

*На правах рукописи*



АРЛЯПОВ ВЯЧЕСЛАВ АЛЕКСЕЕВИЧ

**МИКРОБНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ  
КИСЛОРОДА**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора технических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре химии естественнонаучного института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тулский государственный университет».

**Научный консультант:** Заведующая кафедрой биотехнологии ФГБОУ ВО «Тулский государственный университет», доктор химических наук, доцент

**Понаморева Ольга Николаевна**

**Официальные оппоненты:** Дзантиев Борис Борисович, доктор химических наук, профессор, руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики, заведующий лабораторией иммунобиохимии федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Ефременко Елена Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией экобиокатализа, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

**Сироткин Александр Семенович**, доктор технических наук, профессор, декан факультета пищевых технологий, заведующий кафедрой промышленной биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский национальный исследовательский технический университет».

Защита диссертации состоится «21» июня 2022 г. в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <https://diss.muctr.ru/>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 99.0.027.03

Кандидат технических наук, доцент



Шакир И.В.

# 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность работы

Одним из инновационных направлений развития аналитической биотехнологии является создание амперометрических биосенсоров – современных биотехнологических инструментов, сочетающих в себе высокую чувствительность и простоту анализа. Они могут быть с успехом использованы для контроля индивидуальных компонентов и интегральных характеристик в экологическом мониторинге, пищевой промышленности, клинической диагностике. Так, амперометрические биосенсоры в настоящее время нашли широкое применение для определения глюкозы в крови, хотя перспективы их возможного использования гораздо шире.

Экспресс-анализ загрязняющих веществ в объектах окружающей среды, в частности в природных водоемах, является важной практической задачей. Одна из наиболее широко применяемых характеристик загрязнения воды – это биохимическое потребление кислорода. Согласно определению, БПК – это количество кислорода, необходимое для биохимического окисления органических соединений в течение определенного периода времени под действием микроорганизмов. Стандартный анализ БПК длится не менее 5 дней (БПК<sub>5</sub>), в течение которых загрязняющие вещества могут попасть в природные водоемы, вызвать их эвтрофикацию и гибель полезных гидробионтов. Большое время выполнения классической методики оценки БПК привело к созданию новых подходов к быстрой оценке данного показателя с использованием биосенсоров на основе микроорганизмов, способных метаболизировать значительное количество веществ, содержащихся в пробах воды. Принципиальным отличием этого подхода от классического служит снижение длительности измерения с пяти дней до нескольких минут.

Стоит отметить, что число публикаций по созданию БПК-биосенсоров в журналах, индексируемых международными базами данных, в последние годы неуклонно растет. Это свидетельствует о существовании ряда проблем, возникающих при создании БПК-биосенсоров, которые необходимо решать. Наиболее важными вопросами разработки БПК-анализаторов представляются: упрощение технологии изготовления и обслуживания биологического рецепторного элемента, уменьшение нижней границы анализируемых значений БПК, повышение долговременной стабильности рецепторных систем и увеличение их устойчивости к токсичным компонентам сточных вод. Решение поставленных вопросов возможно как за счет разработки подходов к получению аналитического сигнала биосенсора, благодаря использованию различных типов высокочувствительных преобразователей, так и за счет выбора биологического материала с высокой метаболической активностью, устойчивостью к

токсикантам и широким спектром утилизируемых субстратов, и новых методик иммобилизации биоматериала для увеличения стабильности аналитической системы.

### **Цель работы**

Разработка комплексного научно-методологического подхода к формированию амперометрических микробных биосенсоров для экспресс-анализа БПК и создание на этой базе серийного анализатора биохимического потребления кислорода.

Для достижения цели работы были поставлены и решены следующие **задачи:**

1. Разработать методологию выбора биологического материала для БПК-биосенсора, заключающуюся в сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров. Установить возможность применения данного подхода при использовании индивидуальных культур, искусственных и естественных ассоциаций микроорганизмов активного ила.
2. Провести сравнительный анализ аналитических и метрологических характеристик амперометрических биосенсорных анализаторов в системах с различными способами иммобилизации микроорганизмов для создания стабильных и воспроизводимых рецепторных элементов БПК-биосенсоров.
3. Разработать технологию формирования электродов медиаторного БПК-биосенсора путем моделирования процессов переноса электронов в биоэлектрохимических системах «микроорганизм – медиатор – электрод» и оценить возможность использования различных редокс-соединений в роли искусственных акцепторов электронов для микроорганизмов прокариот и эукариот. Научно обосновать применение двухмедиаторных схем регистрации сигнала в биоэлектрохимических системах на основе дрожжей.
4. Обосновать применение редокс-активных гидрогелей на основе химически модифицированных биополимеров с включенными углеродными нанотрубками для повышения эффективности переноса электронов от бактериальных микроорганизмов на электрод в медиаторных биосенсорах.
5. Создать лабораторные модели биосенсоров на базе кислородного и медиаторного электродов для экспресс-анализа БПК, провести их апробацию на образцах вод и сравнить полученные результаты с

результатами стандартного метода для выбора прототипа коммерческого БПК-биосенсора.

6. Разработать коммерческий БПК-биосенсор, подготовить и аттестовать методику экспресс-анализа биохимического потребления кислорода с применением биосенсорного анализатора.

### **Научная новизна работы**

Предложен научно-методологический подход к формированию чувствительных и стабильных амперометрических микробных биосенсорных анализаторов, основанный на сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров.

Впервые проведен сравнительный анализ ключевых параметров электрохимических БПК-сенсоров на основе единичных штаммов, искусственных и естественных сообществ бактерий и дрожжей, разных способов иммобилизации биоматериала и генерации сигнала биосенсора, позволивший создать научную базу для разработки анализаторов БПК.

Выделены из активного ила очистных сооружений, охарактеризованы и депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, являющиеся перспективными для применения в биотехнологии. Показано, что данные бактерии и дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 могут метаболизировать с высокой скоростью большой круг органических соединений, что дает возможность применять их для формирования биочувствительных элементов БПК-сенсоров.

Впервые на основе сходства ростовых параметров и различия в спектрах окисляемых субстратов микроорганизмов показана возможность формирования их устойчивых ассоциаций с широким спектром окисляемых субстратов для использования в биорецепторе БПК-сенсора.

Синтезирован и охарактеризован биосовместимый полимер поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном, обладающий сетчатой структурой, что обеспечивает формирование гидрогеля для эффективной иммобилизации бактериальных и дрожжевых микроорганизмов в аналитической биотехнологии.

Впервые предложена технология выбора эффективных медиаторных биоэлектрохимических систем с бактериальными и дрожжевыми микроорганизмами, основанная на совместном анализе констант скорости взаимодействия биоматериала с медиатором и констант скорости передачи электронов на электрод. Определены наиболее эффективные искусственные акцепторы электронов для микроорганизмов *P. yeei* и *D. hansenii* в системах с графито-пастовым электродом. Эффективность предложенного подхода к

формированию медиаторных биоэлектрохимических систем подтверждается увеличением чувствительности биосенсоров.

Впервые на основе анализа экспериментально найденных констант скорости взаимодействия микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* с искусственными акцепторами электронов, констант скорости передачи электронов на электрод, констант скорости взаимодействия ферроцена и ряда водорастворимых редокс-соединений предложен подход к разработке двухмедиаторных биосенсорных систем, который дает возможность увеличить эффективность внеклеточного переноса электронов от микроорганизмов эукариот на электрод.

Предложена технология, позволяющая связать метаболизм бактериальных микроорганизмов *Paracoccus yeei* с генерацией электрохимического сигнала на электроде при участии биосовместимых редокс-активных гидрогелей на основе модифицированных ферроценом хитозана и бычьего сывороточного альбумина с включенными углеродными нанотрубками. Полученные результаты позволяют продвинуть исследования и разработки в области создания и миниатюризации устройств, основанных на сопряжении микроорганизмов с электрохимическими преобразователями.

### **Практическая значимость работы**

В ходе выполнения работы решена важная научно-технологическая задача по созданию экспресс-анализатора биохимического потребления кислорода в воде, позволяющего сократить время анализа проб с 5 суток до нескольких минут. Разработаны амперометрические биосенсорные анализаторы биохимического потребления кислорода на основе единичных штаммов и сообществ микроорганизмов, обладающие высокой чувствительностью, стабильностью и корреляцией результатов с результатами стандартного метода. По ключевым характеристикам разработанные экспресс-анализаторы БПК превосходят известные аналоги. Исследование вносит практический вклад в создание экспресс-методов анализа объектов окружающей среды на основе биосенсоров. Полученные результаты являются базой для производства недорогих, портативных и эффективных анализаторов воды, внедрение которых повысит экологическую безопасность и технологический уровень страны.

Включение бактерий или дрожжей в гидрогели на основе синтезированного полимера ПВС, сшитого N-винилпирролидоном, дает возможность реализовать технологию серийного изготовления сенсорных элементов биологических датчиков с воспроизводимыми свойствами, в том числе путем послойной иммобилизации.

Разработанный подход к созданию биоэлектрохимических систем «микроорганизм – медиатор – электрод», с применением анализа констант

скорости взаимодействия искусственных акцепторов электронов с микроорганизмами и электродом, является универсальным и может быть использован при создании медиаторных биологических сенсоров не только для анализа БПК, но и в перспективе для мониторинга других показателей (токсичности, концентрации индивидуальных веществ).

Предложена новая биоэлектрохимическая схема генерации сигнала, реализованная на основе электродов из графитовых материалов с иммобилизованными в биосовместимые ферроценмодифицированные гидрогели с УНТ микроорганизмами. Такая схема обеспечивает передачу электронов от дыхательной цепи бактерий на электрод и позволяет создавать модифицированные электроды, характеризующиеся длительным временем стабильного функционирования, высокой чувствительностью, возможностью анализа в средах с низким содержанием кислорода, а также простотой и технологичностью изготовления. Результаты, полученные в работе, вносят вклад в развитие современной аналитической биотехнологии и позволяют расширить возможности применения медиаторных электродов на основе графитовых материалов (в том числе и наноматериалов).

На основании обобщения проведенных исследований подготовлено техническое задание на разработку биосенсорного анализатора БПК. Совместно с научно-производственной фирмой ООО «Эконикс-Эксперт» разработан коммерчески доступный экспресс-анализатор биохимического потребления кислорода «Эксперт-009». Подготовлена и аттестована методика экспресс-оценки БПК с использованием биологического сенсора (МУ 09–16/001). Созданные биосенсорные анализаторы могут применяться для анализа вод различного происхождения на очистных сооружениях, промышленных предприятиях, службах Роспотребнадзора и МЧС, а также в других структурах, занимающихся экологическим мониторингом.

По результатам работы получено 10 патентов РФ, в которых представлены технические решения к разработке биосенсорных анализаторов для определения БПК и содержания биоразлагаемых органических веществ.

Разработанные биосенсорные анализаторы применяются в ТулГУ для обучения студентов по направлениям подготовки: 04.03.01-Химия, 19.03.00-Биотехнология, 06.03.01-Биология, что дает возможность повышать эффективность образовательного процесса.

#### **Связь с крупными научными программами и проектами**

Описанные в диссертации исследования проходили в 2005 – 2021 гг. в рамках выполнения следующих проектов, руководителем или исполнителем которых был соискатель: гранты ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»: г/к 02.740.11.0296 (исполнитель, 2009 – 2011 гг.),

г/к № 16.740.11.0766 (руководитель, 2011 – 2013 гг.); гранты Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 16.120.11.4341-МК (руководитель, 2012 – 2013 гг.), договор № 14.Z56.14.330-МК (руководитель, 2014 – 2015 гг.), договор № 14.Z56.16.5425-МК (руководитель, 2016 – 2017 гг.); ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России»: соглашение № 14.574.21.0062 (исполнитель, 2014 – 2016 гг.); госзадания Минобрнауки РФ № 14.2094.2014/К (исполнитель, 2014 – 2016 гг.), № FEWG-2020-0008 (исполнитель, 2020 – 2022 гг.); гранта РФФИ № 16-48-710959 р\_а (руководитель, 2016 – 2018 гг.); гранта РФФИ №17-74-10078 (руководитель, 2017 – 2019 гг.).

### **Степень достоверности и апробация работы**

Результаты работы представлялись на Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015, 2017 гг.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2009, 2011, 2014 гг.); Международной конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2014, 2016, 2018, 2020, 2021 гг.); Международной научно-технической конференции «Системы контроля окружающей среды» (Севастополь, 2016 г.); Международной промышленной выставке «Hannover Messe» (Ганновер, 2014 г.); Международном салоне изобретений и инновационных технологий «Архимед» (Москва, 2017 г.); Национальной выставке-форуме «ВУЗПРОМЭКСПО» (Москва, 2015, 2016, 2019 гг.); 71-ой Международной выставке «Идеи, изобретения и инновации «iENA 2019»» (Нюрнберг, 2019 г.), Международной выставке «Smart China Expo – 2021» (Чунцин, 2021 г.).

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Научно-методологический подход к созданию высокочувствительных и стабильных амперометрических биосенсоров на основе микроорганизмов прокариот и эукариот, основанный на сравнительном анализе наиболее важных количественных физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик.
2. Подход к формированию устойчивых ассоциаций микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов на основе сходства их ростовых параметров и различия спектра окисляемых субстратов для использования в биорецепторе БПК-сенсора.
3. Методика получения полимера поливинилового спирта, сшитого N-винилпирролидоном, обладающего сетчатой структурой, который дает



возможность создавать стабильные и чувствительные рецепторные элементы БПК-биосенсоров.

4. Технология выбора медиаторных биоэлектрохимических систем с бактериальными и дрожжевыми микроорганизмами, основанная на совместном анализе констант скорости взаимодействия микроорганизмов с медиатором и констант скорости гетерогенного переноса электронов на электрод.
5. Физико-химический подход к формированию двухмедиаторных систем в сочетании с дрожжевыми клетками, основанный на анализе констант скорости взаимодействия искусственных акцепторов электронов с микроорганизмами эукариот, констант скорости передачи электронов на электрод, констант скорости взаимодействия ферроцена и ряда водорастворимых медиаторов, позволяющий увеличить эффективность внеклеточного переноса электронов от дрожжевых микроорганизмов.
6. Предложенная технология связывания метаболизма бактериальных микроорганизмов *Paracoccus yeai* с генерацией электрохимического сигнала на электроде при участии биосовместимых редокс-активных гидрогелей, модифицированных УНТ.
7. Техническое задание на разработку амперометрического биосенсорного анализатора БПК и аттестованная методика определения БПК с использованием амперометрического биосенсорного анализатора.

#### **Личный вклад автора**

Автор представленного исследования выполнял ключевую роль на всех этапах диссертационной работы. Исследования проведены соискателем, а также студентами и аспирантами под научным руководством соискателя или получавшими у него консультации, что подтверждается совместными научными работами. Под руководством Арляпова В.А. защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата наук. Определение состава активного ила и идентификация выделенных микроорганизмов проведены на базе ЦКП Геном (г. Москва). Электронно-микроскопические исследования выполнены в лаборатории Цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН (г. Пущино). Изучение структуры гидрогелей модифицированного ПВС методом ЯМР проведено в Центре магнитной спектроскопии ИБХФ РАН (г. Москва).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 88 печатных работ, в том числе 21 входящих в международные базы данных и 10 патентов РФ. В автореферате приведены основные печатные работы, отражающие главные результаты диссертации.

### Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 422 страницах и состоит из введения, 4-х глав, экспериментальной части, выводов, списка литературы, включающего 322 источника и 8 приложений. Работа содержит 179 рисунков и 53 таблицы.

### **ГЛАВА 1. РАЗРАБОТКА BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ ФОРМИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БПК-БИОСЕНСОРА**

При создании биочувствительных элементов биосенсоров для оценки БПК применяют микроорганизмы с широким спектром окисляемых субстратов и другими полезными свойствами, а также искусственные и естественные (активный ил) сообщества микроорганизмов. Как правило, сенсоры на основе монокультур микроорганизмов характеризуются более высокой стабильностью работы, но имеют большую ошибку определения БПК из-за более узкого спектра окисляемых субстратов у биоматериала. При этом использование микроорганизмов эукариот более предпочтительно, так как они менее подвержены влиянию условий внешней среды. Для расширения спектра окисляемых веществ применяют искусственные ассоциации, обычно включающие в себя 2 – 3 различных микроорганизма. Биосенсоры, в которых применяются сложные сообщества микроорганизмов, дают показания, максимально приближенные к стандартному методу оценки БПК, однако, имеют плохую стабильность и воспроизводимость данных из-за постоянно изменяющегося микробного состава. Таким образом, разработка биораспознающего элемента БПК-биосенсора с широким спектром окисляемых субстратов является актуальной задачей. Проведенные в данном направлении исследования позволят повысить правильность определения БПК методом с использованием биосенсора при сохранении высокой чувствительности анализа.

## 1.1. Выбор микроорганизмов для формирования биораспознающего элемента БПК-сенсора на основе скрининга штаммов ВКМ

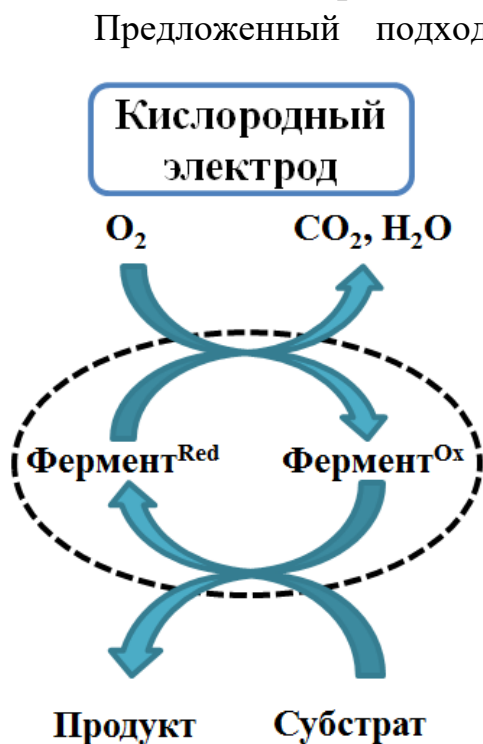


Рис. 1. Принцип работы биосенсора на базе кислородного электрода.

Предложенный подход к выбору биологического материала для биочувствительного элемента БПК-сенсора основан на сравнительном анализе чувствительности микроорганизмов по отношению к окисляемым органическим субстратам как ключевой характеристике биокаталитической активности; стабильности в иммобилизованном состоянии как ключевой физиолого-биохимической характеристике и способности микроорганизмов окислять широкий круг веществ как ключевой метаболической характеристике. Для определения характеристик биорецепторных элементов использовали лабораторную модель амперометрического биосенсора. В качестве основы биосенсора применяли анализатор Эксперт-001 (ООО «Эконикс-Эксперт»), который дает возможность определения содержания кислорода в непрерывном режиме. Принцип работы такой биосенсорной системы основан на том, что преобразователь реагирует на падение уровня кислорода в приэлектродном пространстве, вызванное увеличением дыхательной активности микроорганизмов при окислении субстратов (рис. 1). Для создания биочувствительных элементов биосенсора выбран способ иммобилизации клеток физическим ограничением диализной мембраной, что позволило оценить физиолого-биохимические, биокаталитические и метаболические характеристики микроорганизмов сразу после иммобилизации. Содержание клеток микроорганизмов во всех изготовленных биорецепторах было одинаковым, что дало возможность сопоставить характеристики выбранных микроорганизмов. Выбор исследуемых микроорганизмов основывался на их физиолого-биохимических особенностях и опыте работы с ними в научном коллективе. Все дрожжи и бактерии получены в ВКМ ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН. В работе для исследования были использованы следующие штаммы микроорганизмов: уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans* В-1280; осмо- и галотолерантные дрожжи *Debaryomyces hansenii* Y-2482, Y-1585, Y-111, Y-1050 и *Blastobotrys adenivorans* Y-2677; метилотрофные дрожжи *Ogataea angusta* ВКМ Y-1397, *Ogataea polymorpha* Y-2559 и *Ogataea parapolyomorpha* Y-2518; активные бродильщики *Saccharomyces*

*bayanus* Y-349 и *Saccharomyces pasterianus* Y-507; продуценты кормового белка *Candida boidinii* Y-2356, *Candida maltosa* Y-2359, *Candida blankii* Y-2675. В работе использованы как микроорганизмы прокариот, имеющие мембранную локализацию ферментов, так и эукариот, имеющие внутриклеточную локализацию ферментных систем. В качестве модельной применяли глюкозо-глутаматную смесь, использование которой при анализе биохимического потребления кислорода регламентировано в российских и зарубежных методиках.

**Таблица 1.** Основные характеристики биосенсоров с исследуемыми микроорганизмами.

Применяемые микроорганизмы	Спектр детектируемых веществ, % (от 18)	Чувствительность биосенсора $10^{-5} \text{ с}^{-1}$	Время работы, сут.
<i>Og. angusta</i> Y-1397	61	16±2	26
<i>Og. polymorpha</i> Y-2559	56	14±2	15
<i>Og. parapolyomorpha</i> Y-2518	61	19±3	7
<b><i>D. hansenii</i> Y-2482</b>	<b>100</b>	<b>30±3</b>	<b>35</b>
<i>D. hansenii</i> Y-111	83	12±1	15
<i>D. hansenii</i> Y-1585	72	11±1	10
<i>D. hansenii</i> Y-1050	50	16±1	17
<i>S. bayanus</i> Y-349	44	4,8±0,6	8
<i>S. pasterianus</i> Y-507	44	5,4±0,5	23
<i>C. boidinii</i> Y-2356	72	12±1	12
<i>C. maltosa</i> Y-2359	61	4,3±0,6	16
<i>C. blankii</i> Y-2675	50	19±1	14
<i>B. adenivorans</i> Y-2677	72	23±2	32
<i>G. oxydans</i> B-1280	50	63±3	5

На основе анализа полученных результатов (таблица 1) для дальнейших исследований отобраны штаммы эукариот *Debaryomyces hansenii* Y-2482, характеризующиеся широким кругом окисляемых субстратов, лучшей долговременной стабильностью и высокой чувствительностью.

### **1.2. Разработка подхода для расширения спектра определяемых органических веществ на основе использования искусственных ассоциаций микроорганизмов в рецепторном элементе биосенсора**

Для увеличения количества окисляемых веществ и, как следствие, снижения ошибки определения БПК биосенсором применяют ассоциации микроорганизмов. Для составления сообществ, обладающих широким кругом метаболизируемых веществ и отсутствием конкуренции за субстрат, нужно, чтобы используемые микроорганизмы имели разные ферментные системы.

Подход, разработанный на этой концепции, основывается на использовании в искусственной ассоциации микроорганизмов различных родов и видов. Поскольку известно, что микроорганизмы способны к росту и размножению в иммобилизованном виде, с течением времени состав ассоциации в биорецепторе может меняться.

На основе полученных данных по спектру окисляемых веществ и ростовым параметрам (таблица 2) отобраны микроорганизмы для формирования искусственных ассоциаций. В ассоциацию 1 вошли только дрожжи *Blastobotrys adenivorans* и *Ogataea angusta*. Дрожжи *Blastobotrys* характеризуются очень широким спектром окисляемых веществ, поэтому составляют основу ассоциации. Внесение метилотрофных дрожжей *Ogataea*, активно окисляющих спирты, дает возможность еще расширить спектр утилизируемых субстратов. Важно отметить, что данные микроорганизмы имеют близкие времена фаз роста, это позволяет предположить, что соотношение клеток в процессе их развития будет оставаться постоянным. При формировании ассоциации 2 к микроорганизмам ассоциации 1 добавили дрожжи *D. hansenii* ВКМ Y-2482, что расширяет спектр окисляемых субстратов. Однако продолжительность основных фаз роста данных культур отличается. При составлении ассоциации 3 использовали подход совместной иммобилизации уксуснокислых бактерий *G. oxydans* и метилотрофных дрожжей *Og. parapolyomorpha*. Дрожжи *Og. parapolyomorpha* активно окисляют спирты, а бактерии *G. oxydans* активно окисляют многие углеводы, которые не окисляют дрожжи *Og. parapolyomorpha*. Данная ассоциация может быть применима при создании специализированного БПК-биосенсора для анализа стоков биотехнологических предприятий.

**Таблица 2.** Ростовые характеристики используемых микроорганизмов.

Микроорганизмы	Лаг-фаза, ч	Логарифмическая фаза, ч	Стационарная фаза, ч	Максимальная скорость роста, ч <sup>-1</sup>
<i>G. oxydans</i> B-1280	0–8	8–24	24–50	0,333
<i>Og. angusta</i> Y-1397	0–12	12–38	38–50	0,160
<i>Og. parapolyomorpha</i> Y-2518	0–8	8–22	22–50	0,312
<i>B. adenivorans</i> Y-2677	0–10	10–34	34–50	0,158
<i>D. hansenii</i> Y-2482	0–18	18–30	30–50	0,259
<i>D. hansenii</i> Y-111	0–12	12–38	38–50	0,324
<i>C. boidinii</i> Y-2356	0–10	10–38	38–50	0,043

Нестабильность соотношения микроорганизмов в искусственных ассоциациях во времени является серьезным препятствием к внедрению биосенсоров на их основе. На основании результатов проведенного микробиологического анализа количества жизнеспособных клеток показано, что

ассоциация дрожжей *B. adeninivorans* и *Og. angusta*, как и предполагалось, оставалась устойчивой в течение всего времени исследования (42 дня). Соотношение разных видов дрожжей в ассоциации 2 изменилось только к концу времени исследования, что подтверждает возможность использования предложенного подхода к формированию ассоциаций. У ассоциации 3 на основе бактерий и дрожжей сильно меняется соотношение количества клеток разных видов, со временем начинают преобладать бактерии *G. oxydans*.

По результатам сравнительного анализа характеристик биосенсоров на основе стабильных ассоциаций дрожжей (таблица 3) показано, что ассоциация микроорганизмов *Og. angusta*, *B. adeninivorans*, *D. hansenii* обладает широким спектром окисляемых субстратов, стабильностью и является наиболее перспективной для создания БПК-сенсора.

**Таблица 3.** Основные характеристики биосенсоров с исследуемыми ассоциациями микроорганизмов.

Применяемые микроорганизмы	Спектр детектируемых веществ, % (от 18)	Чувствительность биосенсора $10^{-5} \text{ c}^{-1}$	Время работы, сут.
<i>Og. angusta</i> , <i>B. adeninivorans</i>	83	5±1	15
<i>Og. angusta</i> , <i>B. adeninivorans</i> , <i>D. hansenii</i>	100	7±1	16

Таким образом, впервые показана возможность создания устойчивых ассоциаций микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов на основе сходства их ростовых параметров и различия спектра окисляемых субстратов для рецепторного элемента БПК-биосенсора.

### 1.3. Выделение микроорганизмов активного ила для формирования биорецептора БПК-сенсора

Поскольку активный ил используется в стандартном методе анализа БПК, перспективным является применение выделенных из него микроорганизмов в качестве основы биораспознающего элемента БПК-сенсора. Из активного ила, предоставленного городскими очистными сооружениями, были изолированы преобладающие бактериальные микроорганизмы. По результатам анализа гена 16S рРНК выделенные микроорганизмы были идентифицированы как: *Pseudomonas veronii* DSM 11331<sup>T</sup> (сходство 99,79%), *Bacillus proteolyticus* TD42<sup>T</sup> (сходство 100%), *Paracoccus yeei* ВАА-599<sup>T</sup> (сходство 100%). Параметры биосенсоров на основе изолированных из активного ила микроорганизмов представлены в таблице 4.

**Таблица 4.** Основные характеристики биосенсоров с исследуемыми микроорганизмами активного ила.

Применяемые микроорганизмы	Спектр детектируемых веществ, % (от 18)	Чувствительность биосенсора $10^{-5} \text{ с}^{-1}$	Время работы, сут.
Активный ил	100	$3 \pm 1$	7
<i>P. yeii</i> ВАА-599 <sup>Т</sup>	<b>94</b>	<b>110<math>\pm</math>5</b>	<b>30</b>
<i>P. veronii</i> DSM 11331 <sup>Т</sup>	89	$90 \pm 2$	32
<i>B. proteolyticus</i> TD42 <sup>Т</sup>	94	$20 \pm 1$	28

Биосенсоры на основе индивидуальных микроорганизмов существенно превосходят биосенсор на основе естественного сообщества по чувствительности и стабильности работы. Биосенсор с микроорганизмами *P. yeii* обладает наиболее высокой чувствительностью и широким спектром определяемых веществ, что делает его перспективным для дальнейших исследований. Данные микроорганизмы, изолированные из активного ила, ввиду своей перспективности в аналитической биотехнологии для создания биосенсоров, охарактеризованы и депонированы в ВКМ под номером В-3302.

Таким образом, на основе предложенного подхода к выбору микроорганизмов, основанного на сравнительном анализе их физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик, для дальнейших исследований по разработке БПК-биосенсора предлагается использовать дрожжи *D. hansenii*, бактерии *P. yeii* и искусственную ассоциацию трех дрожжевых микроорганизмов.

#### **1.4. Воздействие параметров среды на окислительную активность выбранных микроорганизмов и ассоциаций**

Наибольшая дыхательная активность всех микроорганизмов отмечается в интервале рН 6,6–7,2. Дыхательная активность дрожжей *D. hansenii* и ассоциации в присутствии субстратов активно развивается в диапазоне от 15°C до 25°C, а для бактерий *P. yeii* – в диапазоне от 20°C до 30°C. Для увеличения правильности экспресс-анализа БПК следует использовать систему термостатирования.

**Таблица 5.** Воздействие параметров среды на окислительную активность выбранных микроорганизмов.

Ион (ПДК, мг/дм <sup>3</sup> )	Сигнал сенсора, % от контрольного значения					
	<i>Debaryomyces hansenii</i>		<i>Paracoccus yeii</i>		Искусственная ассоциация	
	10 ПДК	100 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	10 ПДК	100 ПДК
Cu <sup>2+</sup> (0,001)	86	69	44	34	93	49
Ni <sup>2+</sup> (0,01)	90	56	66	46	74	12
Fe <sup>3+</sup> (0,1)	67	15	59	12	76	25
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> (0,02)	82	80	54	24	85	26
Pb <sup>2+</sup> (0,006)	45	28	67	70	48	11
Bi <sup>3+</sup> (0,1)	88	48	69	41	76	25
Co <sup>2+</sup> (0,1)	87	56	73	60	81	34
Zn <sup>2+</sup> (0,01 )	78	47	66	32	67	36
Массовая доля NaCl	Воздействие NaCl на окислительную активность биоматериала					
5%	75		24		61	
10%	67		0		39	
20%	33		0		33	

При концентрации ионов выбранных для исследования тяжелых металлов 10 ПДК, за исключением Fe<sup>3+</sup> и Pb<sup>2+</sup>, величины откликов сенсора с микроорганизмами *Debaryomyces hansenii* составили не менее 75%, что свидетельствует о стресс-устойчивости данных дрожжей. Ассоциация дрожжей сильнее подвержена воздействию ионов тяжелых металлов (как и хлорида натрия), чем индивидуальный штамм дрожжей *D. hansenii*. Наибольшее воздействие на окислительную активность иммобилизованных бактерий *P. yeii* оказывают ионы Cu<sup>2+</sup>, Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> и Fe<sup>3+</sup>. В целом необходимо отметить, что бактерии гораздо сильнее подвержены влиянию условий окружающей среды, чем дрожжи *D. hansenii*, что необходимо учитывать при создании коммерческого экспресс-анализатора БПК.

## **ГЛАВА 2. СОЗДАНИЕ НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ БАЗЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ РЕГИСТРАЦИИ ИНТЕНСИВНОСТИ КЛЕТОЧНОГО ДЫХАНИЯ**

Большинство описанных в литературе БПК-сенсоров являются микробными биосенсорами, использующими в качестве преобразователя амперометрический датчик с газопроницаемой мембраной для регистрации содержания кислорода (кислородный электрод Кларка). Поскольку классический подход к определению БПК основан на регистрации кислорода, затраченного микроорганизмами на биохимическое окисление органических



веществ, использование аналогичного принципа детекции в биосенсоре позволяет приблизить результаты двух методов. Любые изменения в конфигурации датчика, и, в частности, биорецепторного элемента на его поверхности, могут оказывать существенное влияние на характеристики разрабатываемого биосенсора. Таким образом, развитие экспресс-метода определения БПК с использованием биосенсоров требует решения ряда научно-практических задач, таких как: обеспечение оптимальных условий жизнедеятельности микроорганизмов в рецепторном элементе и эффективное сопряжение биоматериала с преобразователем. Успешное решение этих задач позволит создать научно-методологический подход для разработки БПК-сенсоров на базе кислородного электрода.

### **2.1. Разработка стабильных и чувствительных рецепторных элементов биосенсора при использовании разных методов иммобилизации микроорганизмов**

Важным этапом в создании стабильного и чувствительного биораспознающего сенсорного элемента является иммобилизация биоматериала. Наиболее эффективным способом иммобилизации микроорганизмов служит включение их в гидрогели, которые обеспечивают легкую диффузию исходных веществ и продуктов реакции, обладают механической прочностью и нерастворимы в воде за счет наличия сетчатой структуры. В настоящем исследовании получение биочувствительного элемента выполняли включением биоматериала в гидрогели на основе полисахаридов – агара и хитозана, кремнийорганический золь-гель тетраэтоксисилана (ТЭОС), белковый гидрогель на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА) и синтетические гидрогели поливинилового спирта (ПВС), а также путем физического ограничения диализной мембраной и адсорбции на стекловолкне. Новым подходом для закрепления на преобразователе биоматериала, позволяющим обеспечить легкую диффузию субстратов и продуктов реакции, является применение N-винилпирролидона для химической сшивки ПВС. Такой подход дает возможность создавать сетчатую структуру с высокой механической прочностью. N-винилпирролидон нетоксичен, биосовместим и позволяет сохранить высокую жизнеспособность иммобилизованных микроорганизмов.

**Таблица 6.** Характеристики биосенсоров с разными способами иммобилизации биоматериала.

Способ иммобилизации	Повторяемость, % (n=15, P=0,95)	Время работы, сут.	Нижняя граница анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг/дм <sup>3</sup>	Время анализа, мин
Включение в гель БСА	5,9	30	0,29	10–13
Включение в золь-гель на основе ТЭОС	7,1	11	0,1	6–13
Включение в гель хитозана	6,1	40	1,41	4–6
Включение в гель ПВС, сшитого янтарной к-той	6,3	36	0,9	7–10
<b>Включение в гель ПВС, сшитого N-ВП</b>	<b>2,3</b>	<b>40</b>	<b>0,1</b>	<b>4–6</b>
Включение в агаровый гель	5,8	15	1,86	10–21
Адсорбция	5,4	10	1,3	7–10
Физическое ограничение мембраной	8,4	30	0,6	6–8

Для определения влияния способа иммобилизации микроорганизмов на характеристики биосенсора использовали бактерии *P. yeai*, которые являются типичными представителями микроорганизмов активного ила, используемого в стандартном методе (таблица 6). Каждый рецепторный элемент содержал одинаковое количество биомассы (100 мг). Лучшими характеристиками обладает биосенсор с рецепторами на основе микроорганизмов, включенных в гидрогель ПВС, поперечно сшитого N-винилпирролидоном. Для выявления возможностей оптимизации методики иммобилизации микроорганизмов в данный гидрогель проведены дополнительные исследования по выявлению структуры матрицы, обеспечивающей лучшие параметры жизнедеятельности микроорганизмов.

## **2.2. Оптимизация методики синтеза гидрогеля на основе поперечно сшитого ПВС для иммобилизации микроорганизмов**

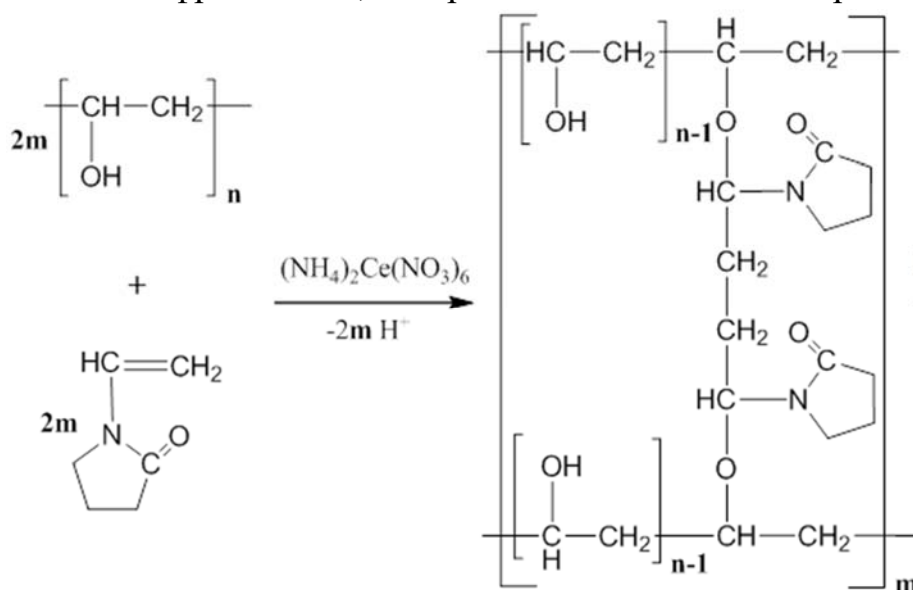
Синтез сетчатого полимера на основе ПВС проводили путем модификации линейного полимера N-винилпирролидоном в присутствии нитрата аммония церия (IV) в качестве инициатора радикальной сшивки (рис. 2). В ходе исследования варьировали продолжительность синтеза и соотношение реагентов и инициатора (таблица 7). Качество полученных матриц оценивали по доле сшитого полимера и чувствительности анализа БПК биосенсором на основе иммобилизованных в эти матрицы микроорганизмов. На свойства полученного

полимера оказывает влияние соотношение исходных компонентов. Недостаток N-ВП приводил к растворению образцов полученного полимера. При более высокой степени сшивки получали стабильные рецепторные элементы, однако увеличение доли сшивки более 55% приводило к снижению чувствительности биосенсора, что объясняется затруднением диффузии окисляемых веществ из пробы к иммобилизованным в гидрогеле микроорганизмам.

**Таблица 7.** Влияние продолжительности синтеза и мольного соотношения компонентов на степень сшивки полимера.

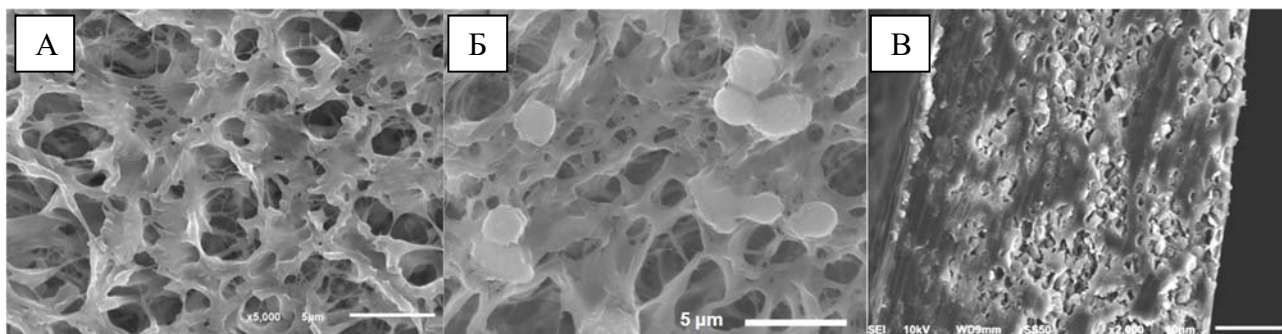
Мольное соотношение ПВС : N-ВП : инициатор	Время синтеза, ч	Доля сшитого полимера, %	Нижняя граница анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>
160:1,75:1	3	растворим	-
160: 3,5:1	3	растворим	-
160:7:0,5	3	42±2%	0,06
160:7:1	1	50±4%	0,08
160:7:1	2	52±5%	0,09
<b>160:7:1</b>	<b>3</b>	<b>54±3%</b>	<b>0,08</b>
160:7:1	5	55±5%	0,08
160:35:5	3	60±3%	0,14
160:70:10	3	70±10%	0,26

Химическую структуру сшитого полимера изучали методами ИК-спектроскопии, одно- и двухмерной ЯМР-спектроскопии. Образование сетчатой структуры ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном, происходит за счет присоединения этилпирролидоновой группы к молекуле ПВС и дальнейшей сшивки одинаковых полимерных фрагментов. При увеличении мольной доли N-ВП число фрагментов, содержащих сшивки полимерных звеньев, возрастает.



**Рис. 2.** Модификация поливинилового спирта N-винилпирролидоном.

Сравнительный анализ чувствительности биосенсоров на основе биочувствительных элементов с различным содержанием микроорганизмов позволил определить оптимальное содержание биомассы в гидрогеле, которое составило 200 мг/мл.



**Рис. 3.** Сканирующая электронная микроскопия ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном (мольное соотношение компонентов 160:70:1): А – матрица модифицированного ПВС после набухания в буферном растворе; Б – матрица модифицированного ПВС с иммобилизованными дрожжами *D. hansenii* после набухания в буферном растворе; В – матрица модифицированного ПВС с иммобилизованными дрожжами *D. hansenii* в разрезе.

Изучение физической структуры гидрогеля ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном, методом сканирующей электронной микроскопии подтверждает формирование в водном растворе гидрогеля с сетчатой структурой (рис. 3). Размер пор гидрогеля варьируется от 1 до 5 мкм, что способствует диффузии кислорода и органических веществ к микроорганизмам и выведению продуктов ферментативных реакций (рис. 3А). При включении в гидрогели бактерий *P. yeai* (диаметр 0,5–1 мкм) или дрожжей *D. hansenii* (диаметр 2–4 мкм) происходит их включение в структуру сети полимера и равномерное распределение по всему объему носителя (рис. 3Б, В).

Таким образом, синтезированный в работе путем модификации ПВС N-винилпирролидоном полимер имеет широкие перспективы применения для иммобилизации дрожжевых и бактериальных микроорганизмов в биотехнологии, и в частности, может быть эффективно использован для формирования биочувствительного элемента БПК-биосенсора.

### **2.3. Сравнительный анализ характеристик БПК-биосенсоров с использованием выбранного биоматериала и способа его иммобилизации**

Как показано в главе 1.2, биосенсор на основе используемых ассоциаций микроорганизмов позволяет детектировать широкий круг органических соединений, что позволяет приблизить получаемые результаты определения БПК с использованием биосенсора к результатам стандартного метода. Однако эти микроорганизмы в определенных условиях могут конкурировать между собой, что приводит к снижению воспроизводимости результатов определения БПК. Применение нескольких штаммов микроорганизмов, иммобилизованных

последовательно, предположительно позволит создать биокатализатор, моделирующий окислительные свойства активного ила, но обладающий высокой стабильностью состава. Градуировочные зависимости для разработанных биосенсоров приведены на рис. 4. Биочувствительные элементы на основе бактерий и дрожжей относятся к каталитическому типу, таким образом, отклик сенсора на их основе формируется за счет ферментативных реакций.

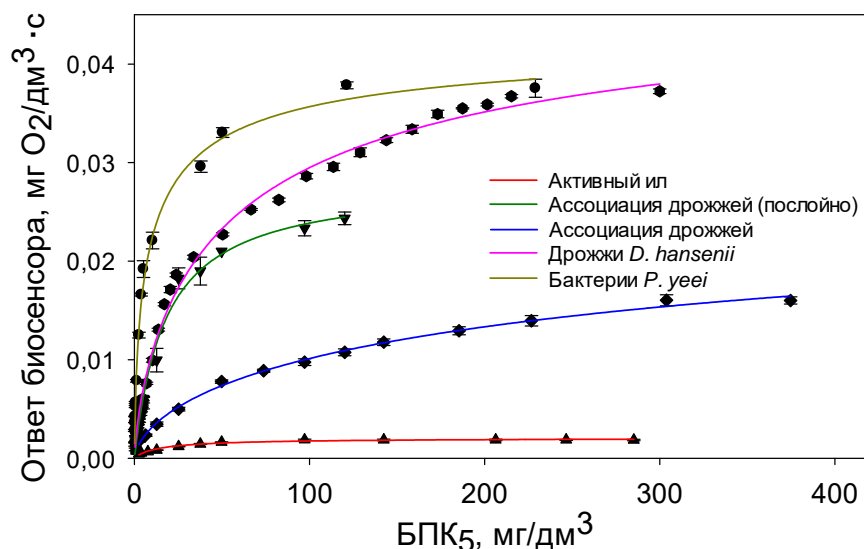


Рис. 4. Градуировочные зависимости для созданных биосенсоров.

Для аппроксимации градуировочных зависимостей применяли уравнение типа Михаэлиса – Ментен:  $R = \frac{R_{\max} [S]}{K'_M + [S]}$ , где  $R_{\max}$  – максимальный ответ биосенсора;  $K'_M$  – кажущаяся константа Михаэлиса. Значение верхней границы анализируемых концентраций выбирали равным  $K'_M$  (таблица 8).

Таблица 8. Характеристики созданных биосенсоров.

Характеристики	<i>Paracoccus yeai</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ассоциация дрожжей	Ассоциация дрожжей (послойно)	Активный ил
Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	0,05–5,0	0,16–30	2,4–80	0,7–21	2,6–14
Коэффициент чувствительности *10 <sup>-5</sup> , с <sup>-1</sup>	350±20	71±2	10±2	70±4	4±1
Время работы, сутки	45	42	17	34	9
Повторяемость, % (n = 15, P=0,95)	7	2	8,9	6,6	7,6
Время анализа, мин	4–6	5–7	5–7	5–12	5–7

Биосенсоры с дрожжами *D. hansenii* и бактериями *P. yeai* дают возможность определять БПК<sub>5</sub> в пределах ПДК (2 мгO<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>) и характеризуются длительным временем стабильной работы. Биосенсоры на основе естественной и искусственной ассоциаций микроорганизмов уступают по чувствительности

биосенсорам на основе отдельных штаммов микроорганизмов. При использовании подхода послойной иммобилизации чувствительность биосенсора значительно возрастает, что может объясняться снижением конкуренции за субстрат и его доступности каждому из клеточных слоев. Полученные результаты подтверждают эффективность предложенных научно-методологических решений для выбора и иммобилизации микроорганизмов при создании БПК-биосенсоров.

Оценка субстратной специфичности выбранных микроорганизмов, включенных в модифицированный ПВС, проведена с использованием веществ, которые могут встречаться в образцах воды различного происхождения (промышленные и бытовые стоки, поверхностные воды) (рис. 5). Дрожжи *D. hansenii* и ассоциации дрожжей, иммобилизованные в гидрогель модифицированного ПВС, могут метаболизировать различные классы органических соединений, которые могут присутствовать в сточных водах. С практической точки зрения, важным является способность иммобилизованных дрожжей окислять додецилсульфат и додецилбензосульфат натрия, которые являются основными компонентами многих моющих средств и часто встречаются в коммунальных сточных водах.

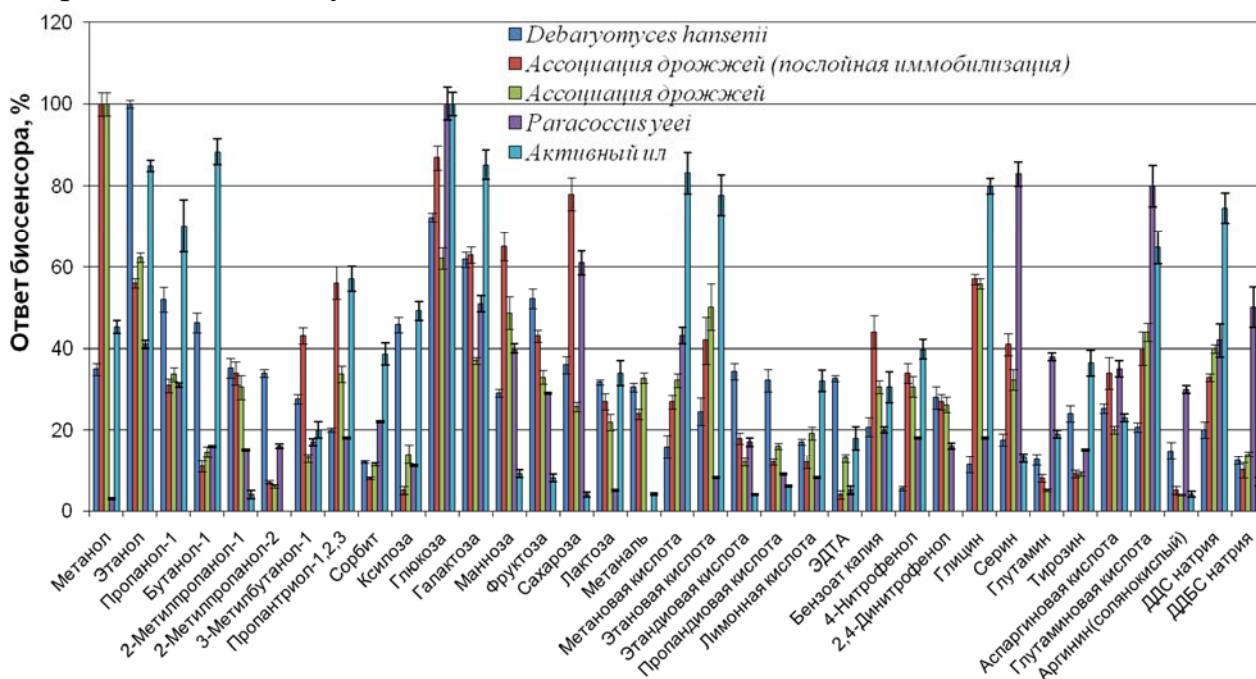


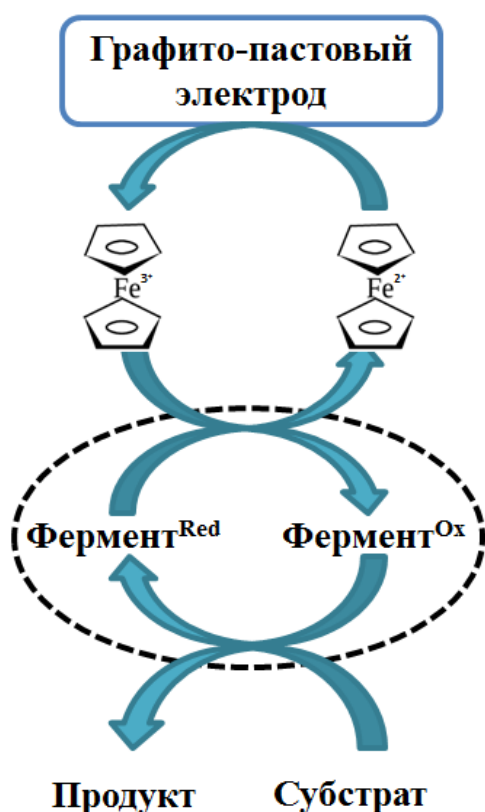
Рис. 5. Профиль детектируемых веществ для разработанных биосенсоров.

Биосенсоры с бактериями *P. yevei* также реагируют на вещества всех представленных классов, за исключением метанала. В целом спектр окисляемых субстратов всех используемых биорецепторов достаточно широкий. Это позволяет добиться высокой корреляции между данными созданных биосенсоров и классическим методом БПК<sub>5</sub> при анализе широкого спектра образцов вод из различных источников.

### ГЛАВА 3. СОЗДАНИЕ НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ БАЗЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕДИАТОРНЫХ БПК-БИОСЕНСОРОВ

Серьезным ограничением биосенсоров на базе кислородного электрода при их использовании для экспресс-анализа БПК является сложность их применения в средах с низким содержанием кислорода, в частности, для определения степени анаэробной очистки стоков. Еще одной проблемой является то, что на показания таких биосенсорных систем большое влияние оказывает начальный уровень кислорода в измерительной кювете, что требует применения аэрации буферного раствора и проб. Кроме того, на показания кислородного датчика и, соответственно, отклик биосенсора оказывают влияние температура и атмосферное давление. Обойти указанные недостатки можно с использованием биосенсоров медиаторного типа.

В таких биосенсорах для сопряжения биоматериала с электродом используют специальные соединения, которые способны к обратимым процессам окисления-восстановления. В процессе функционирования



биосенсора медиатор забирает электроны с ферментных систем микроорганизмов и передает их на электрод, по сути замещая природный акцептор электронов – кислород. Таким образом, число переданных на электрод электронов соответствует уровню окислительной активности биоматериала, которая в свою очередь зависит от содержания органических веществ в пробе (рис. 6). Перенос электронов можно зарегистрировать при наложении на электрохимическую ячейку потенциала, соответствующего редокс-потенциалу медиатора. Это приводит к появлению электродного тока, значение которого пропорционально содержанию метаболизируемых клетками органических соединений.

Рис. 6. Принцип работы биосенсора на базе медиаторного электрода с ферроценом.

Исходя из вышеописанного, следует, что генерация аналитического сигнала медиаторных систем носит комплексный характер и зависит как от биохимических взаимодействий с биоматериалом, так и от электрохимических процессов на электроде. Описанные в литературе подходы к созданию систем



«биоматериал – медиатор – электрод» базируются на подборе каждого ее компонента исходя из положительного опыта его практического использования. Более целостным и всесторонним подходом к формированию медиаторных систем является анализ кинетических параметров протекающих в них процессов биоэлектродкатализа. Это даст возможность выявить лучший медиатор для применяемых бактерий или дрожжей, а также определить фундаментальные причины плохих характеристик биосенсоров и способы их улучшения.

### **3.1 Анализ возможности применения некоторых соединений как медиаторов для выбранных микроорганизмов**

Генерация сигнала в медиаторных амперометрических биосенсорах включает три основные фазы: биохимическое окисление субстрата микроорганизмами, реакцию медиатора с биоматериалом и передачу электронов медиатором на электрод. Для использования медиаторной системы в качестве основы биосенсора нужно, чтобы первая стадия была более медленной, чем две последующие. Выбор наиболее эффективного медиатора переноса электронов основан на комплексной оценке скорости электродной реакции и скорости взаимодействия медиатора с биоматериалом (иммобилизованными на поверхности электрода клетками бактерий и дрожжей). В качестве редокс-соединений применяли растворимые феназины, 2,6-дихлорфенолиндофенол, феррицианид калия, которые добавляли в измерительную ячейку, и малорастворимые производные ферроцена, которые вносили в графитовую пасту при формировании электрода. Для определения константы скорости взаимодействия бактерий и дрожжей с редокс-соединениями применяли метод циклической вольтамперометрии. Для измерения использовали анализатор «Экотест-ВА» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия) в трехэлектродной системе. В качестве рабочих для создания медиаторных биосенсоров применяли графитопастовые электроды. Пастовые электроды по сравнению с электродами на основе целого углеситила или графита при равных физических размерах имеют большую площадь поверхности, что дает возможность получать более высокий аналитический сигнал и надежнее удерживать микроорганизмы на поверхности электрода. В случае определения констант скорости взаимодействия микроорганизмов с медиаторами методом циклической вольтамперометрии, перенос электронов на электрод осложнен реакцией медиатора с биоматериалом. Для определения констант необходимо, чтобы лимитирующей стадией переноса электронов была диффузия, а скорость взаимодействия редокс-соединений с электродом была больше скорости реакции между микроорганизмами и медиатором. Таким образом, при условии высоких концентраций субстрата и

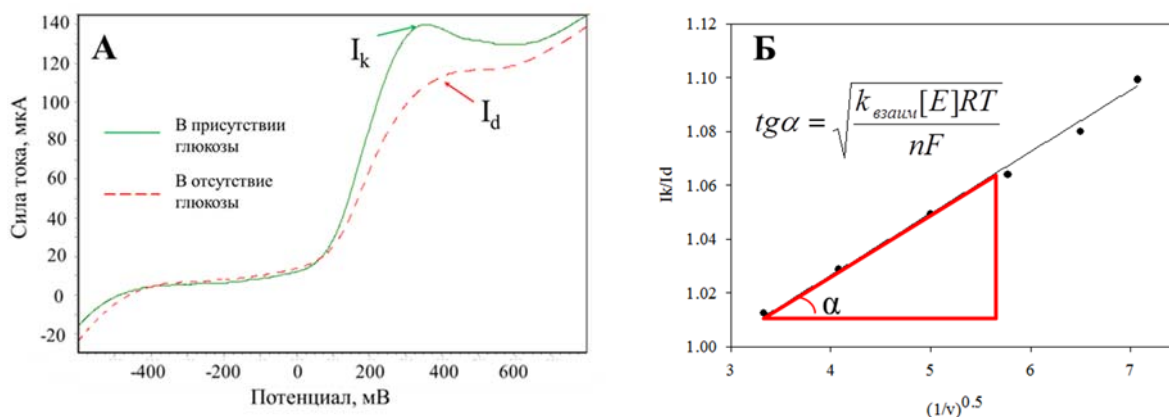


низких концентраций редокс-соединения рассматриваемые в работе системы соответствуют предложенной модели, а константа скорости взаимодействия медиатора с микроорганизмами ( $k_{\text{взаим}}$ ) может быть рассчитана по уравнению Николсона и Шайна (1):

$$\frac{I_k}{I_d} = \sqrt{\frac{k_{\text{взаим}}[E]RT}{nFv}} \quad (1),$$

где:  $I_d$  – ток без субстрата;  $I_k$  – ток при введении субстрата;  $[E]$  – титр клеток.

Для измерения  $k_{\text{взаим}}$  были получены вольтамперограммы в присутствии и отсутствии глюкозы, по ним построены линейные графики в координатах  $I_k/I_d$  от  $1/v^{1/2}$  (рис. 7). По тангенсу угла линейной зависимости были рассчитаны значения констант (таблица 9).



**Рис. 7.** Расчет  $k_{\text{взаим}}$  в системе с микроорганизмами *P. yeai* и ферроценацетонитрилом: А – вид регистрируемых вольтамперных зависимостей; Б – график для расчета  $k_{\text{взаим}}$ .

Процесс переноса электронов на электрод включает в себя несколько этапов, наиболее важными из которых являются: диффузии редокс-соединения к поверхности электрода и его адсорбция на поверхности с передачей электронов. Выявление скоростьопределяющей стадии по анализу зависимости тока от скорости наложения потенциала дало возможность использовать модели Николсона (2) и Лавирона (3) для расчета гетерогенной константы скорости передачи электронов на электрод ( $k_s$ ) (таблица 9). Модель Николсона основана на предположении, что редокс-соединение во всех формах находится в растворенном состоянии, а массоперенос происходит за счет диффузии. Модель Лавирона предложена для случая медленной поверхностной реакции медиатора на электроде и предполагает, что редокс-соединение во всех формах адсорбировано на поверхности электрода.

$$k_s = \psi \sqrt{\pi \frac{nFv}{RT}} D \quad (2),$$

$$\log(k_s) = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log\left(\frac{RT}{nFv}\right) - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E}{2,3RT} \quad (3),$$

где  $F$  – число Фарадея;  $\alpha$  – коэффициент переноса;  $\Delta E_p$  – разность потенциалов пиков;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $n$  – число электронов;  $v$  – скорость наложения потенциала;  $D$  – коэффициент диффузии;  $\psi$  – эмпирический параметр;  $T$  – температура.

**Таблица 9.** Константы скорости восстановления медиаторов бактериями *P. yeai* и дрожжами *D. hansenii* и константы скорости гетерогенного переноса электронов.

Медиатор	Константа скорости взаимодействия, см <sup>3</sup> /(г·с)		Константа скорости гетерогенного переноса электронов, см/с
	<i>P. yeai</i>	<i>D. hansenii</i>	
Ферроценацетонитрил	1,4±0,1	0,6±0,2	0,14±0,05
Ферроценкарбоксальдегид	7±1	3,7±0,1	0,03±0,01
1,1'-Диметилферроцен	3,8±0,9	7,9±0,5	0,07±0,01
<b>Ферроцен</b>	<b>23±1</b>	<b>13±3</b>	<b>0,4±0,1</b>
Гексацианоферрат (III) калия	19±3	14±3	0,0067±0,0009
2,6-Дихлорфенолиндофенол	13±2	8±2	0,069±0,004
<b>Метиленовый синий</b>	<b>21±1</b>	6±1	0,025±0,009
<b>Нейтральный красный</b>	13±3	<b>19±3</b>	0,017±0,005
Тионин	13±4	15±4	0,022±0,005

Наиболее перспективным растворимым медиатором для микроорганизмов *D. hansenii* является нейтральный красный, а иммобилизованным в графитовой пасте – ферроцен. Для микроорганизмов *P. yeai* лучшими медиаторами, исходя из полученных констант, являются метиленовый синий и ферроцен. В целом, растворимые медиаторы взаимодействуют с клетками быстрее, чем производные ферроцена, что закономерно обусловлено диффузионной подвижностью. С другой стороны, константы скорости гетерогенного переноса для соединений ферроценового ряда больше, чем для используемых растворимых медиаторов. Таким образом, впервые предложена методология выбора эффективных медиаторных биоэлектрохимических систем с бактериальными и дрожжевыми микроорганизмами, основанная на совместном анализе констант скорости взаимодействия микроорганизмов с медиатором и констант скорости гетерогенного переноса электронов на электрод. Предложенный подход дает возможность учитывать как реакцию редокс-соединения с биоматериалом, так и электрохимическую стадию передачи электронов и является удобным

инструментом для выбора эффективных систем передачи сигнала в микробных биосенсорах.

Предложенную методологию использовали для формирования биоэлектродов амперометрического медиаторного биосенсора. На основе максимальной константы скорости гетерогенного переноса на графито-пастовый электрод выбраны биоэлектрохимические системы «ферроцен – *Debaryomyces hansenii*» и «ферроцен – *Paracoccus yeii*», а на основе максимальной константы скорости взаимодействия медиатора с микроорганизмами системы: «нейтральный красный – *Debaryomyces hansenii*» и «метиленовый синий – *Paracoccus yeii*».

### 3.2. Разработка медиаторных БПК-биосенсоров

При разработке медиаторного биосенсора находили такие параметры формирования электродов, которые обеспечат максимальную чувствительность анализа БПК<sub>5</sub>. В качестве основы медиаторного биосенсора использовали потенциостат «IPC-micro» (НПО «Вольта», Россия). Рабочий окислительно-восстановительный потенциал составил: для ферроцена 250 мВ, для нейтрального красного –335 мВ, для метиленового синего 40 мВ. Удельная масса биоматериала – 0,15 мг/мм<sup>2</sup>, содержание ферроцена в пасте – 10% по массе для дрожжей и бактерий, концентрация нейтрального красного и метиленового синего – 0,2 и 0,07 ммоль/дм<sup>3</sup> соответственно. Дальнейшую работу выполняли с использованием электродов с оптимальными параметрами. Градуировочные зависимости откликов созданных биосенсорных систем от БПК<sub>5</sub> имеют вид гиперболы, что характерно для ферментативных систем (рис. 8).

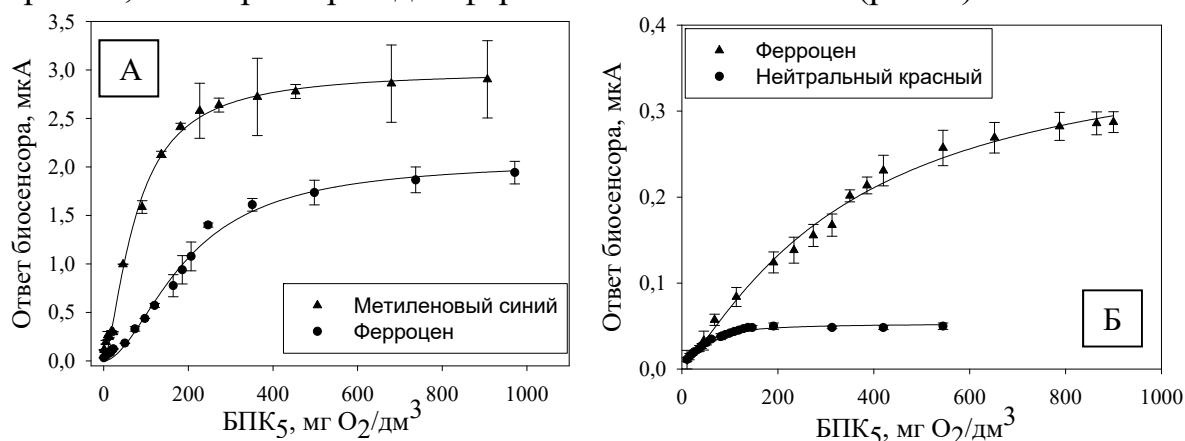


Рис. 8. Градуировочные зависимости для созданных медиаторных биосенсоров на основе микроорганизмов: А – *P. yeii*, Б – *D. hansenii*.

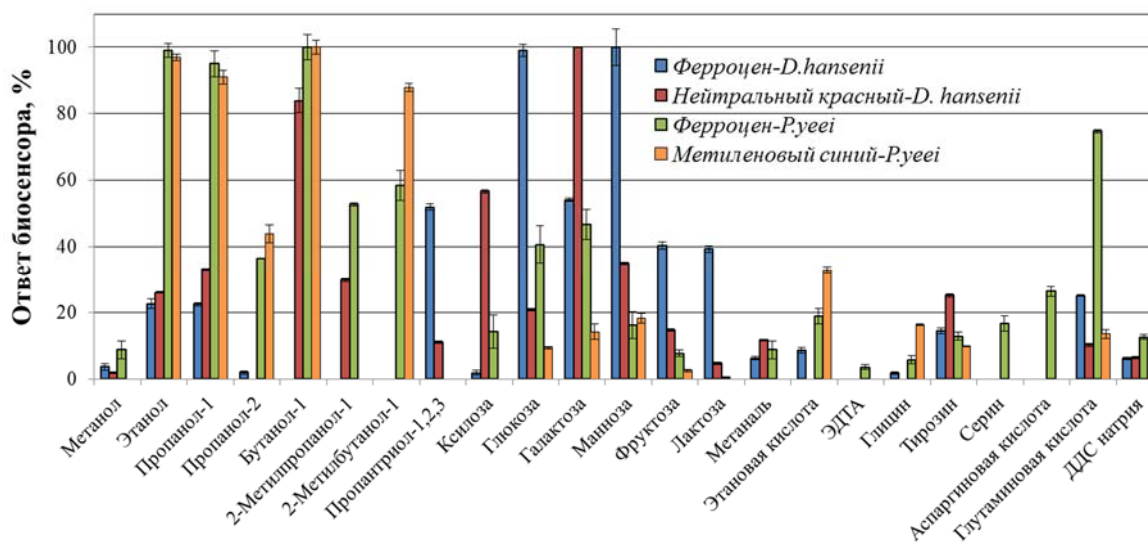
В таблице 10 приведены основные характеристики медиаторных биосенсоров. Созданные медиаторные биосенсоры характеризуются высокой повторяемостью – относительное стандартное отклонение не больше 3%. Для работы с пробами поверхностных вод, в которых БПК<sub>5</sub> лежит в районе 2 – 4

мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> необходимо применять биоаналитические системы на основе микроорганизмов *Paracoccus yeii*.

**Таблица 10.** Характеристики созданных медиаторных биосенсоров.

Характеристики	<i>Paracoccus yeii</i>		<i>Debaryomyces hansenii</i>	
	Ферроцен	Метиленовый синий	Ферроцен	Нейтральный красный
Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	1,3–200	1,4–90	25,2–320	5,1–53
Коэффициент чувствительности, нА·дм <sup>3</sup> /мг О <sub>2</sub>	4,8±0,2	17±1	0,5±0,2	0,4±0,1
Время работы, сутки	22	14	39	16
Повторяемость, % (n=15, P=0,95)	2,9	2,4	2,2	2
Время анализа, мин	4–6	7–12	8–20	5–10

В биоэлектрохимических системах на основе бактерий *P. yeii* регистрируется окисление широкого круга органических соединений (рис. 9). Исходя из полученных результатов, по совокупности характеристик наиболее перспективным для создания медиаторного БПК-сенсора является электрод, содержащий микроорганизмы *Paracoccus yeii* и ферроцен, что подтверждает эффективность предложенной методологии формирования систем «медиатор – микроорганизм».



**Рис. 9.** Профиль детектируемых веществ для разработанных медиаторных биосенсоров.

При использовании дрожжей биоэлектрохимическое окисление многих веществ зарегистрировать не удалось. Это объясняется плохой эффективностью передачи электронов от эукариотических микроорганизмов, ферменты дыхательной цепи которых располагаются в митохондриях. Эта проблема может

быть решена добавлением еще одного медиатора, который способен проникать внутрь клетки.

### 3.3. Разработка кинетического подхода к созданию двухмедиаторных систем внеклеточного переноса электронов у эукариотических микроорганизмов

Для создания систем, содержащих два медиатора, важно, чтобы первое из используемых редокс-соединений с высокой скоростью взаимодействовало с ферментными системами используемых дрожжей, а второе быстро взаимодействовало с поверхностью используемого электрода. По определенным значениям констант скорости взаимодействия медиаторов с электродом (таблица 9) видно, что ферроцен является лучшим редокс-соединением с точки зрения переноса электронов на электрод. Нейтральный красный обладает наибольшей скоростью взаимодействия с дрожжами, что определило выбор данного медиатора для формирования двухмедиаторной системы. По структуре к нейтральному красному близки медиаторы фенатиазинового ряда (метиленовый синий и тионин), а их способность проникать в живые организмы способствует использованию данных медиаторов в составе двухмедиаторных систем. Таким образом, для дрожжей *D. hansenii* сформированы три двухмедиаторные системы: «ферроцен – метиленовый синий», «ферроцен – нейтральный красный» и «ферроцен – тионин». Механизм переноса электронов в исследуемых двухмедиаторных системах показан на рисунке 10.

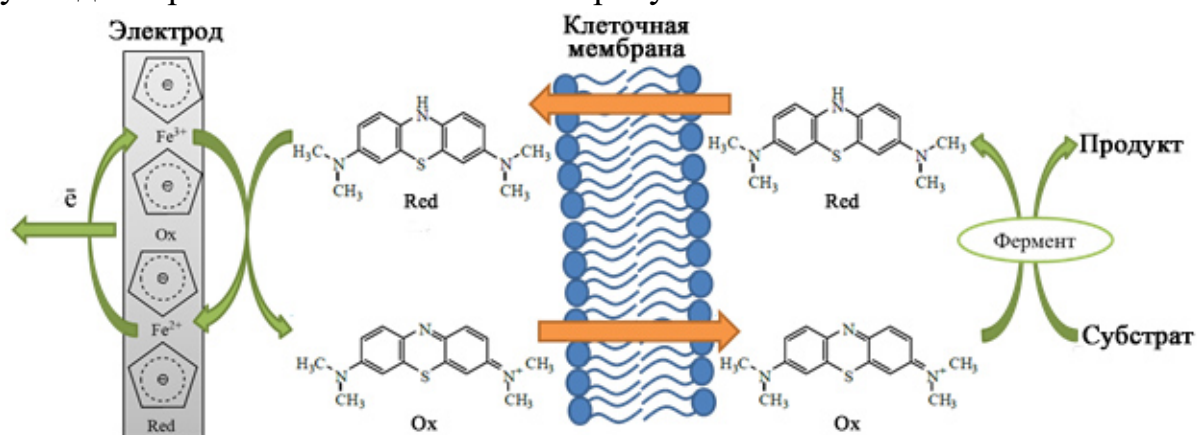


Рис. 10. Механизм переноса электронов в двухмедиаторной системе «ферроцен – метиленовый синий – *D. hansenii*».

При использовании двух редокс-соединений нужно учитывать скорость их реакции друг с другом. Определение константы скорости взаимодействия редокс-соединений ( $k_{M-M}$ ) в системе «ферроцен – растворимый медиатор – микроорганизмы *D. hansenii*» проводили циклической вольтаперометрией по анализу токов в присутствии микроорганизмов ( $I_k$ ) и в их отсутствие ( $I_d$ ), применяя для расчета уравнение Николсона – Шайна (уравнение 1). Значения констант скорости взаимодействия растворимых медиаторов с ферроценом ( $\text{дм}^3/(\text{ммоль} \cdot \text{с})$ ) составили:  $0,18 \pm 0,02$  (нейтральный красный);  $4,8 \pm 0,2$  (тионин);

56,2±0,7 (метиленовый синий). По результатам оптимизации условий функционирования медиаторных биосенсоров выбраны рабочие параметры анализа: удельная плотность биомассы (0,16 мг/мм<sup>2</sup>), содержание ферроцена – 10%, концентрация метиленового синего и нейтрального красного – 1,1 ммоль/дм<sup>3</sup>, тионина – 2,2 ммоль/дм<sup>3</sup>). Характеристики биосенсоров определяли при указанных рабочих параметрах (таблица 11).

**Таблица 11.** Характеристики созданных двухмедиаторных биосенсоров.

Характеристики	Ферроцен – метиленовый синий	Ферроцен – нейтральный красный	Ферроцен – тионин
Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	2,7–7,2	11,3–19,5	4,6–16,7
Коэффициент чувствительности, нА·дм <sup>3</sup> /мг О <sub>2</sub>	0,81±0,04	0,11±0,01	0,22±0,01
Время работы, сутки	43	24	37
Повторяемость, % (n=15, P=0,95)	1,2	2,0	2,2
Время анализа, мин	3,5–6	7–10	8–20

На основе сравнительного анализа характеристик биосенсоров с одномедиаторной и двухмедиаторной системой переноса электронов можно заключить, что использование двух медиаторов позволяет увеличить эффективность передачи электронов от эукариотических клеток на электрод и, как следствие, улучшить характеристики БПК-биосенсора. По долговременной стабильности и чувствительности пара ферроцен – метиленовый синий является лучшей для формирования двухмедиаторного биосенсора. Улучшение характеристик биосенсора в системе с ферроценом и метиленовым синим обусловлено высоким значением константы взаимодействия между медиаторами. Таким образом, впервые на основе анализа экспериментально найденных констант скорости взаимодействия микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* с искусственными акцепторами электронов, констант скорости передачи электронов на электрод, констант скорости взаимодействия ферроцена и ряда водорастворимых редокс-соединений, предложен подход к разработке двухмедиаторных биосенсорных систем, который дает возможность увеличить эффективность внеклеточного переноса электронов от микроорганизмов эукариот на электрод. Применимость предложенного подхода подтверждается повышением чувствительности биосенсора.

### 3.4. Разработка подхода к стандартизации и повышению чувствительности БПК-датчиков за счет использования редокс-активных гидрогелей

Один из главных недостатков классических медиаторных биоаналитических систем – это постоянная диффузия редокс-соединения между поверхностью преобразователя и биоматериалом. Так как восстановленный медиатор обычно характеризуется более высокой растворимостью, такое перемещение вызывает снижение содержания электроактивных частиц на поверхности преобразователя, что отражается в постоянном снижении ответов сенсора. При миниатюризации датчиков данная проблема усугубляется. Решением проблемы является иммобилизация микроорганизмов в редокс-активные гидрогели, представляющие собой полимерные биосовместимые матрицы с ковалентно связанным медиатором. С одной стороны, молекулы медиатора находятся непосредственно на поверхности рабочего электрода, что увеличивает эффективность переноса электронов на электрод, а с другой стороны, ковалентно связанный медиатор может взаимодействовать с биоматериалом. Принимая этот факт во внимание, в данной работе проведена модификация графито-пастового электрода гидрогелями на основе хитозана и бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанных с остатком ферроцена. БСА и хитозан обладают высокой биосовместимостью и нетоксичны. Наличие функциональных групп (аминогрупп) позволяет провести сшивку ферроцена с обоими биополимерами (рис. 11).

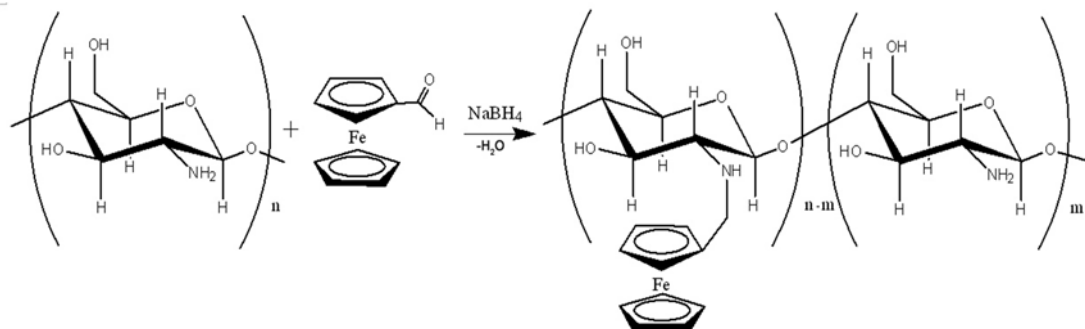


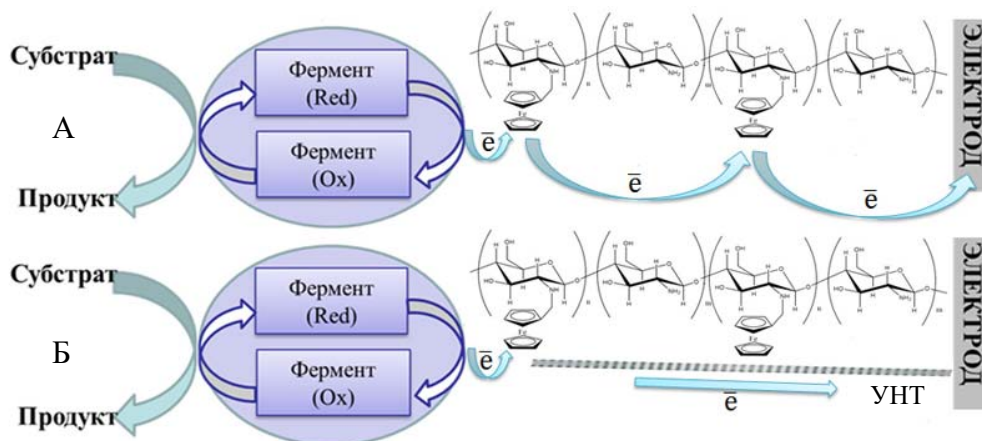
Рис 11. Модификация хитозана ферроценальдегидом.

Образование связей между ферроценальдегидом и биополимером подтверждали методом ИК-спектроскопии. По результатам анализа железа в полученных полимерах методом атомно-абсорбционной спектроскопии массовая доля ферроцена в матрице БСА-ФЦ составила 14,1%, а в матрице хитозан-ФЦ – 6,2%, с выходом 50% и 14% соответственно. Редокс-активные гидрогели использованы для иммобилизации бактерий *P. yeai* и формирования БПК-биосенсоров, характеристики которых приведены в таблице 12.

**Таблица 12.** Характеристики созданных биосенсоров с редокс-активными гидрогелями.

Характеристики	Гель БСА-ферроцен	Гель хитозан-ферроцен	Гель БСА-ферроцен-УНТ	Гель хитозан-ферроцен-УНТ
Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	2,5–47	2,5–18,9	<b>0,1–2,0</b>	<b>0,1–4,5</b>
Коэффициент чувствительности, нА·дм <sup>3</sup> /мг О <sub>2</sub>	8,2±0,5	11,7±0,4	112±2	110±2
Время работы, сутки	38	49	45	50
Повторяемость, % (n=15, P=0,95)	5,7	6,6	5,9	5,0
Время анализа, мин	4–10	4–10	4–10	4–10

Нижняя граница анализируемых значений БПК<sub>5</sub> биосенсора на основе бактерий, включенных в редокс-активный гидрогель, выше по сравнению с медиаторным биосенсором, включающим адсорбированный ферроцен (таблица 10). Это, по-видимому, обусловлено снижением доступности ковалентно связанного медиатора для бактерий.

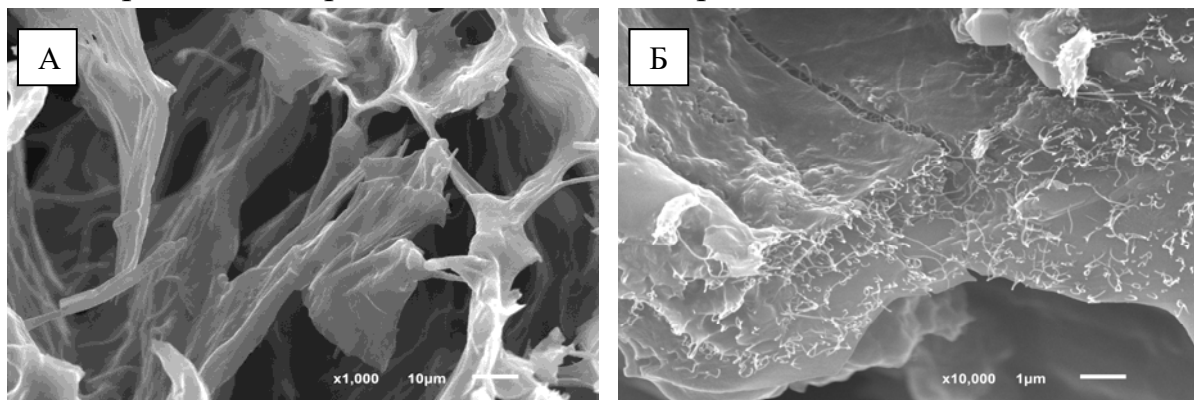


**Рис. 12.** Перенос электронов на электрод в редокс-активном полимере на основе хитозана а) – в отсутствии УНТ; б) – в присутствии УНТ.

Для повышения чувствительности анализа в гидрогель вносили одностенные углеродные нанотрубки (УНТ), которые могут служить мостиками между редокс-активными центрами матрицы и увеличивать эффективность переноса электронов на электрод (рис. 12). Гетерогенные константы скорости переноса электронов от редокс-полимера на электрод близки к гетерогенным константам скорости для адсорбированного ферроцена и составляют:  $0,44 \pm 0,02$  см/с для матрицы на основе хитозана и  $0,45 \pm 0,01$  см/с для матрицы на основе БСА. Введение УНТ увеличивает гетерогенную константу скорости для обоих



матриц до  $0,55 \pm 0,03$  см/с, но практически не изменяет константу взаимодействия редокс-активного полимера с бактериями, что подтверждает предложенную модель переноса электронов в таких биоэлектрохимических системах.



**Рис. 13.** Сканирующая электронная микроскопия редокс-активного гидрогеля на основе хитозана: А – матрица хитозана, модифицированного ферроценом после набухания в буферном растворе; Б – матрица хитозана, модифицированного ферроценом и УНТ после набухания в буферном растворе.

Изучение физической структуры редокс-активных гидрогелей методом сканирующей электронной микроскопии подтверждает наличие у них пористой структуры с размером пор около 10 мкм (рис. 13А). При использовании углеродных нанотрубок (рис. 13Б) происходит их равномерное распределение в структуре синтезированных матриц.

При использовании УНТ чувствительность анализа значительно возрастает, что свидетельствует об увеличении проводящей способности геля. Использование редокс-активного гидрогеля позволяет существенно повысить долговременную стабильность за счет предотвращения десорбции медиатора с поверхности электрода. Еще одним преимуществом использования разработанного подхода является возможность создания модифицированных печатных электродов для анализа БПК, которые будут обладать низкой стоимостью при широкомасштабном промышленном производстве. Таким образом, установлена возможность сопряжения метаболизма бактерий *P. yevei* с электрохимическими процессами на электроде при участии биосовместимых редокс-активных гидрогелей на основе модифицированных ферроценом хитозана и бычьего сывороточного альбумина с включенными углеродными нанотрубками. Полученные результаты позволяют продвинуть исследования и разработки в области создания и миниатюризации устройств, основанных на сопряжении микроорганизмов и электрохимических преобразователей.

#### **ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА КОММЕРЧЕСКОГО БИОСЕНСОРНОГО ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗАТОРА БПК**

Предложенный научно-методологический подход к созданию высокочувствительных и стабильных электрохимических микробных биосенсоров, основанный на сравнительном анализе физиолого-биохимических,

метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров, использован для разработки коммерческого анализатора БПК. По совокупности характеристик лучшими являются макеты БПК-биосенсоров, представленные в таблице 13. Для окончательного выбора биосенсорной системы, которая ляжет в основу коммерческого анализатора, проведены сравнительные испытания по определению биохимического потребления кислорода методом разбавления и экспресс-методом с использованием биосенсоров.

#### 4.1. Сравнительные испытания разработанных биосенсоров при анализе биохимического потребления кислорода сточных и поверхностных вод различного происхождения

Для изучения возможностей практического применения лучших из разработанных биосенсоров проводили анализ реальных образцов сточных и поверхностных вод. Пробоотбор и анализ биохимического потребления кислорода методом разбавления выполняли по ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97.

Таблица 13. Основные параметры созданных БПК-сенсоров.

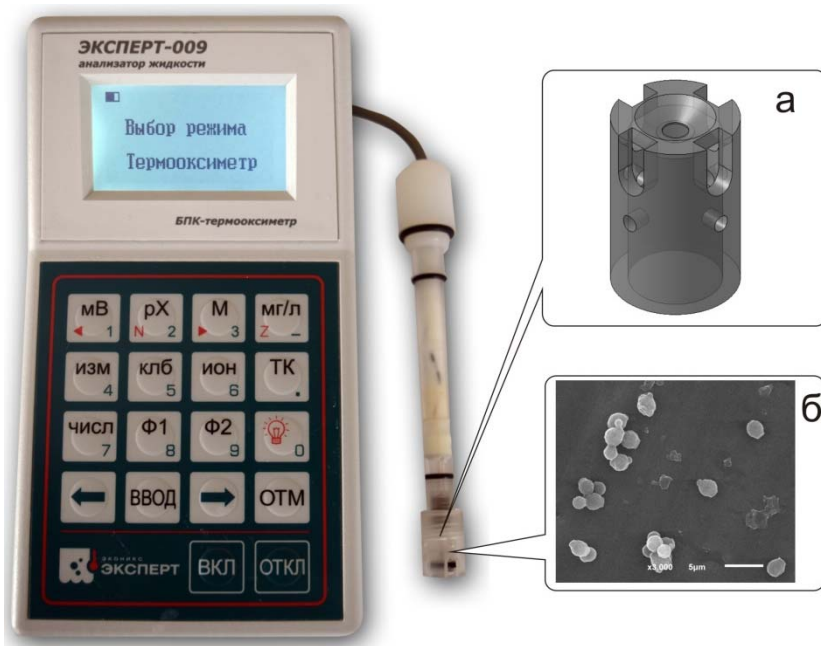
Биоматериал/ иммобилизация	Преобразователь	Диапазон БПК <sub>5</sub> , мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	R
<i>P. yeai</i> / включение в полимер ПВС- N-ВП	Кислородный электрод	0,05–5,0	0,9995
<i>D. hansenii</i> / включение в полимер ПВС- N-ВП	Кислородный электрод	0,16–30	0,9955
Ассоциация дрожжей / послойное включение в полимер ПВС- N-ВП	Кислородный электрод	0,7–21	0,9992
<i>P. yeai</i> / включение в редокс- активный гидрогель хитозана с УНТ	Медиаторный электрод	0,1–4,5	0,9916
<i>D. hansenii</i> / инкапсуляция диализной мембраной	Медиаторный электрод (ферроцен, метиленовый синий)	2,7–7,2	0,9913

По результатам проведенного статистического анализа, полученные значения БПК для метода разбавления и разработанных биосенсоров различаются незначимо. Таким образом, в результатах экспресс-метода определения БПК отсутствует систематическая погрешность. Коэффициенты корреляции (R) между результатами анализа БПК обоими методами приведены в таблице 13. Важно отметить, что созданные анализаторы по своим параметрам, в частности, чувствительности, превосходят многие зарубежные аналоги. Эффективность предложенного в работе научно-методологического подхода к

формированию биочувствительных элементов БПК-биосенсоров подтверждается полученными результатами. Проведенный сравнительный анализ ключевых параметров электрохимических БПК-сенсоров на основе единичных штаммов, искусственных и естественных сообществ бактерий и дрожжей, разных способов иммобилизации биоматериала и генерации сигнала биосенсора, позволил создать научную базу для разработки анализаторов БПК.

#### **4.2. Разработка коммерческого экспресс-анализатора БПК «Эксперт-009»**

При обобщении результатов исследования подготовлено техническое задание на разработку амперометрического биосенсорного анализатора БПК, в котором изложены основные конструктивные и технические требования к разрабатываемому прибору. Для реализации требований ТЗ одним из крупнейших российских производителей лабораторного оборудования ООО «Эконикс-Эксперт» разработана структурная схема анализатора, сконструирован датчик с фиксатором рецептора, создана переработанная конструкция измерительного преобразователя, подготовлено программное обеспечение анализатора, дающее возможность строить градуировку по растворам ГГС и рассчитывать биохимическое потребление кислорода, создана измерительная кювета с возможностью термостатирования. В результате разработан новый прибор «Эксперт-009» (рис. 14). В качестве биокатализатора в созданном анализаторе используются дрожжи *D. hansenii*, иммобилизованные в химически модифицированный ПВС. Данный биосенсор обладает очень широким спектром детектируемых веществ, высокой чувствительностью определения БПК, длительным временем стабильной работы и устойчивостью к составу исследуемых проб. В созданном анализаторе предусмотрена возможность использования других микроорганизмов, в частности, бактерий *P. uvei*, для анализа природных поверхностных вод с низкими значениями БПК<sub>5</sub>.



**Рис. 14.** Анализатор «Эксперт-009»: а – наконечник электрода для фиксации рецептора, б – фотография биочувствительного элемента с дрожжами *D. hansenii*.

Для внесения в государственный реестр средств измерений и допуску к применению на территории РФ анализатора «Эксперт-009» ФБУ «ЦСМ Московской области» проведены испытания разработанного БПК-термооксиметра «Эксперт-009». На базе полученных результатов работы создана «Методика (метод) выполнения измерений биохимического потребления кислорода после 5 дней инкубации (БПК<sub>5</sub>) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах с помощью анализатора растворенного кислорода с амперометрическим датчиком с рецепторным элементом на основе иммобилизованных микроорганизмов». Данная методика аттестована ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ ГЦГ и ЭФМБА России). Свидетельство об аттестации № 09-16/001.311955.2016 от 30.11.2016 г. Таким образом, сформирована вся нормативная база для использования созданного анализатора в аккредитованных лабораториях РФ.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан комплексный научно-методологический подход к созданию биосенсорных анализаторов для экспресс-оценки биохимического потребления кислорода, основанный на сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров, что дает толчок к разработке современных надежных и экспрессных биоаналитических приборов.
2. Сравнительный анализ чувствительности микроорганизмов по отношению к окисляемым субстратам, их способности метаболизировать широкий круг субстратов и стабильности в иммобилизованном состоянии позволил выбрать бактерии активного ила *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 и гало- и осмоотолерантные дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482, как перспективные микроорганизмы для разработки БПК-биосенсоров. Разработанный подход к созданию искусственных ассоциаций микроорганизмов на основе сходства их ростовых параметров и различия в субстратной специфичности позволил создать устойчивую в течение более 20 суток ассоциацию с широким спектром окисляемых веществ.
3. На основании сравнительного анализа характеристик биосенсоров с иммобилизованными разными способами микроорганизмами показано, что наиболее эффективным способом создания биорецепторных систем БПК-сенсора служит включение микроорганизмов в матрицу модифицированного N-винилпирролидоном поливинилового спирта. Гидрогели на основе ПВС, сшитого N-винилпирролидоном, формируют сетчатую структуру в водной среде, что обеспечивает прочное удерживание и сохранение жизнеспособности иммобилизованных микроорганизмов в сочетании с эффективной диффузией веществ в гидрогеле. Такой способ иммобилизации обеспечивает технологические возможности для тиражирования биорецепторных элементов как расходных материалов для БПК-биосенсора.
4. Предложенный подход для оценки эффективности функционирования биоэлектрохимических систем «микроорганизм-медиатор-электрод», рассматривающий как скорость взаимодействия редокс-соединений с биоматериалом, так и с электродом, обеспечивает возможность сформировать медиаторные биосенсоры, обладающие высокой чувствительностью и стабильностью. Сравнительный анализ констант скорости взаимодействия медиаторов с микроорганизмами, констант скорости гетерогенного переноса электронов и констант скорости взаимодействия медиаторов между собой, позволил выбрать

- двухмедиаторные системы, в которых один из медиаторов участвует в быстром переносе электронов на электрод, а второй способен проникать в клетки, взаимодействуя как с компонентами дыхательной цепи микроорганизмов, так и с внеклеточным акцептором электронов.
5. На основе моделирования электрохимических процессов передачи электронов установлена и обоснована возможность сопряжения метаболических процессов в микроорганизмах *Paracoccus yeei* с генерацией электрического сигнала при участии редокс-активных гидрогелей на основе биополимеров, модифицированных ферроценом и содержащих углеродные нанотрубки, что легло в основу создания технологии получения стабильных медиаторных целоклеточных биосенсоров. Для бактериальных БПК-биосенсоров показаны возможности увеличения чувствительности и стабильности биосенсоров при использовании редокс-активных гидрогелей как матриц для иммобилизованных бактерий, что открывает перспективы миниатюризации и стандартизации создаваемых биосенсорных анализаторов.
  6. На основании сравнительного анализа характеристик лабораторных моделей БПК-биосенсоров и корреляции результатов определения БПК в образцах природных и сточных вод с результатами определения стандартным методом показано, что лучшим набором потребительских качеств обладает биосенсор на базе кислородного электрода и включенных в ПВХ, модифицированный N-винилпирролидоном дрожжей *D. hansenii*. На основе обобщения полученных результатов подготовлено техническое задание на разработку амперометрического БПК-биосенсора и совместно с ООО «Эконикс-Эксперт» создан коммерческий прибор для быстрой оценки БПК «Эксперт-009». Разработана и аттестована для применения методика экспресс-определения БПК, позволяющая заменить рутинные пятисуточные анализы степени загрязнения воды.

**Список опубликованных научных работ по теме диссертации**  
*Научные статьи в изданиях, входящих в базы данных Web of Science (Core Collection), Scopus*

1. Понаморева О.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода / О.Н. Понаморева, **В.А. Арляпов**, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т.47. – №1. – С. 5–15.
2. **Arlyapov V.A.** Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces hansenii* / **V.A. Arlyapov**, S.S. Kamanin, O.N. Ponamoreva, A.N. Reshetilov // Enzyme and Microbial Technology. – 2012. – V. 50. – I. 4–5. – P. 215–220.
3. Зайцев М.Г. Характеристики рецепторных элементов биосенсоров при двух способах иммобилизации метилотрофных дрожжей / М.Г. Зайцев, **В.А. Арляпов**, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – № 5. – С. 570–576.
4. **Arlyapov V.A.** BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly(vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone / **V.A. Arlyapov**, N. Yu. Yudina, L.D. Asulyan, S.V. Alferov, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov // Enzyme and Microbial Technology. – 2013. – № 53. – P. 257–262.
5. Каманин С.С. Модифицированные печатные электроды на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной в гибридную кремнийорганическую золь-гель матрицу / С.С. Каманин, **В.А. Арляпов**, Т.В. Рогова, А.Н. Решетилов // Биотехнология. – 2014. – № 2. – С. 80–87.
6. Yudina N.Yu. A yeast co-culture-based biosensor for determination of waste water contamination levels / N.Yu. Yudina, **V.A. Arlyapov**, M.A. Cherpurnova, S.V. Alferov, A.N. Reshetilov // Enzyme and Microbial Technology. – 2015. – №78. – P. 46–53.
7. Ponamoreva O.N. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors / O.N. Ponamoreva, O.A. Kamanina, V.A. Alferov, A.V. Machulin, T.V. Rogova, **V.A. Arlyapov**, S.V. Alferov, N.E. Suzina, E.P. Ivanova // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – V. 67. – P. 321–326.
8. Kamanina O.A. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater / O.A. Kamanina, D.G. Lavrova, **V.A. Arlyapov**, V.A. Alferov, O.N. Ponamoreva // Enzyme and Microbial Technology. – 2016. – V 92. – P. 94–98.
9. Зайцева А.С. Медиаторный БПК-биосенсор на основе ферроцена и дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* / А.С. Зайцева, **В.А. Арляпов**, Н.Ю. Юдина, Н.М. Носова, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – № 3. – Т 53. – С. 341–348.
10. Zaitseva A.S. Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* / A.S. Zaitseva, **V.A. Arlyapov**, N.Yu.

- Yudina, S.V. Alferov, A.N. Reshetilov // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2017. – V. 98. – P. 43–51.
11. Понаморёва О.Н. Дрожжи *Debaryomyces hansenii* в органосиликатной оболочке как основа гетерогенного биокатализатора / О.Н. Понаморёва, Е.Л. Афонина, О.А. Каманина, Д.Г. Лаврова, **В.А. Арляпов**, В.А. Алферов, А.М. Боронин // *Биотехнология*. – 2017. – Т. 33. – № 4. – С. 44–53.
  12. Алферов С.В. Биотопливный элемент на основе бактерий *Glucanobacter* как сенсор для экспресс-анализа БПК / С.В. Алферов, **В.А. Арляпов**, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2018. – Т. 54. – № 6. – С. 637–643.
  13. Харьковская А.С. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила / А.С. Харьковская, **В.А. Арляпов**, А.Д. Туровская, А.Н. Автух, И.П. Стародумова, А.Н. Решетилов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2019. – Т. 55. – № 2. – С. 199–209.
  14. Kamanina O.A. Glucose biosensor based on screen-printed electrode modified with silicone sol-gel conducting matrix containing carbon nanotubes / O.A. Kamanina, S.S. Kamanin, A.S. Kharkova, **V.A. Arlyapov** // *3 Biotech*. – 2019. – V. 9. – I. 7. – № 290.
  15. Kharkova A.S. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity / A.S. Kharkova, **V.A. Arlyapov**, A.D. Turovskaya, V.I. Shvets, A.N. Reshetilov // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2020. – V. 132. – № 109435.
  16. **Арляпов В.А.** Гибридный редокс-активный полимер на основе бычьего сывороточного альбумина, ферроцена, карбоксилированных углеродных нанотрубок и глюкозокозооксидазы / **В.А. Арляпов**, А.С. Харьковская, Т.Н. Абрамова, Л.С. Кузнецова, А.С. Илюхина, М.Г. Зайцев, А.В. Мачулин, А.Н. Решетилов // *Журнал аналитической химии*. – 2020. – № 9. – С. 820–833. (Q4)
  17. **Arlyapov V.A.** Registration of BOD using *Paracoccus yeii* bacteria isolated from activated sludge / **V.A. Arlyapov**, N.Yu. Yudina, L.D. Asulyan, O.A. Kamanina, S.V. Alferov, A.N. Shumsky, A.V. Machulin, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov // *3 Biotech*. – 2020. – V. 10. – I. 5. – № 207.
  18. **Арляпов В.А.** БПК-биосенсор на основе послойно иммобилизованных микроорганизмов / **В.А. Арляпов**, Н.Ю. Юдина, А.В. Мачулин, В.А. Алферов, О.Н. Понаморёва, А.Н. Решетилов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2021. – Т. 57. – № 1. – С. 95 – 104.
  19. **Arlyapov V.A.** Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor / **V.A. Arlyapov**, A.S. Kharkova, S.K. Kurbanaliyeva, L.S. Kuznetsova, A.V. Machulin, S.E. Tarasov, P.V. Melnikov, O.N. Ponomareva, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2021. – V. 143. – № 109706.
  20. Kharkova A.S. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay / A.S. Kharkova, **V.A. Arlyapov**, A.S. Ilyukhina, O.N. Ponomareva, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov // *3 Biotech*. – 2021. – V. 11. – № 222.



21. Kamanina O.A. Application of organosilicate matrix based on methyltriethoxysilane, PVA and bacteria *Paracoccus yeei* to create a highly sensitive BOD biosensor / O.A. Kamanina, **V.A. Arlyapov**, P.V. Rybochkin, D.G. Lavrova, E.A. Podsevalova, O.N. Ponomoreva // 3 Biotech. – 2021. – V. 7. – № 331.

**Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК**

22. **Арляпов В.А.** Микробные биосенсоры для экспресс-определения БПК сточных вод предприятий пищевой промышленности / **В.А. Арляпов**, О.Н. Понаморева, В.А. Алферов, Т.В. Рогова, И.В. Блохин, И.Ф. Чепкова, А.Н. Решетилов // Вода: Химия и Экология. – 2008. – №3. – С. 23–30.

23. Понаморева О.Н. Теория и применение микробных биосенсоров для оперативного мониторинга биохимического потребления кислорода / О.Н. Понаморева, **В.А. Арляпов**, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2009. – Т. 5. – № 1. – С. 42–48.

24. **Арляпов В.А.** Определение кинетических параметров роста и зависимости окислительной активности от негативных факторов внешней среды у дрожжевых штаммов *Candida maltosa* и *Debaryomyces hansenii* / **В.А. Арляпов**, С.С. Каманин, Н.Ю. Юдина, В.А. Алферов // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2009. – Вып. 2. – С. 203–213.

25. Понаморева О.Н. Биосенсор для экспресс-анализа биохимического потребления кислорода на основе дрожжевых микроорганизмов родов *Candida* и *Debaryomyces* / О.Н. Понаморева, **В.А. Арляпов**, С.С. Каманин, Н.Ю. Юдина, А.Н. Решетилов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2010. – Т. 6. – № 3. – С. 5–12.

26. **Арляпов В.А.** Применение низкоселективных микробных биосенсоров для определения содержания компонентов в многокомпонентных водных средах / **В.А. Арляпов**, О.Н. Понаморева, С.В. Алферов, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Сенсорные системы. – 2011. – Т. 25. – № 4. – С. 352–360.

27. **Арляпов В.А.** Устойчивость во времени ассоциации дрожжевых микроорганизмов *Pichia angusta*, *Arxula adeninovorans* и *Debaryomyces hansenii* / **В.А. Арляпов**, Д.П. Вельмякин, М.А. Чепурнова, Е.Е. Бабкина, В.А. Алферов // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2011. – Вып. 2. – С. 288–297.

28. Каманин С.С. БПК-биосенсор на основе ассоциации дрожжевых штаммов / С.С. Каманин, **В.А. Арляпов**, О.Н. Понаморева, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Вода: химия и экология. – 2012. – №3. – С. 74–81.

29. **Арляпов В.А.** Устойчивость во времени ассоциаций микроорганизмов как потенциальных биораспознающих элементов для БПК-сенсоров / **В.А. Арляпов**, М.А. Чепурнова // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2012. – Вып. 2. – С. 201–211.

30. **Арляпов В.А.** Биосенсорный электрод на основе композиции поливиниловый спирт - N-винилпирролидон для экспресс-определения биохимического потребления кислорода / **В.А. Арляпов**, Н.Ю. Юдина, С.В. Алферов, Л.Д. Асулян, Решетилов А.М., В.А. Алферов // Сенсорные системы. – 2012. – Т.26. – №3. – С. 246–255.
31. Юдина Н.Ю. БПК-биосенсор на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* и медиатора нейтральный красный / Н.Ю. Юдина, А.С. Зайцева, Т.Н. Козлова, **В.А. Арляпов** // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2013. – Вып. 2. – Ч. 1. – С. 289–297.
32. Юдина Н.Ю. Выбор основы рецепторного элемента БПК-биосенсора по субстратной специфичности и параметрам роста дрожжей *Debaryomyces hansenii* / Н.Ю. Юдина, Т.Н. Козлова, П.В. Мельников, **В.А. Арляпов** // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2015. – Вып. 2. – С. 108–120.
33. Зайцева А.С. БПК-биосенсор на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* и бимедиаторной системы ферроцен-метиленовый синий / А.С. Зайцева, Е.И. Касарева, **В.А. Арляпов**, В.А. Алферов // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2015. – Вып. 3. – С. 249–259.
34. Каманин С.С. Влияние глутарового альдегида на субстратную специфичность бактерий *Glucanobacter oxydans* subsp. *industrius* ВКМ В-1280 / С.С. Каманин, С.Б. Чарыева, **В.А. Арляпов**, А.Г. Быков, А.Н. Решетилов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2015. – Т. 11. – № 1. – С. 10–19.
35. **Арляпов В.А.** Комплексная экологическая оценка состояния водных объектов Тульской области / **В.А. Арляпов**, И.А. Нечаева, Л.С. Скворцова, Е.М. Волкова // Вода: химия и экология. – 2016. – № 6. – С. 9–21.
36. **Арляпов В.А.** Амперометрический биосенсорный анализатор для экспресс-определения биохимического потребления кислорода / **В.А. Арляпов**, П.В. Мельников, Н.Ю. Юдина, Н.К. Зайцев, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2016. – № 10. – С. 69–78.
37. Зайцева А.С. Медиаторный биосенсор на основе микроорганизмов активного ила для экспресс-определения низких значений БПК<sub>5</sub> / А.С. Зайцева, **В.А. Арляпов**, А.Н. Решетилов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2017. – Т. 13. – № 1. – С. 50–57.
- Статьи в прочих научных журналах, главы в книгах**
38. **Arlyapov V.A.** Express detection of BOD in wastewaters of starch-processing industry / **V.A. Arlyapov**, E.Y. Chigrinova, O.N. Ponamoreva, A.N. Reshetilov // In: Starch science and technology. Ed. by Yuryev V.P., Tomasik P., Blennow A., Wasserman L.A., Zaikov G.E. New York: Nova. – 2008. – P. 43–50.
39. Решетилов А.Н. Экспресс-определение содержания крахмала, глюкозы, этанола и БПК биосенсорным методом при ферментации этанола / А.Н. Решетилов, М.Г.

- Зайцев, **В.А. Арляпов**, В.А. Алфёров, В.П. Леденев // Ликёроводочное производство и виноделие. – 2012. – № 11–12 (155). – С. 31–35.
40. Reshetilov A.N. Microbial cells and enzymes for assaying the fermentation processes of alcohol production: starch, glucose, ethanol, BOD / A.N. Reshetilov, **V.A. Arlyapov**, M.G. Zaitsev, V.A. Alferov // In: Portable biosensing of food toxicants and environmental pollutants. Ed. by Nikolelis D., Varsakas T., Erdem A., Nikoleli G.-P. London–New York: Taylor & Francis. – 2013. – P. 729–741.
41. **Arlyapov V.A.** BOD biosensors: application of novel technologies and prospects for the development / **V.A. Arlyapov**, A.N. Reshetilov, V.A. Alferov, T.A. Reshetilova // In: State of the art in biosensors – environmental and medical applications. Ed. by Rinken T. London: InTech. – 2013. – P. 57–77.
42. Зайцева А.С. Электрохимия процессов переноса электронов в системе «глюкоза-дрожжи *D. hansenii*-ферроцен-электрод» / А.С. Зайцева, А.Р. Гришаева, **В.А. Арляпов** // Актуальная биотехнология. – 2016. – № 3 (18). – С. 30–33.
43. Каманин С.С. Графитовые печатные электроды, модифицированные проводящим белковым гидрогелем и бактериальными клетками, как основа амперометрического биосенсора / С.С. Каманин, **В.А. Арляпов**, О.Н. Понаморёва, А.Н. Решетилов, И.В. Блохин, В.А. Алферов // Сенсорные системы. – 2017. – Т. 31. – № 2. – С. 159–169.
44. Алферов В.А. Разработка биосенсорного анализатора для экспресс-определения биохимического потребления кислорода. / В.А. Алферов, **В.А. Арляпов**, Н.Ю. Юдина, М.Г. Зайцев // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3 (30). – С. 480–484.
45. **Арляпов В.А.** Биокатализаторы на основе иммобилизованных микроорганизмов: теоретические основы создания и особенности применения в биотехнологии: монография / **В.А. Арляпов**, О.А. Каманина // Тула: Изд-во ТулГУ. – 2019. – 146 с.: ил.

#### *Патенты*

46. Пат. на полезную модель РФ 106898, МПК С12М 1/00, С12Q 1/02. Устройство для экспресс-определения биохимического потребления кислорода. / **Арляпов В.А.**, Каманин С.С., Алферов С.В., Понаморева О.Н. Алферов В.А. Патентообладатель Тульский государственный университет. – № 2010149689/10; заявл. 3.12.2010; опубл. 27.07.2011, Бюл. № 21.
47. Пат. РФ 2461625, С12N 11/04, С12N 11/08, С08F 216/06, С08F 226/10. Полимерная композиция для иммобилизации микроорганизмов в биосенсорных анализаторах. / Асулян Л.Д., Филатова Н.М., **Арляпов В.А.**, Алферов С.В., Алферов В.А. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 20101546688/10; заявл. 30.12.2010; опубл. 20.09.2012, Бюл. № 26.
48. Пат. на полезную модель РФ 117918, МПК С12М 1/00, С12Q 1/00. Устройство для определения степени загрязнения воды биоразлагаемыми органическими веществами. / **Арляпов В.А.**, Каманин С.С., Юдина Н.Ю., Алферов С.В.,

- Алферов В.А. Патентообладатель ООО «Экобиохем». – 201114347/10; заявл. 28.10.2011; опубл. 10.07.2012, Бюл № 19.
49. Пат. РФ 2492236, МПК C12M 11/02, C12Q 1/02. Композиция для получения кремнийорганической золь-гель матрицы для иммобилизации микроорганизмов в биосенсорных анализаторах. / Рогова Т.В., **Арляпов В.А.**, Алферов С.В., Каманина О.А., Понаморева О.Н., Алферов В.А. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 2012123164/10; заявл. 5.06.2012; опубл. 10.09.2013, Бюл. № 25.
50. Пат. на полезную модель РФ 155697, G01N 33/487. Устройство для определения содержания компонентов бродильных и ферментационных сред. / Каманин С.С., **Арляпов В.А.**, Алферов С.В., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 2014150683/15; заявл. 16.12.2014; опубл. 20.10.2015, Бюл. № 29.
51. Пат. на полезную модель РФ 164144, МПК C12M 1/34, C12M 1/40, C12Q 1/02. Устройство для экспресс-мониторинга индекса биохимического потребления кислорода. / Зайцева А.С., Юдина Н.Ю., **Арляпов В.А.**, Понаморева О.Н., Алферов В.А. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 2015145398/10; заявл. 21.10.2015; опубл. 20.08.2016, Бюл. № 23.
52. Пат. на полезную модель РФ 167241, МПК C12M 1/40, C12N 13/00, H01M 8/16, C12R 1/01. Графитовый печатный электрод. / Алферов В.А., Алферов С.В., **Арляпов В.А.**, Каманин С.С., Китова А.Е., Колесов В.В., Решетилов А.Н. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 2016114854/10; заявл. 18.04.2016; опубл. 27.12.2016, Бюл. № 36.
53. Пат. РФ 2614249, МПК C08L 29/04, C12N 11/08. Композиция для получения гидрогеля на основе поливинилового спирта для иммобилизации микроорганизмов. / Асулян Л.Д., Камаева О.А., **Арляпов В.А.**, Алферов С.В., Алферов В.А. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 2016114853; заявл. 8.04.2016; опубл. 24.03.2017, Бюл. № 9.
54. Пат. на полезную модель РФ 175461, МПК G01N 33/487, G01N 27/30. Устройство для определения содержания глюкозы, лактата, этанола и крахмала при совместном присутствии. / Каманин С.С., **Арляпов В.А.**, Алферов В.А., Латунина Л.С. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 2017125807; заявл. 18.07.2017; опубл. 05.12.2017., Бюл. № 34.
55. Пат. на полезную модель РФ 192836, МПК C12M 1/40, C12M 1/34, C12Q 1/02. Устройство для экспресс-анализа индекса биохимического потребления кислорода. / Абрамова Т.Н., **Арляпов В.А.**, Илюхина А.С., Курбаналиева С.К., Туровская А.Д., Харькова А.С. Патентообладатель Тульский государственный университет. – 201911440; заявл. 13.05.2019; опубл. 02.10.2019, Бюл. № 28.

*Избранные материалы в сборниках конференций*

56. **Арляпов В.А.** Микробный биосенсор для экспресс-определения БПК сточных вод промышленных предприятий. В сборнике тезисов: Материалы IV Международной научной конференции «Химия, химическая технология и

- биотехнология на рубеже тысячелетий» / **В.А. Арляпов**, О.Н. Понаморёва, А.Н. Решетилов, В.А. Алфёров, И.В. Блохин // Томск. – 2006. – Т. 2. – С. 329–331.
57. Каманин С.С. Разработка макета БПК-биосенсора проточно-инжекционного типа на основе дрожжевых штаммов *Candida maltosa*, *Candida blankii* и *Debaryomyces hansenii*. В сборнике тезисов: Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова / С.С. Каманин, Н.Ю. Юдина, **В.А. Арляпов** // Москва–Пушино. – 2009. – Т. 2. – С. 91–92.
58. Юдина Н.Ю. Подбор устойчивых во времени ассоциаций микроорганизмов для создания биораспознающих элементов БПК-сенсоров. В сборнике тезисов: Материалы X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» / Н.Ю. Юдина, **В.А. Арляпов**, А.С. Зайцева // Киров. – 2012. – Кн. 2. – С. 185–187.
59. Юдина Н.Ю. Создание рецепторного элемента БПК-биосенсора для экспресс-мониторинга водных сред. В сборнике тезисов: VIII Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» / Н.Ю. Юдина, **В.А. Арляпов**, В.А. Алфёров // Москва. – 2015. – С. 381–382.
60. Алфёров В.А. Разработка и подготовка промышленного выпуска амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс-определения биохимического потребления кислорода. В сборнике тезисов: Материалы V Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» / В.А. Алфёров, **В.А. Арляпов**, Л.Д. Асулян, Н.Ю. Юдина, Н.К. Зайцев // Ялта. – 2015. – С.65–66.
61. Юдина Н.Ю. Разработка нового метода химической модификации поливинилового спирта для создания высокочувствительных и стабильных биокатализаторов. В сборнике тезисов: Материалы IV Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» / Н.Ю. Юдина, **В.А. Арляпов**, В.А. Алфёров, О.Н. Понаморёва // Ялта. – 2016. – С. 122–126.
62. Каманин С.С. Биосенсор на основе печатного электрода, модифицированного бактериальными клетками, иммобилизованными в проводящий белковый гидрогель. В сборнике тезисов: Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» / С.С. Каманин, **В.А. Арляпов** // Москва. – 2017. – С. 452–453.