

УДК 57.083

RHODOCOCCLUS QINGSHENGII G1Mm1 КАК ОСНОВА БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНГИЦИДА КАРБЕНДАЗИМА

© 2024 г. Т. Н. Кувичкина^а, Е. Н. Капаруллина^а, *, Н. В. Доронина^а, А. Н. Решетиллов^а

^аФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Московская область, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: lenokap80@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 28.10.2023 г.

Исследована возможность использования штамма *Rhodococcus qingshengii* G1Mm1, выделенного из образца глины Мертвого моря, как основы биосенсора для определения бензимидазольного фунгицида карбендазима. Наблюдали высокую чувствительность биосенсора от 2 до 160 мкМ карбендазима при нейтральных значениях pH и концентрациях NaCl до 500 мМ с долговременной стабильностью до 30 сут.

Ключевые слова: амперометрический микробный биосенсор, родококки, *Rhodococcus qingshengii*, кислородный электрод, фунгицид карбендазим

DOI: 10.31857/S0026365624020086

Низкомолекулярные органические соединения (2,4-динитрофенол, ортофталат натрия, карбендазим) характеризуются высокой степенью токсичности. Для определения этих соединений могут быть использованы амперометрические биосенсоры, в которых в качестве чувствительного элемента применяются микроорганизмы. Разработаны биосенсоры для определения 2,4-динитрофенола и ортофталата натрия с использованием штаммов *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 и *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782, соответственно (Китова и соавт., 2004, Кувичкина и соавт., 2015, Патент, 2015).

Известно, что бензимидазольный фунгицид карбендазим широко используется в сельском хозяйстве для борьбы с различными грибными заболеваниями. Карбендазим химически стабилен и может сохраняться в почве в течение года (Singh et al., 2016). Показано его негативное влияние на печень, эндокринную и репродуктивные системы человека. Деградация этого соединения может происходить в окружающей среде под действием ряда микроорганизмов (Zhang et al., 2022). Известно ограниченное количество деструкторов карбендазима, среди которых преобладают грамположительные актинобактерии, принадлежащие к роду *Rhodococcus*. Несмотря на широкое использование этого фунгицида, пути его деградации изучены недостаточно. Однако охарактеризованы первые ферменты разложения карбендазима (Pandey et al., 2010; Zhang et al., 2022).

Цель данной работы – исследование возможности использования иммобилизованных клеток (ИМК) *Rhodococcus qingshengii* G1Mm1 как основы биосенсора для определения бензимидазольного фунгицида карбендазима.

Штамм G1Mm1 изолирован из образца глины Мертвого моря в рамках этого исследования. Чистую культуру выделяли на агаризованной среде ГКА (глюкозо-картофельный агар), содержащей 10 г глюкозы, 18 г агара, 300 мл картофельного настоя, 700 мл дистиллированной воды. Культуру выращивали на среде ГКА в течение 2–3 сут при температуре 28°C. Чистоту выделенной культуры контролировали световой микроскопией и по однородности колоний на агаризованной среде.

ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (“Zymo Research”, США), согласно инструкции производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали методом ПЦР с использованием универсальных праймеров для прокариот 27f и 1492r (Lane, 1991), секвенирование ПЦР-фрагментов проводили, как описано ранее (Belova et al., 2023). Поиск последовательности гена 16S рРНК проводили в базах данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и JGI (<https://img.jgi.doe.gov/>), филогенетический анализ осуществляли с помощью пакетов программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). На основании секвенирования гена 16S рРНК штамм G1Mm1 принадлежал к известному виду, поскольку имел

100% сходства с представителем рода *Rh. qingshengii* djl-6^T (Xu et al., 2007).

Штамм *Rh. qingshengii* G1Mm1 поддерживали на скошенном ГКА при температуре 28°C. Для культивирования штамма G1Mm1 использовали минеральную среду “К” состава (г/л): KH_2PO_4 —2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.125; NaCl — 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.002; pH — 7.5; доводили 5M NaOH. В качестве источника углерода использовали 0.04% карбеназима. В стерильную среду делали смыв клеток штамма с поверхности агаризованной среды ГКА (1 пробирка), а затем культивировали на качалке (200 об./мин) при температуре 28°C в течение 2 сут. Для приготовления носителя (биорецептора) биомассу клеток штамма G1Mm1, выращенную на жидкой минеральной среде с карбеназимом в качестве единственного источника углерода и энергии, отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 3 мин, дважды отмывали 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7.1) и ресуспендировали. Имобилизацию клеток (ИмК) проводили методом физической адсорбции на хроматографической бумаге Whatman GF/A (Великобритания). Клеточную суспензию наносили на бумагу, формируя пятно диаметром 3 мм, и подсушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Масса ИмК на биорецепторе составляла 2 мг сырого веса. Полученный биорецептор помещали на рабочую поверхность кислородного электрода типа Кларка и фиксировали его с помощью нейлоновой сетки. Измерения проводили с помощью гальваностата-потенциостата IPC—Micro (ООО “Кронас”, Россия), интегрированного с персональным компьютером. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt в пикоамперах в секунду (пА/с) (ответ биосенсора), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребляемого кислорода.

В условиях эксперимента использовали нерастущую культуру, для которой следовало ожидать стабильные стехиометрические соотношения между количеством потребленного кислорода и концентрацией карбеназима. Кинетические константы скорости потребления кислорода и деградации карбеназима идентичны. Максимальные скорости обоих процессов взаимно пропорциональны. Сравнение значений скорости потребления кислорода является обоснованным для подобного параметра деградации карбеназима.

Для изучения влияния концентраций карбеназима на потребление кислорода ИмК концентрации субстрата варьировали в диапазоне от 2 до 160 мкМ. На рис. 1 представлена градуировочная кривая зависимости ответа биосенсора от концентрации карбеназима.

Показано, что скорость деградации карбеназима возрастала по мере повышения его

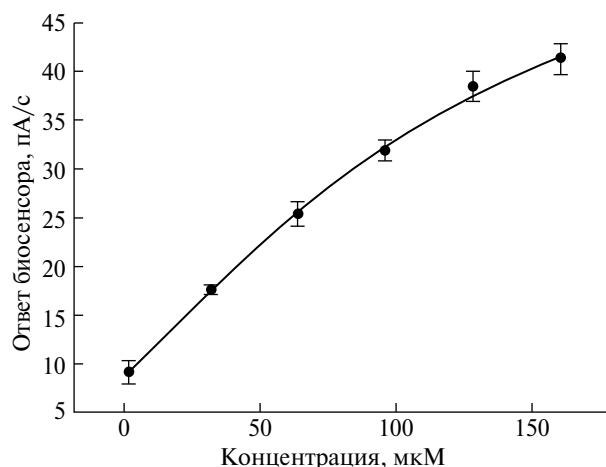


Рис. 1. Градуировочная зависимость биосенсора на основе ИмК *Rhodococcus qingshengii* G1Mm1 от концентрации карбеназима. Ответ биосенсора в пикоамперах в секунду (пА/с).

концентрации. Полученная зависимость величины ответа сенсора от концентрации карбеназима имеет классический сигмоидальный вид (рис. 1), ее аппроксимация проводилась с помощью уравнения Хилла с четырьмя параметрами, коэффициент смешанной корреляции $R^2 = 0.99$ в программе Sigma Plot 12.5. Для биосенсора на основе ИмК *Rh. qingshengii* G1Mm1 были рассчитаны параметры уравнения Хилла: максимальная скорость потребления кислорода ($V_{\text{макс}}$) 62.11 пА/с и константа сродства к субстрату 145.53 мкМ.

В ходе эксперимента определяли оптимальное значение pH буферного раствора в диапазоне значений pH 5–11. Наиболее эффективным оказался 50 мМ калий-фосфатный буфер со значениями pH, близкими к нейтральным.

Исследовали зависимость ответов биорецептора от ионной силы в диапазоне от 25 до 500 мМ NaCl. Биорецептор регистрировал значительные ответы даже при высоких концентрациях хлористого натрия (до 500 мМ), в отличие от других биосенсоров на низкомолекулярные органические соединения (Китова и соавт., 2002; Кувичкина и соавт., 2015a). Возможно, это связано с источником выделения (Мертвое море), в котором концентрация соли достигает 34%.

Для оценки субстратной специфичности биорецептора на основе ИмК штамма *Rh. qingshengii* G1Mm1 использовали ряд органических соединений в концентрации 0.1 мМ (рис. 2). Показано, что при введении раствора катехола в кювету биорецептор регистрировал ответ более 80 пА/с. Предположили, что одним из интермедиатов разложения карбеназима является катехол, также как у *Pseudomonas* sp. CBW (Fang et al., 2010).

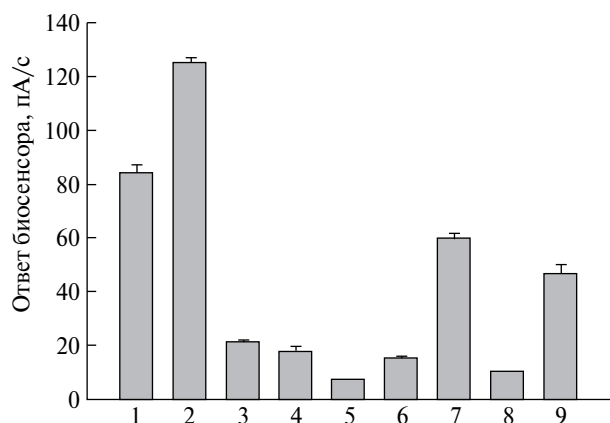


Рис. 2. Субстратная специфичность ИмК штамма *Rh. qingshengii* G1Mm1. Обозначения: 1 — катехол; 2 — фруктоза; 3 — L(-) - арабит; 4 — D-глюкоза; 5 — D-сорбит; 6 — D(+)-целлобиоза; 7 — метиламин; 8 — диметиламин; 9 — карбендазим (концентрация субстратов 0.1 мМ). Ответ биосенсора в пикоамперах в секунду (пА/с).

Кроме того, типовой штамм *Rh. qingshengii* djl-6^T способен расти на катехоле, глюкозе, фруктозе и карбендазими (Xu et al., 2007).

Операционная стабильность является одной из важнейших характеристик биосенсора. Величина ответа биосенсора на карбендазим остается стабильной в течение 6 измерений.

Время отклика — это время, требующееся для того, чтобы аналитическая система пришла в состояние равновесия с определяемым веществом. В данном случае при введении карбендазима в кювету время отклика составляло 1.5 мин, время восстановления составляло 23.5 мин. Таким образом, длительность одного измерения, включающая время отклика и время регенерации, составило 25 мин.

Долговременная стабильность, характеризующая устойчивость работы сенсора в течение длительного периода времени, показала, что ответ был стабильным в течение 30 сут.

Данное исследование позволило создать макет амперометрического биосенсора на основе ИмК штамма актинобактерий *Rhodococcus qingshengii* G1Mm1 для определения фунгицида карбендазима. Таким образом, *Rhodococcus qingshengii* G1Mm1 перспективен для деградации и биоконтроля остаточных концентраций этого фунгицида в экологически чистом земледелии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1051).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы анализировали и обсуждали данные, и участвовали в подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Китова А.Е., Кувичкина Т.Н., Аринбасарова А.Ю., Решетиллов А.Н. Деградация 2,4-динитрофенола свободными и иммобилизованными клетками *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 // Прикл. биохим. микробиол. 2004. Т. 40. С. 307–311.
- Kitova A.E., Kuvichkina T.N., Arinbasarova A.Y., Reshetilov A.N. Degradation of 2,4-dinitrophenol by free and immobilized cells of *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 // Appl. Biochem. Microbiol. 2004. V. 40. P. 258–261.
- Кувичкина Т.Н., Будина Д.В., Олькова А.С., Решетиллов А.Н. Оценка присутствия ди-(2-этилгексил)фталата в поливинилхлоридных пластмассах масс-спектрометрическим и биосенсорным методами // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 4. С. 11–15.
- Патент на полезную модель 2015. № 156546.
- Belova A.A., Kaparullina E.N., Agafonova N.V., Grouzdev D.S., Kopitsyn D.S., Machulin A.V., Doronina N.V. *Ancylobacter crimeensis* sp. nov., a new species of aerobic methylotrophic bacteria isolated from Oak phyllosphere // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 598–608.
- Fang H., Wang Y., Gao C., Yan H., Dong B., Yu Y. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim // Biodegradation. 2010. V. 21. P. 939–946.
- Pande G. Domian S.J., Russell R.J., Brearley C., Kotsonis S., Cakeshott J.G. Cloning and biochemical characterization of a novel carbendazim (methyl-1H-benzimidazol-2-ylcarbamate)-hydrolyzing esterase from newly isolated *Nocardiodetes* sp. strain SG-4G and its potential for use in enzymatic bioremediation // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 75. P. 2040–2945.
- Singh S., Singh N., Kumar V., Datta S., Wani B., Singh D., Singh K., Singh J. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim // Environ. Chem. Lett. 2016. V. 14. P. 317–329.
- Xu J.L., He J., Wang Z.C., Wang K., Li W.J., Tang S.K., Li S.P. *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 2754–2757.
- Zhang M., Bai X., Li Q., Zhang L., Zhu Q., Gao S., Ke Zh., Jiang M., Hu J., Qiu J., Hong Q. Functional analysis, diversity and distribution of carbendazim hydrolases Mhel and CbMa, responsible for the initial step in carbendazim degradation // Environ. Microbiol. 2022. V. 24. P. 4803–4817.

***Rhodococcus qingshengii* G1Mm1 as the Basis of a Biosensor for Determination of the Fungicide Carbendazim**

T. N. Kuvichkina¹, E. N. Kaparullina^{1, *}, N. V. Doronina¹, and A. N. Reshetilov¹

¹*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences," Pushchino, 142290 Russia*
**e-mail: lenokap80@gmail.com*

Received October 13, 2023; revised October 27, 2023; accepted October 28, 2023

Abstract—The possible application of *Rhodococcus qingshengii* strain G1Mm1, isolated from a Dead Sea clay sample, as the basis of a biosensor for determining the benzimidazole fungicide carbendazim was investigated. High sensitivity of the biosensor under neutral pH and up to 500 mM NaCl at 2 to 160 μ M carbendazim was maintained for up to 30 days.

Keywords: amperometric microbial biosensor, rhodococci, *Rhodococcus qingshengii*, oxygen electrode, carbendazim