

Бактериальные биосенсоры для экологического мониторинга углеводородов нефти: мини-обзор *

О.Н. Понаморева

Аннотация. Представлены последние достижения в применении бактериальных биосенсоров для экологического мониторинга углеводородов нефти. Рассмотрены два класса бактериальных биосенсоров: оптические биосенсоры, которые измеряют билюминесценцию, и электрохимические биосенсоры, которые измеряют оксидоредуктазопосредованное потребление кислорода.

Ключевые слова: биоанализ, микробные сенсоры, биосенсоры, экологический мониторинг, углеводороды нефти.

Введение

Экспресс-оценка загрязнения объектов окружающей среды является необходимым компонентом экологических исследований. Учитывая постоянно растущий объем нефти и нефтепродуктов, поступающих в окружающую среду, вследствие несовершенства технологических процессов добычи, доставки и переработки нефти, контроль степени загрязнения компонентами нефти вод, почв, растительности становится необходимым элементом экологического мониторинга. Процесс естественного самовосстановления загрязненной окружающей среды является очень длительным, углеводороды нефти и их производные постепенно загрязняют водные ресурсы. Особую опасность представляют полиароматические углеводороды (нафталин, фенантрен и др.), которые проявляют канцерогенные свойства. Таким образом, проблема быстрого анализа природных вод на содержание полиароматических углеводородов (ПАУ) является актуальной для сохранения здоровья нации.

Потребность в доступных системах и приборах для экологического контроля инициировала развитие новых технологий и методов, которые способны обеспечить суммарное определение в водных средах группы соединений-загрязнителей, таких как компоненты нефти, в условиях полевого экспери-

* Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» (гос. контракты № 02.740.11.0296, № П976).

мента, а не только в специализированных лабораториях. Большинство этих методов связано с функционированием биосенсоров.

Биосенсоры — биоаналитические устройства, позволяющие использовать высокочувствительные «интеллектуальные» методы измерения содержания химических соединений или биологических эффектов в образцах. Биосенсорные системы для экологического мониторинга, в том числе для определения содержания биодоступных углеводов нефти и их токсических эффектов, основаны на различных принципах функционирования. В основном, для создания таких систем используют биораспознающие элементы на основе ферментов, антител, нуклеиновых кислот и микроорганизмов [1]. Важно отметить, что биосенсоры на основе целых клеток бактерий нашли широкое применение в экологии [2, 3]. Биологические ответы микроорганизмов в биораспознающих элементах сенсоров, главным образом, связаны с метаболизмом и клеточным дыханием. Способность микроорганизмов к трансформации или деградации углеводов нефти хорошо известна и является предметом особого внимания исследователей, прежде всего с точки зрения использования микроорганизмов-деструкторов для очистки загрязненной окружающей среды, прежде всего от нефтяных загрязнений [4]. Наибольшее применение при разработке микробных сенсоров нашли два типа преобразователей: электрохимического типа (в основном на основе кислородного электрода) и оптического типа, регистрирующего люминесценцию природных или генноинженерных микроорганизмов [5, 6].

1. Оптические микробные сенсоры

Следует отметить, что основное число публикаций посвящено разработке и использованию микробных биосенсоров оптического типа [1, 5-8]. Аналитическим сигналом в оптических биосенсорах является изменение интенсивности свечения микроорганизмов. В биораспознающих элементах биосенсоров используют как нативные, так и рекомбинантные штаммы бактерий [7].

Природные люминесцентные бактерии встречаются, главным образом, в море. Описано 11 штаммов из 4 родов *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* (*Alteromonas*) и *Photorhabdus* (*Xenorhabdus*). Фермент люцефифераза — смешанная оксидаза, окисляет длинноцепочечные альдегиды до карбоновых кислот, восстанавливая флаavinмоноклеотид (ФМН), при этом происходит испускание голубовато-зеленого света (490 нм) [9]. Уровень люминесценции *in vivo* связан с метаболической активностью и целостностью бактерий. В регуляцию активности *lux*-оперона вовлечены стресс-контролирующие регуляторные последовательности в бактериальном геноме. Соответственно, факторы, воздействующие на стрессовые системы, влияют непосредственно или опосредованно и на регуляторную активность *lux*-оперона. Для определения токсичности водных сред, в том числе обусловленной содержанием ПАУ и хлорированных углеводов, использовали природные люминес-

центные бактерии *V. fischeri* (NRRL B11177), что легло в основу коммерческой тест-системы *Microtox*.

Несколько последних обзоров посвящены различным аспектам использования генноинженерных микроорганизмов как биорепортеров для определения ксенобиотиков и токсикантов [2, 5, 7, 10-13]. В основном такие микроорганизмы применяют для оценки токсичности и генотоксичности ксенобиотиков в анализируемых пробах. Биоанализ на токсичность основан на молекулярном встраивании репортерной системы в выбранный генный промотор регуляции различных стрессовых ответов в клетке и не является селективным анализом [14]. Для детекции определенных химических соединений или групп соединений используют специфические конструкции со встроенным *lux*-геном. Так, для детекции нафталина в газовой фазе и в воде использовали бактериальный штамм *Pseudomonas putida* с подобной конструкцией [15]. Этот штамм содержал плазмиду деградации нафталина NAF7, а репортерный *lux*-ген встроили в хромосому под промотор салицилат гидроксилазы. В газовой фазе предел детекции нафталина составил 50нМ и 5мкМ в водной фазе.

Биологические методы, основанные на генноинженерных люминесцентных бактериях, дыхательной активности и дегидрогеназной активности, применили для мониторинга процессов биodeградации и токсичности ВТЕХ [16]. Люминесцентный биосенсор способен контролировать токсичность и биодоступность компонентов ВТЕХ в экстрактах из загрязненных почв в ходе процессов деградации. Биосенсорный анализ является важным дополнением к химическому анализу для понимания процессов биodeградации.

Рекомбинантные биолюминесцентные бактерии DNT5, содержащие репортерный *lux*-ген в нафталиновом опероне (конструкция *pagR-pagAa::luxCDABE*), протестировали на возможность определения ароматических соединений с помощью многоканальной мониторинговой системы [17]. Семь химических соединений (бензойная кислота, салициловая кислота, 2,5- и 3,5-дигидроксibenзойная кислота, бензол, нафталин и фенол) проверяли как потенциальные субстраты штамма DNT5. Самую большую люминесценцию наблюдали в присутствии гидрофильных субстратов (кислот) и практически не наблюдали люминесценцию в присутствии бензола, нафталина и фенола.

В работе [18] проводили сравнительное исследование характеристик толуольных бактериальных биосенсоров на основе двух репортерных генов (*gfp* и *luxCDABE*), которые продуцировали продуцировали зеленую флуоресценцию и люминесценцию соответственно. Люминесцентный бактериальный биосенсор более чувствителен к толуолу, а флуоресцентный бактериальный биосенсор более стабильный. Результаты проведенных исследований продемонстрировали, что оба биосенсора — люминесцентный и флуоресцентный, могут применяться для индикации биодоступных фракций ВТЕХ в окружающей среде.

Бактериальный штамм *Burkholderia sp.* RP007 — деструктор ПАУ трансформировали репортерной плазмидой, содержащей генную конструкцию между последовательностью пируватного промотора/оператора и гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP). Полученный бактериальный биосенсор *Burkholderia sp.* strain RP037 продуцировал сигнальные количества репортерного белка после инкубации бактерий с кристаллами фенантрена. Наблюдали соотношение между продукцией GFP и масс-обменом фенантрена в водной среде.

Следует отметить, что время ответа оптических биосенсоров на основе рекомбинантных бактерий исчисляется часами, что затрудняет проведение быстрого мониторинга объектов окружающей среды в полевых условиях.

2. Электрохимические биосенсоры на основе целых клеток микроорганизмов

В обзорах [1, 19–25] авторы суммировали информацию по разработке и применению биосенсоров электрохимического типа для мониторинга объектов окружающей среды, в том числе углеводородов нефти и ароматических соединений.

Если в качестве преобразователя используется кислородный электрод, то действие биосенсора основано на том, что изменение концентрации кислорода, регистрируемое при помощи электрода, позволяет судить о дыхательной активности иммобилизованных на поверхности электрода бактерий и, следовательно, о содержании окисляемых ими соединений [25].

При разработке биосенсоров для детекции ароматических соединений для формирования рецепторного элемента сенсора по обнаружению определенного токсиканта следует использовать штаммы, наиболее эффективно его разрушающие и обладающие способностью использовать поллютант в качестве единственного источника углерода и энергии при росте [58]. Руководствуясь указанным, были разработаны микробные биосенсоры для детекции нафталина, бифенила, хлорированных бензоатов на основе штаммов-деструкторов указанных соединений; все использованные штаммы принадлежали роду *Pseudomonas* [26]. В биосенсоре для детекции нафталина использовали бактерии *P. putida* BS238, несущие плазмиду деградации нафталина pBS2. Нижний предел детекции нафталина составлял 1 мкМ при верхнем пределе 10–15 мМ. Использование в качестве основы биорецептора бесплазмидного штамма, не содержащего плазмиду, позволило получить сенсор, не обладающий чувствительностью к нафталину. Этот результат имеет значение для разработки систем селективной детекции нафталина с помощью пары сенсоров. Использование дифференциальной схемы измерения образца сенсорами на основе плазмидного и бесплазмидного штаммов с последующим вычитанием сигналов может позволить в определенной степени нивелировать сигналы, обусловленные присутствием мешающих соединений [27]. В биосенсорах для детекции бифенила использовали четыре природных

штамма *P. putida*, растущих на бифениле. Для детекции хлорпроизводных бензоата применили штамм *P. aeruginosa* 142, характеризующийся способностью к их деградации. Детекция бифенила была возможна в диапазоне концентраций от 2 мкМ до 20 мМ, хлорбензоатов — от 100 мкМ до 5 мМ [28].

Бактериальный штамм *Pseudomonas putida* ML2 использует бензол как источник углерода и энергии, поэтому аэробная деградация бензола может быть измерена с помощью кислородного электрода [29]. Штамм *Pseudomonas putida* ML2 применили при разработке бактериального биосенсора проточно-инжекционного типа для обнаружения бензола в воздухе. Линейный интервал определяемых концентраций составил 0.025 и 0.15 мМ бензола в стандартном растворе, содержащем 2% ДМФА, время ответа — 6 мин. Результаты, полученные с помощью биосенсора проточного типа хорошо коррелируют с результатами хроматографического определения содержания бензола в образцах, при этом биосенсорная система легко может быть использована для анализа в полевых условиях. Авторы делают вывод о перспективности разработки таких недорогих биосенсоров для оперативного контроля содержания бензола в воздухе рабочих помещений, как дополнение к газохроматографическому анализу.

Для детекции ароматических соединений в воде была использована оксигеназная активность бактериальных ферментов *in vivo* [30]. Бактерии способны участвовать в деградации восстановленных соединений, таких как углеводороды, путем первоначального окисления этих веществ под действием бактериальных оксигеназ, которые проявляют высокую специфичность, стабильность и активность и могут быть применены *in vivo* как компоненты биосенсоров. Оксигеназную активность ферментов *in vivo* определяли в присутствии ароматических углеводородов с помощью кислородного электрода по изменению скорости потребления кислорода. В качестве модельных субстратов использовали семейство ароматических углеводородов ВТЕХ (бензол, толуол, этилбензол, изомеры ксилола). Предел обнаружения и чувствительность достигали миллимолярных концентраций, как и в методе на основе рекомбинантных ДНК.

Фенол-деградирующий штамм *Pseudomonas putida* DSM 50026 использовали в амперометрическом биосенсоре для измерения содержания фенолов [31]. Бактерии выращивали с использованием фенола в качестве единственного источника углерода и энергии. Целые клетки бактерий иммобилизовали на поверхности кислородного электрода в желатиновой мембране путем кросс-сшивки глутаровым альдегидом. Биосенсор использовали для определения содержания фенолов в модельных сточных водах.

Для разработки миниатюрных амперометрических биосенсоров — биочипов применили генноинженерные бактерии *E. coli* с биорепортерным геном LacZ, кодирующий фермент β -галактозидазу [32, 33]. Рекомбинантные бактерии отвечали на стресс, вызванный фенолом. В присутствии фенола промотор, отвечающий за стрессовый ответ, активировался и индуцировал

продукцию репортерного фермента, которую определяли с помощью субстрата *n*-аминофенил- β -D-галактопиранозида. Продукт ферментативной реакции *n*-аминофенол окислялся на рабочем электроде и регистрировался с помощью компьютерной программы обработки данных. Сигнал продуцировался через 10 минут после начала анализа.

Следует отметить, что биосенсоры на основе кислородного электрода и целых клеток микроорганизмов применяли не только для обнаружения ксенобиотиков, но и для физиолого-биохимической характеристики микроорганизмов — деструкторов [34]. Специфичность и чувствительность различных штаммов родов *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus* по отношению к целому ряду ксенобиотиков были охарактеризованы с использованием биосенсорной техники. Авторы отмечают, что использование простой в исполнении техники измерения позволяет проводить быстрый скрининг микроорганизмов — потенциальных деструкторов ароматических и хлорароматических соединений и получать спектр окисляемых субстратов.

Таким образом, преимуществами биоаналитических систем на основе кислородного электрода и целых клеток микроорганизмов являются простота исполнения и легкость обслуживания, а биораспознающие элементы на основе иммобилизованных микроорганизмов легко воспроизводить, поддерживать и эксплуатировать.

Список литературы

1. *Rogers K.R.* Chip-based biosensors for environmental monitoring. Review // Part six, chap. 75 (p.1-7) in Handbook of Biosensors and Biochips. V. 2. Wiley-Interscience, 2007. 1500 p.
2. *D'Souza S.F.* Microbial biosensors // Biosens. Bioelectron. 2001. V.16. P.337–353.
3. *Lei Y., Chen W., Mulchandani A.* Microbial biosensors. Review // Anal Chim Acta. 2006. V.568. P.200–210.
4. *Van Hamme J.D., Ajay S., Owen P.W.* Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V.67, №4. P.503–549.
5. *Gu M.B., Mitchell R.J., Kim B.C.* Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. №87. P.269–305.
6. *Ron E.Z.* Biosensing environmental pollution // Curr Opin Biotechnol. 2007. V.18, №3. P.252–258.
7. *Belkin S.* Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants // Curr Opin Microbiol. 2003. №6(3). P.206–212.
8. Exposing culprit organic pollutants: a review / A. Keane [et al.] // J. Microbiol Methods. 2002. V.49, №2. P.103–119
9. *Ulitzur S.* Natural Luminescent Whole-Cell Bioreporters // Part six, chap. 9 (p.1-10) in Handbook of Biosensors and Biochips. V. 2. Wiley-Interscience, 2007. 1500 p.
10. *Sorensen S.J., Burmolle M., Hansen L.H.* Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors // Curr. Opin. Biotechnol. 2006. V.17, №1. P.11–16.

11. Hansen L.H., Sørensen S.J. The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems // *Microbial Ecol.* 2001. V.42. P.483–494.
12. Vollmer A.C., Van Dyk T.K. Stress responsive bacteria: biosensors as environmental monitors // *Adv. Microbial Physiol.* 2004. V.49. P.131–174.
13. Harms H., Wells M.C., van der Meer J.R. Wholecell living biosensors — are they ready for environmental application? // *Appl Microbiol Biotech.* 2006. V.70. P.273–280.
14. Belkin S. Recombinant Bacterial Reporter Systems // Part six, chap. 10 (p.1-9) in *Handbook of Biosensors and Biochips*. V. 2. Wiley-Interscience, 2007. 1500 p.
15. Werlen C., Jaspers M.C., van der Meer J.R. Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *Pseudomonas putida* biosensor // *Appl Environ Microbiol.* 2004. V.70, №1. P.43–51.
16. Application of luminescent biosensors for monitoring the degradation and toxicity of BTEX compounds in soils / J.J. Dawson [et al.] // *J Appl Microbiol.* 2008. V.104, №1. P.141–151.
17. Lee J.H., Mitchell R.J., Gu M.B. Chemical-specific continuous biomonitoring using a recombinant bioluminescent bacterium DNT5 (nagR-nagAa::luxCDABE) // *J. Biotechnol.* 2007. V.131, №3. P.330–334.
18. Li Y.F., Li F.Y., Ho C.L., Liao V.H. Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds / Y.F. Li [et al.] // *Environ Pollut.* 2008. V.152. №1. P.123–132.
19. Hanrahan G., Patil D.G., Wang J. Electrochemical sensors for environmental monitoring: design, development and applications // *J. Environ. Monit.* 2004. V.6, №8. P.657–664.
20. Wanekaya A.K., Chen W., Mulchandani A. Recent biosensing developments in environmental security // *J. Environ. Monit.* 2008. V.10, №6. P.703–712.
21. Paitan Y. On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution / Y. Paitan [et al.] // *Biotechnol. Adv.* 2003. V.22, №1-2. P.27–33.
22. Sole S., Alegret S. Environmental toxicity monitoring using electrochemical biosensing systems // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2001. №4. P.256–264.
23. Решетилов А.Н. Микробные, ферментные и иммунные биосенсоры для экологического мониторинга и контроля биотехнологических процессов. Обзор. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2005. Т.41, №5. С.504–513.
24. Rishpon J. Electrochemical biosensors for environmental monitoring // *Rev Environ Health.* 2002. V.17, №3. P.219–247.
25. Riedel K., Kunze G., König A. Microbial sensors on a respiratory basis for wastewater monitoring // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2002. №75. P.81–118.
26. Бактерии *Pseudomonas* как основа рецепторного элемента микробных сенсоров для детекции ароматических ксенобиотиков / А.Н. Решетилов [и др.] // *Докл. РАН.* 1996. Т.348, №4. С.552–555.
27. Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Filonov A.E., Gayazov R.R., Kosheleva I.A., Boronin A.M. *Pseudomonas putida* as a receptor element of microbial sensor for naphthalene detection // *Process Biochem.* 1997. V.32. №6. P.487–493.
28. / A.N. Reshetilov [et al.] // *Anal. Lett.* 1999. V.32, №1. P.11–23.

29. Benzene analysis in workplace air using an FIA-based bacterial biosensor / Y.H. Lanyon [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V.15, №20(10). P.2089–2096.
30. Tizzard A.C., Lloyd-Jones G. Bacterial oxygenases: in vivo enzyme biosensors for organic pollutants // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V.22, №11. P.2400–2407.
31. Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida* / S. Timur [et al.] // *Talanta.* 2003. №61. P.87–93.
32. Popovtzer R., Shacham-Diamand Y., Rishpon J. An electrochemical biochip sensor for the detection of pollutants. Review // Part six, chap. 59 (p.1-9) in *Handbook of Biosensors and Biochips*. V. 2. Wiley-Interscience, 2007. 1500 p
33. Monitoring aromatic hydrocarbons by whole cell electrochemical biosensors / Y. Paitan [et al.] // *Anal. Biochem.* 2004. V.335. P.175–183.
34. Screening of xenobiotic compounds degrading microorganisms using biosensor techniques / B. Beyersdorf-Radeck [et al.] // *Microbiol Res.* 1998. V.153, №3. P.239–245.

Пономарева Ольга Николаевна (olga@tsu.tula.ru), к.х.н., доцент, кафедра химии, Тульский государственный университет.

Bacterial biosensors for environmental biomonitoring petroleum hydrocarbons: mini-review

O.N. Ponomareva

Abstract. Recent advances in the application of bacterial biosensors for environmental monitoring petroleum hydrocarbons are reviewed. Two classes of bacterial biosensors for environmental biomonitoring petroleum hydrocarbons are considered: optical biosensors that measure bioluminescence, and electrochemical biosensors that measure oxidoreductase-mediated oxygen depletion to the presence of a specific substance (or group of substances).

Keywords: bioassay, microbial sensors, biosensors, ecological monitoring, petroleum hydrocarbons.

Ponomareva Olga (olga@tsu.tula.ru), candidate of chemical sciences, associate professor, department of chemistry, Tula State University.

Поступила 15.04.2010