без добавления SDS.

Концентрацию SDS в среде культивирования измеряли методом анализа активного вещества в присутствии метиленового синего спустя 5 суток. В делительную воронку помещалось 100 мкл исследуемого образца, 9,9 мл деионизированной H<sub>2</sub>O, 2,5 мл 10% раствора метиленового синего и 1 мл хлороформа. Воронку встряхивали в течение 15 секунд, после разделения жидкостей хлороформ сливали в колбу. Экстракция с хлороформом повторялась трижды, после чего полученные фракции обмывали 10 мл

дистиллированной воды. После измерялась оптическая плотность образца, в качестве контроля использовался холостой хлороформ. Измерения проводились при  $OD_{652\text{нм}}$ . Результаты показали, что наибольший процент деградации (43,8%) SDS наблюдался при минимальной исследуемой концентрации – 0,2 г/л. При повышении концентрации SDS наблюдалась обратная зависимость его деградации. Для концентраций додецилсульфата натрия 0,4 и 0,6 г/л эффективность разложения составляла 21,9% и 3,7% соответственно (Рисунок 1).

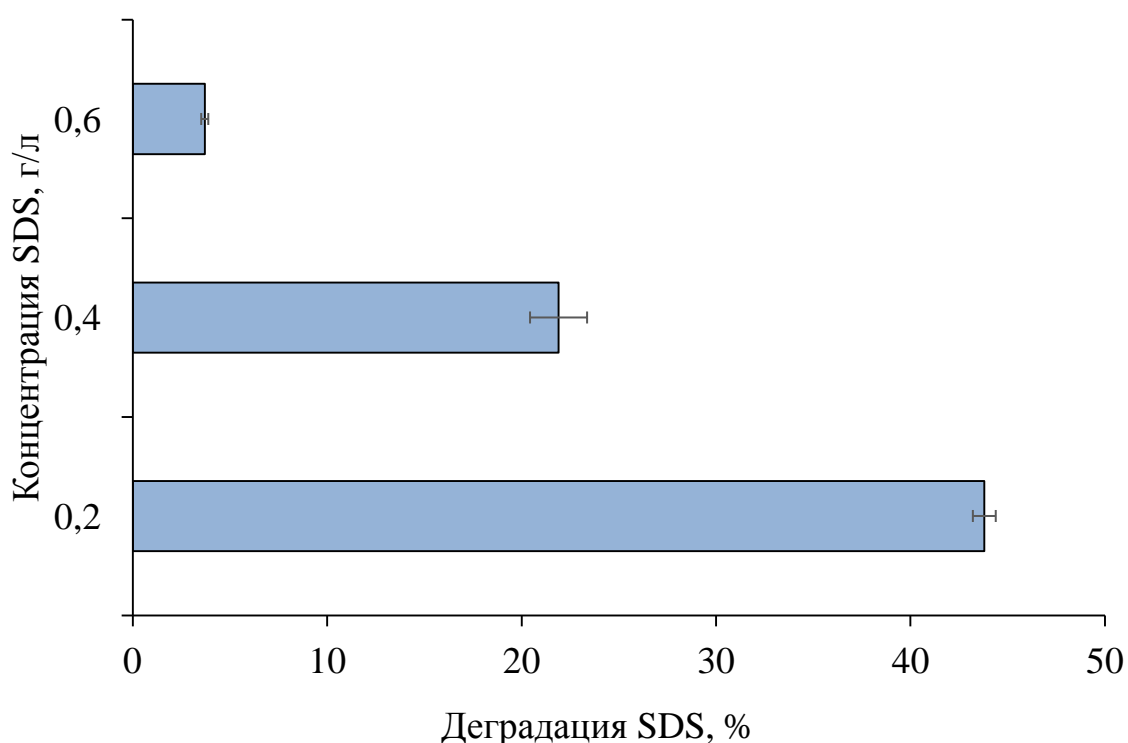


Рисунок 1 – Деградация SDS *H. lusitanum* P6-12.

Подобное различие может быть обусловлено токсическим воздействием ПАВ на бактериальные клетки, и последующим снижением жизнеспособности. Полученный результаты в десятки раз меньше, чем у эталонного биодеграданта SDS – *Pseudomonas aeruginosa*.

Мы предположили, что внесение ПАВ в состав среды приведёт к изменению физико-химических свойств поверхности клеток, что отразится на величине электрооптического сигнала.

Далее нами была произведена оценка изменения электрооптических свойств суспензии клеток *H. lusitanum* P6-12, выращенных в присутствии различных концентраций SDS (опытные образцы) и без добавление детергента (контроль). При исследовании изменения электрооптических свойств бактерий в условиях культивирования в присутствие SDS на протяжении суток использовались концентрации SDS: 400, 200, 4 и 0,8 мг/л. Результаты представлены на Рисунке 2.

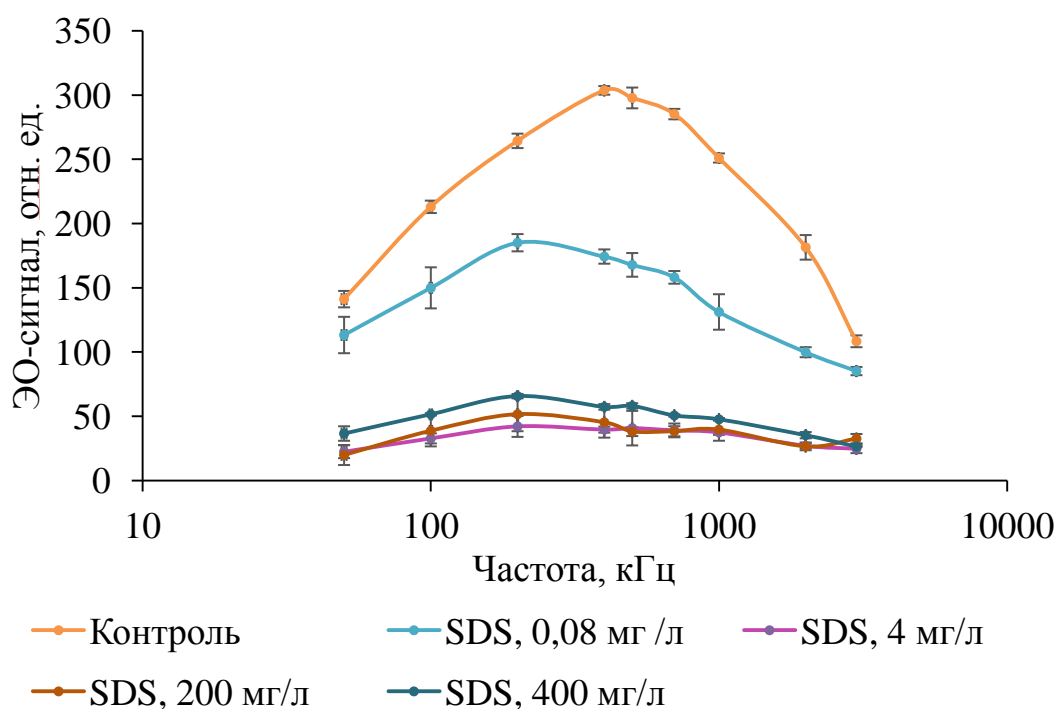


Рисунок 2 – Изменение ЭО сигнала клеточной суспензии *H. lusitanum* P6-12 при культивировании в присутствии SDS.

Минимальная концентрация, вызывающая достоверное изменение электрооптического сигнала суспензии составила 10 мкг/л. Пределом линейного диапазона изменения электрической поляризуемости клеток

*Herbaspirillum lusitanum* P6-12 было содержание SDS в среде – 2 мг/л (Рисунок 3).

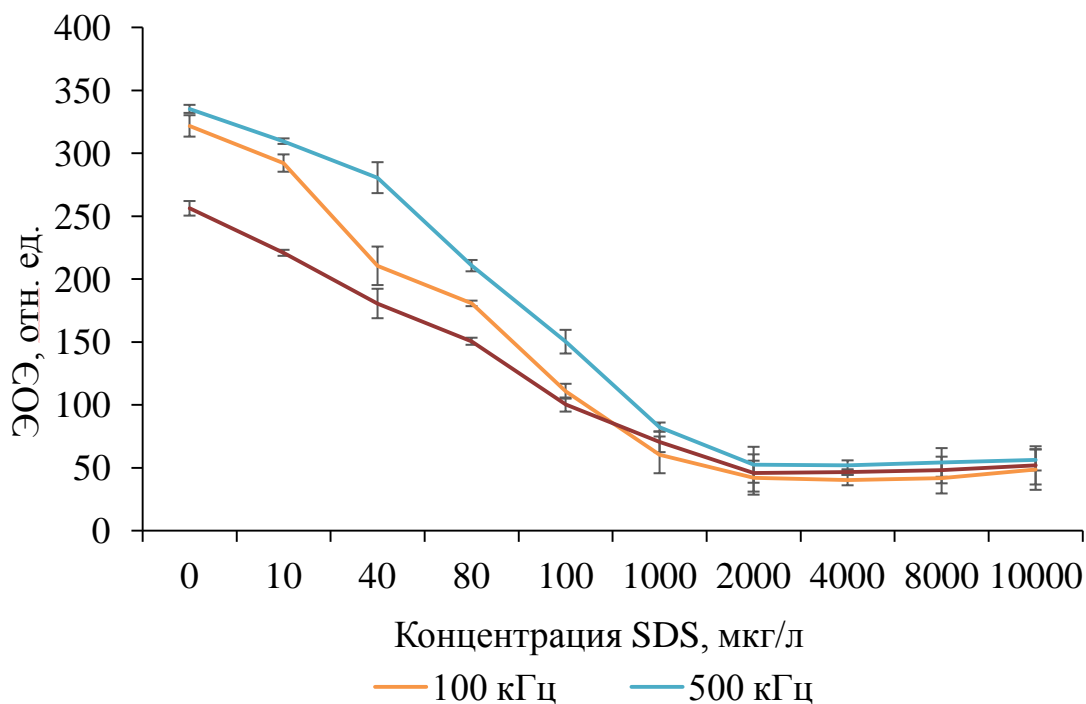


Рисунок 3 – Изучение зависимости изменения электрической поляризуемости клеток *H. lusitanum* P6-12 под влиянием разных концентраций SDS.

При краткосрочном воздействии SDS на клеточную суспензию исследовалось изменение электрической поляризуемости клеток при концентрациях представленных на Рисунке 4. Время воздействия SDS ограничивалось 5 минутами, после чего клеточную суспензию дважды отмывали.

Реакция бактерий на ПАВ наступала уже при минимальной концентрации. При этом стоит отметить тот факт, что в ходе культивирования в присутствии SDS реакция была гораздо слабее. Возможно, это связано с тем фактом, что клетки деградировали SDS в ходе роста, и при выходе на стационарную фазу роста клетки подвергались воздействию более низкой концентрации ПАВ.

Наиболее глубокие изменения и выход на плато наблюдался, начиная с концентрации 1000 мкг/л, что также соотносится с предыдущими результатами.

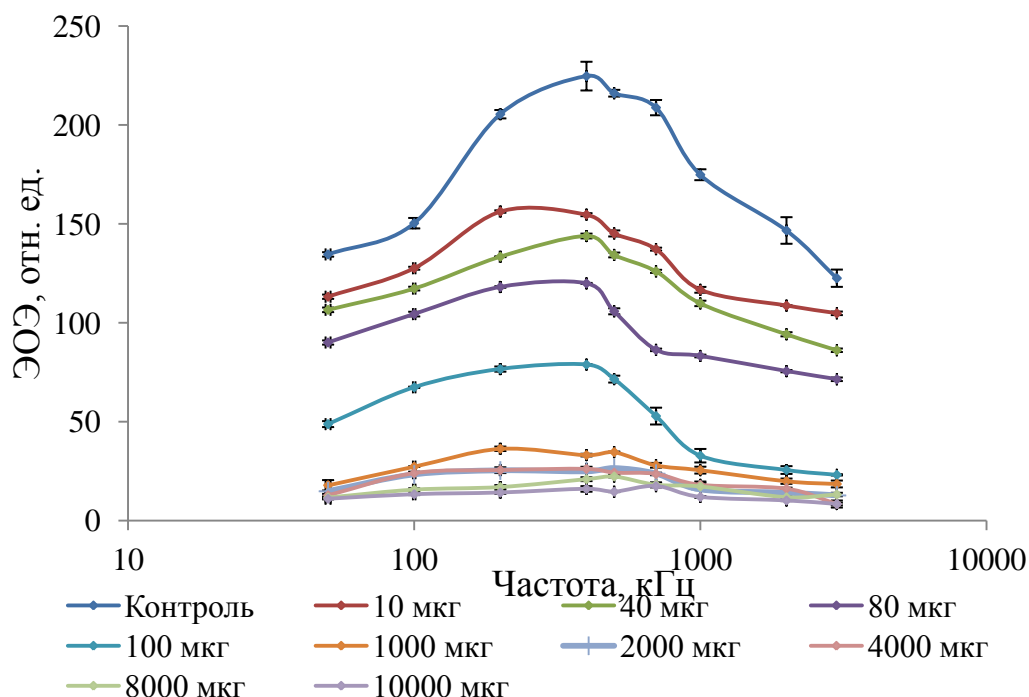


Рисунок 4 – Изменение ЭО сигнала клеточной суспензии *H. lusitanum* P6-12 без культивирования в присутствии SDS.

На основе полученных данных из предыдущего опыта были произведены измерения ЭО сигнала клеток после воздействия SDS в течение 5, 10 и 15 минут. Использовались концентрации 40, 100 и 2000 мкг/л SDS (Рисунок 5).



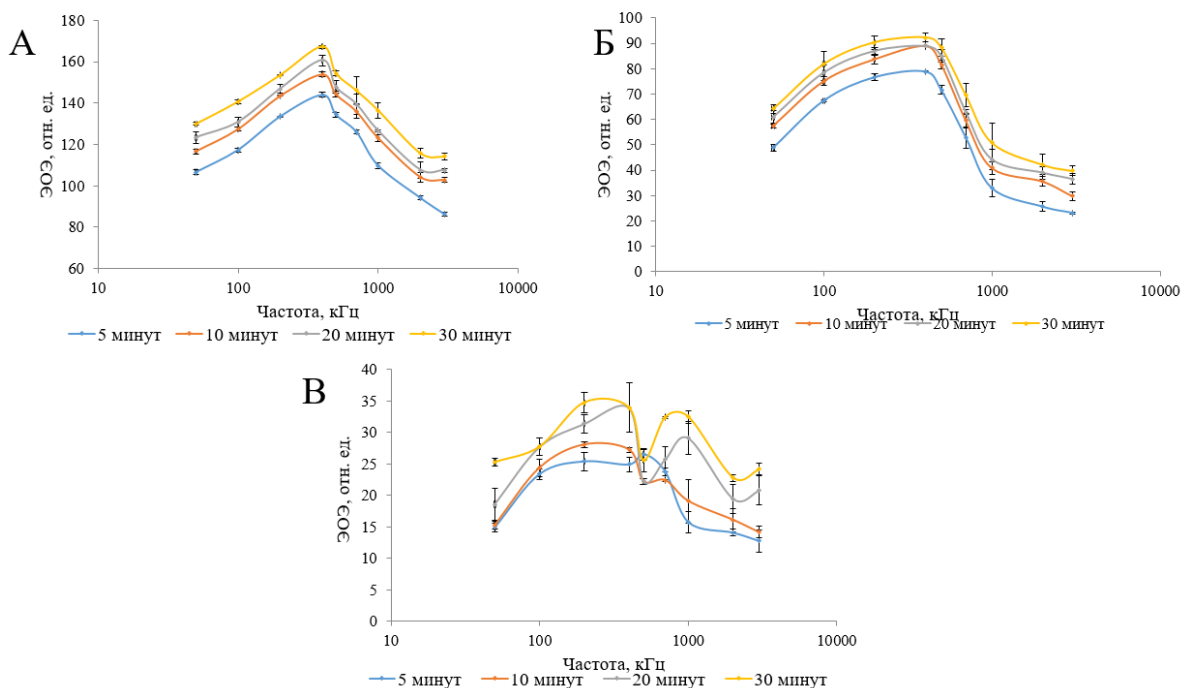


Рисунок 5 – Изменение ЭО сигнала клеточной суспензии *H. lusitanum* P6-12 при концентрации SDS 40 мкг/л (А), 100 мкг/л (Б), 2000 мкг/л (В).

Концентрация 40 мкг/л значительно ниже установленного ПДК для SDS, но соответствует некоторым концентрациям, обладающим биологическим эффектом на водные организмы. Установлено, что с увеличением срока инкубации клеток в присутствии SDS величина ЭО сигнала незначительно растёт, при некоторых частотах достоверные различия отсутствуют.

Концентрация 100 мкг/л находится в середине линейного диапазона, и так же меньше установленного ПДК. Результаты сходны с минимальной исследуемой концентрацией, при увеличении времени инкубации наблюдается возрастание электрооптического сигнала. При повешении частоты сигнала отмечается снижение ЭО спектра клеток, подобный эффект, но менее выраженный наблюдался и при концентрации SDS в 40 мкг/л.

Концентрация 2000 мкг/л находится в начале «плато» и является максимально, при которой возможны достоверные измерения изменения электрической поляризуемости бактериальных клеток. Полученные результаты не достоверны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Грамотрицательные бактерии *H. lusitanum* P6-12 нельзя использовать в качестве биодеградантов SDS в воде. Полученные данные по разложению SDS в течение 5 суток в десятки раз ниже по сравнению с эталонным биодеградантом SDS *Pseudomonas aeruginosa*. При концентрациях SDS более 1 г/л бактерии *H. lusitanum* P6-12 погибают, показывая высокую чувствительность к исследуемому детергенту, которую можно использовать для детекции додецилсульфата натрия.

При культивировании в присутствии SDS, а также краткосрочном воздействии отмечалось изменение электрической поляризуемости клеток бактерий *H. lusitanum* P6-12. Полученные данные демонстрируют широкий разброс чувствительности к детектируемому веществу. Данные, полученные в при краткосрочном воздействии SDS более достоверны и показательны, чем при длительном культивировании.

Исходя из полученных экспериментальных данных можно предположить, что данные микроорганизмы могут использовать в биосенсорах с электрооптическим датчиком как чувствительная часть. Отсутствие необходимости в культивировании в присутствии SDS и малое время, необходимое для отклика делает данный способ наиболее привлекательным для детекции SDS или иных анионных ПАВ в водных средах.

## ВЫВОДЫ

1. Торможение роста бактерии *H. lusitanum* P6-12 при выращивании на среде с использованием SDS в качестве единственного источника углерода наблюдалось, начиная с концентрации 0,8 г/л.

2. Наиболее интенсивный рост бактерий был отмечен для концентрации SDS 0,2 г/л.

3. Наблюдается обратная зависимость деградации SDS бактериями *H. lusitanum* P6-12 от его содержания в среде. Максимальный процент

деградации в 43,8% наблюдался при концентрации SDS 0,2 г/л. Эффективность разложения при концентрации 0,6 г/л составила 3,7%.

4. Пределы чувствительности электрооптического датчика для определения SDS с использованием *H. lusitanum* P6-12 составляют от 10 мкг/л до 2 мг/л.

5. При отсутствии культивирования в присутствие SDS отмечается более значительное изменения электрической поляризуемости клеток даже при добавлении SDS в малых количествах.

6. Оптимальное время воздействия SDS на бактериальные клетки составляет 5 минут. При более длительном воздействии фиксируется снижение интенсивности сигнала.

