

АДГЕЗИЯ КЛЕТОК *Escherichia coli* K-12 НА ПОВЕРХНОСТИ ОРГАНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЯ

Адгезия клеток микроорганизмов на поверхности органофункционализированных сорбентов для микроэкстракции при работе с растворами, содержащими химические и биологические поллютанты, является обязательным звеном в цепи физико-химических взаимодействий при проведении количественного анализа. При этом вопросы эффективности определения химических аналитов в таких системах часто связаны с ухудшением точности и воспроизводимости аналитического метода. Способствуют этому в первую очередь особенности строения сорбентов – пористость, высокая площадь поверхности, наличие и состав привитых функциональных групп. Так, при подготовке проб воды методом твердофазной микроэкстракции для газохроматографического определения хлорорганических пестицидов (альфа и гамма изомеров гексахлорциклогексана (α -ГХЦГ и γ -ГХЦГ) и 4,4-дихлордифенилтрихлорэтана (4,4-ДДТ)), возможна адгезия содержащихся в природных источниках клеток *Escherichia coli* K-12 как на силикагелях с модифицированной C_{18} -углеводородными группами поверхностью, так и на классическом гранулированном силикагеле марки КСМГ без модификации. Кроме того, изучен вопрос эффективности микроэкстракции пестицидов из модельных растворов, содержащих взвесь клеток *E. coli*. В результате исследования была показана высокая связывающая способность силикагелей по отношению к микроорганизмам. Рассчитанное время установления сорбционного равновесия не превышало 30 минут, а коэффициент распределения микроорганизмов V_s при использовании немодифицированного силикагеля был выше, по сравнению с таковым для силикагеля с поверхностью, содержащий привитые функциональные группы C_{18} , что свидетельствует о меньшей адгезивной способности последнего. При совместной сорбции микроорганизмов и хлорорганических пестицидов коэффициент распределения существенно не отличался от такового, рассчитанного ранее. При этом показатели эффективности извлечения 4,4-ДДТ уменьшались на фоне незначительного изменения степени извлечения изомеров ГХЦГ. Таким образом, представляется возможной ситуация совместной сорбции изученных пестицидов и клеток *E. coli* без потерь для качества анализа.

Ключевые слова: органофункционализированный силикагель, адгезия, *Escherichia coli* K-12, хлорорганические пестициды, экстракция.

Силикагель – гель, образующийся из перенасыщенных растворов кремниевых кислот, по праву занимает лидирующее место среди сорбентов в современной аналитической химии и экологической промышленности [1]–[3]. Комплекс физико-химических особенностей, таких как инертность, термостойкость и пористость, позволил производить на основе силикагеля разнообразными модифицированными сорбенты с заданными параметрами, способными удерживать на своей поверхности как химические, так и биологические поллютанты [4], [5]. Особую роль занимает силикагель при производстве картриджей для твердофазной экстракции разного размера и сорбционной ёмкости, вплоть до миниатюрных [6]–[9]. При этом особой актуальностью отличаются вопросы совместной экстракции органических компонентов и удержания микробных клеток на итоговую результативность анализа, как, например, в случае подготовки проб природной воды, содержащей в своём составе механические примеси и взвесь микроорганизмов [10].

В рамках данной работы рассмотрены вопросы адгезии клеток *Escherichia coli* K-12 на поверхности силикагелей с поверхностью, модифицированной углеводородами при подготовке проб воды методом твердофазной микроэкстракции и газохроматографического определения пестицидов.

Материалы и методы

В качестве сорбентов для исследования были выбраны: C_{18} -гибридный силикагель (Kromasil, Германия), а также силикагель марки КСМГ ГОСТ 3956–76. Перед применением силикагель КСМГ измельчали в ступке путём растирания и просеивали через сито с диаметром ячеек 0,2 мм. После образцы высушивали в сушильном шкафу при 180 °С в течение 4 часов и помещали в ёмкость с притёртой пробкой. Хранили в эксикаторе для предотвращения дополнительного увлажнения. Из группы хлорорганических пестицидов в качестве модельных загрязнителей были выбраны альфа и гамма изомеры

гексахлорциклогексана (α -ГХЦГ и γ -ГХЦГ) и 4.4-дихлордифенилтрихлорэтан (4.4-ДДТ), представляющие собой порошок с содержанием основного вещества 98–99 %. Для приготовления водных растворов все используемые пестициды предварительно растворяли в этиловом спирте ГОСТ 5962-2013.

Для описания адгезии микроорганизмов на поверхности силикагеля была использована суточная культура клеток *E. coli* К-12. Клетки бактерий отмывали от остатков среды роста (ГРМ-бульон ТУ 9398-021-78095326-2006) и ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере рН 7,0 до оптической плотности 0,1. Далее по 2 мл приготовленной суспензии помещали в стерильные пробирки с предварительно подготовленной навеской силикагеля на 90 минут. После рассчитывали V_s – коэффициент распределения микроорганизмов между водной средой и твердой фазой, как разность концентрации клеток до и после совместной инкубации с сорбентом [10]. Для выражения концентрации клеток использовали технику подсчета колониеобразующих единиц, КОЕ. Для анализа качества совместного удержания пестицидов и микробных клеток в пробирки дополнительно вносили 10 мкл смешанного раствора хлорорганических пестицидов с концентрацией 5 мкг/дм³. По истечению срока инкубации сорбент отделяли декантацией, просушивали на воздухе и проводили десорбцию с использованием *n*-гексана и газохроматографическое определение концентрации пестицидов. Оценивали степень извлечения пестицидов (R , %).

Результаты исследования

На первом этапе исследования была изучена адгезивная способность силикагелей по отношению к клеткам *E. coli* в экспериментальной системе, не содержащей дополнительные примеси. Показана высокая связывающая способность силикагелей по отношению к микроорганизмам. Изучение кинетики сорбции показало, что время установления сорбционного равновесия не превышало 30 минут. Рассчитанный коэффициент распределения микроорганизмов V_s в случае использования КСМГ силикагеля составил $1,1 \times 10^{12}$ КОЕ/г. При этом способность к адгезии *E. coli* уменьшалась для силикагеля с C_{18} -модифицированной структурой и была описана достоверным уменьшением коэффициента

распределения до $0,7 \times 10^9$ КОЕ/г. Данный эффект предположительно мог быть вызван как уменьшением удельной площади доступной поверхности силикагеля в процессе модификации, так и увеличением степени его гидрофобности, вызванным наличием большого числа C_{18} -углеводородных цепей, выполняющих роль своеобразного гидрофобного экрана для грамотрицательных клеток *E. coli* [11]–[15].

Следующий экспериментальный блок был направлен на выявление особенностей совместной сорбции микроорганизмов и хлорорганических пестицидов. Учитывая полученные ранее данные, в качестве сорбента применяли только C_{18} -гибридный силикагель. Пестициды вносились в суспензию клеток в виде водно-спиртового раствора с конечной концентрацией спирта не более 3%. Оцененная гибель клеток *E. coli* в предварительном эксперименте после совместной инкубации микроорганизмов в растворе пестицидов не превышала 5%. На основании полученных данных были получены изотермы сорбции микроорганизмов на поверхности C_{18} -гибридного силикагеля. Показано, что коэффициент распределения существенно не отличался от такового, рассчитанного ранее. При этом качество извлечения пестицидов на поверхности сорбента также было проанализировано путём их десорбции. Рассчитанная степень извлечения пестицидов в случае отсутствия клеток в сорбируемом растворе варьировала от 58% до 60 %, тогда как внесение клеток *E. coli* в экспериментальную смесь уменьшало данный показатель. Полученный эффект был более выражен по отношению к 4.4-ДДТ, степень извлечения которого уменьшалась до 20%, тогда как изменение параметров сорбции изомеров ГХЦГ не носило достоверный характер.

Выводы

Таким образом, представляется возможной ситуация совместной сорбции α - и γ -изомеров ГХЦГ и клеток *E. coli* на поверхности картриджной для твердофазной микроэкстракции без потерь для качества анализа на содержание данных поллютантов, однако в случае расширения числа экстрагируемых веществ и, как следствие, определяемых показателей, рекомендуется проводить фильтрование или центрифугирование проб природной воды.

15.09.2017

Список литературы:

1. Kara D., Fisher A. Modified silica gel and their use for the preconcentration of trace elements // Separation and purification reviews. – 2012. – V. 41. – P. 267-317.
2. Воронков М. Г., Власова Н. Н., Пожидаев Ю. Н. Кремнеорганические ионообменные и комплексообразующие сорбенты // ЖПХ. – 1996. – Т. 69. – №5. – С. 705-718.
3. Yu H., Song H., Chen M. Dithizone immobilized silica gel on-line preconcentration of trace copper with detection by flame atomic absorption spectrometry // Talanta. – 2011. – V. 85. – № 1. – P. 625-630.
4. Ashley K.D., Inns W.B. Control of physical structure of silica-alumina catalyst // Industr. and Eng. Chem. – 1952. – V.44. – № 12. – P. 2857-2863.
5. Ying J.Y., Mehnert C.P., Wong M.S. Synthesis and applications of supramolecular-templated mesoporous materials // Angew. Chem. – Int. Edit. – 1999. – V.38. – № 1-2. – P. 56-77.
6. Laaks J., Jochmann M.A., Schmidt T.C. Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – V. 402. – P. 565-571.
7. Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial // Anal. Chim. Acta. – 2011. – V. 701. – P. 119-128.
8. Bagheri H., Alipour N., Ayazi Z. Multiresidue determination of pesticides from aquatic media using polyaniline nanowires network as highly efficient sorbent for microextraction in packed syringe // Anal. Chim. Acta. – 2012. – V. 740. – P. 43-49.
9. Самонин В. В., Еликова Е. Е. Изучение закономерностей адсорбции бактериальных клеток на пористых носителях // Микробиология. – 2004. – № 6. – С. 810-816.
10. Савин А. В. Органомодифицированные сорбенты для удаления легких нефтяных углеводородов из водной и воздушной сред: дис. ... канд. техн. наук. – Казань, 2014. – 178 с.
11. Фоменко О. Е., Рёсснер Ф. Модифицирование силикатных поверхностей путем силилирования их кремнийорганическими соединениями // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9. – № 5. – С. 633-642.
12. Савин А. В., Денисова А. П., Хузиахметов Р. Х., Неклюдов С. А., Бреус В. А. Сорбционное связывание углеводородов и условно-патогенных микроорганизмов неорганическими сорбентами (на примере бензола и E. coli) // Вестник казанского технологического университета. – 2015. – Т. 15. – № 19. – С. 123-126.
13. Delkash M., Bakhshayesh B. E., Kazemian H. Using zeolitic adsorbents to clean up special wastewater streams: A review // Microporous and Mesoporous Materials. – 2015. – V. 214. – P. 224-241.
14. Sakkos J. K., Mutlu B. R., Wackett L. P., Aksan A. Adsorption and biodegradation of aromatic chemicals by bacteria encapsulated in a hydrophobic silica gel // Appl. Mater. Interfaces. – 2017. – V. 9. – № 32. – P. 26848-26858.
15. Seki H. Silica gel medium for enumeration of petroleumlytic microorganisms in the marine environment // Appl. Microbiol. – 1973. – V. 26. – № 3. – P. 318-320.

Сведения об авторах:

Романенко Наталья Александровна, старший преподаватель кафедры биохимии и микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: romanenko-na@yandex.ru

Свиридова Татьяна Геннадьевна, студентка группы 16 Хим(м)ФАХ кафедры биохимии и микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: kobtg@yandex.ru

Сальникова Елена Владимировна, заведующий кафедрой химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат химических наук, доцент
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: salnikova_ev@mail.ru