

ЧУТЛИВИЙ ЕЛЕМЕНТ БІОСЕНСОРУ ДЛЯ ОЦІНКИ МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН

Escherichia Coli ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

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

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

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



Мета роботи:

Розробка чутливого елемента вольтамперометричного сенсора для визначення концентрації глюкози у поживному середовищі бактеріальних клітин для подальшого його використання в біологічних методах аналізу.

Експериментальна частина

Глюкозу визначали ферментативно з використанням ферменту глюкозооксидази (GOx) (рис. 1) методом ЦВА з використанням планарного друкованого вуглецевого електрода SPCE (рис. 2). На електроді детектується анодний струм H_2O_2 . Модифікація поверхні електроду наночастинками CuO дозволяє детектувати каталітичний струм відновлення CuO до Cu_2O після контакту електроду з H_2O_2 (рис. 3). Це підвищує селективність визначення глюкози. Модифікація відбувається шляхом фіксації наночастинок та ферменту в SiO_2 -плівці, що створюється методом золь-гель синтезу. Закріплення ферменту на поверхні електроду сприяє покращенню аналітичних характеристик методики визначення, спрощенню і прискоренню процедури аналізу [1].

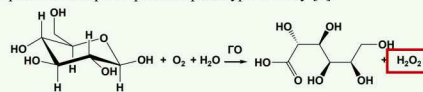


Рис. 1. Рівняння ферментативного окиснення глюкози

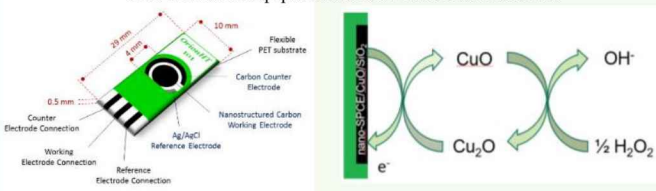


Рис. 2. Будова планарного друкованого вуглецевого електрода (SPCE)

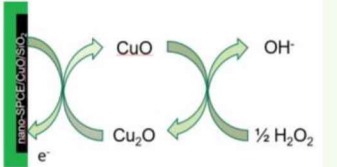


Рис. 3. Схема каталітичного циклу H_2O_2 перексиду на SPCE-SiO₂-CuO

Порівняння аналітичного відгуку глюкози на немодифікованому SPCE та SPCE-SiO₂-CuO-GOx

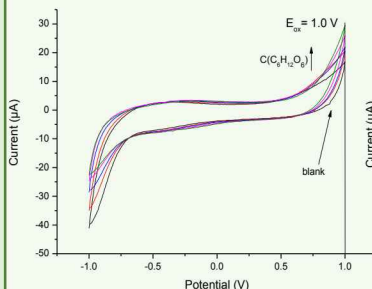


Рис. 4. Вольтамперограма $C_6H_{12}O_6$ на SPCE без попередньої модифікації. $E_{ox} = 1,0$ В, pH = 5,7, $C(GOx) = 3 \times 10^{-2}$ мг/мл
Лінійний діапазон: $2,5 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ М

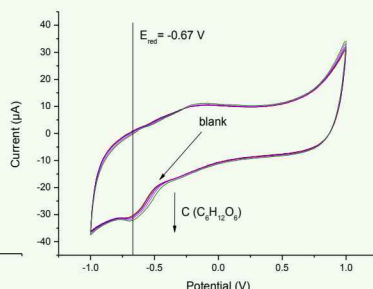


Рис. 5. Вольтамперограма $C_6H_{12}O_6$ на SPCE-SiO₂-CuO-GOx, $E_{відновлення} = -0,67$ В. pH = 5,7
Лінійний діапазон: $1,0 \times 10^{-3}$ - $5,0 \times 10^{-3}$ М

Дослідження метаболічної активності бактеріальних клітин щодо глюкози

Штам бактерій *Escherichia coli* K-A нарощували у рідкому поживному середовищі протягом 24 годин. Температура культивування 37 °С.

Умови дослідження метаболічної активності: середовища культивування – M9 (Na_2HPO_4 6 г/л, KH_2PO_4 3 г/л, NaCl 0,5 г/л, NH_4Cl 1 г/л) та МПБ (м'ясо-пептонний бульон), концентрація глюкози - 5×10^{-3} М, інкубація 60 хв при 37 °С.

Умови електрохімічних вимірювань

SPCE: серія розведень відповідним поживним середовищем, GOx додавали в розчин, час проходження ферментативної реакції: 40 хв. при 37 °С в розчині після осадження бактеріальних клітин.

SPCE-SiO₂-CuO-GOx: серія розведень відповідним поживним середовищем, розчин аналізується безпосередньо після нанесення його краплини на поверхню електроду, час контакту розчину з електродом – 3 хв.

Порівняння аналітичного відгуку глюкози після контакту з бактеріальними клітинами в поживних середовищах

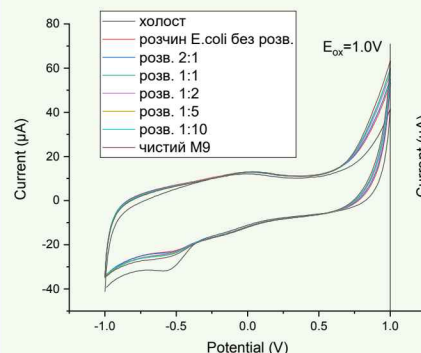


Рис. 6. Циклічні вольтамперограми розчинів після осадження бактеріальних клітин в поживному середовищі M9 на SPCE до та після їх розбавлення, $C_{поч}(C_6H_{12}O_6) = 5 \times 10^{-3}$ М, $C(GOx) = 3 \times 10^{-2}$ мг/мл
час контакту клітин з розчином – 60 хв, час проходження фермент. реакції – 40 хв.

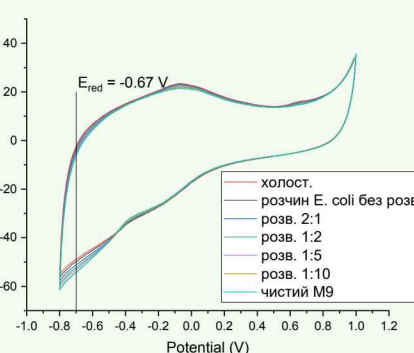


Рис. 7. Циклічні вольтамперограми серії розведення суспензії бактеріальних клітин в середовищі M9 на SPCE-SiO₂-CuO-GOx
 $C_{поч}(C_6H_{12}O_6) = 5 \times 10^{-3}$ М, час контакту клітин з розчином – 60 хв, час контакту розчину з електродом – 3 хв.

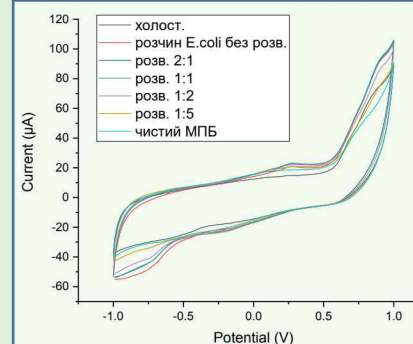


Рис. 8. Циклічні вольтамперограми розчинів після осадження бактеріальних клітин в поживному середовищі МПБ на SPCE до та після їх розбавлення.
 $C_{поч}(C_6H_{12}O_6) = 5 \times 10^{-3}$ М, $C(GOx) = 3 \times 10^{-2}$ мг/мл
час контакту клітин з розчином – 60 хв, час проходження фермент. реакції – 40 хв.

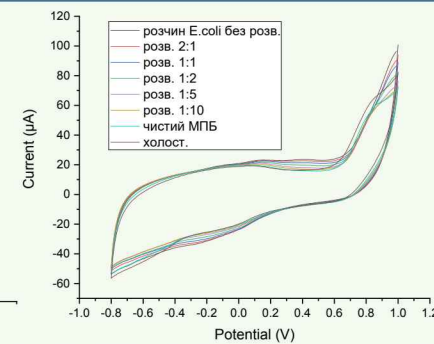


Рис. 9. Циклічні вольтамперограми серії розведення суспензії бактеріальних клітин в середовищі МПБ на SPCE-SiO₂-CuO-GOx
 $C_{поч}(C_6H_{12}O_6) = 5 \times 10^{-3}$ М, час контакту клітин з розчином – 60 хв, час контакту розчину з електродом – 3 хв.

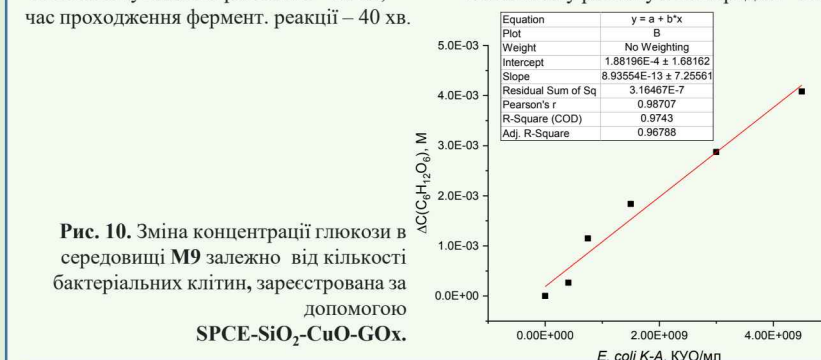


Рис. 10. Зміна концентрації глюкози в середовищі M9 залежно від кількості бактеріальних клітин, зареєстрована за допомогою SPCE-SiO₂-CuO-GOx.

Висновки

Немодифікований SPCE характеризується ширшим лінійним діапазоном визначення глюкози, проте значно більшим часом аналізу, в той час як SPCE-SiO₂-CuO-GOx дає можливість суттєво спростити і прискорити визначення субстрату. Крім того, застосування модифікованого електроду дозволяє покращити селективність визначення завдяки детектуванню глюкози за струмом відновлення. SPCE-SiO₂-CuO-GOx є перспективним чутливим елементом вольтамперометричного сенсора для визначення метаболічної активності бактерій *E. coli* K-A у поживному середовищі M9 у присутності глюкози. Для середовища МПБ результати виявилися неоднозначними через значний вплив електроактивного фону

[1] Kornii A, Saska V, Lisnyak V V., Tananaiko O. Carbon nanostructured screen-printed electrodes modified with CuO/Glucose oxidase/Maltase/SiO₂ composite film for maltose determination. *Electroanalysis*. 2020;1-13.