

© Дибкова С. М., Грузіна Т. Г., Рєзнїченко Л. С.

УДК 541.13:577.112.087

Дибкова С. М., Грузіна Т. Г., Рєзнїченко Л. С.

БІОАНАЛІТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУТЛИВОГО ЕЛЕМЕНТУ БІОСЕНСОРНОГО АНАЛІЗАТОРУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕРБІЦИДІВ НА ОСНОВІ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ)

sdybkova@gmail.com

Робота виконана в рамках проекту «Дослідна експлуатація та атестація експресних біосенсорних аналізаторів для визначення стану ґрунтів сільськогосподарського призначення та якості сільськогосподарської продукції за показниками забрудненості органічними та неорганічними поліюгантами» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація», № державної реєстрації 011U001679.

Вступ. В Україні на сьогоднішній день у відповідності з «Переліком пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні» для контролю за дводольними бур'янами на посівах зернових злакових культур та кукурудзи використовують 42 гербіцидних препарати [5]. Діючими речовинами таких гербіцидів є диметиламінна сіль та 2-етилгексилефір 2,4-Дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д). При нормах витрат 0,4-2 кг/га з допомогою гербіцидів на основі 2,4-Д можна знищити майже всі види дводольних бур'янів [10].

Токсична дія гербіцидів на основі 2,4-Д зумовлена активацією холінергічної системи теплових та негативним впливом на роботу залоз внутрішньої секреції. Контакт людини з розпиленими гербіцидами такого класу призводить до подразнення очей, атрофічних змін слизової оболонки носоглотки, змін нюхової та смакової чутливості, диспепсичних розладів [11]. Припущення щодо канцерогенних властивостей 2,4-Д виявилися хибними [9]. Гербіциди на основі 2,4-Д відносять до пестицидів 3 класу небезпеки. Відомо, що орієнтовно допустимий рівень (ОДР) 2,4-Д у ґрунті складає 0,1 мг/кг, а допустима добова доза для людини — 0,0001 мг/кг [6]. На основі токсиколого-гігієнічної оцінки властивостей таких гербіцидів рекомендовані наступні максимальні допустимі рівні (МДР) 2,4-Д в сільськогосподарській сировині: зерно хлібних злаків — 0,02 мг/кг, кукурудза (зерно) — 0,015 мг/кг [3].

Класичним методом хіміко-аналітичного визначення 2,4-Д є метод газорідинної хроматографії (ГРХ) [8]. Однак, цей метод визначення гербіцидів у ґрунтах та сільськогосподарській продукції є доволі затратним та вимагає висококваліфікованого персоналу. Крім того, визначені цим методом МДР відповідають межах чутливості самого методу, що обмежує діапазон тестування 2,4-Д [7]. Тому роз-

робка експресних чутливих біоаналітичних систем для ідентифікації токсичної складової 2,4-Д для живих організмів є надзвичайно актуальною. На цьому шляху аналітичні системи на основі біосенсорів мають безперечну перевагу застосування як з точки зору їх економічності, так і адекватності та специфічності щодо біологічної складової токсичної дії [4]. Перспективними виступають бактеріальні біосенсори на основі амперометричного датчика електроду Кларка з використанням як аналітичного сигналу респіраторної активності (РА) мікробних клітин та рівня її інгібування.

Мета дослідження полягала у визначенні біоаналітичних характеристик чутливого елемента біосенсорного аналізатору для визначення гербіцидів на основі 2,4-Д.

Об'єкт і методи дослідження. Як аналіт в роботі використаний гербіцид «Амісоль» («Укравіт», Україна) на основі 2,4-Д у вигляді диметиламінної солі. Препарат «Амісоль» є водним розчином з концентрацією 2,4-Д 730 г/л. В експериментах використовували робочий водний розчин препарату з концентрацією 2,4-Д 7,3 мг/мл.

В якості чутливого елемента біосенсора до 2,4-Д тестували бактерії штаму *Pseudomonas* sp.24D, виділеного з ґрунтового мікробного консорціуму, що контактував з досліджуваним гербіцидом протягом трьох місяців [1]. Бактерії штаму культивували на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) та м'ясо-пептонному агарі.

Вивчення ростових характеристик штаму *Pseudomonas* sp.24D здійснювали в періодичній культурі, при культивуванні бактерій в МПБ протягом 24 годин при температурі 23-240С в колбах на качалці. Концентрацію клітин визначали спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46, «Ломо» (Росія)) при довжині хвилі 540 нм.

Аналітичним сигналом біосенсорного аналізатору слугувала РА бактерій штаму *Pseudomonas* sp.24D, а вимірюваним параметром — максимальна величина зміни концентрації кисню ($C_{\text{вих}} - C_{\text{к}}$) в середовищі вимірювання, яку виражали як індекс біологічного споживання кисню (БСК, %). В якості трансд'юсера була застосована амперометрична система кисневого електроду Кларка (АЖА 101 М, Білорусь) портативного експресного біосенсорного БСК-аналізатора. Час вимірювань складав 2 хвилини, об'єм комірки вимірювання — 4,5 мл [4].

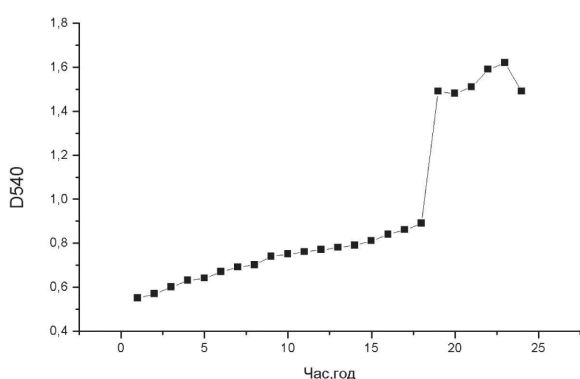


Рис. 1. Кінетика приросту біомаси бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D*.

Показником токсичної дії 2,4-Д виступав рівень інгібування PA бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* цим гербіцидом.

Специфічність бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* до 2,4-Д оцінювали аналізуючи характер впливу важких металів та органічних забруднювачів ґрунту на PA. При цьому використовували наступні розчини аналітично чистих солей важких металів («Merck», Германія): $K_2Cr_2O_7$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $Cu(CH_3COO)_2$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $ZnCl_2$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM); $CdCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,1M, 1 mM, 0,01mM) та фенолу (0,1M, 1 mM, 0,01mM).

Сенсорний елемент на основі бактерій *Pseudomonas sp.24D* отримували шляхом ліофілізації з використанням захисного середовища, що містило 10% сахарози та 2% желатини. Ліофілізат зберігали при - 200С. Регідрацію сенсорних елементів на основі бактерій *Pseudomonas sp.24D* здійснювали в середовищі культивування (МПБ) протягом 3 годин перед початком вимірювання величини PA.

Чутливість бактерій *Pseudomonas sp.24D* та створеного на їх основі сенсорного елемента оцінювали за величиною PA після 30-хвилинної експозиції бактеріальних клітин з гербіцидом «Амісоль» в середовищі культивування (МПБ) при температурі 23-240С. Кінцеві концентрації 2,4-Д становили (мг/мл): 0,008; 0,016; 0,032; 0,048; 0,064; 0,08; 0,096; 0,112; 0,128; 0,144; 0,160; 0,32; 0,48; 0,64; 0,80.

Статистичну обробку результатів експерименту здійснювали згідно [2] з використанням критерію Ст'юдента ($p < 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення.

PA бактерій – одна з основних фізіологічних реакцій мікроорганізмів — надзвичайно чутлива до дії полутантів різної природи. Тому логічним припущення щодо інгібування PA у випадку токсичної дії 2,4-Д на клітини досліджуваних бактерій.

Для оцінки аналітичних характеристик бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* необхідно передумовою насамперед є визначення кінетики приросту їх

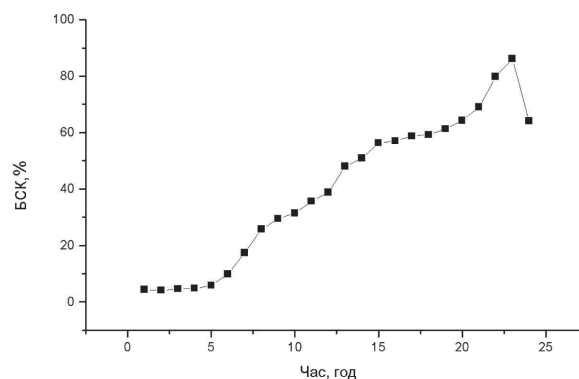


Рис. 2. Залежність рівня PA бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* від фази росту культури.

біомаси. На **рисунок 1** наведена крива росту бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D*.

Видно, що експоненціальна фаза росту досліджуваних бактерій характеризується наявністю двох фаз: повільної — до 15 години культивування та більш інтенсивної — з 16 по 23 годину. Особливістю бактерій даного штаму є відсутність lag-фази на кривій росту. Експоненціальна фаза росту бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* закінчується після 23 години культивування, в подальшому спостерігається загибель клітин. Тому, для вивчення аналітичних характеристик бактеріальних клітин доцільно використовувати їх з 21 по 23 годину росту в періодичній культурі.

Подальші дослідження були спрямовані на визначення величини PA бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* в залежності від фази росту культури. Отримані дані представлені на **рисунок 2**.

Видно, що максимальна величина PA досліджуваних бактерій спостерігається на 23-й годині росту культури, що відповідає максимальному приросту біомаси згідно кривої росту.

З наведених вище результатів можна зробити висновок, що максимальна фізіологічна активність бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* відповідає 22-23 годинам культивування бактерій в періодичній культурі.

Для вивчення специфічності бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* було оцінено вплив важких металів в іонному стані та фенолу на PA досліджуваних бактерій. Показано, що іони важких металів (Cu, Zn, Cd, Cr, Mn, Co, Ni) та фенол у дослідженому концентраційному діапазоні (0,1M-0,01mM) не виявляють інгібуючого впливу на PA клітин досліджуваного штаму: величина PA була на рівні контрольних інтактних клітин. Таким чином, можна стверджувати про високу специфічність бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* до токсичної дії 2,4-Д.

Для визначення чутливості клітин бактерій штаму *Pseudomonas sp.24D* до дії 2,4-Д було проаналізовано залежність рівня їх PA від концентрації аналіту. На **рисунок 3** наведена концентраційно-залежна чутливість штаму *Pseudomonas sp.24D* до дії 2,4-Д.

Як видно, в зоні низьких концентрацій 2,4-Д (0,008-0,160 мг/мл), спостерігається прямо пропорційна залежність рівня інгібування PA від концен-

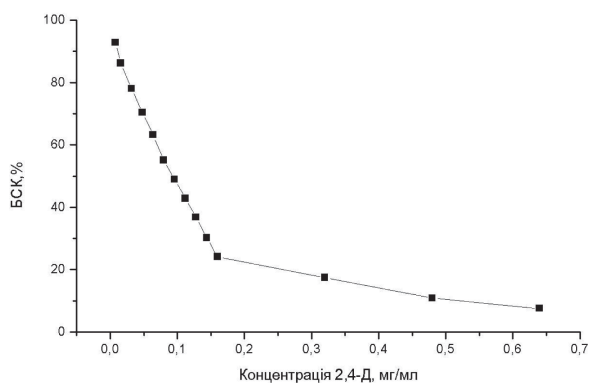


Рис. 3. Залежність рівня РА бактерій штаму Pseudomonas sp.24D від концентрації 2,4-Д.

трації 2,4-Д. Наявність такого прямолінійного відрізка свідчить про потенційну можливість застосування бактерій штаму Pseudomonas sp.24D для кількісного визначення 2,4-Д. Особливо цінним є той факт, що ця область чутливості клітин досліджуваного штаму до 2,4-Д співпадає із значеннями МДР 2,4-Д в сільськогосподарській продукції (0,02 мг/кг для зерна хлібних злаків та 0,015 мг/кг для зерна кукурудзи) та ОДР 2,4-Д у ґрунті (0,1 мг/кг ґрунту).

Визначення чутливості сенсорного елемента на основі бактерій Pseudomonas sp.24D, отриманого шляхом ліофілізації мікроорганізмів з використанням захисного середовища, також продемонструвало наявність прямо пропорційної залежності рівня інгібування РА від концентрації 2,4-Д (рис. 4).

Таким чином, проведені дослідження щодо біоаналітичних можливостей клітин бактерій штаму Pseudomonas sp.24D для визначення 2,4-Д засвідчили їх високу чутливість та специфічність до досліджуваного класу гербіцидів. Це відкриває перспективи використання бактерій такого штаму для

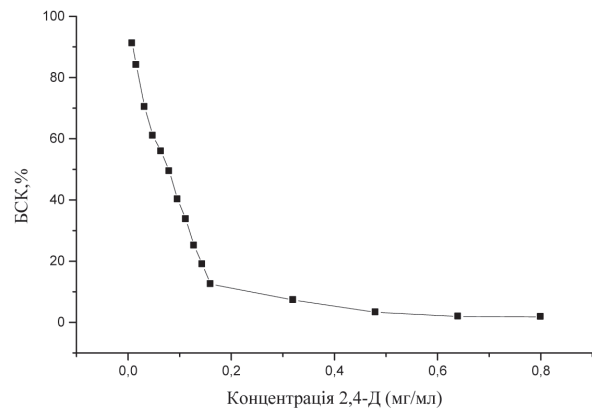


Рис. 4. Залежність рівня РА сенсорного елемента від концентрації 2,4-Д.

експресного якісного та кількісного визначення 2,4-Д гербіцидів.

Висновки. Оцінені біоаналітичні характеристики бактерій штаму Pseudomonas sp.24D: фізіологічні особливості росту в періодичній культурі; залежність величини РА від фази росту бактерій; концентраційно-залежний однозначний інгібуючий вплив 2,4-Д на величину РА. Встановлена висока специфічність та висока чутливість бактерій штаму Pseudomonas sp.24D до 2,4-Д. Продемонстровано можливість створення чутливого до дії 2,4-Д сенсорного елемента на основі бактерій Pseudomonas sp.24D шляхом ліофілізації.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення можливостей застосування сенсорного елемента на основі бактерій Pseudomonas sp.24 для біосенсорного кількісного визначення 2,4-Д в ґрунтах сільськогосподарського призначення та сільськогосподарській продукції.

Література

1. Дибкова С.М. Розробка чутливого елемента біосенсорного аналізатору для визначення вмісту гербіцидів у ґрунтах та сільськогосподарській продукції / С.М. Дибкова, Т.Г. Грузіна, Л.С. Резніченко, З.Р. Ульберг // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, Т. 3 (115). – С. 51-55.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
3. Лепешкин И.В. Токсиколого-гигиеническая оценка и регламентация применения гербицидов на основе диметиламинной соли и 2-этилгексилового эфира 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты для защиты зерновых злаковых культур и кукурузы / И.В. Лепешкин, А.П. Гринько, Н.Н. Недопитанская // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. – 2013. – № 4. – С. 5-11.
4. Методичні рекомендації. Експресне біосенсорне визначення біологічного споживання кисню (БСК) для оцінки рівня забрудненості органічними речовинами об'єктів ветеринарно-санітарного контролю. — Київ, 2010. — 17 с.
5. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: офіційне / Під ред. В.О. Ящук, Д.В. Іванова, Р.М. Кривошії [та ін.]. – Київ: Юні вест Медіа, 2012. — 831 с.
6. Перелік санітарно-гігієнічних норм. Допустимі рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті. ДсанПіН8.8.1.2.3.4.-000-2001. Постанова Головного державного санітарного лікаря України № 137 від 20.09.2001, К., 2001. – 244 с.
7. Чміль В.Д. Методичні вказівки з визначення мікро кількостей пестицидів в продуктах харчування, кормах та навколишньому середовищі. Методика вимірювання масової частки 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти в зерні і олії кукурудзи методом газоріднинної хроматографії / В.Д. Чміль, Є.І. Давидюк. – Збірник № 34. – Київ: Міністерство екології та природних ресурсів України, 2003. – С. 140-153.
8. Чміль В.Д. Методи определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Методические указания по определению 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в воде, почве, фураже, продуктах питания

- растительного и животного происхождения хроматографическими методами / В.Д. Чмиль, Д.И. Чканников, Н.Н. Павлова, А.Н. Макеев. – М.: Колос, 1989. – С. 176-182.
- Goodman J.E. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma, gastric cancer, and prostate cancer: meta-analyses of the published literature / J.E. Goodman, C.T. Loftus, Zu Ke. // *Annals of Epidemiology*. – 2015. –V. 25, № 8. — P. 626-636.
 - Quastel J.H. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) as a Selective Herbicide / J.H. Quastel // *Agricultural control chemicals: Advances in Chemistry*. – 1950. – Vol. 1, № 45. – P. 244-249.
 - USDA Forest service. 2,4-D Human health and ecological risk assessment. Final report. – Arlington, 2006. – 245 p.

УДК 541.13:577.112.087

БІОАНАЛІТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУТЛИВОГО ЕЛЕМЕНТУ БІОСЕНСОРНОГО АНАЛІЗАТОРУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕРБІЦИДІВ НА ОСНОВІ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

Дибкова С. М., Грузина Т. Г., Резніченко Л. С.

Резюме. Мета дослідження полягала у визначенні біоаналітичних характеристик чутливого елемента біосенсорного аналізатору для визначення гербіцидів на основі 2,4-Д. Адекватним аналітичним сигналом біосенсорного аналізатору для визначення гербіцидів на основі 2,4-Д з чутливим елементом – бактеріями штаму *Pseudomonas* sp.24D — є респіраторна активність (РА) таких бактерій. Дія 2,4-Д на бактерії штаму *Pseudomonas* sp.24D проявляється в інгібуванні РА. РА бактерій *Pseudomonas* sp.24D не чутлива до дії іонів важких металів Cu, Zn, Cd, Cr, Mn, Co, Ni та фенолу у дослідженому концентраційному діапазоні: 0,1М-0,01мМ. Встановлена висока специфічність та висока чутливість бактерій штаму *Pseudomonas* sp.24D до 2,4-Д. Продемонстровано можливість створення чутливого до дії 2,4-Д сенсорного елемента на основі бактерій *Pseudomonas* sp.24D шляхом ліофілізації.

Ключові слова: бактерії, 2,4-Дихлорфеноксиоцтова кислота, респіраторна активність, сенсорний елемент, ліофілізація, біосенсор.

УДК 541.13:577.112.087

БИОАНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА БИОСЕНСОРНОГО АНАЛИЗАТОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕРБИЦИДОВ НА ОСНОВЕ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Дыбкова С. Н., Грузина Т. Г., Резниченко Л. С.

Резюме. Целью исследования было определение биоаналитических характеристик чувствительного элемента биосенсорного анализатора для определения гербицидов на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Адекватным аналитическим сигналом биосенсорного анализатора для определения гербицидов на основе 2,4-Д с чувствительным элементом – бактериями штамма *Pseudomonas* sp.24D – является респираторная активность (РА) таких бактерий. Действие 2,4-Д на бактерии штамма *Pseudomonas* sp.24D проявляется в ингибировании РА. РА бактерий *Pseudomonas* sp.24D не чувствительна к действию ионов тяжелых металлов Cu, Zn, Cd, Cr, Mn, Co, Ni и фенола в исследованном концентрационном диапазоне: 0,1М-0,01мМ. Определена высокая специфичность и высокая чувствительность бактерий штамма *Pseudomonas* sp.24D к 2,4-Д. Показана возможность создания чувствительного к 2,4-Д сенсорного элемента на основе бактерий *Pseudomonas* sp.24D путем лиофилизации.

Ключевые слова: бактерии, 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота, респираторная активность, сенсорный элемент, лиофилизация, биосенсор.

UDC 541.13:577.112.087

BIOANALYTICAL CHARACTERISTICS OF SENSITIVE ELEMENT OF BIOSENSOR ANALYZER FOR THE DETERMINATION HERBICIDES 2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID

Dybko S. M., Gruzina T. G., Rieznicenko L. S.

Abstract. In Ukraine, for the control of dicotyledonous weeds in cereal crops of cereals and corn using 42 drugs herbicidal active substance which is 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Herbicides based on 2,4-D belongs to the third class of danger. Approximately permissible level of 2,4-D in soil — 0.1 mg/kg, and acceptable daily intake for humans — 0.0001 mg/kg. Featured following maximum permissible level (MRL) of 2,4-D in grain cereals — 0.02 mg/kg, maize (corn) — 0,015 mg/kg. To determine the 2,4-D using the method of gas-liquid chromatography. However, this method is expensive, and by this method correspond limits the sensitivity of the method, which limits the range of 2,4-D test. Therefore, the development of express bioanalytical methods for the identification of 2,4-D is extremely important. Extremely promising acting bacterial biosensors based on amperometric sensor electrode Clark using both analytical signal of respiratory activity (RA) microbial cells and the level of inhibition.

The aim of this work was determining characteristics of bioanalytical sensor biosensor analyzer for determination of herbicides based on 2,4-D.

In this work have used herbicide «Amisol» («Ukravit», Ukraine). The bacteria strain *Pseudomonas* sp.24D, isolated from soil microbial consortium, served as the sensory element of the biosensor to 2,4-D. RA bacterial strain *Pseudomonas* sp.24D was realized by biosensor analytical signal analyzer and the measured parameter — the maximum value of the oxygen concentration changes measurements in the environment, which is expressed as an index of biological oxygen demand (BOD%). Amperometric transducer system was Clark oxygen electrode

(AZHA 101 M, Belarus) of portable express biosensor analyzer. The specificity of the bacteria strain *Pseudomonas* sp.24D to 2,4-D was assessed by analyzing the impact of heavy metals (ion Cu, Zn, Cd, Cr, Mn, Co, Ni) and phenol RA. Sensory element, that based on the bacteria *Pseudomonas* sp.24D, was obtained through lyophilization using a protective medium containing 10% sucrose and 2% gelatin. The sensitivity of the bacteria *Pseudomonas* sp.24D and created, based on this bacterias, sensory element assessed by the magnitude of RA after 30-minute exposure of bacterial cells with herbicide «Amisol» in final concentrations (mg/ml): 0,008; 0,016; 0,032; 0,048; 0,064; 0,08; 0,096; 0,112; 0,128; 0,144; 0,160; 0,32; 0,48; 0,64; 0,80.

It is shown that the maximum physiological activity of the bacteria strain *Pseudomonas* sp.24D corresponds to 22-23 hours of culturing bacteria in periodic culture. Ions of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Cr, Mn, Co, Ni) and phenol in a concentration range of 0.1M-0,01mM show no inhibition of RA cells investigated strain. Determination of the sensitivity of the bacteria strain *Pseudomonas* sp.24D to 2,4-D action as the basis of sensor elements biosensor showed a direct proportional inhibition of RA on the concentration of 2,4-D. This dependence in the area of low concentrations of 2,4-D (0,008-0,160 mg/ml) indicates the potential use of bacteria strain *Pseudomonas* sp.24D for the quantitative determination of 2,4-D. Especially valuable is the fact that this region of the sensitivity of cells to 2,4-D corelated with values of 2,4-D in agricultural raw materials. Evaluation of the sensitivity of sensor elements based on the bacteria *Pseudomonas* sp.24D, that was obtained by lyophilization of microorganisms using a protective environment, also showed a direct proportional inhibition of RA on the concentration of 2,4-D.

Estimated bioanalytical characteristics bacterial strain *Pseudomonas* sp.24D: physiological characteristics of growth in the periodic culture; RA dependence of the phase of bacterial growth; clear concentration-dependent inhibitory effect of 2,4-D on the value of RA. Installed the high specificity and high sensitivity of the bacterial strain *Pseudomonas* sp.24D to 2,4-D. Demonstrated ability to create sensitive to 2,4-D sensor elements that based on the bacteria *Pseudomonas* sp.24D by lyophilization.

Keywords: bacteria, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, respiratory activity, sensitive element, lyophilization, biosensor.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 25.09.2016 року