

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Тульский государственный университет»

*На правах рукописи*

**АРЛЯПОВ ВЯЧЕСЛАВ АЛЕКСЕЕВИЧ**

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

1.5.6. Биотехнология

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
доктора технических наук

Научный консультант:  
Зав. кафедрой биотехнологии ФГБОУ ВО  
«ТулГУ», доктор химических наук, доцент  
Понаморева Ольга Николаевна

Москва – 2022

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДГ	– алкогольдегидрогеназа
АТФ	– аденозинтрифосфат
БПК	– биохимическое потребление кислорода
БПК <sub>5</sub>	– биохимическое потребление кислорода за 5 суток
БПК <sub>полн</sub>	– полное биохимическое потребление кислорода
БТЭ	– биотопливный элемент
ВЧ	– волновое число
ВКМ	– Всероссийская коллекция микроорганизмов
ГГС	– глюкозо-глутаматная смесь
ГЦК	– гексацианоферрат (III) калия
$G_0$	– поверхностная концентрация электроактивного соединения
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДДС	– додецилсульфат натрия
ДДБС	– додецилбензосульфат натрия
ДМФЦ	– 1,1'-диметилферроцен
ДХФИФ	– 2,6-дихлорфенолиндофенол
ИК	– инфракрасная спектроскопия
МНПВО	– многократно нарушенное полное внутреннее отражение
МТЭС	– метилтриэтоксисилан
МС	– метиленовый синий
НАДН/ НАД <sup>+</sup>	– восстановленная и окисленная форма никотиамидадениндинуклеотида
НК	– нейтральный красный
ПВС	– поливиниловый спирт
ПДК	– предельно допустимая концентрация
ПНДФ	– природоохранные нормативные документы федеративные

ПО	– программное обеспечение
ПК	– персональный компьютер
пНК	– полинейтральный красный
РАН	– Российская академия наук
РЭ	– рабочий электрод
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия
ТЗ	– техническое задание
ТН	– тионин
ТЭОС	– тетраэтоксисилан
УФ	– ультрафиолет
ФЦ	– ферроцен
ФЦ <sup>+</sup>	– катион ферроцена
ФЦК	– ферроценкарбоксальдегид
ФЦАЦ	– ферроценацетонитрил
ХПК	– химическое потребление кислорода
ЦВА	– циклическая вольтамперометрия
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭС	– электрод сравнения
ЭТЦ	– электрон-транспортная цепь
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
$(C_{Mок})_{x=0}$	– концентрация окисленной формы медиатора на поверхности электрода
$(C_{Mв})_{x=0}$	– концентрация восстановленной формы медиатора на поверхности электрода
$C_0$	– концентрация вещества в растворе
$D_S$	– коэффициент диффузии субстрата
$D_M$	– коэффициент диффузии медиатора
$D$	– коэффициент диффузии
$E$	– электродный потенциал
$E_p$	– потенциал катодного или анодного пика

$E_p^{cat}$	– потенциал катодного пика
$E_{Ok}$	– окисленная форма фермента
$E_B$	– восстановленная форма фермента
$E_M^0$	– стандартный окислительно-восстановительный потенциал медиатора
$\Delta E_p$	– разность потенциалов катодного и анодного пиков
$[E]$	– равновесная концентрация фермента
$E^{0'}$	– стандартный потенциал
$F$	– постоянная Фарадея
$I$	– измеряемый ток
$I_k$	– предельный ток в присутствии субстрата
$I_d$	– предельный ток в отсутствие субстрата
$I_{max}$	– максимальный ток биоэлектрокаталитического окисления медиатора микроорганизмами, регистрируемый биосенсором
$I_p$	– ток анодного пика
$k_{кат}$	– каталитическая константа
$K_S$	– константа Михаэлиса для субстрата
$K_M$	– константа Михаэлиса для медиатора
$k_{\rightarrow}$	– константа скорости прямой электродной реакции с участием медиатора
$k_{\leftarrow}$	– константа скорости обратной электродной реакции с участием медиатора
$k_s$	– гетерогенная константа скорости электрохимической реакции
$k_{взаим}$	– константа скорости взаимодействия медиатора и биоматериала
$k_{Med}$	– полная константа скорости восстановления медиатора микроорганизмами
$l$	– толщина биокаталитического слоя

$l_m$	– толщина полупроницаемой мембраны
$M_{Oк}$	– окисленная форма медиатора
$M_B$	– восстановленная форма медиатора
$[M]$	– равновесная концентрация медиатора
$n$	– число электронов
N-ВП	– N-винилпирролидон
OECD	– Организация Экономического Сотрудничества и Развития
P	– продукт
PQQ-	– пирролохинолинхинон
$[S]$	– равновесная концентрация субстрата
S	– субстрат
$s$	– площадь электрода
$T$	– температура
$v$	– скорость наложения потенциала
$x$	– координата реакции
$\alpha$	– коэффициент переноса электронов для катодного процесса
$\varepsilon$	– молярный коэффициент поглощения
$\lambda_{max}$	– длина волны максимума поглощения
$\psi$	– параметр, влияющий на разность потенциалов пиков
Микроорганизмы:	
<i>P. yeii</i>	– <i>Paracoccus yeii</i>
<i>D. hansenii</i>	– <i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>S. cerevisiae</i>	– <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. bayanus</i>	– <i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>S. pasterianus</i>	– <i>Saccharomyces pasterianus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	– <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. veronii</i>	– <i>Pseudomonas veronii</i>
<i>G. oxydans</i>	– <i>Gluconobacter oxydans</i>

<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
<i>B. subtilis</i>	– <i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. proteolyticus</i>	– <i>Bacillus proteolyticus</i>
<i>C. violaceum</i>	– <i>Chromobacterium violaceum</i>
<i>V. fischeri</i>	– <i>Vibrio fischeri</i>
<i>Og. angusta</i>	– <i>Ogataea angusta</i>
<i>Og. polymorpha</i>	– <i>Ogataea polymorpha</i>
<i>Og. parapolyomorpha</i>	– <i>Ogataea parapolyomorpha</i>
<i>B. adenivorans</i>	– <i>Blastobotrys adenivorans</i>
<i>C. boidinii</i>	– <i>Candida boidinii</i>
<i>C. maltosa</i>	– <i>Candida maltosa</i>
<i>C. blankii</i>	– <i>Candida blankii</i>

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>15</b>
<b>ГЛАВА 1. РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ ФОРМИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БПК-БИОСЕНСОРА .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Теоретические основы функционирования БПК-биосенсоров.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.1. Биохимическое потребление кислорода.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.2. Методы определения БПК<sub>5</sub> .....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.3. Метод определения БПК с использованием биосенсора .....</b>	<b>33</b>
1.1.3.1. Принцип функционирования БПК-биосенсоров на основе различных принципов измерения.....	34
1.1.3.2. Рецепторные системы БПК-биосенсоров.....	41
1.1.3.3. Характеристика БПК-биосенсоров различных типов.....	43
1.1.3.4. Коммерческие БПК-биосенсоры .....	55
<b>1.2. Выбор микроорганизмов для формирования биораспознающего элемента БПК-сенсора на основе скрининга штаммов ВКМ .....</b>	<b>60</b>
<b>1.2.1. Особенности физиологии, метаболизма и применения в биосенсорах используемых микроорганизмов.....</b>	<b>60</b>
1.2.1.1. Общая характеристика метилотрофных дрожжей <i>Ogataea</i> <i>angusta</i> , <i>Ogataea polymorpha</i> и <i>Ogataea parapolyomorpha</i> .....	60
1.2.1.2. Характеристика дрожжей <i>Blastobotrys adenivorans</i> .....	63
1.2.1.3. Характеристика дрожжей <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	66
1.2.1.4. Общая характеристика дрожжей <i>Candida boidinii</i> , <i>Candida maltosa</i> и <i>Candida blankii</i> .....	69
1.2.1.5. Общая характеристика дрожжей <i>Saccharomyces bayanus</i> и <i>Saccharomyces pastorianus</i> .....	74
1.2.1.6. Общая характеристика бактерий <i>Glucanobacter oxydans</i> .....	77
<b>1.2.2. Определение ключевых метаболических, биокаталитических и физиолого-биохимических характеристик выбранных микроорганизмов</b>	<b>81</b>

<b>1.3. Разработка подхода для расширения спектра определяемых органических веществ на основе использования искусственных ассоциаций микроорганизмов в рецепторном элементе биосенсора.....</b>	<b>93</b>
<i>1.3.1. Составление искусственных ассоциаций микроорганизмов.....</i>	<i>94</i>
<i>1.3.2. Определение стабильности состава созданных искусственных ассоциаций микроорганизмов.....</i>	<i>98</i>
<i>1.3.3. Определение ключевых метаболических, биокаталитических и физиолого-биохимических характеристик созданных ассоциаций.....</i>	<i>100</i>
<b>1.4. Выделение микроорганизмов активного ила для формирования биорецептора БПК-сенсора .....</b>	<b>104</b>
<i>1.4.1. Особенности биоценоза активного ила очистных сооружений .....</i>	<i>104</i>
<i>1.4.2. Выделение микроорганизмов активного ила, перспективных для создания БПК-биосенсора .....</i>	<i>106</i>
<i>1.4.3. Особенности выделенных из активного ила микроорганизмов <i>Pseudomonas veronii</i>, <i>Paracoccus yeei</i> и <i>Bacillus proteolyticus</i> .....</i>	<i>110</i>
<i>1.4.4. Определение ключевых метаболических, биокаталитических и физиолого-биохимических характеристик выделенных микроорганизмов .....</i>	<i>113</i>
<b>1.5. Воздействие параметров среды на окислительную активность выбранных микроорганизмов и ассоциаций .....</b>	<b>118</b>
<i>1.5.1. Влияние pH на окислительную активность микроорганизмов .....</i>	<i>118</i>
<i>1.5.2. Влияние ионной силы раствора на дыхательную активность микроорганизмов.....</i>	<i>120</i>
<i>1.5.3. Влияние температуры на дыхательную активность микроорганизмов.....</i>	<i>123</i>
<i>1.5.4. Влияние ионов тяжелых металлов на дыхательную активность микроорганизмов.....</i>	<i>125</i>
<b>ГЛАВА 2. СОЗДАНИЕ НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ БАЗЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ РЕГИСТРАЦИИ ИНТЕНСИВНОСТИ КЛЕТОЧНОГО ДЫХАНИЯ.....</b>	<b>130</b>



<b>2.1. Методы иммобилизации микроорганизмов в биосенсорных анализаторах .....</b>	<b>130</b>
<i>2.1.1. Общий подход к иммобилизации микроорганизмов в биосенсорных анализаторах .....</i>	<i>130</i>
<i>2.1.2. Химические методы иммобилизации микроорганизмов .....</i>	<i>133</i>
<i>2.1.3. Адсорбция микроорганизмов на носителях .....</i>	<i>135</i>
<i>2.1.4. Капсулирование микроорганизмов.....</i>	<i>137</i>
<i>2.1.5. Иммобилизация микроорганизмов путем включения в гидрогели ..</i>	<i>138</i>
<i>2.1.5.1. Включение клеток в гидрогели на основе поливинилового спирта</i>	<i>141</i>
<i>2.1.5.2. Включение микроорганизмов в гели на основе белков .....</i>	<i>147</i>
<i>2.1.5.3. Включение микроорганизмов в кремниевые золь-гель матрицы ....</i>	<i>149</i>
<i>2.1.5.4. Включение микроорганизмов в гидрогели на основе полисахаридов .....</i>	<i>154</i>
<b>2.2. Разработка стабильных и чувствительных рецепторных элементов биосенсора при использовании разных методов иммобилизации микроорганизмов .....</b>	<b>158</b>
<i>2.2.1 Формирование рецепторных элементов БПК-биосенсора на основе различных способов иммобилизации микроорганизмов .....</i>	<i>158</i>
<i>2.2.2. Характеристики БПК-биосенсоров на основе иммобилизованных разными способами бактерий P. уееі.....</i>	<i>168</i>
<b>2.3. Оптимизация методики синтеза гидрогеля на основе поперечно сшитого ПВС для иммобилизации микроорганизмов.....</b>	<b>176</b>
<b>2.4. Изучение химической структуры полимера ПВС, сшитого N-винилпирролидоном .....</b>	<b>181</b>
<b>2.5. Изучение молекулярной структуры ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном .....</b>	<b>188</b>
<b>2.6. Определение физико-механических свойств ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном.....</b>	<b>195</b>

<b>2.7. Сравнительный анализ характеристик БПК-биосенсоров с использованием выбранного биоматериала и способа его иммобилизации .....</b>	<b>198</b>
<b>ГЛАВА 3. СОЗДАНИЕ НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ БАЗЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕДИАТОРНЫХ БПК-БИОСЕНСОРОВ .....</b>	<b>214</b>
<b>3.1. Особенности применения амперометрических медиаторных биосенсоров для экспресс-анализа БПК.....</b>	<b>216</b>
<i>3.1.1. Закономерности функционирования медиаторных биосенсоров ...</i>	<i>216</i>
<i>3.1.2. Медиаторные соединения различных классов .....</i>	<i>219</i>
3.1.2.1. Производные ферроцена .....	220
3.1.2.2. 2,6-Дихлорфенолиндофенол.....	222
3.1.2.3. Гексацианоферрат (III) калия.....	223
3.1.2.4. Феназины .....	224
<i>3.1.3. Электрохимические методы исследования медиаторного переноса электронов .....</i>	<i>229</i>
3.1.3.1. Амперометрия .....	229
3.1.3.2. Вольтамперометрия с линейной разверткой потенциала .....	230
3.1.3.3. Циклическая вольтамперометрия.....	232
<i>3.1.4. Особенности формирования и использования медиаторных биосенсорных систем для определения биохимического потребления кислорода.....</i>	<i>240</i>
<b>3.2. Анализ возможности использования некоторых соединений как медиаторов для выбранных микроорганизмов .....</b>	<b>246</b>
<i>3.2.1. Определение константы скорости взаимодействия микроорганизмов с редокс-соединениями .....</i>	<i>248</i>
<i>3.2.2. Определение гетерогенной константы скорости передачи электронов редокс-соединениями на электрод.....</i>	<i>249</i>
<b>3.3. Разработка медиаторных БПК-биосенсоров .....</b>	<b>254</b>

<b>3.4. Разработка кинетического подхода к созданию двухмедиаторных систем внеклеточного переноса электронов у эукариотических микроорганизмов .....</b>	<b>265</b>
<b>3.5. Разработка подходов к стандартизации и повышению чувствительности БПК-датчиков за счет использования редокс-активных гидрогелей.....</b>	<b>279</b>
<b>3.5.1. Создание редокс-активных гидрогелей для иммобилизации микроорганизмов.....</b>	<b>279</b>
3.5.1.1. Особенности создания и изучения механизмов электронного переноса в редокс-активных гидрогелях .....	279
3.5.1.2. Редокс-активные полимеры на основе БСА .....	283
3.5.1.3. Редокс-активные полимеры на основе хитозана .....	286
3.5.1.4. Использование углеродных нанотрубок в редокс-активных и проводящих гелях .....	289
<b>3.5.2. Получение биосовместимых редокс-активных гидрогелей на основе полимеров, ковалентно связанных с медиаторами .....</b>	<b>294</b>
<b>3.5.3. Сравнительный анализ характеристик БПК-биосенсоров на основе созданных редокс-активных полимеров .....</b>	<b>306</b>
<b>ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА КОММЕРЧЕСКОГО БИОСЕНСОРНОГО ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗАТОРА БПК .....</b>	<b>317</b>
<b>4.1. Сравнительные испытания разработанных биосенсоров при анализе биохимического потребления кислорода сточных и поверхностных вод различного происхождения .....</b>	<b>317</b>
<b>4.2. Разработка коммерческого экспресс-анализатора БПК «Эксперт-009» .....</b>	<b>325</b>
4.2.1. Основное содержание ТЗ на разработку амперометрического биосенсорного анализатора БПК .....	327
4.2.2. Создание коммерческого биосенсорного анализатора БПК «Эксперт-009».....	334
<b>5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	<b>352</b>

<b>5.1. Используемые штаммы микроорганизмов.....</b>	<b>352</b>
<b>5.2. Выделение и идентификация микроорганизмов активного ила .....</b>	<b>352</b>
<b>5.3. Культивирование микроорганизмов .....</b>	<b>353</b>
<b>5.4. Определение параметров роста микроорганизмов .....</b>	<b>353</b>
<b>5.5. Иммобилизация биоматериала и формирование биосенсора на основе кислородного электрода.....</b>	<b>354</b>
<i>5.5.1. Иммобилизация микроорганизмов с использованием диализной     мембраны .....</i>	<i>354</i>
<i>5.5.2. Иммобилизация микроорганизмов адсорбцией на стекловолоконном     фильтре.....</i>	<i>354</i>
<i>5.5.3. Иммобилизация микроорганизмов включением в золь-гель ТЭОС ..</i>	<i>355</i>
<i>5.5.4. Иммобилизация микроорганизмов включением в гель хитозана ....</i>	<i>355</i>
<i>5.5.5. Иммобилизация микроорганизмов включением в гель ПВС, сшитого     янтарной кислотой .....</i>	<i>355</i>
<i>5.5.6. Иммобилизация микроорганизмов включением в поперечно-сшитый     бычий сывороточный альбумин.....</i>	<i>356</i>
<i>5.5.7. Иммобилизация микроорганизмов включением в агаровый гель .....</i>	<i>356</i>
<i>5.5.8. Иммобилизация микроорганизмов в гидрогель поливинилового     спирта, сшитого N-винилпирролидоном.....</i>	<i>356</i>
<i>5.5.9. Послойная иммобилизация микроорганизмов в гидрогель     поливинилового спирта, сшитого N-винилпирролидоном .....</i>	<i>357</i>
<b>5.6. Проведение биосенсорных измерений с использованием кислородного электрода.....</b>	<b>357</b>
<b>5.7. Проведение биосенсорных измерений с использованием медиаторного электрода.....</b>	<b>359</b>
<b>5.8. Формирование рабочих электродов на основе редокс-активных полимеров .....</b>	<b>360</b>
<i>5.8.1. Синтез редокс-активного полимера на основе БСА и медиатора     ферроценкарбоксальдегида и формирование рабочего электрода (БСА-ФЦ)     .....</i>	<i>360</i>

5.8.2. Синтез редокс-активного полимера на основе хитозана и медиатора ферроценкарбоксальдегида и формирование рабочего электрода (ХИТ-ФЦ) .....	361
5.8.3. Модификация редокс-активных полимеров углеродными нанотрубками .....	361
5.8.4. Иммуобилизация микроорганизмов в созданные редокс-активные матрицы и формирование биосенсоров.....	362
5.9. Циклическая вольтамперометрия.....	362
5.10. Импедансная спектроскопия .....	362
5.11. Определение содержания железа в редокс-активных полимерах методом атомно-абсорбционной спектроскопии .....	363
5.12. Регистрация ИК-спектров .....	363
5.13. Регистрация ЯМР-спектров.....	363
5.14. Определение доли сшитого N-винилпирролидоном ПВС методом экстракции.....	364
5.15. Определение физико-механических свойств полимерных пленок на основе поливинилового спирта .....	364
5.16. Определение количества жизнеспособных клеток микроорганизмов в ассоциациях методом Коха.....	364
5.17. Оптическая микроскопия.....	365
5.18. Сканирующая электронная микроскопия.....	365
5.19. Определение БПК <sub>5</sub> стандартным методом разбавления .....	365
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	366
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	369
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СЕРТИФИКАТ О ДЕПОНИРОВАНИИ В ВКМ МИКРООРГАНИЗМОВ <i>PARACOCCUS YEEI</i>, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АКТИВНОГО ИЛА</b> .....	407
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 2. СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ТИПА СРЕДСТВ ИЗМЕРЕНИЙ ДЛЯ АНАЛИЗАТОРА «ЭКСПЕРТ-009»</b> .....	408

<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 3. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗАТОРА РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА «ЭКСПЕРТ-009» (СОГЛАСНО ОПИСАНИЯ ТИПА СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЯ).....</b>	<b>409</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 4. РЕЗУЛЬТАТЫ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ МУ 09-16/001 .....</b>	<b>411</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 5. СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ МУ 09-16/001.....</b>	<b>413</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 6. АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>414</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 7. АКТ О ПРАКТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОПЫТНЫХ ОБРАЗЦОВ МИКРОБНЫХ БИОСЕНСОРОВ.....</b>	<b>416</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 8. ПИСЬМО О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>418</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

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 (БПК). 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 yeai* 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. yeai* 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.); госзадание Минобрнауки России № 14.2094.2014/К (исполнитель, 2014 – 2016 гг.), № FEWG-2020-0008 (исполнитель, 2020 – 2022 гг.); гранта РФФИ № 16-48-710959 p\_a (руководитель, 2016 – 2018 гг.); грант РНФ №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 yeii* 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).



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

При создании рецепторных элементов биосенсоров для оценки биохимического потребления кислорода применяют микроорганизмы с широкой субстратной специфичностью и другими полезными качествами, а также искусственные и естественные (активный ил) сообщества микроорганизмов. Как правило, сенсоры на основе единичных микроорганизмов характеризуются более высокой стабильностью работы, но имеют большую ошибку определения БПК из-за более узкой субстратной специфичности 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 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. Теоретические основы функционирования БПК-биосенсоров**

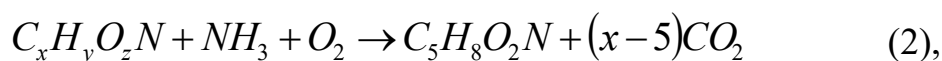
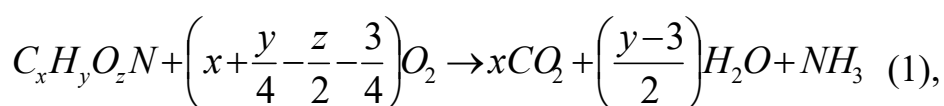
### ***1.1.1 Биохимическое потребление кислорода***

Биохимическое потребление кислорода – это количество растворенного кислорода, потребляемого за установленное время и в определенных условиях

при биохимическом окислении содержащихся в воде органических веществ [1]. При расчете БПК не учитывают потребление  $O_2$  на происходящую нитрификацию. Различают БПК за конкретный временной промежуток (БПК<sub>5</sub> – 5 сут.) и полное БПК (БПК<sub>полн.</sub>). За полное биохимическое потребление кислорода принимают количество  $O_2$  в пробе, которое идет на биохимическое окисление органических соединений до начала нитрификации [2].

Известно, что биохимическое окисление разных органических соединений имеет неодинаковую скорость [3]. Скорость биохимического окисления зависит от химического строения веществ и присутствия адаптированных к ним микроорганизмов. К веществам, имеющим высокую скорость биохимического окисления, относят: низшие спирты, моносахариды, формальдегид, фенол и др. К веществам, имеющим среднюю скорость биохимического окисления, относят: анионоактивные поверхностно-активные вещества, крезолы, резорцин, ксиленолы, пирокатехин и др. К веществам, имеющим низкую скорость биохимического окисления, относят: неионогенные поверхностно-активные вещества, гидрохинон, тимол и др.

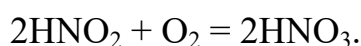
Процессы биохимического окисления органических веществ сопряжены с процессами жизнедеятельности микроорганизмов. В общем виде эти процессы можно выразить следующим уравнением:



где  $C_xH_yO_zN$  – суммарное соотношение основных элементов, имеющих в составе загрязненных вод,  $C_5H_8O_2N$  – среднее соотношение основных элементов в клеточном веществе бактерий.

Уравнение (1) описывает процессы при дыхании микроорганизмов, а уравнение (2) – процессы синтеза клеточных веществ в микроорганизмах. Общее количество кислорода, затраченное при этих двух процессах, отвечает величине БПК<sub>полн.</sub>. Характер потребления кислорода искажается из-за процессов нитрификации. Нитрификация протекает под действием нитрифицирующих

бактерий – *Nitrozomonas*, *Nitrobacter* и др. Они окисляют азотсодержащие соединения, которые могут присутствовать в загрязненных природных и сточных водах (например, пищевых предприятий), и переводят азот из аммонийной в нитратную форму. Процесс описывается следующими уравнениями:



Нитрификация начинается примерно на 7-й день инкубации. Поэтому при определении БПК<sub>10</sub>, БПК<sub>20</sub> и т. д. в пробу вводят различные ингибиторы жизнедеятельности нитрифицирующих бактерий, но не оказывающие влияния на бактерии, окисляющие органические соединения. В качестве ингибитора чаще всего применяют раствор тиомочевины [2, 4].

На практике чаще всего используют параметр БПК<sub>5</sub>. При загрязнении поверхностных вод сточными водами хозяйственно-бытового происхождения БПК<sub>5</sub> составляет примерно 70% от полного биохимического потребления кислорода. Очень чистыми считают водоемы с БПК<sub>5</sub> 0,5–1,0 мг/дм<sup>3</sup>, а очень грязными – с БПК<sub>5</sub> более 10 мг/дм<sup>3</sup>. На уровень БПК также оказывают влияние сезонные изменения температуры, от которой зависит растворимость кислорода и скорость биохимических процессов в микроорганизмах. Для разных категорий водоемов регламентированы разные значения БПК<sub>5</sub>: для водоемов питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий – не более 2 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>; для водоемов рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест – не более 4 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> [5]. Величина биохимического потребления кислорода свидетельствует о степени опасности сточных вод для водоемов, способности поверхностных вод к самоочищению и общем уровне экологической ситуации в водоеме.

### 1.1.2. Методы определения БПК<sub>5</sub>

По существующим в Российской Федерации нормативным документам анализ биохимического потребления кислорода производится тремя основными методами, различающимися в первую очередь методикой определения количества потребленного микроорганизмами кислорода (таблица 1).

Таблица 1. Методы определения БПК, действующие на территории РФ.

Название метода	Сущность	Диапазон определяемых концентраций	Показатель точности анализа
Скляночный метод йодометрического титрования [4]	Измерение содержания растворенного кислорода методом йодометрического титрования пробы воды до и после 5 суток инкубации (метод Винклера): 1) $Mn(OH)_2 \downarrow + O_2 = MnO_2 \cdot H_2O \downarrow$ 2) $MnO_2 \cdot H_2O \downarrow + 2H_2SO_4 + 2KI = MnSO_4 + I_2 + K_2SO_4 + 3H_2O$ 3) $I_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaI + Na_2S_4O_6$	от 0,5 до 5,0 вкл.	26%
		св. 5,0 до 100 вкл.	13%
		св. 100 до 300 вкл.	9%
Скляночный метод – амперометрическое определение [4]	Измерение содержания растворенного кислорода с использованием амперометрического кислородного электрода до и после 5 сут. инкубации: катод (Pt): $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$ анод (Ag):	от 0,5 до 200 вкл.	14%
		св. 200	12%

	$4\text{Ag} + 4\text{Cl}^- \rightarrow 4\text{AgCl} + 4\text{e}^-$		
Манометрический метод [6]	Измерение разности парциального давления кислорода в герметично закрытом датчике до и после 5 сут. инкубации.	от 1 до 5,0 вкл.	50%
		св. 5,0 до 10 вкл.	35%
		св. 10 до 50 вкл.	30%
		св. 50 до 300 вкл.	25%
		св. 300 до 4000 вкл.	20%

Наиболее широко для определения БПК используют метод разбавления. Для этого исследуемый образец воды разбавляют насыщенной кислородом дистиллированной водой (необходима концентрация кислорода 8–9 мг/дм<sup>3</sup>). В воду для разбавления добавляют различные соли для создания буферной системы, которая поддерживает постоянное значение рН, не изменяющееся при выделении СО<sub>2</sub>. Кроме того, в воду для разбавления вносят бактериальную затравку (активный ил). Величину разбавления подбирают, исходя из перманганатной окисляемости воды так, чтобы количества кислорода в разбавляющей воде хватало для биохимического окисления всех органических веществ в пробе. После определения концентрации кислорода в разбавленной пробе ее инкубируют в герметичной склянке (рис. 1А) при 20°С в течение 5 суток (БПК<sub>5</sub>). Затем еще раз определяют концентрацию растворенного кислорода и по разнице с начальной концентрацией рассчитывают БПК.

Для получения корректных данных определения БПК необходимо, чтобы инкубация образца проводилась при постоянной температуре без доступа воздуха и света, концентрация растворенного кислорода в пробе во время инкубации должна упасть примерно на 50% от начальной, а конечная концентрация растворенного О<sub>2</sub> после инкубации должна быть не менее 3

мг/дм<sup>3</sup> для обеспечения нормальных условий проведения аэробных процессов. Определение содержания кислорода до и после инкубации проводят йодометрическим титрованием или с использованием амперометрического кислородного электрода [4].

Промышленно выпускаются приборы для автоматизации стандартного метода определения БПК. Так, например, компанией «Scalar» (Нидерланды) разработан автоматический анализатор биохимического потребления кислорода методом разбавления (рис. 1Б).

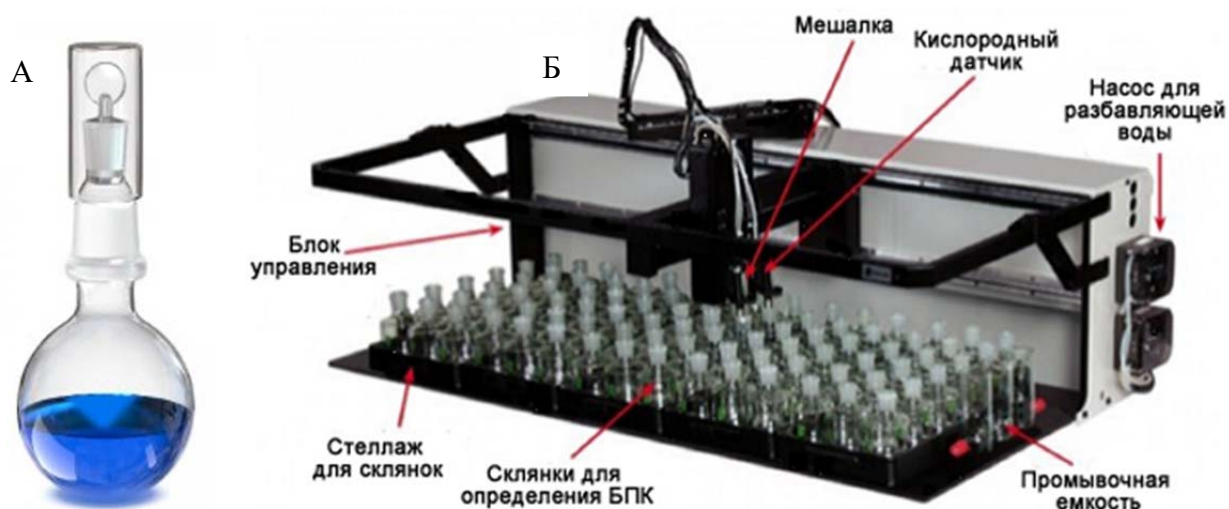


Рис. 1. Анализ биохимического потребления кислорода методом разбавления: А – склянка для инкубирования пробы при анализе БПК; Б – полуавтоматический анализатор БПК компании «Scalar».

Возможным вариантом модификации стандартного метода разбавления может быть применение оптического датчика для измерения содержания кислорода [3]. Такой датчик представляет собой достаточно простую систему, в которой оптический краситель облучается синим светом и испускает более длинноволновый красный свет в результате люминесценции. При наличии кислорода в среде происходит тушение люминесценции, которое можно зарегистрировать по уменьшению времени затухания люминесценции. Достоинством таких датчиков является простота обслуживания, отсутствие необходимости в их калибровке и минимальное влияние скорости потока на результаты измерения.

Классический метод оценки БПК, базирующийся на измерении потребления кислорода микроорганизмами, является довольно простым и надежным, однако имеет ряд недостатков. Очень большая длительность анализа не удовлетворяет современным требованиям к аналитическим методам. Методика не подходит для мониторинга работы очистных сооружений в режиме реального времени. Кроме того, в результатах классического метода может наблюдаться значительный разброс (более 20%) из-за разных микробных популяций, используемых в разных лабораториях. Указанные недостатки подтолкнули к разработке ряда новых методов для замены устаревшего метода разбавления.

Одним из подходов к упрощению анализа БПК является использование фотометрического метода определения кислорода. Несколько фирм предлагают коммерчески доступные наборы реактивов для этих целей: «Hach Lange» (LCK 554, LCK 555), «Macherey Nagel» (BOD<sub>5</sub>-Nanocolor). В тестах фирмы «Hach Lange» использованы реактивы, дающие красное окрашивание с интенсивностью, зависящей от содержания кислорода в растворе (рис. 2). Такой подход может несколько упростить процесс проведения анализа, однако не снимает главную проблему – необходимость 5-суточной инкубации пробы.



Рис. 2. Набор для кюветного теста на БПК<sub>5</sub> фирмы «Hach Lange», диапазон измерения 4–1650 мг/л O<sub>2</sub>.

Манометрический метод анализа БПК основан на измерении давления в герметичной склянке в процессе биодеструкции веществ в пробе. В процессе разложения органических веществ микроорганизмы потребляют кислород и выделяют углекислый газ. Углекислый газ поглощается щелочью, находящейся над уровнем жидкости, что приводит к снижению давления в склянке. Снижение давления регистрируется с помощью встроенного в крышку манометра и пересчитывается на количество потребленного кислорода. Наибольшее распространение получили манометрические анализаторы биохимического потребления кислорода производства Германии: OxiTop (рис. 3), OxyDirect, BODTrak; Италии: BOD EVO Sensor; Соединенных Штатов Америки: Quick Scan BOD Analyzer и Китая: CI-B5 BOD ANALYZER.



Рис. 3. Комплект для анализа БПК OxiTop.

Манометрический метод получил широкое распространение на промышленных предприятиях, так как он наиболее прост в использовании и дает возможность определять БПК в образцах без разбавления пробы (диапазон определяемых значений БПК без разбавления пробы  $0-700 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  по сравнению с  $0-6 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$  стандартного метода) [3]. Однако проблему необходимости 5-суточной инкубации пробы он также не решает.



### 1.1.3. Метод определения БПК с использованием биосенсора

Снижение времени определения БПК возможно при использовании биосенсорных анализаторов. Принцип определения, реализованный в биосенсорах, заключается в том, что биологический материал, который иммобилизован на физико-химическом преобразователе, взаимодействует с анализируемым веществом, генерируя зависимый от содержания определяемого вещества аналитический сигнал. Этот сигнал регистрируется преобразователем, обрабатывается и представляется в виде числовых данных (рис. 4).

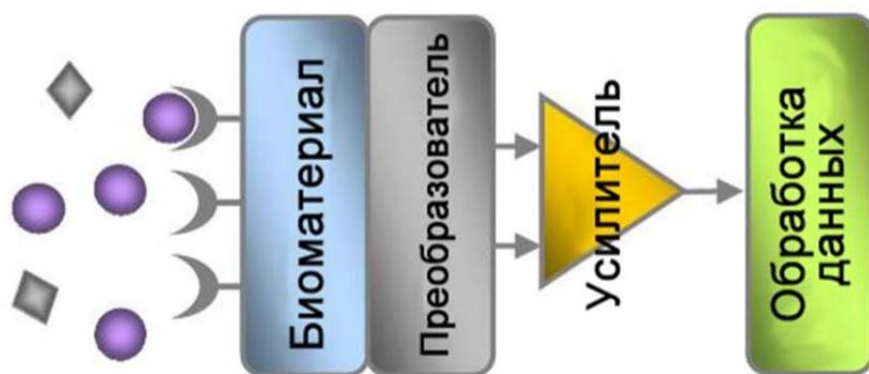


Рис. 4. Схематическое представление биосенсора.

Для экспресс-анализа БПК используют микробные биосенсоры, основанные на применении целых клеток микроорганизмов. В результате окисления микроорганизмами потребляемых субстратов их дыхательная активность изменяется, что можно зарегистрировать разными типами преобразователей. Разработка биосенсоров для экспресс-анализа БПК началась около 40 лет назад [7, 8], однако интенсивно продолжается и на сегодняшний день [9]. Необходимо отметить, что значение индекса БПК, определяемое с помощью биосенсоров, не всегда соответствует результатам стандартного 5-суточного метода. Это связано с тем, что биоматериал в рецепторном элементе биосенсора за короткое время не способен окислить такой же широкий спектр

веществ, как активный ил за 5 суток. Особенно данная проблема обостряется при наличии большого количества медленноокисляемых органических веществ в пробе [3]. Поэтому исследования последних лет направлены в первую очередь на повышение корреляции результатов экспресс-анализа БПК со стандартным методом. Как правило, коэффициент корреляции этих результатов находится в диапазоне 0,9–0,99 [3, 10]. Основными путями повышения корреляции являются: использование микроорганизмов с широким спектром окисляемых веществ [11] и их ассоциаций [12], адаптация и повышение стабильности в биосенсорных системах активного ила и других природных сообществ микроорганизмов [13], выбор специализированных стандартов для градуировки биосенсора [14]. Таким образом, многие исследования посвящены созданию биосенсоров для анализа БПК в строго определенных типах реальных образцов, а не универсальных анализаторов [15, 16]. Востребованность подобных исследований привела к коммерциализации наиболее успешных моделей БПК-биосенсоров [3, 9, 10]. В первой главе настоящей диссертации представлена и проанализирована информация о принципе функционирования, рецепторных системах и характеристиках биосенсорных анализаторов БПК различных типов.

#### **1.1.3.1. Принцип функционирования БПК-биосенсоров на основе различных принципов измерения**

Большинство описанных БПК-биосенсоров являются биосенсорами на основе иммобилизованных микроорганизмов. В основу их функционирования положено определение интенсивности дыхания микробных клеток, закрепленных на электроде. В 1977 г. вышла в свет статья, в которой был представлен первый БПК-биосенсор [7]. В качестве рецепторной системы в нем были использованы микробы из активного ила. При функционировании описанного сенсора микроорганизмы потребляют находящиеся в пробе органические вещества, расходуя при этом  $O_2$ . Остаточное содержание  $O_2$  определяется с использованием кислородного электрода (рис. 5). Таким

образом, можно измерить увеличение интенсивности клеточного дыхания, которое пропорционально содержанию органических веществ в пробе. При прохождении через кювету с сенсором буферного раствора остатки пробы удаляются и интенсивность эндогенного дыхания применяемых дрожжей или бактерий приходит в исходное состояние.

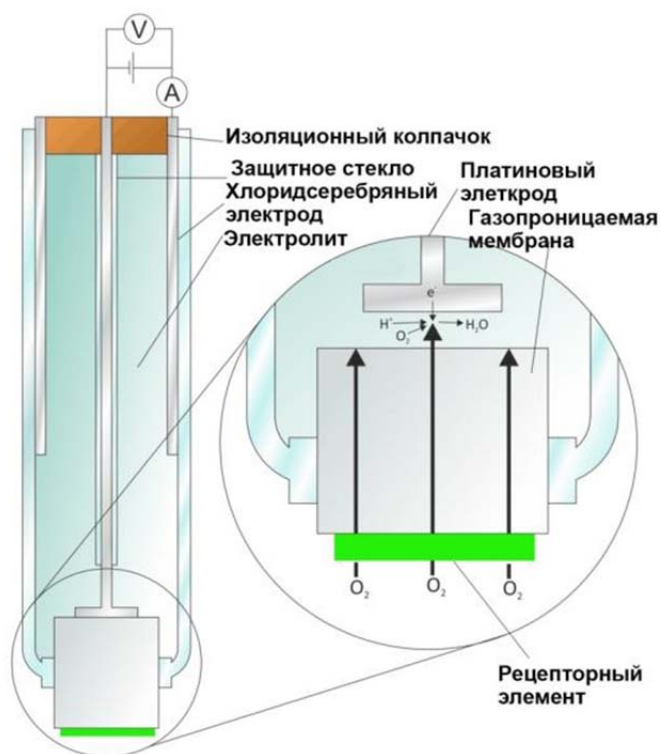


Рис. 5. Конструкция биосенсора на основе кислородного электрода (электрода Кларка).

Еще одним подходом к конструированию экспресс-анализаторов БПК являются системы, построенные на основе биореакторов (рис. 6). БПК-биосенсоры, основанные на технологии биореактора, преимущественно разрабатываются для онлайн-мониторинга [9, 10]. Принцип работы этих биосенсоров основан на анализе потребления кислорода микроорганизмами, контактирующими с анализируемым образцом, как и при стандартном методе. В биореактор непрерывно подается сточная вода, насыщенная растворенным кислородом. Кислородный электрод измеряет изменения частоты дыхания, чтобы определить БПК в образце. Чаще всего в качестве биоматериала в таких системах применяют неидентифицированные микроорганизмы или активный

ил [17]. Таким образом, с одной стороны, плотность клеток в биореакторе гораздо выше, чем в природной или сточной воде, из-за непрерывной подачи органических веществ, а с другой стороны, микробное сообщество внутри биореактора полностью адаптировано к анализируемым органическим субстратам, что значительно сокращает время анализа [18]. Время отклика анализаторов биореакторного типа обычно составляет менее 45 минут, что позволяет контролировать сточные воды в режиме реального времени.

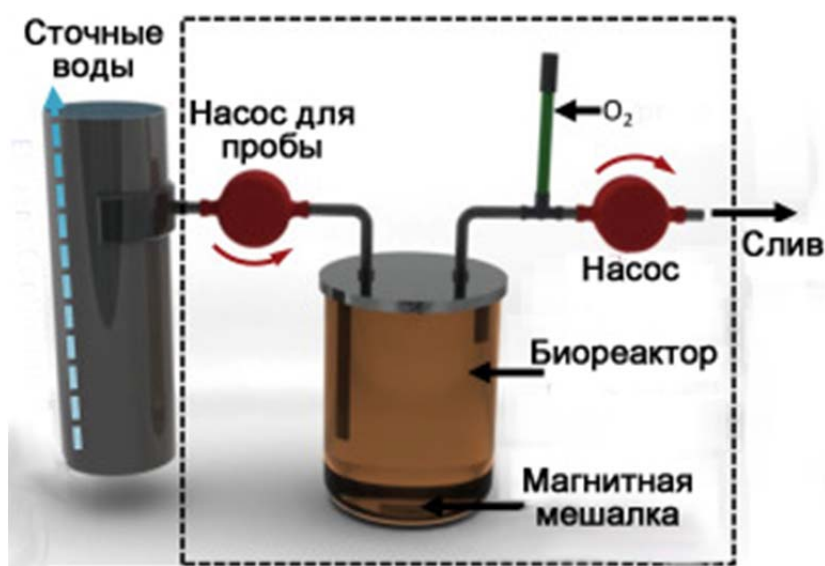


Рис. 6. Схематическое изображение биосенсора биореакторного типа [3].

Достоинством биореакторных БПК-анализаторов также является возможность легкой замены преобразователя без нарушения активности биоматериала. Кроме того, биореакторный БПК-биосенсор, по сравнению с биосенсором на основе иммобилизованного биоматериала, обычно имеет более стабильные характеристики [10]. Недостатком таких устройств являются большие габариты и отсутствие возможности анализа «на месте». Исходя из этого, системы биореакторного типа предназначены прежде всего для постоянного мониторинга степени загрязнения стоков на очистных сооружениях.

На определение биохимического потребления кислорода с использованием электрода Кларка влияет количество  $O_2$  в анализируемом

образце. Использование медиаторных биосенсоров, основанных на применении соединений, способных к обратимому окислению-восстановлению, позволяет получать результаты, независимые от уровня кислорода в анализируемом образце. Разработки в области создания медиаторных экспресс-анализаторов БПК идут в двух направлениях: непосредственно создание БПК-биосенсоров на основе использования медиаторного переноса электронов [16, 19, 20] и модификация стандартного метода анализа БПК [21–23]. Впервые возможность модификации стандартного метода анализа БПК с использованием искусственных акцепторов электронов представлена в работе [24]. Такой подход основан на анаэробном инкубировании анализируемой пробы с гексацианоферратом (III) калия. БПК определяется по количеству образующегося после инкубации гексацианоферрата (II) калия.

Разработка биосенсоров, основанных на использовании медиаторов, является одним из наиболее перспективных направлений развития аналитической биотехнологии [25, 26]. Ответ биосенсора в таких системах достигается за очень короткое время, что обеспечивает высокую скорость измерений. Большой размер рабочего медиаторного электрода дает возможность генерировать аналитический сигнал значительно больше, чем сигнал кислородного датчика [26]. Кроме того, применение наноматериалов совместно с медиаторами позволяет существенно повысить чувствительность таких систем.

Еще одним важным потребительским качеством биологических сенсоров является возможность снижения их массы и размеров. С этой точки зрения медиаторные БПК-биосенсоры имеют широкие перспективы за счет возможности использования в них печатных электродов (рис. 7). Такой подход позволяет формировать дешевые и миниатюрные датчики, доступные для потребителей [27]. Важным достоинством медиаторных БПК-биосенсоров является возможность их использования в анаэробных условиях за счет того,

что ферменты дыхательной цепи регенерируются под действием медиаторов, а не кислорода.

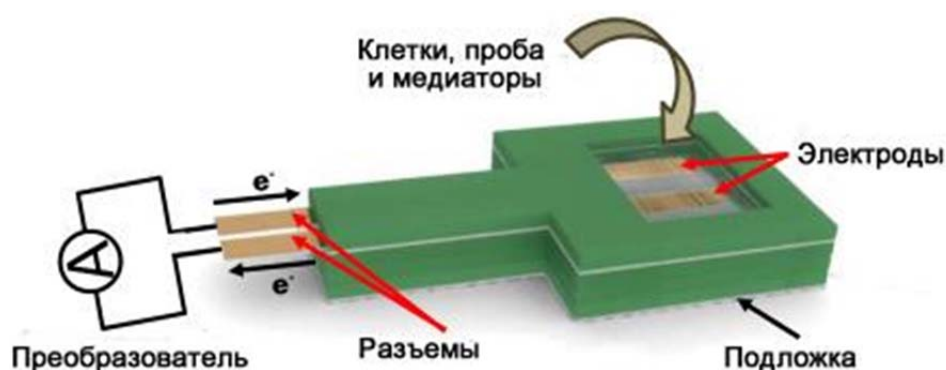


Рис. 7. Схематическое изображение одноразового медиаторного чипа для определения БПК [25].

В работе [7] впервые описан БПК-биосенсор на основе микробного биотопливного элемента. Биотопливный элемент включает в себя анодное анаэробное отделение и катодное аэробное отделение, которые разделены протонообменной мембраной. В анодном отделении биоматериал окисляет органический субстрат с образованием углекислого газа, протонов и электронов. Протоны проходят через протонообменную мембрану в катодное отделение, а электроны идут на катод по внешней цепи, генерируя электрический ток. В катодном отделении происходит образование воды из протонов и подающегося в систему кислорода (рис. 8). При этом генерируемый БТЭ электрический ток пропорционален содержанию органических субстратов в анодном отделении, что позволяет проводить определение БПК в анализируемом образце [3].

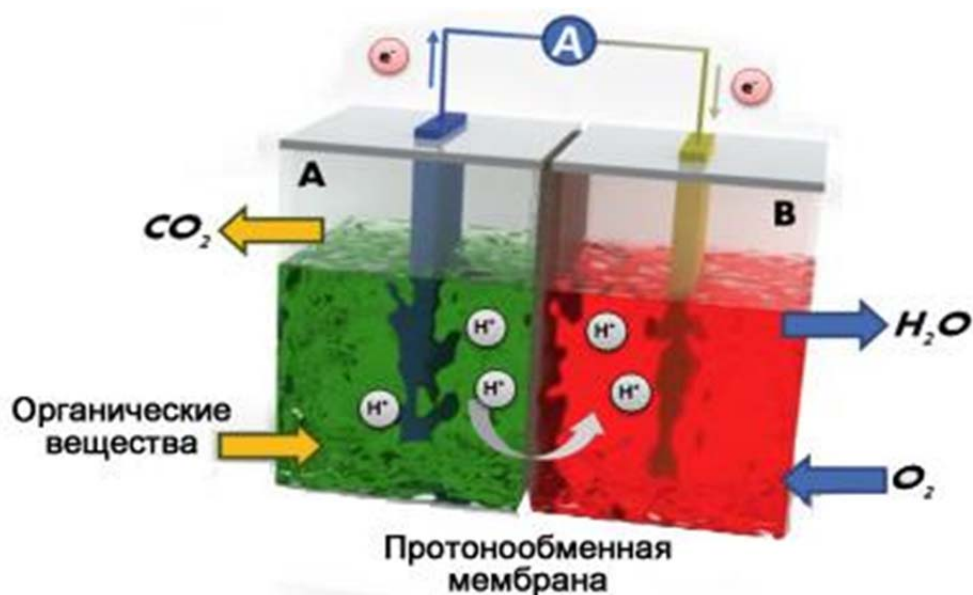


Рис. 8. Принцип работы микробного топливного элемента для определения БПК: А – анаэробное анодное отделение, В – аэробное катодное отделение [3].

Так, например, в работах [28, 29] представлены БТЭ, имеющие высокую корреляцию результатов измерения БПК со стандартным методом ( $R^2 = 0,95-0,98$ ). Особенностью БПК-биосенсоров на основе биотопливных элементов является высокая временная стабильность таких систем (до 5 лет) [30]. Недостатками сенсоров на базе БТЭ являются: плохая экспрессность (более 1 ч на 1 анализ, а также большой размер и стационарность приборов. Большая часть описанных ранее биотопливных элементов для анализа БПК были созданы на основе индивидуальных штаммов бактерий, что несколько ограничивало спектр разлагаемых в БТЭ субстратов [31]. Однако в последнее время наметилась тенденция к созданию БТЭ на основе электроактивных биопленок микроорганизмов сточных вод [32]. Такие системы позволяют добиться окисления очень широкого спектра субстратов и достигнуть высокой корреляции со стандартным методом, но проблема длительного времени ответа сохраняется [33].

Активная разработка технологий оптического волокна явилась основой для создания оптических БПК-биосенсоров [34, 35]. Как правило, оптические

БПК-биосенсоры основаны двух подходах: использование оптического датчика кислорода на основе измерения тушения флуоресценции или применение люминесцентных микроорганизмов в рецепторном элементе. В первом случае микроорганизмы иммобилизуют совместно с кислородчувствительными флуоресцентными красителями (рис. 9), а во втором – напрямую измеряют интенсивность люминесценции микроорганизмов при окислении органических веществ [34]. БПК-биосенсоры оптического типа характеризуются высокой стабильностью и позволяют создавать миниатюризированные датчики [34, 36]. Однако они могут уступать электрохимическим биосенсорам с точки зрения чувствительности и негативного влияния на анализ окрашенных веществ в сточных водах.

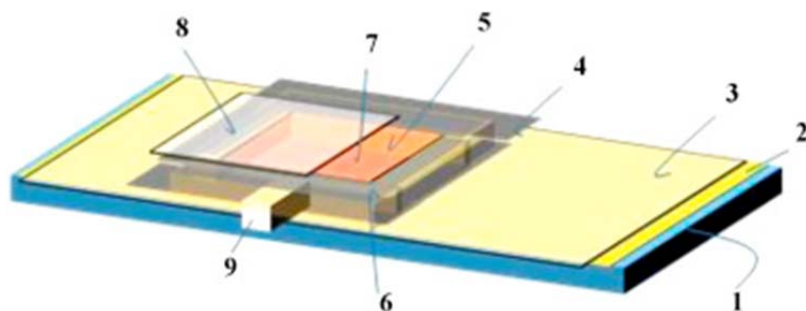


Рис. 9. Схематическое изображение оптического БПК-биосенсора [35]: 1 – стеклянная пластина, 2 – рутениевый краситель, 3 – полиэтилен – полипропиленовая пленка, 4 – уплотнитель, 5 – биорецептор, 6 – уплотнитель, 7 – кювета для образца, 8 – защитное стекло, 9 – слив.

Существуют и альтернативные биосенсорные подходы к анализу БПК. Так, создан БПК-биосенсор на основе определения концентрации углекислого газа, образующегося при биodeградации органических веществ в сточных водах [37]. Созданный анализатор позволил провести онлайн-мониторинг работы очистных сооружений. В работе [38] описан биосенсор на основе массива амперометрических датчиков и математической обработки данных. Такой подход дал возможность проводить одновременное определение: ХПК, БПК, общего количества органического углерода и других важных показателей сточных вод. В работе [39] магнитные наночастицы  $Fe_3O_4$  использовались для



магнитной маркировки клеток *Bacillus subtilis* и последующей иммобилизации их на матрице ультрамикроэлектродов с использованием внешнего магнитного поля. Этот модифицированный микроэлектрод был использован в качестве микродатчика БПК. Было показано, что его можно регенерировать и воспроизводить, добиваясь большей чувствительности, чем сенсоры на основе регистрации растворенного кислорода и медиаторные БПК-биосенсоры. Описана попытка создания калориметрического БПК-биосенсора [40], однако данное направление развития не получило.

### **1.1.3.2. Рецепторные системы БПК-биосенсоров**

В БПК-биосенсорах чаще всего используют два типа рецепторных элементов: чистые культуры микроорганизмов или их ассоциации (по аналогии с активным илом в классическом методе оценки БПК<sub>5</sub>). С точки зрения правильности определения БПК использование ассоциаций микроорганизмов, особенно активного ила, является более предпочтительным, поскольку позволяет расширить спектр окисляемых биорецепторным элементом органических веществ. Однако биосенсоры на основе ассоциаций характеризуются плохой воспроизводимостью результатов во времени из-за меняющегося состава ассоциаций. Применение единичных штаммов микроорганизмов может снижать правильность определения БПК из-за более узкого спектра окисляемых веществ, однако позволяет добиться большей стабильности измерений [3]. В некоторых работах авторы предлагают решать эту проблему за счет использования ассоциаций из двух-трех микроорганизмов [12, 41]. Однако даже при использовании малого количества штаммов проблема сохранения состава ассоциаций остается. Среди наиболее часто используемых для формирования БПК-биосенсоров микроорганизмов можно выделить дрожжи: *Trichosporon cutaneum*, *Arxula adenivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* и бактерии: *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Как правило, микроорганизмы эукариот метаболизируют более широкий круг органических

веществ и более устойчивы к неблагоприятным факторам среды (температура, соленость и т. д.) [25], а бактерии позволяют создавать более чувствительные анализаторы [42].

В последнее время актуальным направлением формирования рецепторных элементов БПК-биосенсоров является использование биопленок [43, 44]. Бактериальные биопленки сформированы микробными агрегатами, находящимися во внеклеточных полимерных матрицах, и прикреплены к поверхности датчика биосенсора. Имобилизация микроорганизмов на электроде с образованием биопленки является уникальным способом решения проблемы расширения субстратной специфичности и повышения стабильности микробного сообщества. Так, в исследовании [45] представлен новый тип датчика БПК, использующий биопленку с бактериями *Geobacter* sp. с этанолом в качестве единственного источника углерода. Электроактивные биопленки, отобранные в биоэлектрохимических системах на среде этанола, являются хорошими кандидатами для применения в биосенсорах, поскольку они могут непосредственно взаимодействовать с электродом. Проблемами применения биопленок для создания биочувствительных элементов БПК-биосенсоров являются: длительное время формирования устойчивых биопленок, необходимость выращивания биопленок под конкретный тип сточных вод, то есть отсутствие универсальности создаваемого датчика.

Метод имобилизации микробов на сенсорном датчике определяет операционную и долговременную стабильность, экспрессность и чувствительность анализа. В этой связи следует отметить, что постоянно проводятся исследования по разработке новых методик имобилизации [46, 10]. Наиболее простыми способами имобилизации микроорганизмов являются адсорбция и физическое ограничение клеток полупроницаемыми мембранами. Лучшие характеристики показывают биосенсоры на основе микроорганизмов, включенных в различные гидрогели, например: поливинилового спирта [47], агарозы [11], альгината кальция [16], кремнийорганические золь-гели [12] или поликарбомоилсульфонат [48]. В качестве альтернативы возможно

использование одноразовых датчиков на основе магнитных наночастиц, в которых биокomпонент можно относительно несложно заменить [39].

Важным шагом к правильной работе рецепторной системы БПК-биосенсора является ее градуировка. Использование подходящего стандартного раствора – это один из факторов повышения правильности анализа. Наиболее часто в качестве градуировочного раствора применяют глюкозо-глутаматную смесь (смесь глюкозы и глутаминовой кислоты с концентрациями 150 мг/дм<sup>3</sup>, соответствующий 205 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> БПК<sub>5</sub>). Несмотря на повсеместное применение ГГС в стандартном методе анализа БПК [4, 49, 50], она имеет ряд недостатков при градуировке БПК-биосенсоров. Так, ГГС плохо хранится и легко подвергается микробному заражению. Кроме того, входящая в ее состав глутаминовая кислота медленнее окисляется микробами в присутствии глюкозы. Это почти не сказывается на результатах стандартного метода из-за его длительности, но может оказывать влияние на результаты измерения БПК биосенсором. Еще одним недостатком ГГС является то, что в ее состав входят два легкоокисляемых вещества, тогда как в сточных и поверхностных водах содержатся преимущественно вещества с низкими скоростями окисления [3]. По указанным причинам одним из направлений развития БПК-биосенсоров является создание градуировочных смесей, близких по составу к реальным образцам вод [11, 51]. Одним из примеров такой смеси является стандарт, рекомендуемый Организацией Экономического Сотрудничества и Развития (OECD). В нем содержатся: мясной экстракт, пептон, карбамид и неорганические вещества [52]. Использование этого градуировочного стандарта может позволить увеличить корреляцию между результатами стандартного метода и данными биосенсора [3, 10].

### **1.1.3.3. Характеристика БПК-биосенсоров различных типов**

На эффективность измерения с использованием биосенсорного анализатора влияют его аналитические и метрологические характеристики,

среди которых: чувствительность, селективность, повторяемость и воспроизводимость, время анализа и стабильность рецепторного элемента. Оптимизация работы биосенсорной системы представляет собой комплексную задачу, потому что действия по улучшению одной характеристики могут негативно повлиять на другую.

Для определения аналитического сигнала биосенсорного анализатора применяют два основных подхода. Первый основан на определении разности между сигналами преобразователя биосенсора до и после введения пробы в состояние равновесия. В случае использования такого подхода время анализа может составлять от нескольких минут до нескольких часов. Другой подход основан на анализе кинетической зависимости величины отклика сенсора от времени. Такая кинетическая зависимость начинает измеряться после ввода пробы и характеризует увеличение интенсивности микробного метаболизма. В этом случае время анализа является достаточно малым и может составлять от нескольких секунд до нескольких минут. Кроме того, такой подход позволяет достичь большого диапазона определяемых значений БПК, однако может приводить к небольшой потере воспроизводимости анализа [53]. Кинетический подход предпочтительнее равновесного в том случае, когда важно анализировать большое количество проб.

Для проведения количественного анализа нужно знать зависимость сигнала биосенсора от уровня биохимического потребления кислорода в пробе. Линейный участок данной зависимости определяет диапазон анализируемых значений БПК в пробе. Широкий диапазон линейной зависимости упрощает проведение анализа и снижает ошибку за счет отсутствия разбавления пробы. Кроме диапазона определяемых значений БПК для соотнесения аналитических возможностей биологических сенсоров сравнивают чувствительность. Основной характеристикой чувствительности является коэффициент чувствительности – это значение производной аналитического сигнала биосенсора от БПК. Еще одной характеристикой чувствительности служит предел обнаружения – это наименьшее значение

БПК, которое можно обнаружить в пробе. Как правило, увеличить чувствительность биосенсора можно за счет повышения количества микроорганизмов в рецепторе. Кроме того, на описанные характеристики влияют тип преобразователя и метод иммобилизации биоматериала на преобразователе. БПК-биосенсоры с высоким содержанием микроорганизмов в рецепторном элементе обычно позволяют определять более низкие значения БПК, но в менее широком интервале.

Результаты измерения БПК, получаемые с использованием биосенсорного подхода, могут отличаться от результатов классического метода разбавления. Повторяемость биосенсорных анализаторов БПК чаще всего находится в пределах 10% для биосенсоров на основе единичного штамма микроорганизмов, и может падать до 15% при использовании ассоциаций микроорганизмов [3].

В последнее время создаются новые модели БПК-биосенсоров на основе описанных выше преобразователей [9, 10]. Особое внимание при этом обращают на улучшение характеристик анализаторов: увеличение стабильности и чувствительности анализа, повышение корреляции результатов, полученных стандартным методом и с использованием биосенсоров. Прежде всего эта работа направлена на обнаружение новых микроорганизмов, использование современных материалов, в том числе и наноматериалов, и поиск эффективных подходов к иммобилизации микроорганизмов. Более подробно основные параметры представленных в научных публикациях БПК-биосенсоров разных типов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристики и параметры представленных в научных публикациях БПК-сенсоров.

Микроорганизмы, иммобилизация	Измеренные образцы	Основные характеристики	[ссылка], год
<b>Биосенсоры на основе кислородного электрода</b>			
Коммерческий препарат микроорганизмов активного ила (BODseed). Микроорганизмы термически убиты. Иммобилизация адсорбцией на мембрану из поликарбоната.	ГГС. Сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> до 40 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения 40–45 мин.	[54], 2005
Бактерии <i>Pseudomonas putida</i> , иммобилизованные в гель агарозы.	ГГС. Синтетические сточные воды (OECD). Сточные воды с повышенным содержанием фенола.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>7</sub> 0–50 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения 15–45 мин.	[55], 2008
Ассоциация неидентифицированных микроорганизмов. Иммобилизация адсорбцией на нейлоновой мембране.	ГГС. Сточные воды.	Нижняя граница анализируемых значений БПК – 1 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> , корреляция между БПК <sub>6с</sub> и БПК <sub>5</sub> (отклонение 10%), сходимость 3,49–4,45%. Долговременная стабильность – 60 дней. Время измерения – 90 мин.	[27], 2008
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , иммобилизованные в кальций-альгинат	ГГС. Сточные воды.	R = 0,95.	[56], 2009
Коммерческий препарат микроорганизмов активного ила	ГГС. Синтетические	Нижняя граница анализируемых значений	[47], 2011

(BODseed). Иммобилизация в кремнийорганический золь-гель на основе кремниевой кислоты и привитого сополимера поливинилового спирта и 4-винилпиридина.	сточные воды (OECD).	БПК <sub>5</sub> – 0,5 мг/дм <sup>3</sup> . Время измерения – 10 мин. Долговременная стабильность – 50 дней. R = 0,9851.	
Биопленка естественного сообщества микроорганизмов из местных сточных вод, выращенная на стекле.	ГГС. Синтетические сточные воды (OECD). Сточные воды очистных сооружений, пищевой промышленности и поверхностные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 0,5–30 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 6–8 мин. Воспроизводимость – 3,9%. Долговременная стабильность – 17 месяцев. R = 0,983	[57], 2012
Бактерии <i>Pseudomonas fluorescens</i> P75, иммобилизованные в гель агарозы.	Синтетические сточные воды (OECD). Сточные воды мясоперерабатывающих предприятий.	Линейный диапазон 5–40 мг/дм <sup>3</sup> БПК <sub>7</sub> . Долговременная стабильность – 80 дней. Время измерения – до 20 мин.	[11], 2012
Бактерии <i>Aeromonas hydrophila</i> P69.1, иммобилизованные в гель агарозы.	Синтетические сточные воды (OECD). Сточные воды мясоперерабатывающих предприятий.	Линейный диапазон 5–45 мг/дм <sup>3</sup> БПК <sub>7</sub> . Долговременная стабильность – 90 дней. Время измерения – до 20 мин.	[11], 2012

<p>Биосенсоры на основе индивидуальных культур различных бактерий, иммобилизованных в гель агарозы. Математическая обработка данных 7 сенсоров для точного определения БПК.</p>	<p>Синтетические сточные воды (OECD) и воды, моделирующие состав стоков мясной, молочной, сланцевой и бумажной промышленности.</p>	<p>Стандартное отклонение результатов – менее 3,4%.</p>	<p>[14], 2013</p>
<p>Бактерии <i>Pseudomonas putida</i>, адсорбированные на нитратцеллюлозной мембране.</p>	<p>ГГС. Образцы воды.</p>	<p>Диапазон анализируемых значений БПК<sub>5</sub> 0,5–10 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. Время измерения – 15 мин. Долговременная стабильность – 10 дней.</p>	<p>[58], 2013</p>
<p>Биопленка микроорганизмов из сточных вод очистных сооружений на гидрогеле восстановленного оксида графена.</p>	<p>ГГС. Синтетические сточные воды (OECD).</p>	<p>Диапазон анализируемых значений БПК<sub>5</sub> 2–64 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. Предел обнаружения БПК<sub>5</sub> – 0,4 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. Время измерения – 10 мин. Долговременная стабильность – 2 месяца. R = 0,981</p>	<p>[13], 2015</p>
<p>Биопленка микроорганизмов сточных вод. Биосенсор биореакторного типа.</p>	<p>ГГС. Образцы поверхностных вод.</p>	<p>Долговременная стабильность – более 30 дней.</p>	<p>[17], 2016</p>
<p>Бактерии <i>Escherichia coli</i>, иммобилизованные в коллагеновое волокно с Zr (IV).</p>	<p>ГГС. Синтетические сточные воды (OECD). Образцы речной воды.</p>	<p>Диапазон анализируемых значений БПК<sub>5</sub> до 225 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. Долговременная стабильность – 42 дня.</p>	<p>[42], 2017</p>



Биосенсоры медиаторного типа			
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Бимедиаторная система «гексацианоферрат (III) калия – менадион».	ГГС. Образцы воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 6,6–220 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . $R = 0,999$ . Относительное стандартное отклонение – 1,3%. Сокращение ответа сенсора при хранении при 4 <sup>0</sup> С в течение 14 дней – 93 %.	[25], 2007
Бактерии <i>Exiguobacterium marius</i> , <i>Bacillus horikoshii</i> и <i>Halomonas marina</i> , включенные в кремнийорганический золь-гель с ПВС. Медиатор феррицианид калия.	ГГС. Образцы морской воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 1,2–40 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Предел обнаружения БПК <sub>5</sub> – 0,8 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Стандартное отклонение результатов – 3,8%. $R = 0,988$ .	[12], 2008
Дрожжи <i>Candida krusei</i> , нанесенные на частицы силикагеля. Медиатор феррицианид калия	ГГС. Синтетические сточные воды (OECD). Сточные воды спиртзавода.	Время анализа – 20 мин.	[59], 2010
Бактерии <i>Klebsiella pneumoniae</i> , медиатор феррицианид калия	ГГС. Синтетические сточные воды (OECD). Муниципальные сточные воды	Линейная зависимость БПК <sub>5</sub> 30–500 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> или 30–200 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> , с использованием ГГС и синтетических сточных вод, соответственно. $R = 0,9962$ и $0,9934$ , соответственно.	[21], 2011
Бактерии <i>Escherichia coli</i> , иммобилизованные в сополимер ПВС-поливинилпиридин. Медиатор нейтральный красный.	ГГС. Синтетические сточные воды (OECD). Мочевина и	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 50–1000 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Относительное стандартное отклонение – 2,8%. Время измерения – 15–	[19], 2012

	реальные сточные воды.	60 мин.	
Активный ил. Медиатор гексацианоферрат (III) калия.	ГГС, Синтетические сточные воды (OECD). Сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 2,1–40 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 240 мин. R = 0,96.	[22], 2013
Биопленка на основе микроорганизмов сточных вод. Медиатор гексацианоферрат (III) калия.	ГГС. Пробы сточной воды с очистных сооружений.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 2–200 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 30 мин. Долговременная стабильность – 60 суток.	[60], 2015
Бактерии <i>Chromobacterium violaceum</i> , иммобилизованные в альгинат кальция. Медиатор гексацианоферрат (III) калия.	ГГС. Синтетические сточные воды (OECD). Сточные воды пищевой, текстильной и перерабатывающей промышленности.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 20–230 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 30 мин. Повторяемость – 4,1%. R = 0,9663.	[16], 2015
Бактерии <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , иммобилизованные в полипирроле. Медиатор гексацианоферрат (III) калия.	ГГС	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 5–100 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 15 мин.	[61], 2015
Бактерии <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , иммобилизованные в матрице «полипиррол-альгинат». Медиатор поли (нейтральный красный).	Образцы речной воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 5–100 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Предел обнаружения БПК <sub>5</sub> – 3 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 20 мин.	[62], 2016
Бактерии <i>Bacillus subtilis</i> , ковалентно связанные с золотым	ГГС	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 5–30	[63], 2016

электродом.		мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Предел обнаружения БПК <sub>5</sub> – 1,65 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . R = 0,978	
Бактерии <i>Bacillus subtilis</i> в трехмерном пористом композитном материале «графен-полипиррол» (rGO-PPy). Медиатор гексацианоферрат (III) калия.	Реальные образцы озерной и речной воды. Бытовые сточные воды г. Пекина.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 4–60 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 15 мин. Предел обнаружения БПК <sub>5</sub> – 1,8 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Долговременная стабильность – 60 суток.	[20], 2017
Активный ил, иммобилизованный в криогель хитозана и бычьего сывороточного альбумина. Медиатор метиленовый синий в сочетании с графеном.	ГГС. Сточные воды различного происхождения.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 1–100 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Предел обнаружения БПК <sub>5</sub> – 0,1 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Операционная стабильность – 2,9%. Время измерения – 9 мин. Долговременная стабильность – 65 суток.	[26], 2017
Электроактивная биопленка <i>Shewanella loihica</i> . Двухнаправленный внеклеточный перенос электронов.	Синтетические образцы.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 0–435 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время анализа – менее 1 ч. R = 0,99.	[43], 2020
<b>Оптические биосенсоры</b>			
Бактерии <i>Bacillus subtilis</i> . Иммобилизация в кремнийорганический золь-гель на основе ТЭОС и химически модифицированного ПВС. Датчик кислорода на основе из трис(4,7-дифенил – 1,10 - фенантролин) Ru (II)	ГГС. Синтетические и хозяйственные сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> до 25 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время анализа – 15–30 мин. Долговременная стабильность – более 45 суток. R = 0,9808	[64], 2005
Изолированные из морской воды бактерии <i>Marinobacter marinus</i> ,	ГГС. Морская вода.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> от 0,2 до 40	[41], 2006

<i>Bacillus licheniformis, Dietzia maris.</i> Иммобилизация в кремнийорганический золь-гель с добавлением ПВС. Оптический датчик на основе тушения флуоресценции комплексного соединения рутения.		мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время устойчивой работы до 1 года. Воспроизводимость – 2%. $R = 0,9933$	
Бактерии <i>Photobacterium phosphoreum</i> , иммобилизованные в гель альгината натрия. Измерение интенсивности биолюминесценции.	ГГС. Сточные воды очистных сооружений.	Время анализа – 20 мин.	[34], 2007
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , иммобилизованные включением в гель ПВС-стирилпиридин. Оптический датчик на основе тушения флуоресценции комплексного соединения рутения.	ГГС.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 1–20 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . $R = 0,99$ .	[35], 2015
<b>Биотопливные элементы</b>			
Активный ил очистных сооружений.	Синтетические сточные воды. Мониторинг сточных вод в реальном времени.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> до 100 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Воспроизводимость – 10%. Время анализа – около 60 мин.	[65], 2005
Электрохимически активные бактерии.	Синтетические и реальные сточные воды.	Линейная зависимость от БПК до 350 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время стабильной работы – 7 месяцев. Время анализа – около 40 мин.	[66], 2009
Биопленка микроорганизмов сточных вод.	Сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 17–78 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время анализа – от	[67], 2011

		30 мин до 10 ч.	
Электроактивная биопленка.	Ацетат, пропионат, глюкоза, этанол.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 32–1280 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время анализа – до 20 ч	[68], 2012
Электроактивная биопленка смеси 6 бактерий: <i>Thermincola carboxydiphila</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ochrobactrum intermedium</i> , <i>Shewanella frigidimarina</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> .	Сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 8–240 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> .	[69], 2014
Электроактивная биопленка с высоким содержанием бактерий <i>Geobacter</i> .	Синтетические сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 174–1200 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время анализа – 17,5 ч.	[45], 2016
Электроактивная биопленка <i>Shewanella loihica</i> .	Синтетические сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 0–43,5 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	[70], 2018
Электроактивная биопленка.	Синтетические сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 25–500 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . R = 0,995.	[71], 2019
Электроактивная биопленка	ГГС. Сточные воды с повышенным содержанием нитратов.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 20–500 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	[15], 2020
Электроактивная биопленка <i>Shewanella loihica</i> .	ГГС.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 0–130,5 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . R = 0,99	[43], 2020
Электроактивная биопленка	Синтетические сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> до 300 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Долговременная	[33], 2020

		стабильность – более 30 суток. R = 0,9950.	
Электроактивная биопленка	Сточные воды очистных сооружений.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 20–490 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время анализа – 1,1 мин.	[72], 2020
Электроактивная биопленка	ГГС.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 20–500 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . R=0,9999	[73], 2021
<b>Биосенсоры на основе других принципов измерения</b>			
Определение углекислого газа, выделяемого микроорганизмами при утилизации органических веществ. Датчик углекислого газа на основе ИК-спектрометра.	Сточные воды очистных сооружений.	Корреляция для результатов определения содержания углекислого газа и БПК R=0,97457.	[37], 2005
Амперометрические ферментные электроды на основе: ацетилхолинэстеразы, тирозиназы, пероксидазы хрена и бутирилхолинэстеразы. Многокомпонентный анализ с математической обработкой результатов.	Сточные воды.	–	[38], 2005
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Спектрофотометрический анализ.	ГГС. Речная вода.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 1,1–22 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время анализа – 30 мин.	[74], 2007
Сообщество активного ила. Определение кислотности среды и содержания углекислого газа.	Стоки очистных сооружений	–	[51], 2008
Магнитно-функционализированные бактерии <i>Bacillus subtilis</i> на матрице ультрамикрoэлектродов.	Пробы воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 2–15 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . Время измерения – 5 мин.	[39], 2017

Амперометрическое определение кислорода с использованием наночастиц палладия и восстановленного карбоксиграфена.				
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Автоматизированная микрофлюидная хемилюминесцентная система с медиаторами: феррицианидом и хиноном.	ГГС. Пробы воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 10–315 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> .	[75], 2018	
Респирометрическая система в реальном времени с фотосенсорами и датчиками подсчета пузырьков.	ГГС. Бытовые сточные воды.	Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> 0–420 мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . R = 0,99.	[18], 2021	

#### 1.1.3.4. Коммерческие БПК-биосенсоры

Следует отметить, что большинство описанных в научных публикациях биосенсорных анализаторов БПК остались на стадии лабораторных моделей. Тем не менее, в настоящее время на рынке есть несколько коммерческих экспресс-анализаторов БПК. Первый такой анализатор был выпущен в 1983 году фирмой Nisshin Electric Co. Ltd (Япония). При этом метод анализа биохимического потребления кислорода с использованием биосенсорного анализатора был включен в Японский промышленный стандарт (JIS) только в 1990 году (JIS K3602). После этого коммерческие БПК-биосенсоры были выпущены на рынок другими европейскими и японскими производителями. Первые коммерциализированные анализаторы БПК являлись биосенсорами на основе кислородного электрода. В качестве биоматериала в первых моделях, как правило, использовали активный ил [3]. Выпускаемые в настоящее время коммерческие анализаторы БПК чаще всего основаны на принципе биореактора (таблица 3).

Таблица 3. Основные параметры коммерческих БПК-биосенсоров.

Марка	Компания-производитель, государство	Используемый конструктивный подход	Анализируемые значения БПК, мг/дм <sup>3</sup>	Экспрессность, мин	Ошибка анализа
Biox-1010	Endress and Hauser, Швейцария	Биореакторный тип	5–100000	3–15	3%
BioMonitor	LAR, США	Биореакторный тип	1–200000	3–4	<5%
BOD-3000	Central Kagaku Corp., Япония	Биореакторный тип	0–1000	30–60	–
DKK BOD sensor 7842	DKK Corporatio, Япония	Биосенсорный тип	0–60	5	10%
HABS-2000	KORBI, Южная Корея	Микробный топливный элемент	0–200	10	5%
MB-DBO	Biosensore, Испания	Биореакторный тип	10–1000	30	<3%
Ra-BOD	AppliTek, Бельгия	Биореакторный тип	20–100000	30	<5%
QuickBOD α1000	Central Kagaku Corp., Япония	Биосенсорный тип	5–50	60	5%



Коммерчески доступные анализаторы БПК отличаются методикой внесения биоматериала в измерительную ячейку (реактор). Так, в анализатор Ra-BOD постоянно вносят микроорганизмы активного ила. В анализаторе Bioх-1010 используемый биоматериал высевают в маленькие пластиковые ячейки, находящиеся внутри биологического реактора. Это сделано для увеличения контактной площади биоматериала и его защиты от механического воздействия при перемешивании. В анализаторе MB-DBO биоматериал выращивают в отдельном независимом отсеке биореактора. Это позволяет создать устойчивую популяцию микроорганизмов и использовать основной измерительный отсек биореактора постоянно [3]. Анализатор QuickBOD α1000 один из немногих, который основан на применении чистой культуры дрожжевых микроорганизмов *Trichosporon cutaneum*. Анализатор BioMonitor имеет достаточно необычное строение: в его составе 4 биореактора, соединенных последовательно. При этом вся система работает по принципу аэротенка (рис. 10).

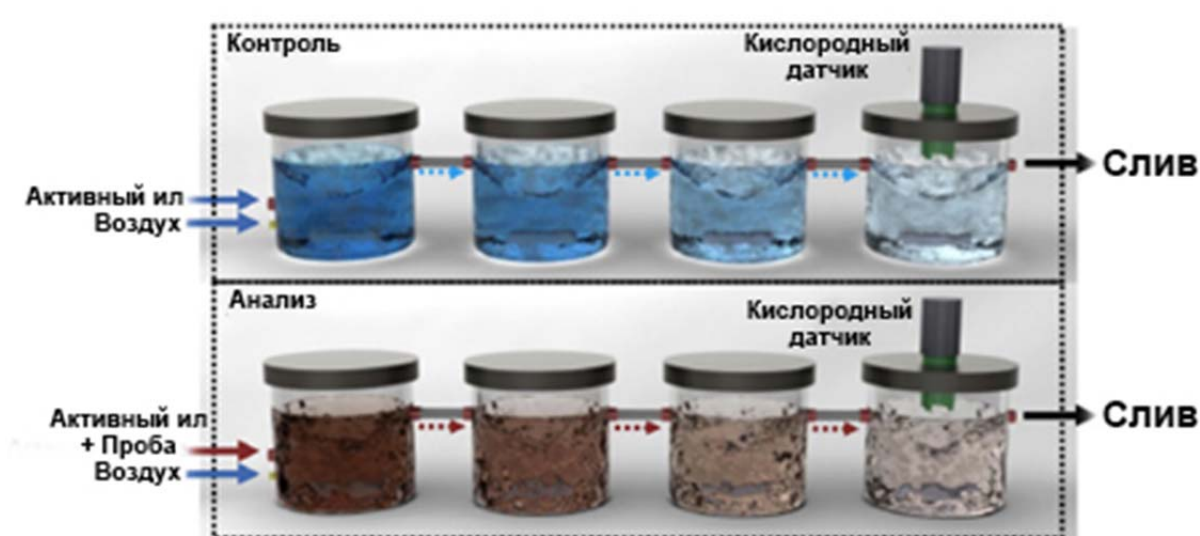


Рис. 10. Принципиальная схема анализатора БПК BioMonitor (LAR, США) [3].

Потребление кислорода на биохимические реакции измеряется с использованием  $O_2$ -датчика, вмонтированного в последний биореактор. Расчет БПК происходит по изменению между измеренным потреблением кислорода в

анализируемом образце и контрольном образце с активным илом, но без пробы воды. Несмотря на сложность конструкции, такой подход позволяет увеличить степень утилизации органических веществ в пробе и сократить время анализа до 3–4 минут.



BOD-3000



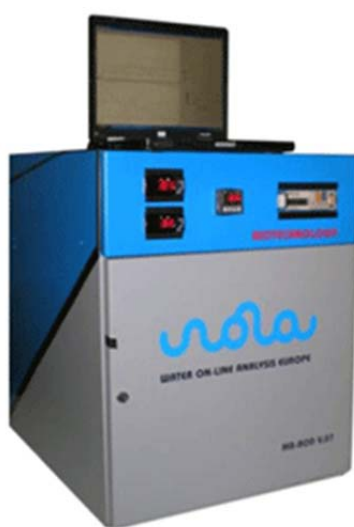
Quick BOD α1000



BIOX-1010



HABS-2000



MB-DVO



Ra-BOD

Рис. 11. Коммерческие экспресс-анализаторы БПК.

Важным преимуществом коммерческих БПК-биосенсоров является скорость анализа. Большинство коммерческих биосенсорных анализаторов БПК сконструированы по принципу биореактора, поэтому, к сожалению, являются стационарными и имеют большую массу и размеры (вес до 200 кг)

(рис. 11). Кроме того, БПК-биосенсоры дают надежные и воспроизводимые результаты в строго определенных условиях. Так, например, физико-химические характеристики исследуемых образцов воды должны быть приблизительно на одном уровне. Кроме того, важным фактором получения верных результатов является правильный подбор градуировочных смесей, имеющих сходство в составе с исследуемыми пробами. Используемый в биосенсоре биоматериал должен быть адаптирован к исследуемым образцам и градуировочным растворам. Таким образом, биосенсорные анализаторы БПК наиболее эффективны для постоянного мониторинга одних и тех же образцов с близким составом. При определении БПК образцов с разным составом и из разных источников биосенсорные анализаторы могут давать большую ошибку [3, 10].

Исходя из представленных данных, анализ биохимического потребления кислорода с использованием биосенсоров является перспективным направлением аналитической биотехнологии. БПК-биосенсоры служат надежными аналитическими инструментами, которые можно использовать для постоянного мониторинга водных экосистем и сточных вод. К сожалению, БПК-биосенсоры имеют некоторые ограничения, мешающие их активному использованию. Среди них: плохая стабильность, недостаточная чувствительность для определения БПК в рамках предельно допустимых значений, трудности в процедурах стандартизации, пробелы в нормативной документации в ряде стран, сложности с обслуживанием биосенсоров, слабая устойчивость применяемого биоматериала к токсичным компонентам сточных вод и отсутствие портативности [9]. Таким образом, проведение исследований по разработке собственных коммерческих БПК-анализаторов в Российской Федерации является актуальной задачей.

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

В работе для исследования были использованы следующие штаммы микроорганизмов: уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280; осмо- и галотолерантные дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, Y-1585, Y-111, Y-1050 и *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677; метилотрофные дрожжи *Ogataea angusta* ВКМ Y-1397, *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 и *Ogataea parapolyomorpha* ВКМ Y-2518; активные бродильщики *Saccharomyces bayanus* ВКМ Y-349 и *Saccharomyces pasterianus* ВКМ Y-507; продуценты кормового белка *Candida boidinii* ВКМ Y-2356, *Candida maltosa* ВКМ Y-2359, *Candida blankii* ВКМ Y-2675. Все дрожжи и бактерии получены в ВКМ Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук. Выбор данных бактерий и дрожжей основывался на литературных данных и опыте работы с ними в научном коллективе. В работе использованы как микроорганизмы прокариот, имеющие мембранную локализацию ферментов, так и прокариот, у которых ферментные системы локализованы внутри клеток.

### 1.2.1. Особенности физиологии, метаболизма и применения в биосенсорах используемых микроорганизмов

#### 1.2.1.1. Общая характеристика метилотрофных дрожжей *Ogataea angusta*, *Ogataea polymorpha* и *Ogataea parapolyomorpha*

Метилотрофы — это разнообразная группа микроорганизмов, которые могут использовать соединения с одним атомом углерода, такие как метанол или метан, в качестве источника углерода для своего роста. Метилотрофные дрожжи выделены из разнообразных сред, например с поверхности фруктов, слоя под корой деревьев и в кишечнике насекомых. Ключевыми ферментами

метаболизма спиртов в метилотрофных дрожжах служат алкогольдегидрогеназа (АДГ, КФ. 1.1.1.1.) и алкогольоксидаза (АО, КФ. 1.1.3.13). Процесс окисления метанола начинается с катализируемой алкогольоксидазой реакции, в которой образуется метаналь. Далее метаналь может участвовать в процессе синтеза углеводов или окисляться до углекислого газа [76].

Дрожжи *Ogataea* принадлежит к семейству грибов *Saccharomycetaceae*, подсемейству *Saccharomycetoideae*. Их можно выращивать на широком спектре источников углерода, например на метаноле, этаноле, глюкозе, глицерине и других многоатомных спиртах. С переносом видов *Hansenula* с шляпообразными аскоспорами в род *Pichia* после признания того факта, что эти два рода нельзя разделить на основе использования нитратов [77], возник ряд номенклатурных трудностей. Одна из них касалась *Hansenula polymorpha*, поскольку ранее использовалось название *Pichia polymorpha*. Из-за отсутствия названия *polymorpha* для нового определения было выбрано название *Pichia angusta*, поскольку *Hansenula angusta* являлось синонимом *H. polymorpha*. При описании штаммов на основе анализа последовательности генов рРНК было обнаружено, что *Ogataea (Hansenula) polymorpha* и *H. angusta* тесно связаны, но являются отдельными. Филогенетический анализ показал, что *H. polymorpha* представляет собой два разных вида: *Ogataea polymorpha* и *Ogataea parapolymorpha* [78, 79]. Таким образом, в настоящее время роды *Hansenula* и *Pichia* относят к роду *Ogataea*. По форме клетки микроорганизмов *Ogataea* могут быть круглыми или овальными. В редких случаях встречаются сильно вытянутые клетки. Размер дрожжей *Ogataea* от 1,5×1,9 мкм до 4,6×5,3 мкм (рис. 12).

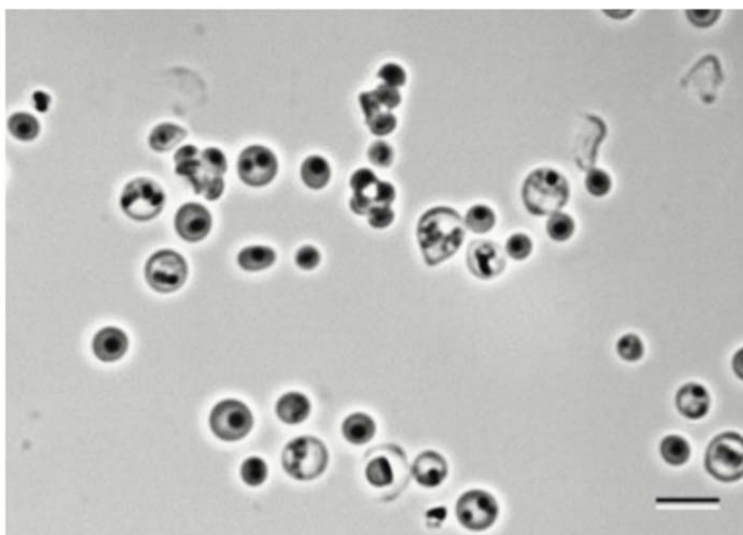


Рис. 12. Микроорганизмы *Ogataea polymorpha* NRRL Y-5445 через 5 дней роста на твердой среде 5% агар с солодовым экстрактом при 25°C [80].

Дрожжи рода *Ogataea* активно используют в биотехнологии для биосинтеза полипептидов и фармацевтических препаратов [80]. *Og. polymorpha* может применяться для биотехнологического синтеза благодаря уникальным особенностям. Эти дрожжи являются термотолерантными, они могут расти в диапазоне температур 30–50°C. Это может быть полезно при синтезе животных белков, которые требуют температуры около 37°C для поддержания биологической активности [81]. *Ogataea polymorpha* способны секретировать белки и выполнять модификации белков (т. е. гликозилирование). Для этой цели у *Ogataea polymorpha* доступны гомологичные и гетерологичные промоторы. В активированном состоянии они могут способствовать высокоэффективному биосинтезу чужеродных белков. Промоутеры MOX и FMD происходят из генов пути деградации метанола. Промотор TPS1, полученный из гена трегалозо-6-фосфатсинтазы является конститутивным по отношению к различным источникам углерода. В комбинации с высоким числом копий интегрированной плазмиды упомянутые промоторы могут обеспечивать высокие уровни экспрессии гетерологичного гена в выбранных штаммах. Поколение рекомбинантных штаммов *Og. polymorpha* использующих векторы, митотически интегрированных в геном хозяина, обеспечивают хорошую основу для воспроизводимого производственного процесса.

Рекомбинантные штаммы *Og. polymorpha* широко используются в промышленности. Некоторые из них являются признанными производителями фармацевтических препаратов, например пенициллина, гирудина (антикоагулянта, предотвращающего свертывание крови) и различных интерферонов [80].

Дрожжи *Ogataea* можно применять в биосенсорах для определения метанола и этанола. Так, в работе [82] созданы амперометрические биосенсоры с использованием мутантных клеток *H. polymorpha*. Дрожжи иммобилизовали на двух электродах – кислородном электроде и электроде для детекции перекиси водорода. При этом на кислородном электроде иммобилизовали дрожжи с высокой активностью алкогольоксидазы, а на электрод для детекции перекиси помещали дрожжи с низкой каталазной активностью. В качестве метода иммобилизации использовали включение в гидрогель альгината кальция. Такая система позволяла достаточно чувствительно определять низкие концентрации спиртов. В другой работе показана возможность изменения селективности биосенсора на основе дрожжей рода *Ogataea* при изменении условий их роста [83]. Таким образом, данные дрожжи можно использовать для создания БПК-сенсоров, предназначенных для анализа сточных вод спиртовых и ликероводочных производств.

#### **1.2.1.2. Характеристика дрожжей *Blastobotrys adeninivorans***

*Blastobotrys (Arxula) adeninivorans* представляют собой несовершенные и непатогенные гаплоидные дрожжи, относящиеся к отделу *Subphylum Saccharomycotina* [84]. Среди их уникальных свойств можно выделить: устойчивость при высоких температурах и высоком осмотическом давлении, а также большое количество окисляемых субстратов. Еще одной их особенностью является зависимость морфологии клеток от температуры роста. Геном *Blastobotrys adeninivorans* хорошо изучен и секвенирован. *Blastobotrys adeninivorans* имеют большое количество разных метаболических путей, что

позволяет им метаболизировать различные классы органических веществ. Эти уникальные свойства делают данные дрожжи перспективным биоматериалом для разных направлений биотехнологии и, в частности, для создания биосенсоров.

*B. adenivorans* – относительно недавно открытый вид дрожжей. Первое сообщение об этом микроорганизме было опубликовано Мидделховеном в 1984 г. Эти микроорганизмы были изолированы из почвы и получили название *Trichosporon adenivorans* [85]. Через 6 лет был описан еще один штамм этих дрожжей, получивший название LS3 [86]. Позднее были выделены еще несколько штаммов дрожжей с такими же свойствами. Этому виду было присвоено название *Arxula adenivorans* [87], которое спустя некоторое время изменили на *Blastobotrys adenivorans*. На основе данных о генетической последовательности *B. adenivorans* было показано, что с точки зрения систематики они достаточно далеки от дрожжей *S. cerevisiae* [88].

Физиология *Blastobotrys adenivorans* подробно изучена в нескольких работах [86, 87]. Эти дрожжи активно окисляют многие углеводы, полиспирты и кислоты органического происхождения, кроме лактозы, инулина, L-рамнозы, лактата и метанола. Во время роста дрожжи *B. adenivorans* выделяют в ростовую среду внеклеточные ферменты, такие как протеазы, глюкоамилазу, трегалазу, инвертазу, рибонуклеазу, некоторые фосфатазы и целлюбиазы. Однако окисление одно- и двухатомных спиртов, карбоновых и дикарбоновых кислот и других веществ, не содержащих азот, происходит с окислением промежуточных продуктов распада. Кроме того, *B. adenivorans* окисляет некоторые гидроксилбензоаты и фенолы.

Дрожжи *B. adenivorans* устойчивы к температуре и могут расти при температуре до 48°C без предварительной адаптации. В зависимости от температуры культивирования штамм LS3 дикого типа имеет три морфологические формы. До 42°C клетки размножаются почкованием, при 42°C клетки образуют псевдомицелий, а при температуре выше 42°C они становятся мицелиальными [89] (рис. 13). Клетки дрожжей рода *Blastobotrys*



овальные или удлинённые, размером от  $2,2 \times 2,4$  мкм до  $3,6 \times 5,6$  мкм. Диморфизм дрожжей *B. adenivorans* является обратимым под действием температуры. Таким образом, морфологию данных дрожжей можно легко контролировать.

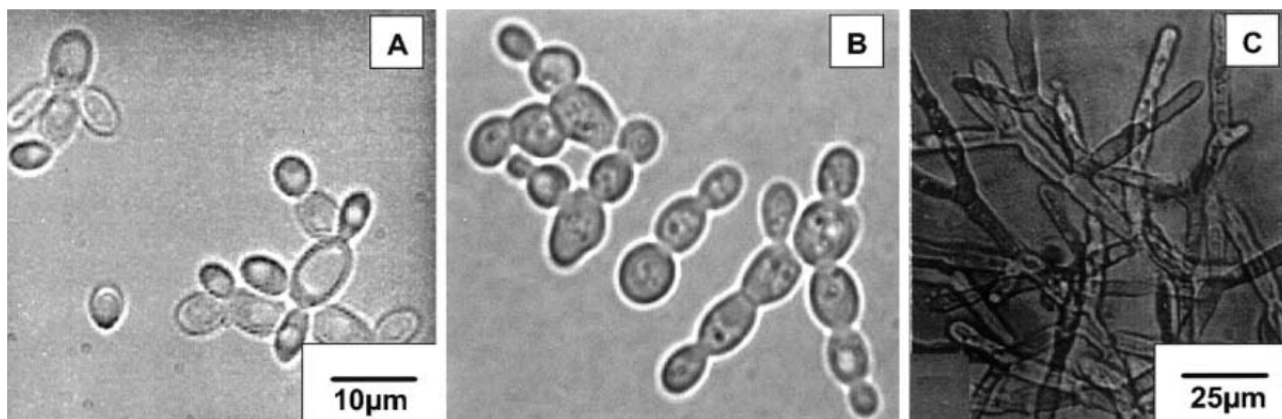


Рис. 13. Микрофотографии штамма *B. adenivorans* LS3, выращенного при А – 30°C, В – 42°C, С – 45°C [90].

Еще одно свойство *B. adenivorans* – галотолерантность. Клетки могут расти на средах, содержащих до 20% NaCl, при этом наблюдается лишь незначительное влияние на уровни транскрипции, секреции и роста вплоть до 10% NaCl [91]. Осмотолерантность – очень желательная характеристика как для ферментации, так и для биоремедиации и создания биосенсоров. В 1998 году Таг и др. сообщили об устойчивости *B. adenivorans* к высоким концентрациям хлорида натрия в воде. Что позволяет создавать биосенсоры для использования в солоноватых сточных водах и морской воде [92]. Дрожжи *Blastobotrys adenivorans*, благодаря своей галотолерантности и способности окислять очень широкий спектр веществ, были успешно использованы для разработки БПК-биосенсора [93]. Созданный биодатчик характеризовался высокой долговременной стабильностью (40 сут.) и диапазоном определяемых значений БПК до  $550 \text{ мгО}_2/\text{дм}^3$ . Апробация биосенсора проведена на различных образцах сточных вод, в том числе водах с высокой соленостью.

На основе клеток *B. adenivorans* разработан биосенсор для определения эстрогена. Эстроген стимулировал производство и экспорт фитазы, что было обнаружено с помощью ферментного анализа. Это позволило специфично, чувствительно и воспроизводимо определять эстроген в сточных водах в течение 30 часов без предварительного концентрирования пробы [94]. Версия подобного биосенсора была дополнительно усовершенствована, что позволило осуществлять непрерывный мониторинг эстрогенных соединений в сточных водах с концентрацией NaCl до 5% [95]. Также были разработаны сенсоры на основе трансгенных штаммов *B. adenivorans* для обнаружения других молекул, таких как омепразол, лансопризол [96] и прогестерон [97].

### 1.2.1.3. Характеристика дрожжей *Debaryomyces hansenii*

Дрожжи *Debaryomyces hansenii* и их анаморфное состояние *Candida famata* — это галотолерантные и термотолерантные пищевые дрожжи [98]. Они накапливают липиды, участвуют в ферментации мяса, присутствуют во всех видах сыров и производят литические ферменты и альдиты [99]. Впервые эти дрожжи были выделены из морской воды. Они способны расти в средах, содержащих до 4 моль/дм<sup>3</sup> хлорида натрия [100]. *D. hansenii* очень разнообразны, по современной классификации выделяют две их разновидности: *D. hansenii* var. *fabryi* и *D. hansenii* var. *hansenii*. У этих разновидностей наблюдаются разные температуры роста [101] расхождения в структуре их генов 26S рРНК [102] и различия в электрофоретической подвижности их глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ [103].

По своему строению *Debaryomyces hansenii* являются аскомицетами. Форма клеток – сфероидальная или слегка овальная, размеры которой 2×2,2 – 7,2×8,6 мкм. Встречаются как одиночные клетки, так и пары и короткие цепочки клеток (рис. 14).

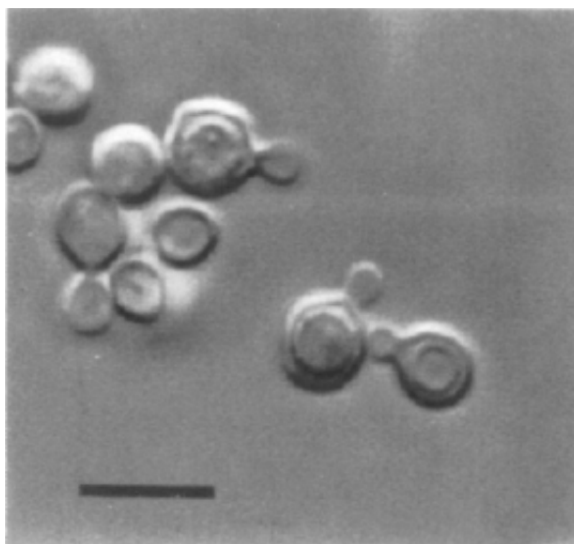


Рис. 14. Микрофотография дрожжей *D. hansenii* var. *hansenii* JCM 2093. Бар-метка: 5 мкм [104].

Род *Debaryomyces* подробно описан в работе [105]. Все виды *Debaryomyces* являются гаплоидными дрожжами, которые размножаются вегетативно многосторонним бутонированием. Половое размножение у *D. hansenii* происходит путем сопряжения двух клеток разной формы и размеров. Это сопряжение обычно приводит к короткой диплофазе с последующим мейозом и образованием аскоспор [106]. Аски содержат от одного до четырех сферических, шаровидных, яйцевидных или линзовидных гладких или бородавчатых аскоспор. Изогамное сопряжение также встречается [105]. Физиологическая и молекулярная информация о *D. hansenii* накапливалась за последние 10–20 лет. Это дрожжи со значительным уровнем полиморфизма длины хромосом. Их геном был полностью секвенирован французским консорциумом Genolevures. Таким образом, это открыло новые возможности для комплексного подхода к пониманию их галотолерантности.

Как уже упоминалось, *D. hansenii* устойчивы при высоких температурах и высоком осмотическом давлении. Они встречаются в очень соленой воде, например, такой как солончаки в Намибии или Большое Соленое озеро в США. Они могут культивироваться в средах с содержанием NaCl до 25% или 18% глицерина [107]. Возможность роста на 10% NaCl заслуживает особого упоминания, так как это используется для отличия *D. hansenii* от других

аскомицетных дрожжей. В дополнение к их способности расти при высокой концентрации солей, *Debaryomyces* окисляют очень широкий круг органических веществ. В отличие от других, часто применяемых в биотехнологии дрожжей, *D. hansenii* легко утилизируют алканы нормального строения и крахмал [108]. Эти дрожжи плохо растут при отсутствии кислорода, а в присутствии глюкозы *D. hansenii* могут окислять нафталин и бенз(а)пирен [98]. Оптимальная температура роста лежит в пределах 20–25<sup>0</sup>С, однако они способны к росту и при 0<sup>0</sup>С [99].

Поскольку *D. hansenii* – это одни из самых распространенных дрожжей в соленой среде, они являются важным модельным организмом для изучения солеустойчивости и их механизм осмоотолерантности изучен в деталях в работах [109]. В работе [110] описаны механизмы противодействия дрожжей *Debaryomyces hansenii* стрессу, связанному с изменением состава окружающей среды. В данных дрожжах была найдена алкил-редуктаза, способная превращать гидроперекиси липидов в спирты, не обладающие токсичностью для клеток. Показано, что она играет большую роль в адаптации *Debaryomyces hansenii* к солености среды [111]. Галотолерантность *D. hansenii* также обуславливается их мембранным составом (соотношением фосфолипидов к стеролу) [109], присутствием механизмов транспорта глицерина и ионов калия [112] и наличием особых ферментов [113]. Устойчивость *D. hansenii* к воздействию негативных факторов объясняется их разветвленной дыхательной цепью (наличие альтернативной оксидазы, альтернативной НАДН-дегидрогеназы и митохондриальной изоформы глицерол-фосфат-дегидрогеназ). Таким образом, в стрессовых условиях возможно переключение дыхательных путей на альтернативные механизмы [114].

*D. hansenii* – одни из липидаккумулялирующих, «маслянистых» дрожжей. Высокая способность данных дрожжей синтезировать и накапливать жиры может быть полезна в целях биотехнологического синтеза различных продуктов [98]. *D. hansenii* могут синтезировать несколько токсинов. Это также может быть интересным объектом биотехнологических исследований как с

целью синтеза самих токсинов, так и с целью предотвращения роста нежелательных микроорганизмов при выращивании самих *D. hansenii*. В работе [115] показано, что токсин миоцин, вырабатываемый *D. hansenii*, убивает разные виды дрожжей. Активность миоцина *D. hansenii* наблюдалась только в присутствии солей, например, хлоридов натрия или калия.

*D. hansenii* применяются для изготовления мясных продуктов и сыра. Применение *D. hansenii* в производстве различных мясных продуктов известно достаточно давно, в частности, показано, что они оказывают влияние на органолептические свойства мяса [116]. Еще одним направлением использования *D. hansenii* является синтез ксилита из D-ксилозы. Ксилит является подсластителем и сырьем в пищевой промышленности при производстве сахара и кондитерских изделий. В работе [117] достаточно подробно изучен синтез ксилита из ксилозы в дрожжах *D. hansenii*. Осмотолерантность *D. hansenii* очень выгодна для биотехнологического применения, потому что позволяет использовать соленые среды и добиваться стерильного производства. К сожалению, по этим же причинам *D. hansenii* может быть виновником порчи консервированных в рассоле продуктов [98].

#### **1.2.1.4. Общая характеристика дрожжей *Candida boidinii*, *Candida maltosa* и *Candida blankii***

Широкие таксономические границы рода *Candida* приводят к огромному разнообразию заселенных мест их обитания. Будучи гетеротрофными, они зависят от других организмов в преобразовании доступных субстратов в пригодные для использования формы. Обычными хозяевами являются растения: поверхность листьев, нектарники и нектар цветов, лепестки цветов и другие части цветов, кожица плодов, гниющие фрукты (желательно поврежденные), стебли и связанные с растениями среды обитания, включая почву. Поверхность листьев населена азотфиксирующими бактериями или продуцентами сахаристых соединений, которые обеспечивают питательные

вещества для дрожжей. Многие тропические фрукты из Африки и Южной Америки демонстрируют постоянную колонизацию дрожжами *Candida* [80]. *Candida boidinii*, например, ассоциируется с дубильными растворами, содержащими сахара, азотистые соединения и минеральные соли (рН 4,0–5,9). Дрожжи *Candida* обитают в почве не постоянно. Их количество там зависит от количества доступных питательных веществ. Поверхностные слои предпочтительны, поскольку *Candida* являются аэробными или микроаэрофильными. *Candida* присутствуют в почвах многих регионов. Связанные с растениями дрожжи достигают земли, смываются дождем или вместе с опадающими фруктами. Там они переживают зиму и разносятся обратно в начале лета (ветер, насекомые).

Как обычные обитатели *Candida* присутствуют в естественных и загрязненных водах (реки, озера, бассейны целлюлозных заводов, в очистных сооружениях и т. д.) и донных отложениях. В морской среде количество дрожжей рода *Candida* увеличивается по мере разложения морских растений, ламинарии и планктона. Из этих источников были выделены *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*. Патогенный микроорганизм *C. albicans* является одним из индикаторов общего загрязнения воды. Загрязнение нефтью приводит к значительному увеличению концентрации *C. lipolytica*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* и *C. maltosa* [80].

*Candida boidinii* – метилотрофные дрожжи, филогенетически родственные дрожжам *Ogataea*. Этот вид дрожжей был впервые идентифицирован в Испании по смывке коры деревьев [118], хотя экология этого микроорганизма широко распространена, и он был изолирован из различных субстратов, связанных с деятельностью человека (ферментация вина, производство оливок, тепаче и т. д.) и природной среды (почва, морская вода, патоки сока многих богатых сахаром древесных пород и т. д.) [104]. Внутривидовое биоразнообразие, по-видимому, является отличительной чертой вида *C. boidinii*. В ряде работ приведены результаты генетического анализа и сравнения разных штаммов *C. boidinii* [118, 119]. При росте на богатой среде

через 3 дня при 25°C клетки *C. boidinii* приобретают цилиндрическую форму и имеют размеры 2,0×4,0 до 4,0×20,0 мкм, встречаются одиночные, соединенные попарно и образующие цепи клетки (рис. 15).

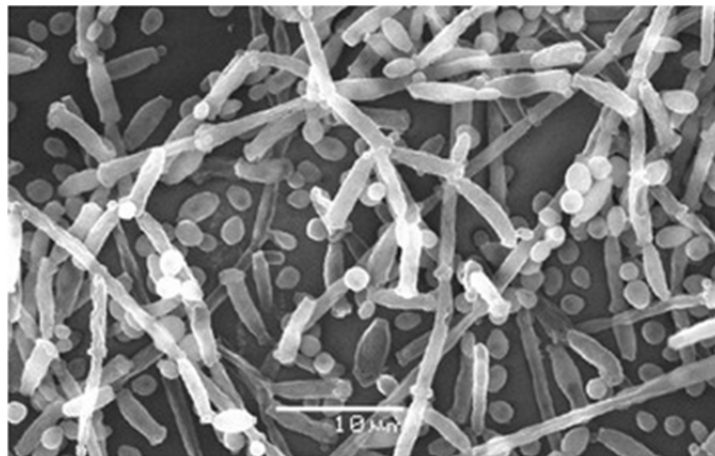


Рис. 15. СЭМ изображение микроорганизмов *C. boidinii* UNISS-Cb60 на среде YM через 7 дней при 25°C [118].

*C. boidinii* – дрожжи с большим биотехнологическим потенциалом. Эти потребляющие ксилозу метилотрофные дрожжи оказались пригодными для изучения генов, связанных с деградацией метанола [120, 121]. Более того, этот вид участвует в переработке оливок, где проявляет различные многофункциональные свойства, такие как липазная активность [122], образование биопленок на эпидермисе плодов [123] и коагрегация с бактериями, такими как *Lactobacillus pentosus* [124]. *Candida boidinii*, как и другие метилотрофные дрожжи широко используются в качестве систем для продукции гетерологичных белков [125]. Они объединяют преимущества эукариотической системы экспрессии (эффективная секреция и посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование или введение дисульфидных связей) с благоприятными свойствами роста устойчивых одноклеточных организмов (быстрый рост на простых средах, отсутствие производства внутренних эндотоксинов или вирусных ДНК) [126]. Катализируемое ферментами дрожжей восстановление кетонов успешно используется для получения структурных единиц хиральных спиртов, которые

могут быть включены в синтез множества биоактивных соединений. Так, например, стереоселективное биовосстановление 1-фенилбутан-2-она, катализируемое растворимой алкогольдегидрогеназой из *R. erythropolis* и формиатдегидрогеназой из *Candida boidinii*, разработанное фирмой Forschungszentrum Jülich GmbH, приводит к синтезу соответствующего хирального (S)-спирта, промежуточный продукт синтеза симпатомиметических препаратов [127].

Еще одним важным видом с точки зрения коммерческого применения являются *Candida maltosa*, которые применяются как продукты питания и подкормка для животных и могут быть использованы при обработке широкого круга субстратов, в том числе, сырой нефти. Клетки *C. maltosa* хорошо окисляют глицерин, сорбит, глюкозу, галактозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу. Не окисляют лактозу, раффинозу, рибозу, крахмал [128]. Хорошо усваивают аммонийную форму азота, но не усваивают нитраты. Дрожжи *C. maltosa* в качестве источника углерода и энергии могут использовать n-алканы и фенол [129]. Добавление глюкозы к угнетенным клеткам *C. maltosa* вызывает резкое увеличение концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и фруктозо-2,6-дифосфата, за которым следует фосфорилирование различных белков и инактивация ферментов глюконеогенеза [130]. При росте на богатой среде через 3 дня при 25°C клетки имеют круглую или яйцевидную форму, размеры (3,0–5,0) x (4,0–7,0) мкм, и встречаются поодиночке, парами или небольшими группами (рис. 16).



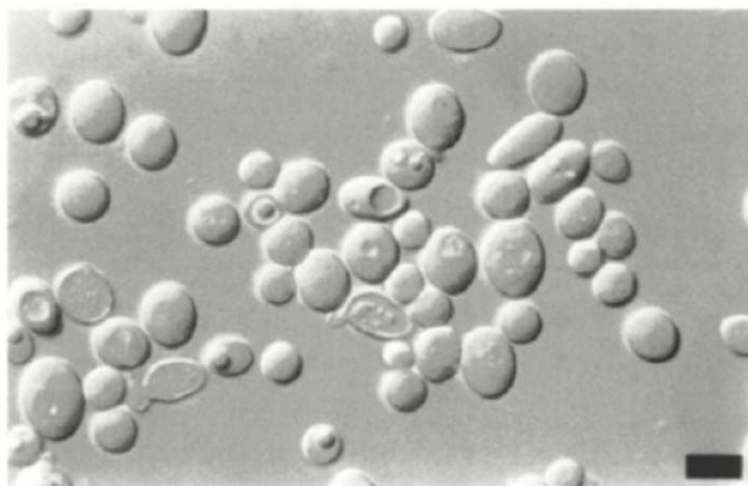


Рис. 16. Дрожжи *Candida maltosa* CBS 6680 через 3 дня роста в среде: глюкоза, дрожжевой экстракт, пептон при 25°C. Бар-метка: 5 мкм [104].

*C. maltosa* разлагает н-алканы путем односторонней деструкции, что подтверждается анализом внеклеточных продуктов метаболизма [131]. Гидроксилирование н-алканов до жирных спиртов катализируется специальной системой цитохромов P-450, которая локализована в микросомной мембранной фракции [132]. Две последующие ступени окисления идут через образование альдегида к формированию жирных кислот, которые разрушаются  $\beta$ -окислением. Вид *Candida maltosa* может быть использован для биологической очистки воды от нефтепродуктов [128]. В частности, сообщество штаммов ВКПМ Y-2256 и Y-2257 предлагается применять для удаления широкого спектра углеводов из сырой нефти и нефтепродуктов. Штамм дрожжей *Candida maltosa* ЕН 15 был использован в качестве биологического агента для биоразложения эмульгированных углеводов. Для эмульгирования углеводов были использованы шесть различных поверхностно-активных соединений, степень биодegradации и количество биомассы были определены в течение 7 дней. Полученные результаты свидетельствуют о значительной способности *Candida maltosa* ЕН 15 к биоразложению углеводов, однако эффективность биодеструкции зависит от типа и концентрации ПАВ [133].

Как и многие дрожжи, *Candida blankii* были предметом различных биотехнологических исследований [134]. Метаболический процесс *C. blankii*

носит аэробный характер, они окисляют многие спирты, аминокислоты, углеводы и другие органические соединения. Через 3 дня роста на богатой среде при 25°C клетки *Candida blankii* имеют форму от сфероидальных до яйцевидных, могут удлиняться, иметь размер (2,0–5,0) x (2,0–13,0) мкм и находятся по отдельности, в парах и коротких цепочках.

Дрожжи *C. blankii* могут быть использованы в производстве белка из гидролизатов гемицеллюлозы [135]. *C. blankii* – одни из нескольких широко изученных дрожжей для использования в ферментации ксилозы. Дрожжи *Candida blankii* используются для переработки агропромышленных отходов и, в частности, для переработки жома сахарного тростника, являющегося основным побочным продуктом промышленной переработки. Жом содержит 50% целлюлозы, 25% гемицеллюлозы и 25% лигнина. При помощи дрожжей *Candida blankii* появилась возможность переработки жома в белки животного происхождения, ферменты, аминокислоты, органические кислоты, а также вещества, применяемые в фармацевтике.

#### 1.2.1.5. Общая характеристика дрожжей *Saccharomyces bayanus* и *Saccharomyces pastorianus*

Род *Saccharomyces* — это наиболее широко используемая людьми группа дрожжей. *Saccharomyces cerevisiae* и родственные им виды используются в трех основных процессах пищевой промышленности. Первый — это производство спирта и алкогольных напитков, включая вино, пиво, sake и спиртные напитки. *Saccharomyces pastorianus* изначально считался штаммом для производства лагерного пива. *Saccharomyces bayanus* в основном ассоциируется с винодельческой промышленностью. Во-вторых, это хлебопекарная промышленность. Третий процесс включает производство биомассы, экстрактов, автолизатов и ароматизаторов. Дрожжи, используемые в таких процессах, могут быть либо специально выращенными, либо побочными продуктами.

Виды *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus* и *Saccharomyces pastorianus* филогенетически тесно связаны между собой в роду *Saccharomyces*. Виды *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. pastorianus* особенно характерны для виноделен и пивоварен. Эффективное разделение видов *Saccharomyces* может быть затруднено, поскольку они часто имеют явно идентичные морфологические, физиологические и серологические свойства. Дрожжи *Saccharomyces bayanus* обладают следующими специфическими свойствами: криотолерантность [136], типичный профиль ферментации виноградного сула, который явно отличается от профиля брожения *S. cerevisiae*; производство меньшего количества уксусной кислоты и этанола, но большего количества глицерина и янтарной кислоты; синтез, но не разложение яблочной кислоты [137]; и значительное производство летучих ферментативных соединений, таких как фенилэтанол и его ацетат [138]. Эти факторы приводят к значительным органолептическим различиям продуктов брожения, в которых содержится данный вид дрожжей.

Клетки *S. bayanus* при росте в 5% солодовом экстракте через 3 дня при 25°C имеют шаровидную, яйцевидную или удлиненную форму (2,2–6,0) x (3,5–10,5) мкм и обычно изолированы или могут находиться группами 3–20 штук (рис. 17А). Клетки *S. pastorianus* при росте в 5% солодовом экстракте через 3 дня при 25°C имеют шаровидную, эллипсоидальную или цилиндрическую форму (2,2–8,0) x (3,5–13,5) мкм, одиночные, либо соединенные попарно или группами (рис. 17Б).

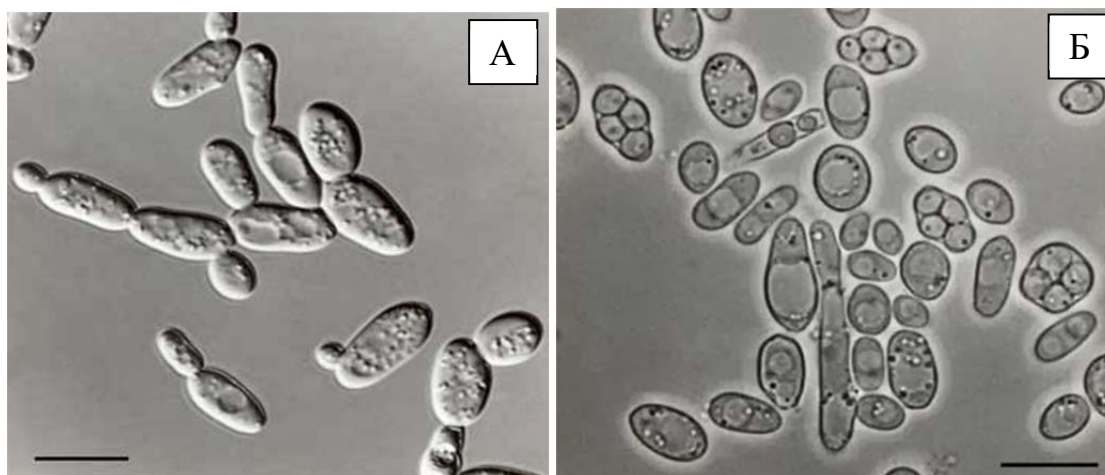


Рис. 17. Дрожжи *Saccharomyces bayanus* (А) и *Saccharomyces pastorianus* (Б). Бар-метка: 10 мкм.

Штаммы *Saccharomyces bayanus* были разделены на две подгруппы с помощью анализа молекулярной изменчивости [139]. Первый содержит штаммы с однородными фенотипическими и генотипическими характеристиками, сходными с таковыми из *S. uvarum* (типовой штамм CBS 395). Штаммы этой подгруппы демонстрируют электрофоретический кариотип, характеризующийся наличием двух полос размером 225 и 365 т.п.н. и профилем ферментации, включающим глицерин, янтарную и уксусную кислоты. Эти штаммы часто встречаются в процессе виноделия. Вторая группа включает гораздо больше гетерогенных штаммов и штамм типа CBS 380. Штамм CBS 380 физиологически ведет себя как промежуточное звено между первой подгруппой и *S. cerevisiae*. Было предложено рассматривать эти две подгруппы как разновидности, названные *S. bayanus var. bayanus* и *S. bayanus var. uvarum* [140].

*Saccharomyces bayanus* не первый описанный гибридный вид. Было показано, что *Saccharomyces pastorianus* является частичным гибридом, полученным в результате спаривания между пекарскими дрожжами *S. cerevisiae* и дрожжами, принадлежащими к виду *S. bayanus* [141]. При этом митохондриальная ДНК была унаследована только от *S. bayanus*. Для дрожжей рода *Saccharomyces* вообще характерно образование гибридных штаммов. Так,

гибридный штамм ВКПМ У-2160, полученный путем скрещивания штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-172 со штаммом *Saccharomyces bayanus* Fc 1118, применяется при производстве вина и шампанского [142].

Еще одним направлением использования дрожжей рода *Saccharomyces* является разработка биосенсоров. Однако для этого чаще всего используют самый распространенный вид *S. cerevisiae*. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* способны окислять достаточно широкий спектр органических веществ, поэтому они активно применяются при разработке БПК-биосенсоров [25, 56, 74]. Создан анализатор БПК на основе амперометрического кислородного электрода и *S. cerevisiae*, инкапсулированных в альгинатную матрицу, который показывает неплохую корреляцию с результатами классического метода БПК<sub>5</sub> ( $R = 0,95$ ) [56]. Описан БПК-биосенсор на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и двухмедиаторной системы с феррицианидом и липофильным медиатором менадиона, имеющий высокую воспроизводимость ответов ( $S = 1,3\%$ ) [25]. Колориметрический БПК-биосенсор на основе *Saccharomyces cerevisiae* и 2,6-дихлорфенолиндофенола имел линейный интервал в диапазоне 1,1–22 мг/дм<sup>3</sup> и был использован для анализа образцов речной воды [74].

#### **1.2.1.6. Общая характеристика бактерий *Gluconobacter oxydans***

*Gluconobacter oxydans* – грамотрицательные бактерии, принадлежащие к семейству *Acetobacteraceae*. *G. oxydans* – облигатный аэроб, имеющий респираторный тип метаболизма с использованием кислорода в качестве конечного акцептора электронов. Штаммы *Gluconobacter* встречаются в спелом винограде, яблоках, финиках, садовой земле, сидре, пиве и вине [143]. Штаммы *Gluconobacter* не патогенны по отношению к человеку и другим животным, но способны вызывать бактериальную гниль яблок и груш. Бактерии *Gluconobacter oxydans* производят неполное окисление углеводов, спиртов и кислот. Неполное окисление приводит к почти количественным выходам продуктов окисления, делающим *G. oxydans* важным для

промышленного использования. Штаммы *Gluconobacter* можно применять в промышленном производстве L-сорбозы из D-сорбита, D-глюконовой кислоты, 5-кето- и 2-кетоглюконовой кислоты из D-глюкозы и дигидроксиацетон из глицерина.

Уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans* имеют форму эллипса или стержня, размеры (0,5–0,8) × (0,9–4,2) мкм, встречаются поодиночке или парами, реже цепочками. Неполное окисление субстратов происходит в периплазме за счет мембранолокализованных дегидрогеназ (рис. 18).

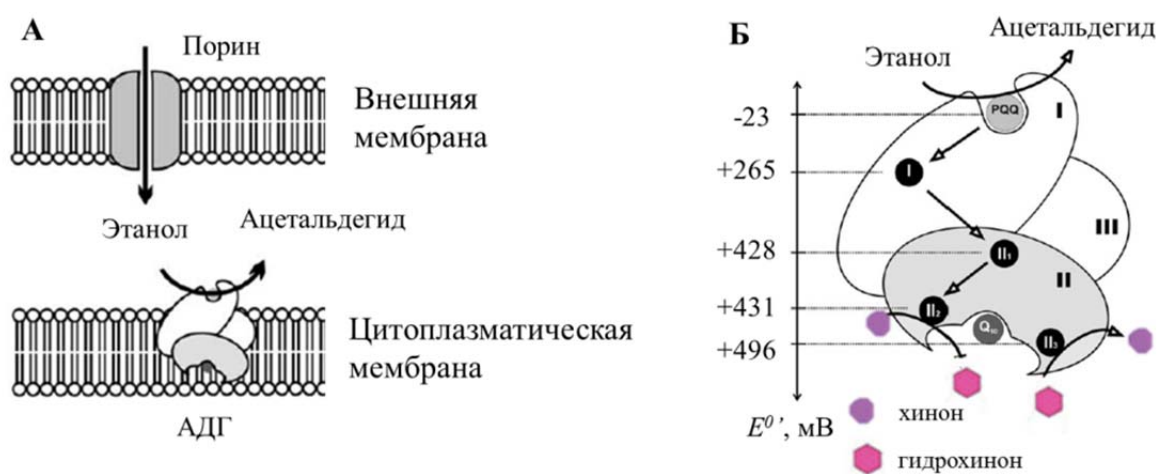


Рис. 18. Окисление этанола бактериями *Gluconobacter oxydans*. А – транспорт этанола через клеточную мембрану, Б – алкогольдегидрогеназа *Gluconobacter oxydans* и перенос электронов в ней.

Бактериальные микроорганизмы *Gluconobacter oxydans* характеризуются уникальным устройством своей метаболической системы [144]. Она интересна поверхностной локализацией многих ферментных систем, редукцией многих диссимиляционных путей, накоплением в ростовой среде промежуточных метаболитов и высокой скоростью цепи переноса электронов [145].

В уксуснокислых бактериях рода *Gluconobacter* присутствуют многие мембраносвязанные и цитозольные оксидоредуктазы. Например, в штамме *Gluconobacter oxydans* ATCC 621Н с определенным полностью геномом, имеется 32 мембраносвязанных дегидрогеназы, 11 с идентифицированной и 21 с неустановленной субстратной специфичностью [146]. В то время как

мембранные ферменты катализируют окисление различных спиртов, углеводов и многоатомных спиртов для обеспечения первичной энергии, цитозольные ферменты, по-видимому, играют роль в ассимиляции продуктов окисления на более поздней стадии [147, 148]. Многие мембраносвязанные ферменты в уксуснокислых бактериях представляют собой PQQ- или ФАД-зависимые белки, содержащие фрагменты гема с в качестве медиаторов переноса электронов.

В бактериях *Gluconobacter frateurii* СМ9 был обнаружен фермент, катализирующий окисление циклических спиртов и алифатических вторичных спиртов до соответствующих кетонов, PQQ-циклическая алкогольдегидрогеназа [149]. Важным мембранлокализованным ферментом *Gluconobacter* является PQQ-зависимая полиолдегидрогеназа, известная также как PQQ-глицериндегидрогеназа [150]. Данный фермент обладает разнообразной субстратной специфичностью и способен катализировать окисление глицерина, мезоэритрита, D-арабита, рибита, D-сорбита, D-маннита и D-глюконата [151].

В процессе метаболизма D-глюкозы она окисляется до глюконо- $\delta$ -лактона с помощью мембраносвязанной PQQ-глюкозодегидрогеназы, который затем превращается в D-глюконовую кислоту либо самопроизвольно, либо с помощью глюконолактоназы, присутствующей в клеточной мембране [152]. Затем глюконовая кислота превращается в 2-кето-D-глюконовую кислоту или 5-кето-D-глюконовую кислоту двумя разными мембраносвязанными ферментами, которые осуществляют конкурентную реакцию. Глюконатдегидрогеназа, содержащая ФАД, ответственна за образование 2-кето-D-глюконовой кислоты [153], тогда как 5-кето-D-глюконовая кислота образуется с помощью PQQ-зависимой глицериндегидрогеназы. Эти продукты окисления глюкозы ассимилируются цитоплазматическими редуктазами в стационарной фазе роста. Затем полученные продукты подвергаются пентозофосфатному пути как главному пути производства клеточной массы. Другой мембраносвязанный фермент, описанный в уксуснокислых бактериях

*Gluconobacter* — это ФАД-зависимая D-фруктозодегидрогеназа, которая катализирует окисление D-фруктозы до 5-кето-D-фруктозы [154].

Возможность получения уксусной кислоты бактериями *Gluconobacter* установлена достаточно давно [155]. Вначале этанол переходит в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы, далее из ацетальдегида образуется уксусная кислота. Кроме этилового спирта *Gluconobacter* метаболизируют и другие алифатические спирты с образованием соответствующих им карбоновых кислот. Способность к метаболизму различных спиртов значительно различается среди штаммов одного вида. Глицерин – это один из наиболее легкоутилизируемых ростовых субстратов для бактерий *Gluconobacter*. Между тем установлено, что продукты его разложения могут быть токсичны для клеток [156].

Особенности метаболизма бактерий *G. oxydans* обуславливают перспективы их применения в биосенсорах. Особенно важной их особенностью является то, что пирролохинолинхинон, находящийся в ферментных системах, связан с внешней клеточной мембраной, что позволяет получать быстрый ответ биосенсора. Так, на основе бактерии *Gluconobacter oxydans* разработан микробный биосенсор для определения 2-фенилэтанола, который применялся для мониторинга биотехнологических процессов [157]. Клетки *G. oxydans* были иммобилизованы внутри одноразовой гелевой мембраны из полиэлектролитного комплекса, состоящей из альгината натрия, сульфата целлюлозы и полиметилenguанидина, прикрепленной к миниатюрному кислородному электроду Кларка. В работе [158] был сконструирован микробный амперометрический биосенсор для измерения этанола в проточно-инъекционной системе. В системе использовались бактерии *Gluconobacter oxydans*, закрепленные на поверхности стеклоуглеродного электрода. Описанная биосенсорная система использовалась для автономного мониторинга этанола во время спиртового брожения. Еще один пример использования бактерий *Gluconobacter oxydans* для создания биосенсора на этанол представлен в работе [159]. В работе [160] показано успешное



использование бактерий *G. oxydans* при создании медиаторного биосенсора для определения глюкозы. Созданный биосенсор имел относительно быстрое время отклика, хорошую воспроизводимость и стабильность.

### ***1.2.2. Определение ключевых метаболических, биокаталитических и физиолого-биохимических характеристик выбранных микроорганизмов***

Предложенный подход к выбору биологического материала для рецепторного элемента БПК-биосенсора основан на сравнительном анализе чувствительности микроорганизмов по отношению к окисляемым субстратам как ключевой характеристики биокаталитической активности; стабильности в иммобилизованном состоянии как ключевой физиолого-биохимической характеристики и способности микроорганизмов окислять широкий круг веществ как ключевой метаболической характеристики. 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. 19).

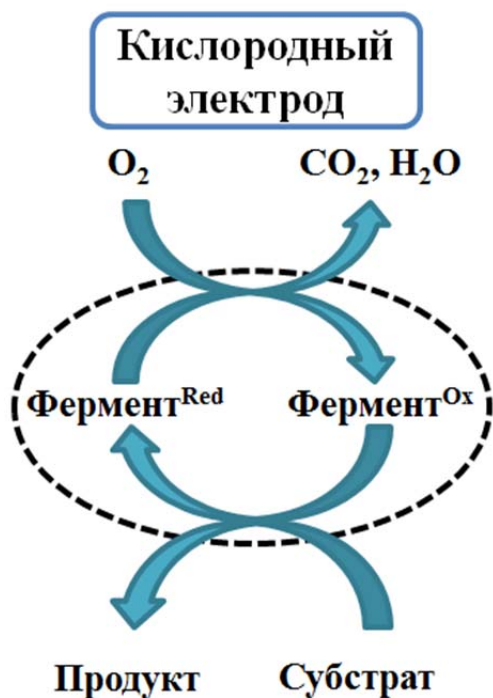


Рис. 19. Принцип работы биосенсора на базе кислородного электрода.

Для создания рецепторных 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. Это дало возможность сопоставить количественные биокаталитические и физиолого-биохимические характеристики выбранных микроорганизмов. В качестве модельной применяли глюкозо-глутаматную смесь, использование которой при анализе биохимического потребления кислорода регламентировано в российских и зарубежных методиках [4, 161].

Использование микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов дает возможность увеличить правильность определения биохимического потребления кислорода методом с использованием биосенсора. Оценка спектра окисляемых субстратов выбранных для исследования дрожжей и бактерий проведена по отношению к органическим веществам различных классов: спиртам, углеводам, альдегидам, карбоновым и аминокислотам. Для определения спектра окисляемых веществ выбранных микроорганизмов определяли ответ биосенсора на добавление в кювету исследуемых субстратов

с концентрацией 80 ммоль/дм<sup>3</sup>. При добавлении субстрата в кювету микроорганизмы начинают его метаболизировать, что ведет к увеличению интенсивности их дыхания и снижению уровня O<sub>2</sub> вблизи поверхности электрода (рис. 20).

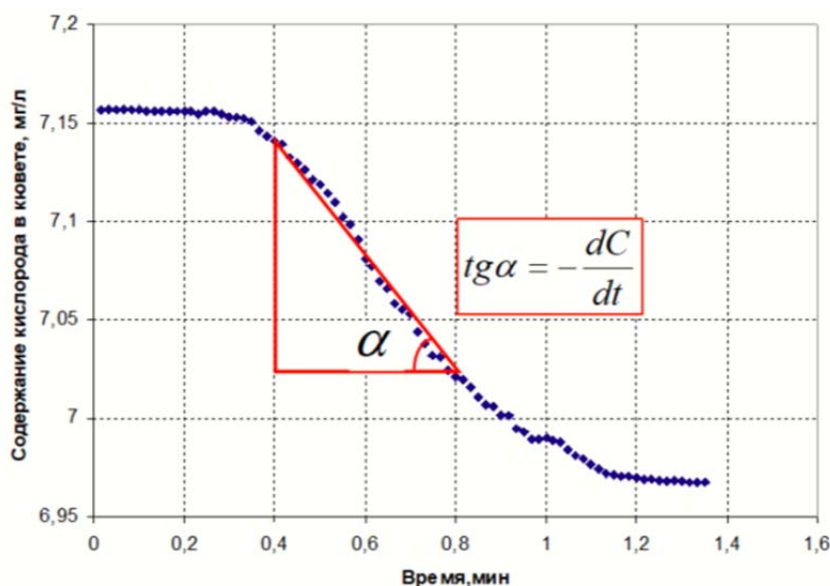


Рис. 20. Типичный вид ответа созданного биосенсора на добавление ГГС.

На мониторе компьютера отображается график изменения концентрации кислорода от времени, по которому можно вычислить ответ биосенсора. В качестве ответа биосенсора использована скорость изменения содержания растворенного кислорода во времени. Полученные данные по спектру окисляемых субстратов исследуемых микроорганизмов приведены в таблицах 4–6.

Таблица 4. Сравнение субстратной специфичности рецепторных элементов на основе изучаемых штаммов *Ogataea*, *Blastobotrys* и *Candida*.

Субстрат	<i>Og. angusta</i> ВКМ Y-1397	<i>Og. polymorpha</i> ВКМ Y- 2559	<i>Og. parapolymorpha</i> ВКМ Y-2518	<i>B. adeninivora</i> ВКМ Y- 2677	<i>C. boidinii</i> ВКМ Y- 2356
Метилловый спирт	да	да	да	нет	да
Этиловый спирт	да	да	да	да	да
Пропиловый спирт	да	да	да	да	да
Бутиловый спирт	да	да	да	да	слабый
Изоамиловый спирт	нет	нет	нет	слабый	нет
Глицерин	да	слабый	слабый	нет	да
D-глюкоза	да	слабый	да	да	да
Сахароза	слабый	нет	нет	да	слабый
D-галактоза	нет	нет	слабый	да	слабый
Лактоза	нет	нет	нет	слабый	нет
D-ксилоза	нет	нет	нет	нет	слабый
Метаналь	да	да	да	нет	да
Метановая кислота	слабый	слабый	слабый	нет	слабый
Этановая кислота	слабый	слабый	слабый	да	слабый
Глутамат	да	нет	слабый	да	слабый
Лизин	нет	нет	нет	слабый	нет
Додецилсульфат Na	нет	нет	нет	слабый	нет
Додецилбензосульфат Na	нет	нет	нет	слабый	нет
Спектр метаболической активности, % от числа субстратов	61	56	61	72	72

«да» – значимый отклик сенсора,

«слабый» – слабый отклик сенсора (менее 30% от максимального отклика),

«нет» – отсутствует отклик сенсора.

Таблица 5. Сравнение субстратной специфичности рецепторных элементов на основе изучаемых штаммов *Candida*, *Saccharomyces* и *Gluconobacter*.

Субстрат	<i>C. maltosa</i> ВКМ У-2359	<i>C. blankii</i> ВКМ У-2675	<i>S. bayanus</i> ВКМ У-349	<i>S. pasterianus</i> ВКМ У-507	<i>G. oxydans</i> ВКМ В- 1280
Метиловый спирт	нет	нет	нет	нет	нет
Этиловый спирт	да	да	да	да	да
Пропиловый спирт	да	да	да	слабый	да
Бутиловый спирт	да	да	слабый	слабый	да
Изоамиловый спирт	да	слабый	нет	нет	нет
Глицерин	нет	слабый	слабый	слабый	нет
D-глюкоза	да	да	да	да	да
Сахароза	да	да	да	да	нет
D-галактоза	да	да	да	да	да
Лактоза	нет	нет	нет	нет	слабый
D-ксилоза	нет	нет	нет	нет	да
Метаналь	нет	нет	нет	нет	нет
Метановая кислота	нет	нет	нет	нет	нет
Этановая кислота	да	нет	нет	нет	нет
Глутамат	слабый	нет	слабый	слабый	слабый
Лизин	слабый	нет	нет	нет	слабый
Додецилсульфат Na	да	да	нет	нет	нет
Додецилбензосульфат Na	нет	нет	нет	нет	нет
Спектр метаболической активности, % от числа субстратов	61	50	44	44	50

«да» – значимый отклик сенсора,

«слабый» – слабый отклик сенсора (менее 30% от максимального отклика),

«нет» – отсутствует отклик сенсора.

Таблица 6. Сравнение субстратной специфичности рецепторных элементов на основе изучаемых штаммов *Debaryomyces*.

Субстрат	<i>D. hansenii</i> Y-2482	<i>D. hansenii</i> Y-111	<i>D. hansenii</i> Y-1585	<i>D. hansenii</i> ВКМ Y-1050
Метиловый спирт	слабый	да	да	да
Этиловый спирт	да	слабый	слабый	слабый
Пропиловый спирт	да	слабый	слабый	нет
Бутиловый спирт	да	нет	слабый	нет
Изоамиловый спирт	слабый	нет	нет	нет
Глицерин	слабый	да	нет	нет
D-глюкоза	да	да	да	да
Сахароза	слабый	да	да	да
D-галактоза	да	да	слабый	слабый
Лактоза	слабый	да	да	да
D-ксилоза	слабый	да	да	слабый
Метаналь	да	слабый	слабый	нет
Метановая кислота	да	слабый	слабый	слабый
Этановая кислота	да	слабый	слабый	нет
Глутамат	слабый	да	слабый	слабый
Лизин	слабый	слабый	нет	нет
Додецилсульфат Na	да	слабый	нет	нет
Додецилбензосульфонат Na	слабый	нет	нет	нет
Спектр метаболической активности, % от числа субстратов	100	83	72	50

«да» – значимый отклик сенсора,

«слабый» – слабый отклик сенсора (менее 30% от максимального отклика),

«нет» – отсутствует отклик сенсора.

Метилотрофные дрожжи рода *Ogataea* обладают близкой друг к другу субстратной специфичностью. Характерной особенностью этих микроорганизмов является способность окислять метанол, глицерин, а также

вторичные и разветвленные спирты. Исходя из этого, биосенсор на их основе можно использовать для анализа сточных и технологических вод предприятий спиртовой и ликероводочной промышленности. Дрожжи *C. boidinii* могут метаболизировать достаточно большой круг органических веществ, за исключением разветвленных спиртов, поверхностно-активных веществ, лизина и некоторых дисахаридов. Наибольший отклик сенсора на основе дрожжей *Candida maltosa* наблюдался на глюкозу. Некоторые другие углеводы и первичные спирты тоже окислялись микроорганизмами. Сенсор с микроорганизмами *C. blankii* способен окислять наименьшее количество субстратов среди исследуемых дрожжей рода *Candida*.

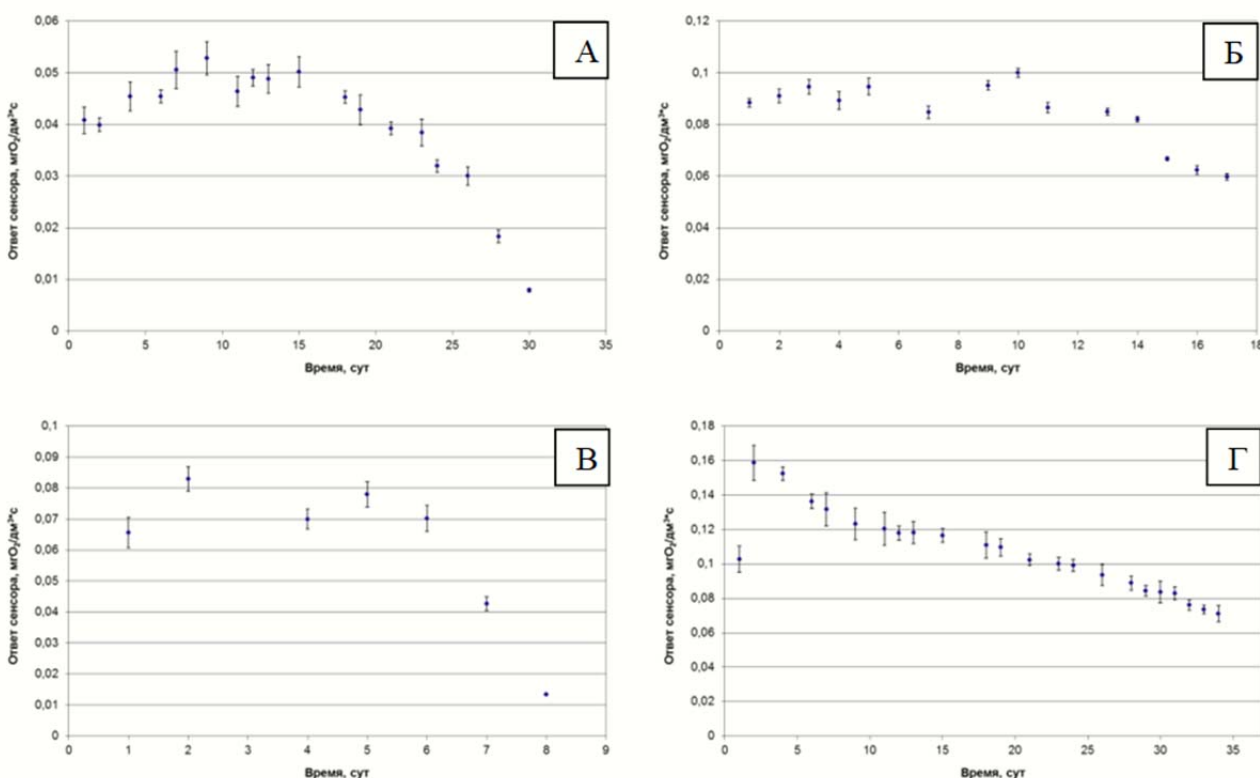
Дрожжевой штамм *D. hansenii* Y-2482 способен метаболизировать соединения всех представленных классов органических веществ, в том числе: углеводы, спирты линейного и разветвленного строения, ПАВ, карбоновые кислоты и аминокислоты. С практической точки зрения, важным является способность данных микроорганизмов окислять додецилсульфат и додецилбензосульфонат натрия, которые являются основными компонентами многих моющих средств и часто встречаются в коммунальных сточных водах. Особенностью штамма *D. hansenii* Y-111 является активное окисление глицерина. Окисление моносахаридов, таких как глюкоза, галактоза и ксилоза, происходило достаточно активно всеми исследуемыми штаммами *D. hansenii*. Дрожжи *D. hansenii* с высокой скоростью метаболизируют сахарозу, что может быть обусловлено наличием в них фермента инвертазы.

Дрожжи *B. adenivorans* характеризуются наибольшей окислительной активностью к спиртам линейного строения и глюкозе. Они могут окислять большое количество различных веществ: углеводы, аминокислоты, ПАВ, спирты, за исключением глицерина и метанола. Дрожжевые микроорганизмы *B. adenivorans* являются перспективными для использования в БПК-биосенсоре, предназначенном для анализа коммунальных сточных вод.

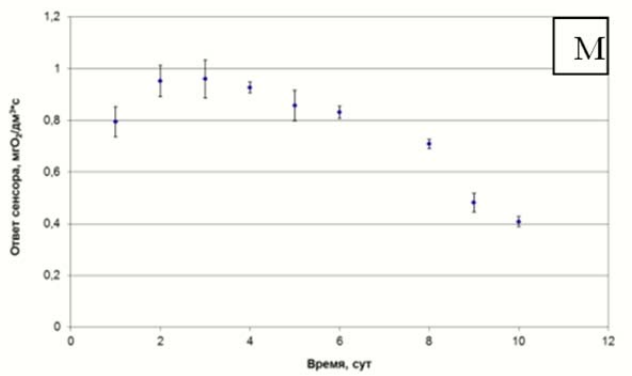
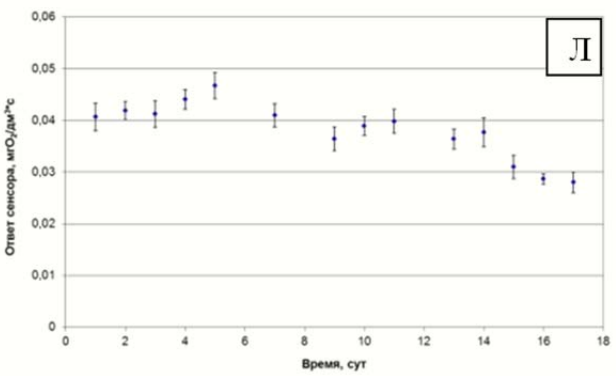
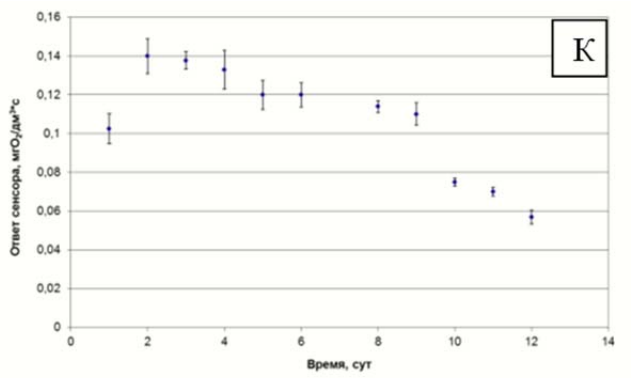
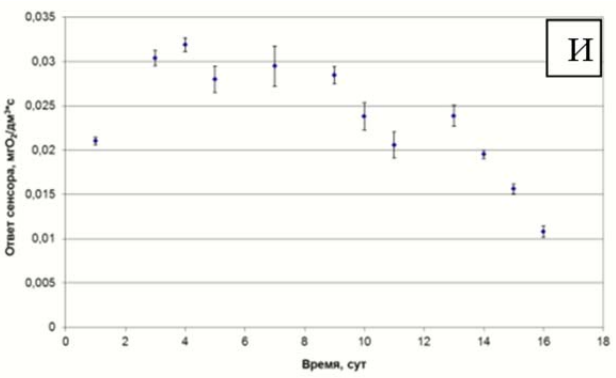
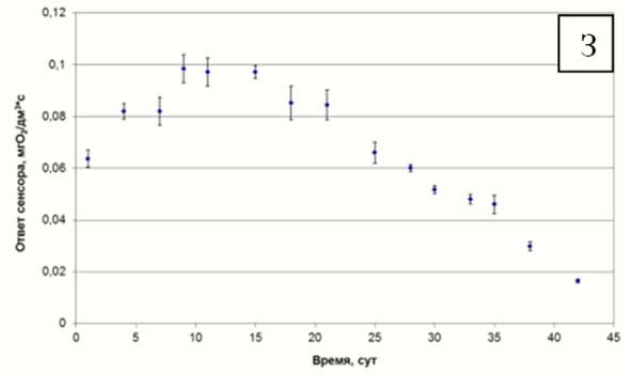
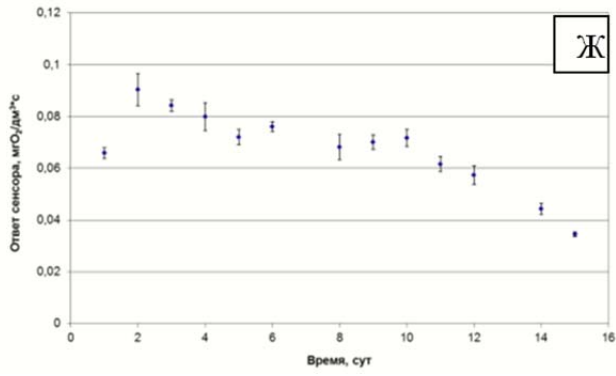
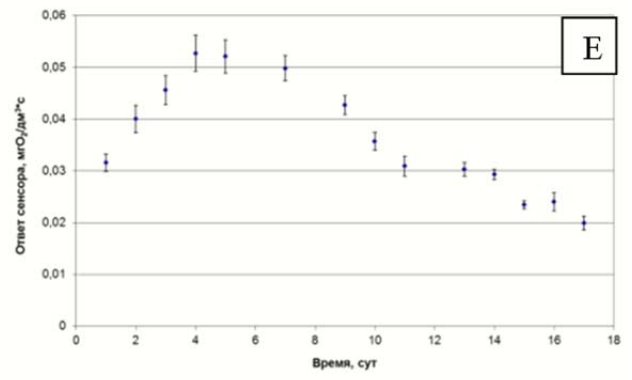
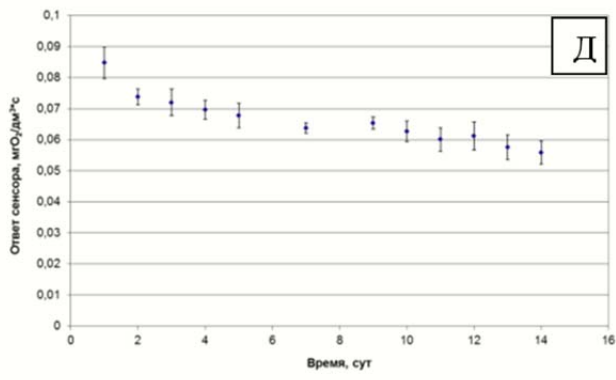
Сенсоры на основе микроорганизмов *Saccharomyces bayanus* и *Saccharomyces pastorianus* показали худшие результаты по субстратной

специфичности. Они способны окислять менее половины взятых для исследования субстратов. Бактерии *G. oxydans* активно окисляют многие углеводы и одноатомные спирты линейного строения за исключением метанола. Также были зафиксированы невысокие ответы биосенсора на основе *G. oxydans* на некоторые аминокислоты. В целом биосенсор на основе данных бактерий характеризуется узким спектром определяемых веществ.

Устойчивость микроорганизмов в иммобилизованном состоянии характеризуется долговременной стабильностью биосенсора или временем его работы. Время работы определяется в первую очередь физиолого-биохимическими характеристиками используемого биоматериала. Время работы рассчитывали как время, за которое ответ сенсора не падал более чем на 25% от начального. Для этого определяли ответ сенсора при введении в измерительную ячейку одинаковой концентрации ГГС. Вид зависимости ответа созданных сенсоров от времени приведен на рисунке 21.







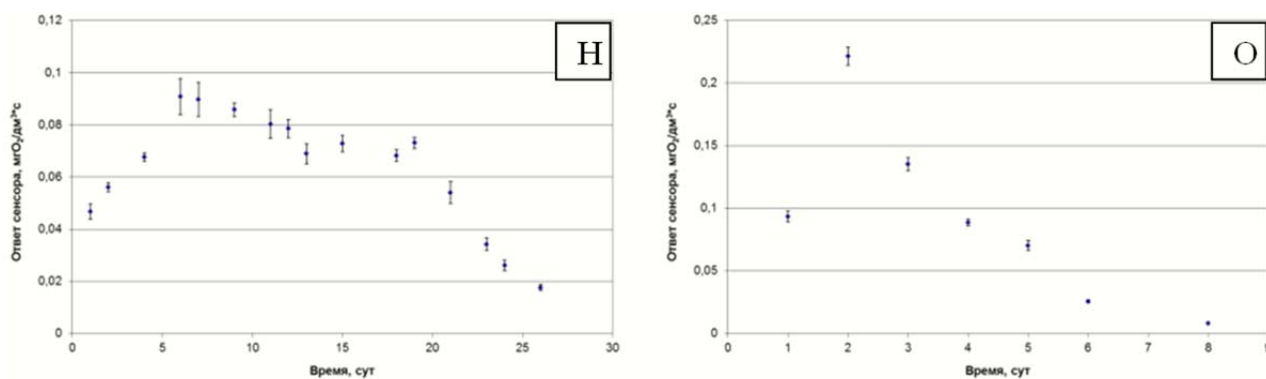


Рис. 21. Долговременная стабильность биосенсоров на основе: А – *Ogataea angusta* ВКМ Y-1397; Б – *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559; В – *Ogataea parapolyomorpha* ВКМ Y-2518; Г – *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2677; Д – *Candida boidini* ВКМ Y-2356; Е – *Candida maltosa* ВКМ Y-2359; Ж – *Candida blankii* ВКМ Y-2675; З – *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482; И – *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-111; К – *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-1585; Л – *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-1050; М – *Saccharomyces bayanus* ВКМ Y-349; Н – *Saccharomyces pasterianus* ВКМ Y-507; О – *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* В-1280.

У большинства сформированных рецепторных элементов биосенсоров наблюдается некоторое снижение активности в первые дни после иммобилизации. Это может быть объяснено адаптацией микроорганизмов к изменившимся условиям внешней среды при иммобилизации. Лучшей стабильностью обладают иммобилизованные микроорганизмы *B. adenivorans* ВКМ Y-2677 и *D. hansenii* ВКМ Y-2482. Сводные результаты по долговременной стабильности биосенсоров на основе выбранных микроорганизмов приведены в таблице 7.

Для сопоставления биокаталитических характеристик исследуемых микроорганизмов проведен сравнительный анализ чувствительности биосенсоров на их основе. Коэффициент чувствительности определяли как тангенс угла наклона зависимости ответа биосенсора от значения БПК<sub>5</sub> (рис. 22, 23).

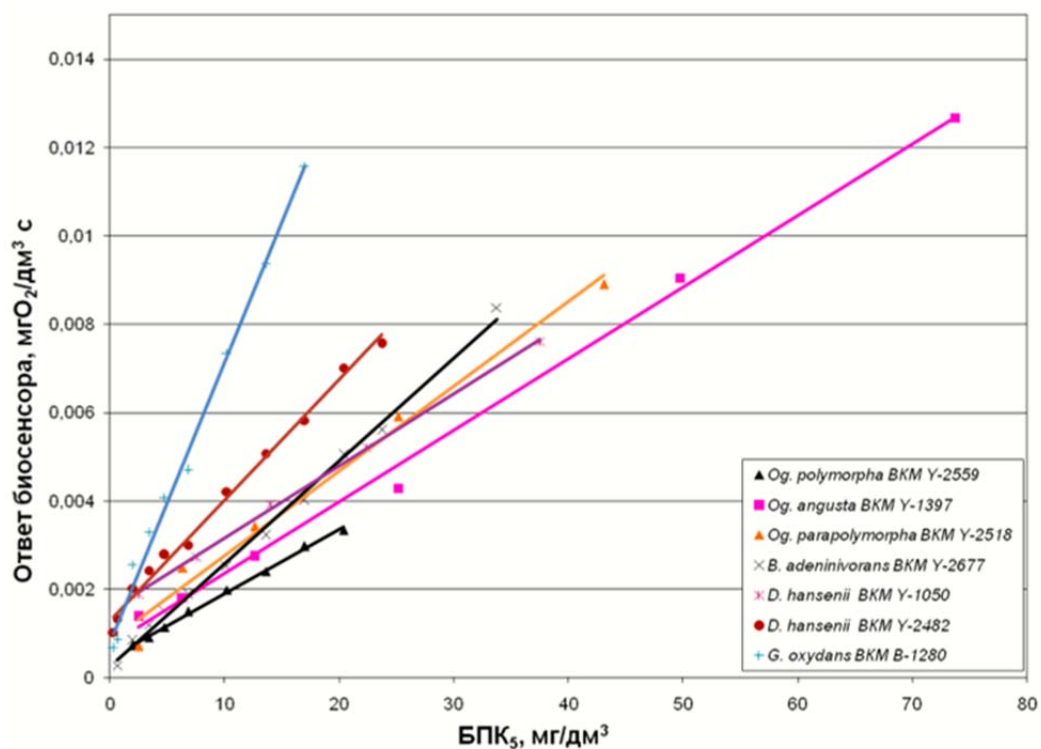


Рис. 22. Зависимость ответов биосенсоров на основе выбранных микроорганизмов от BPK<sub>5</sub> (линейные участки).

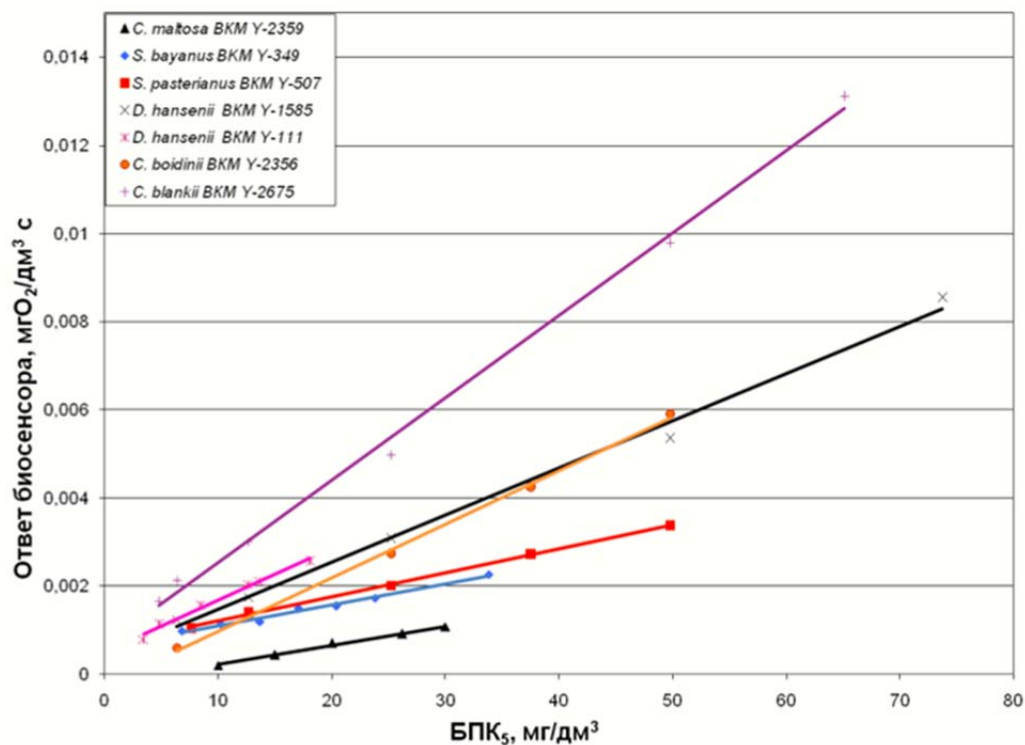


Рис. 23. Зависимость ответов биосенсоров на основе выбранных микроорганизмов от BPK<sub>5</sub> (линейные участки).

Сводные характеристики биосенсоров на основе выбранных микроорганизмов представлены в таблице 7.

Таблица 7. Основные характеристики биосенсоров с исследуемыми микроорганизмами.

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

Таким образом, на основе предложенного подхода к выбору микроорганизмов, основанного на сравнительном анализе их физиолого-

биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик, для дальнейшей работы по созданию БПК-биосенсора предлагается использовать микроорганизмы *D. hansenii* Y-2482, характеризующиеся наиболее широкой субстратной специфичностью, лучшей долговременной стабильностью и высокой чувствительностью в иммобилизованном состоянии.

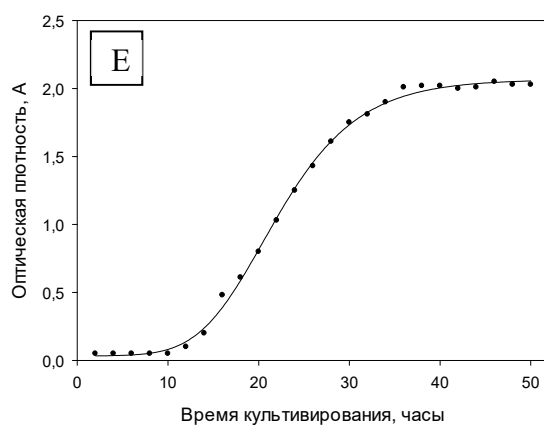
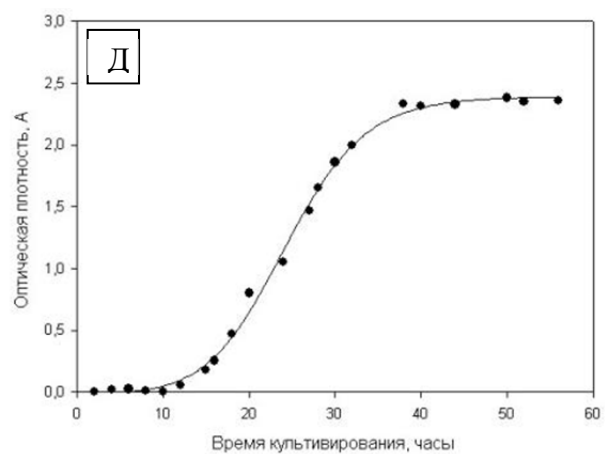
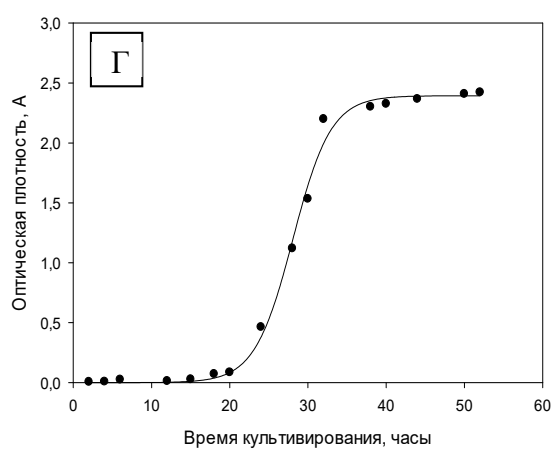
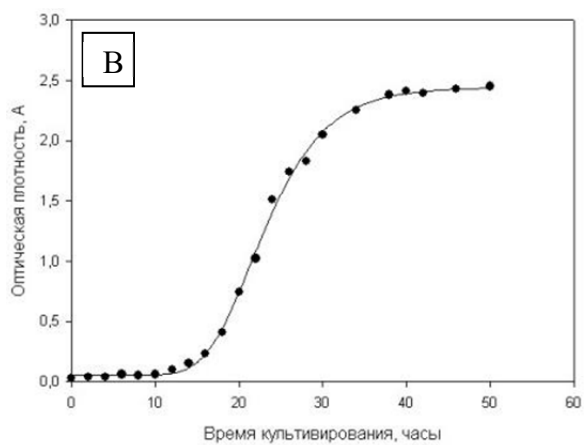
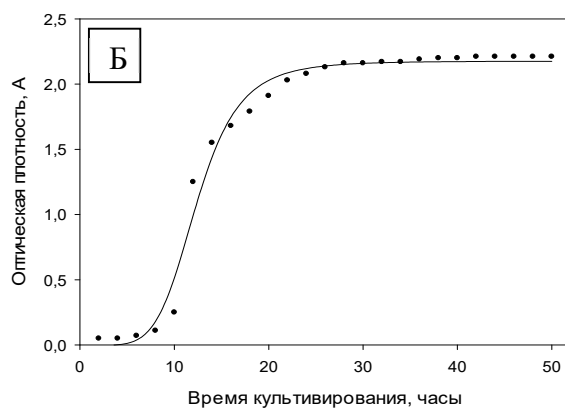
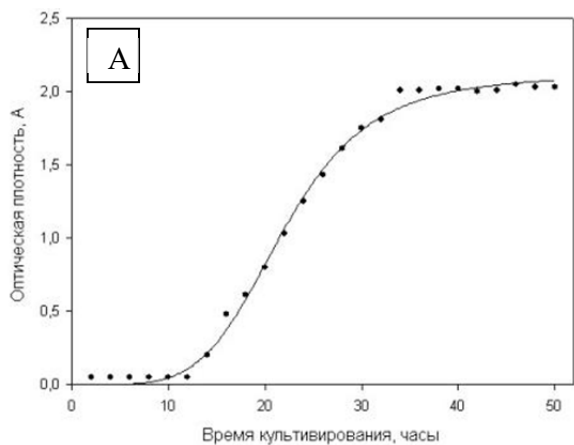
### **1.3. Разработка подхода для расширения спектра определяемых органических веществ на основе использования искусственных ассоциаций микроорганизмов в рецепторном элементе биосенсора**

Для увеличения количества окисляемых веществ и, как следствие, снижения ошибки определения БПК-биосенсором применяют ассоциации микроорганизмов. Несмотря на описанные в литературе БПК-биосенсоры, основанные на применении сообществ микроорганизмов, в большинстве случаев используются сообщества микроорганизмов, выделенных совместно из определенного источника [41, 69]. Многообещающим подходом может быть создание искусственных ассоциаций, подобранных на основании сравнительного анализа их метаболических и физиолого-биохимических параметров. Это даст возможность создавать рецепторные элементы, способные реагировать на широкий спектр органических веществ без проведения длительных и трудоемких экспериментов с природными сообществами микроорганизмов. Кроме того, природные сообщества адаптированы под конкретный тип сточных и поверхностных вод, в то время как создаваемые искусственные ассоциации могут включать разные микроорганизмы и быть универсальными.

### *1.3.1. Составление искусственных ассоциаций микроорганизмов*

Проведенные ранее исследования показали, что субстратная специфичность сообществ микроорганизмов может не соответствовать сумме субстратных специфичностей входящих в них микроорганизмов. В некоторых случаях спектр окисляемых субстратов ассоциации, может быть, даже уже спектра отдельных культур [162]. Это может объясняться конкуренцией отдельных микроорганизмов между собой за окисление наиболее легко утилизируемого вещества. Для составления ассоциаций, характеризующихся широким спектром окисляемых 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.

Известно, что микроорганизмы способны к росту и размножению в иммобилизованном виде [163]. Так как функционирование биосенсора связано с окислением микроорганизмами органических веществ, в том числе азотсодержащих, с течением времени состав ассоциации в биорецепторном элементе может меняться. Быстрорастущие микроорганизмы могут вытеснять из ассоциации микроорганизмы, растущие медленнее. Поскольку ключевыми требованиями к искусственным ассоциациям микроорганизмов, применяемым в рецепторных элементах БПК-биосенсоров, являются стабильность состава и широкая субстратная специфичность, в настоящей работе ассоциации формировались на основе сходства их ростовых параметров (времен фаз роста и удельной скорости роста) и различия спектра окисляемых субстратов отдельных микроорганизмов. Оценка спектра окисляемых субстратов отдельных штаммов исследуемых микроорганизмов представлена в таблице 1. Для оценки ростовых параметров микроорганизмов, показывающих лучшие характеристики (таблица 7), были получены их кривые роста турбидиметрическим методом (рис. 24).



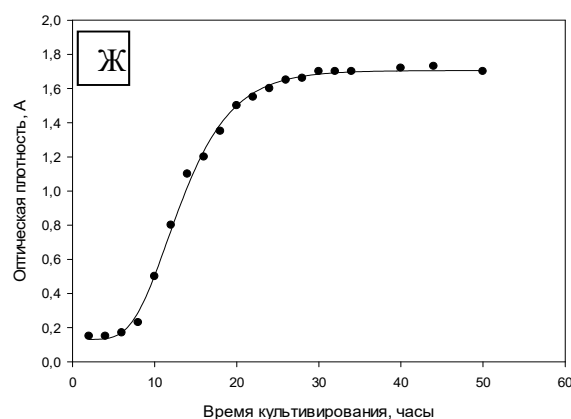


Рис. 24. Кривые роста микроорганизмов: А – *Og. angusta* ВКМ Y-1397; Б – *Og. parapolyomorpha* ВКМ Y-2518; В – *B. adenivorans* ВКМ Y-2677; Г – *D. hansenii* ВКМ Y-2482; Д – *D. hansenii* ВКМ Y-111; Е – *C. boidinii* ВКМ Y-2356; Ж – *G. oxydans* ВКМ В-1280.

Удельная скорость роста микроорганизмов ( $\mu$ ,  $\text{ч}^{-1}$ ) зависит от концентрации ростовых субстратов и физиолого-биохимических характеристик микроорганизмов и определяется в линейной фазе роста, когда можно пренебречь частичным расходом субстратов. Определение удельной скорости роста производили по уравнению  $\ln N = \ln N_0 + \mu \cdot t$ , считая при этом, что число микроорганизмов пропорционально оптической плотности суспензии микроорганизмов. Ростовые характеристики микроорганизмов представлены в таблице 8.



Таблица 8. 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

На основе полученных данных по спектру окисляемых веществ (таблица 4–6) и ростовым параметрам (таблица 8) 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 субстратную специфичность. 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 дрожжам ассоциации 1 добавили микроорганизмы *Debaryomyces hansenii* Y-2482, что позволило расширить субстратную специфичность за счет некоторых углеводов и аминокислот (аспарагиновой кислоты, ксилозы). При этом ростовые характеристики дрожжей *Debaryomyces* отличаются от ростовых характеристик микроорганизмов ассоциации 1. Такое различие может привести к изменению соотношения микроорганизмов в процессе работы биосенсора. При составлении ассоциации 3 использовали

подход совместной иммобилизации уксуснокислых бактерий *G. oxydans* и метилотрофных дрожжей *Og. parapolyomorpha*. Дрожжи *Ogataea* с высокой скоростью метаболизируют спирты, а бактерии *Gluconobacter* с высокой скоростью метаболизируют многие углеводы, которые не метаболизируют дрожжи *Ogataea*. Оба штамма микроорганизмов используются при создании биосенсоров для детекции спиртов и углеводов, характеризующихся высокой чувствительностью [83, 160, 164]. Кроме того, оба штамма обладают близкими ростовыми характеристиками. Данная ассоциация может быть применима при создании специализированного БПК-биосенсора для анализа стоков биотехнологических предприятий.

### ***1.3.2. Определение стабильности состава созданных искусственных ассоциаций микроорганизмов***

Нестабильность соотношения микроорганизмов в искусственных ассоциациях во времени является серьезным препятствием к внедрению биосенсоров на их основе. В большинстве публикаций по разработке биосенсоров, основанных на ассоциациях микроорганизмов, приводится время стабильной работы биосенсора [3]. Однако высокий сигнал биосенсора может быть обусловлен только одним или несколькими применяемыми штаммами. Устойчивость состава созданных искусственных ассоциаций микроорганизмов во времени изучали с использованием оптического микроскопирования и путем подсчета КОЕ высевом микроорганизмов на твердые питательные среды. Условия, при которых находились искусственные ассоциации, были приближены к условиям их использования в рецепторном элементе биосенсора: комнатная температура, хранение в буферном растворе, ежедневное промывание раствором глюкозо-глутаматной смеси. Результаты проведенного микробиологического анализа количества жизнеспособных клеток микроорганизмов представлены на рисунке 25.

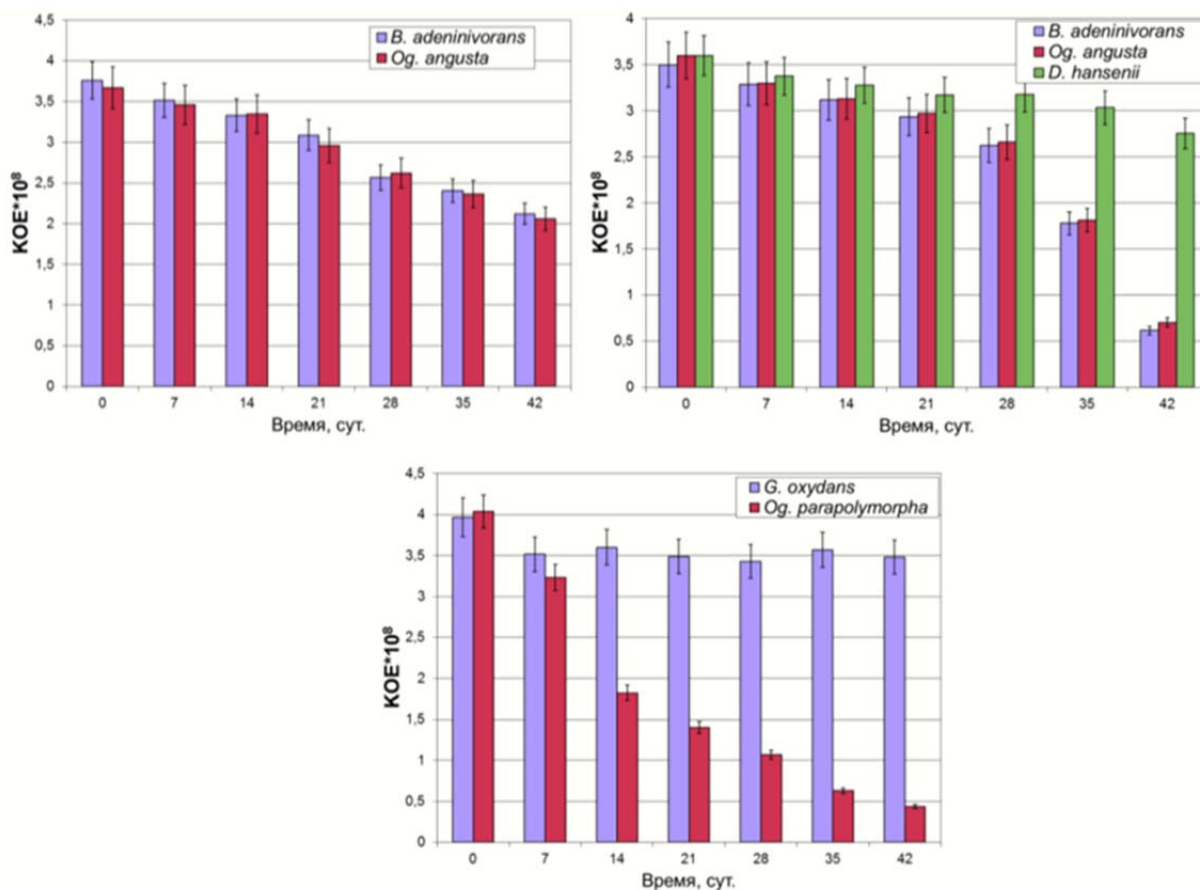


Рис. 25. Изменение микробного состава созданных ассоциаций во времени.

На основании результатов проведенного микробиологического анализа количества жизнеспособных клеток показано, что ассоциация дрожжей *B. adenivorans* и *Og. angusta*, как и предполагалось, оставалась устойчивой в течение всего времени исследования (42 суток). По данным анализа методом Коха и данным микроскопии микробный состав ассоциации 2 начал существенно меняться только после 3 недель эксперимента. К концу периода исследования число клеток дрожжей *Debaryomyces* в 4 раза превышало число клеток других дрожжей. Это может объясняться более высокой скоростью роста дрожжей *Debaryomyces* по сравнению с другими микроорганизмами в ассоциации. Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность использования предложенного подхода к формированию искусственных ассоциаций микроорганизмов на основе сходства их ростовых

параметров и различия спектра окисляемых субстратов отдельных микроорганизмов.

Ассоциация 3 на основе бактерий и дрожжей значительно изменяет свой состав, с течением времени начинают преобладать бактерии *G. oxydans*. Несмотря на схожие ростовые параметры входящих в нее микроорганизмов, ассоциация 3 является неустойчивой. Это может объясняться более низкой устойчивостью дрожжей *Og. parapolymorpha* к изменениям окружающих условий при иммобилизации. Например, показано, что при совместном использовании бактериальные микроорганизмы могут вытеснять дрожжевые через 20 суток [165]. Таким образом, ассоциацию 3 далее не использовали.

### **1.3.3. Определение ключевых метаболических, биокаталитических и физиолого-биохимических характеристик созданных ассоциаций**

Для двух ассоциаций микроорганизмов, обладающих лучшей стабильностью, была проведена оценка спектра метаболической активности, стабильности функционирования в составе биорецептора и чувствительности БПК-биосенсора на ее основе (таблица 9). Для создания рецепторных элементов биосенсора был использован способ иммобилизации клеток физическим ограничением диализной мембраной.

Таблица 9. Сравнение субстратной специфичности рецепторных элементов на основе созданных искусственных ассоциаций.

Субстрат	<i>Og. angusta</i> , <i>B. adenivorans</i>	<i>Og. angusta</i> , <i>B. adenivorans</i> , <i>D. hansenii</i>
Метиловый спирт	да	да
Этиловый спирт	да	да
Пропиловый спирт	да	да
Бутиловый спирт	да	да
Изоамиловый спирт	слабый	слабый
Глицерин	да	да
D-глюкоза	да	да
Сахароза	слабый	слабый
D-галактоза	слабый	да
Лактоза	нет	слабый
D-ксилоза	нет	слабый
Метаналь	да	да
Метановая кислота	слабый	да
Этановая кислота	слабый	слабый
Глутамат	да	да
Лизин	слабый	слабый
Додecilсульфат Na	слабый	да
Додecilбензосульфонат Na	нет	слабый
Спектр метаболической активности, % от числа субстратов	83	100

«да» – значимый отклик сенсора,  
«слабый» – слабый отклик сенсора (менее 30% от максимального отклика),  
«нет» – отсутствует отклик сенсора.

Таким образом, наиболее широким спектром окисляемых субстратов обладает ассоциация на основе трех дрожжевых микроорганизмов: *Og. angusta*, *B. adenivorans*, *D. hansenii*. Данная ассоциация окисляет одноатомные и

многоатомные спирты, моно- и дисахариды, карбоновые и аминокислоты, ПАВ и нитрофенолы.

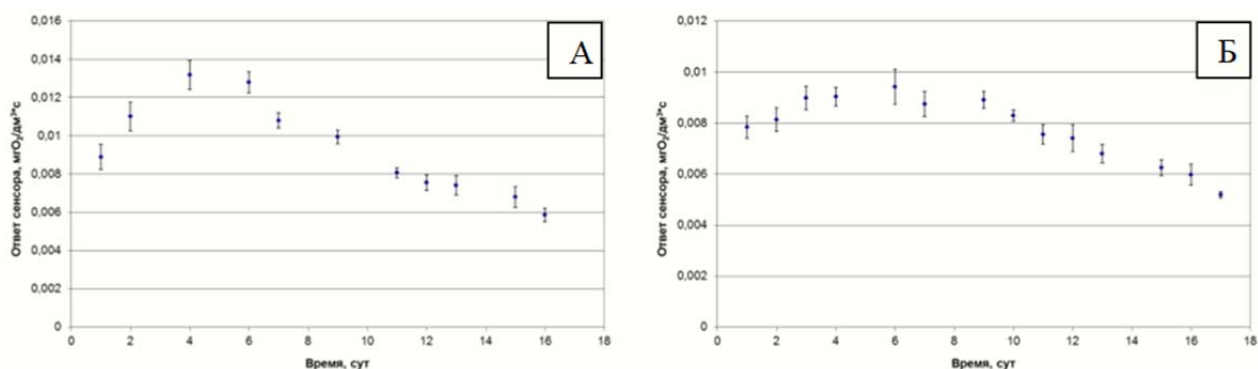


Рис. 26. Долговременная стабильность биосенсора с рецепторным элементом на основе искусственных ассоциаций: А – дрожжей *Og. angusta*, *B. adeninivorans*; Б – дрожжей *Og. angusta*, *B. adeninivorans*, *D. hansenii*.

Результаты определения долговременной стабильности для двух выбранных ассоциаций представлены на рисунке 26. У большинства сформированных рецепторных элементов биосенсоров на основе искусственных ассоциаций, так же как и при использовании единичных штаммов, наблюдается некоторое снижение активности в первые дни после иммобилизации. Биосенсоры на основе обеих созданных ассоциаций обладают близкой стабильностью. Сводные результаты по долговременной стабильности биосенсоров на основе ассоциаций приведены в таблице 1. Для сопоставления биокаталитических характеристик исследуемых микроорганизмов проведен сравнительный анализ чувствительности биосенсоров на их основе (рис. 27).

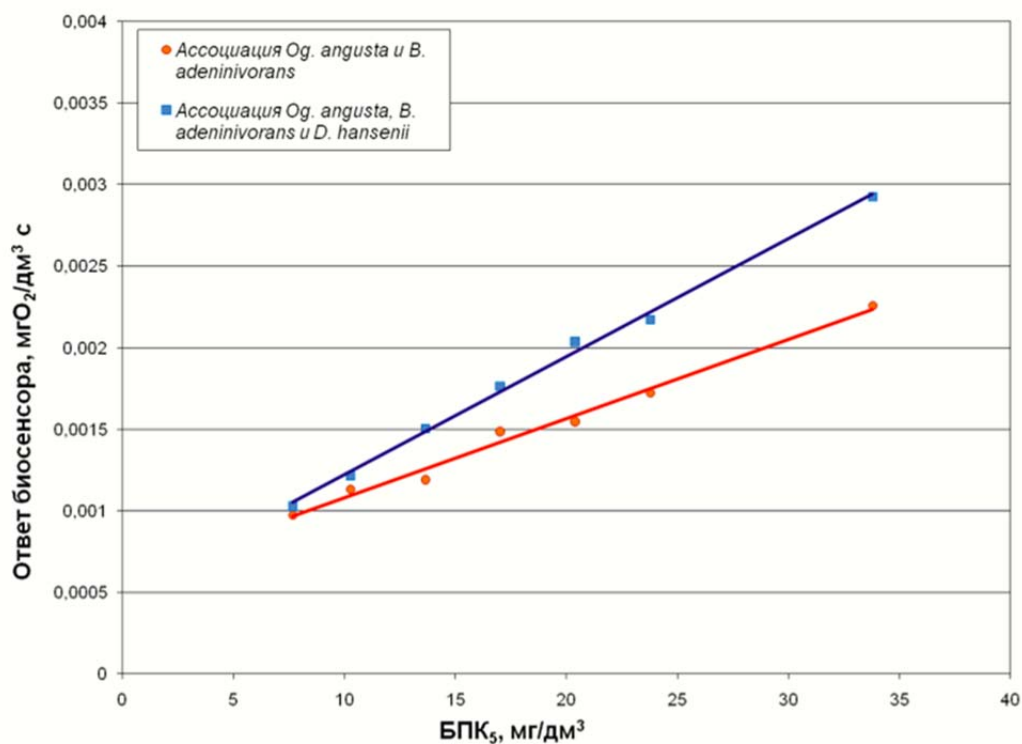


Рис. 27. Зависимость ответов биосенсоров на основе созданных ассоциаций от БПК<sub>5</sub> (линейные участки).

Сводные характеристики биосенсоров на основе созданных искусственных ассоциаций дрожжевых микроорганизмов представлены в таблице 10.

Таблица 10. Основные характеристики биосенсоров на основе исследуемых ассоциаций микроорганизмов.

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

Таким образом, ассоциация дрожжей *Og. angusta*, *B. adenivorans*, *D. hansenii* обладает широким спектром окисляемых веществ, достаточной стабильностью функционирования и чувствительностью и является перспективной при разработке биораспознающего элемента БПК-сенсора.

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

##### ***1.4.1. Особенности биоценоза активного ила очистных сооружений***

Активный ил является сложным биоценозом большого количества организмов. В биоценозе активного ила принято выделять 3 основных типа организмов, которые выполняют наиболее значимую роль в процессах очистки сточных вод: бактерии, простейшие, многоклеточные организмы. Чаще всего активный ил представляет собой хлопья бурого цвета, которые состоят преимущественно из бактериальных клеток различных родов. На поверхности этих хлопьев также могут находиться разнообразные простейшие.

Очистка сточных вод на начальном этапе производится микроорганизмами, питающимися путем использования растворенных органических веществ, проникающих через клеточную мембрану с помощью пассивного транспорта. Такой тип питания характерен для бактерий и жгутиконосцев, которые активно размножаются и имеют большую численность в активном иле. При этом больше всего органических загрязнений удаляется бактериями, так как они имеют большую удельную поверхность и быстрый метаболизм [166].



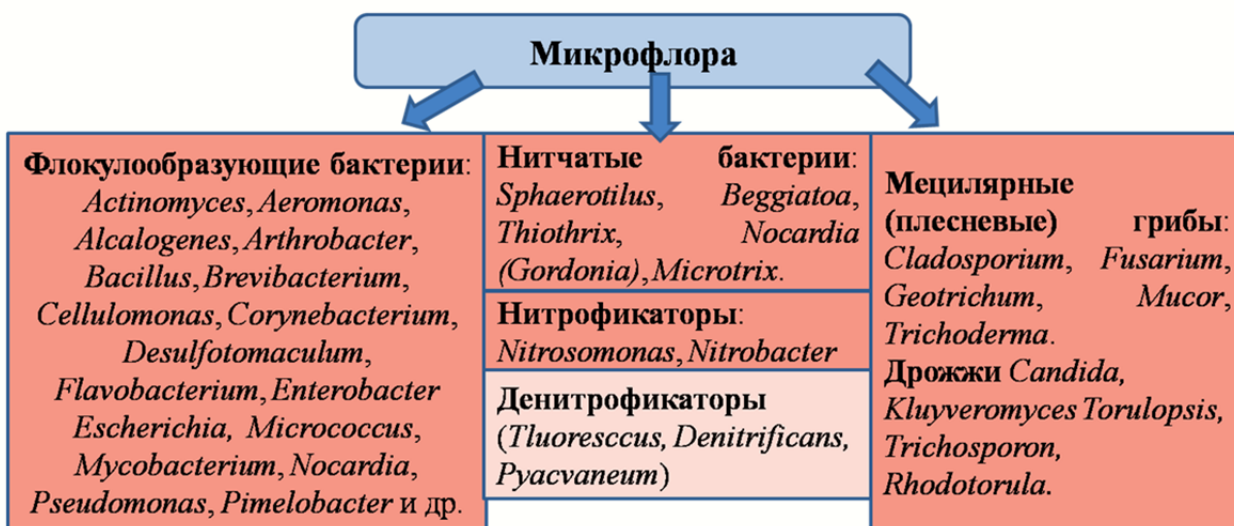


Рис. 28. Микроорганизмы активного ила [167].

Примерный состав активного ила представлен на рисунке 28, точный бактериальный состав активного ила зависит от типа очищаемых сточных вод. В активном иле очистных сооружений, используемых для очистки коммунальных сточных вод, обычно в больших количествах встречаются бактерии родов: *Pseudomonas, Achromobacter Flavobacterium* [167]. Кроме микроорганизмов в активном иле встречаются саркодовые, жгутиковые, ресничные, сосущие инфузории, различные амёбы, жгутиконосцы, панцирные и беспанцирные коловратки.

Поскольку каждый вид бактерий имеет определенный и различный набор ферментных систем, то он специализируется на окислении тех или иных органических веществ. Таким образом, чем разнообразнее бактериальный состав активного ила, тем более полно пройдет очистка воды от органического загрязнения. При этом изменение состава сточных вод приводит к замедлению процесса их биологической очистки, поскольку активному илу необходимо время на адаптацию и увеличение численности микроорганизмов, окисляющих преобладающие в стоках вещества.

Количество микроорганизмов в кубическом сантиметре аэротенка доходит до  $2,4 \times 10^9$ , что намного превосходит их содержание в природе. Именно это и дает возможность производить быструю очистку стоков от

загрязняющих веществ. Гетеротрофные бактерии играют решающую роль в разрушении органических веществ. Большая часть бактерий активного ила городских очистных сооружений относится к аэробным грамотрицательным неспорообразующим палочкам (например, *Pseudomonas*). Нитчатые бактерии также часто присутствуют в активном иле, но из-за более низкой скорости размножения уступают в численности сапрофитным бактериям. Повышение содержания нитчатых бактерий может вызвать вспухание активного ила. Наряду с гетеротрофными бактериями, в активном иле содержатся и хемосинтезирующие, из которых чаще всего могут быть нитрифицирующие бактерии родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*.

Важным параметром активного ила служит способность к флокуляции. Она проявляется в способности микроорганизмов образовывать хлопья. Скорость утилизации органических веществ значительно выше при нахождении ила во флокулированном состоянии. Этот процесс происходит за счет выделения микроорганизмами активного ила внеклеточных полисахаридов. Кроме этого, в выделяемый илом гель входят внеклеточные ферменты, клетчатки и белки.

#### ***1.4.2. Выделение микроорганизмов активного ила, перспективных для создания БПК-биосенсора***

Поскольку активный ил применяется в стандартном методе определения БПК, для повышения правильности анализа с использованием биосенсора перспективным является использование выделенных из него микроорганизмов в качестве основы биораспознающего элемента БПК-сенсора. Применение активного ила для разработки БПК-анализаторов описано в ряде работ [3, 22, 23]. Необходимо отметить, что из-за меняющегося микробного состава активного ила существенно затрудняется и стандартизация рецепторных элементов на его основе.

Из активного ила, предоставленного городскими очистными сооружениями, были изолированы входящие в состав бактериальные микроорганизмы. Выделение микроорганизмов проводили на среде LB по методу Коха (рис. 29).

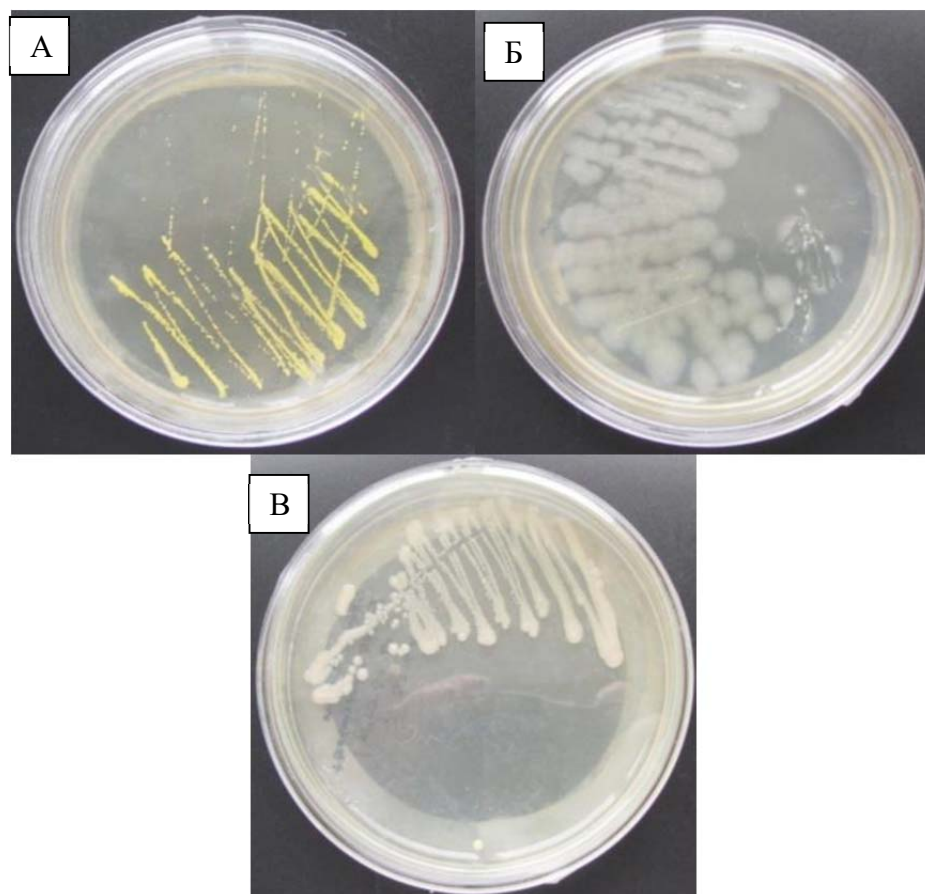


Рис. 29. Фотографии выделенных микроорганизмов активного ила, растущих на агаризованной питательной среде LB: А – *Paracoccus yeei* ВАА-599<sup>T</sup>; Б – *Bacillus proteolyticus* TD42<sup>T</sup>; В – *Pseudomonas veronii* DSM 11331<sup>T</sup>.

Для формирования биосенсора были взяты 3 микроорганизма прокариот, имеющие наибольшую численность в образце ила. Для этих бактерий был произведен анализ гена 16S рРНК. По его результатам 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%). Поскольку эти бактерии ранее не использовались при создании биосенсоров, необходимо было определить их

ростовые параметры и окислительную активность на разных фазах роста (рис. 30, таблица 11).

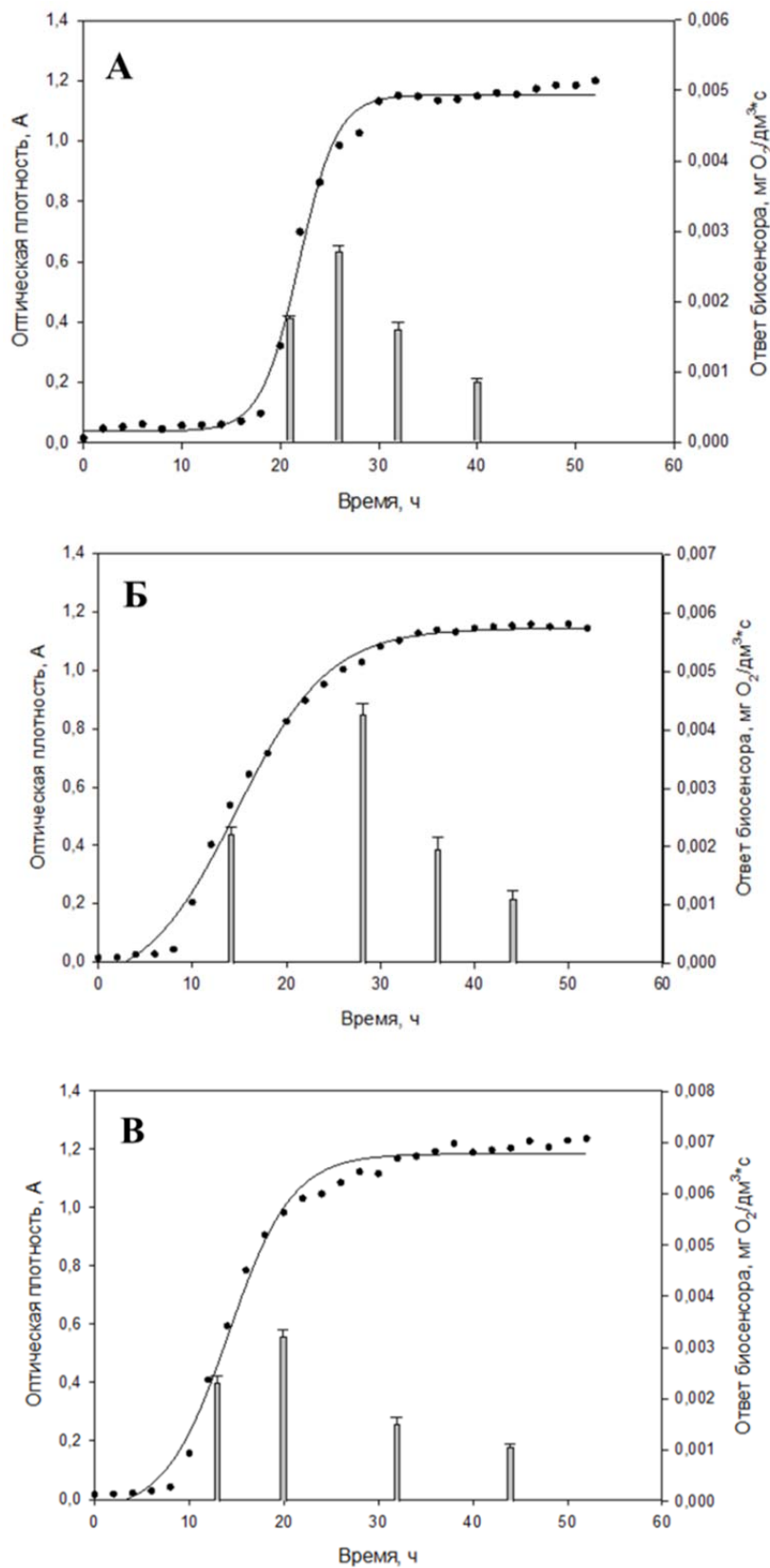


Рис. 30. Кривые роста изолированных бактерий: А – *Paracoccus*; Б – *Pseudomonas*; В – *Bacillus*.

Таблица 11. Ростовые характеристики микроорганизмов ила.

Микроорганизмы	Лаг-фаза, ч	Логарифмическая фаза, ч	Стационарная фаза, ч	Максимальная активность, ч
<i>Paracoccus yeei</i> ВАА-599 <sup>Т</sup>	0–16	16–32	32–52	26
<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 <sup>Т</sup>	0–6	6–36	36–52	28
<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 <sup>Т</sup>	0–6	6–32	32–52	20

Таким образом, бактерии *Paracoccus* в отличие от других выделенных из активного ила микроорганизмов характеризуются большой лаг-фазой. Всем бактериям характерны короткие экспоненциальные фазы и быстрый выход кривой роста на стационар. Для определения времени роста с максимальной метаболической активностью бактерий получены зависимости ответа сенсора с биорецепторными элементами на основе индивидуальных культур микроорганизмов (рис. 30). Для этого были взяты образцы культуральной жидкости с бактериями *Pseudomonas veronii* после 14, 28, 36 и 44 часа роста, культуральной жидкости с бактериями *Bacillus thuringiensis* после 13, 20, 32 и 44 часа роста и культуральной жидкости с бактериями *Paracoccus yeei* после 21, 26, 32 и 40 часов роста. Далее микроорганизмы были выделены из ростовой среды центрифугированием. Для формирования биорецепторного элемента биомассу разбавляли буфером 1:1 и иммобилизовали в диализную мембрану на электроде. Измерения проводили с использованием 1 моль/дм<sup>3</sup> раствора глюкозы. На основании полученных результатов можно сделать следующий вывод: наибольшая активность бактерий *Paracoccus yeei*, *Pseudomonas veronii* и

*Bacillus proteolyticus* отмечается в фазе замедления роста (26, 28 и 20 часов соответственно). Дальнейшие исследования проводили при найденном оптимальном времени культивирования.

#### **1.4.3. Особенности выделенных из активного ила микроорганизмов *Pseudomonas veronii*, *Paracoccus yeei* и *Bacillus proteolyticus***

Род *Paracoccus* в настоящее время содержит 31 признанный вид. Бактерии *Paracoccus yeei* (семейства *Rhodobacteraceae*) являются облигатными аэробами, неферментирующими грамотрицательными кокками (диаметром 0,5–0,9 мкм), неподвижны и не образуют спор. Могут быть одиночными, в парах или образовывать тетракокки. На твердой питательной среде образуют пигментированные круглые и выпуклые колонии (рис. 31) [168]. Способны расти при солености среды от 0 до 5,0% (слабые галофилы, оптимум 1,0%) в диапазоне температур от 4 до 48°C (мезофилы, оптимум 28°C), предпочитают нейтральный pH среды.

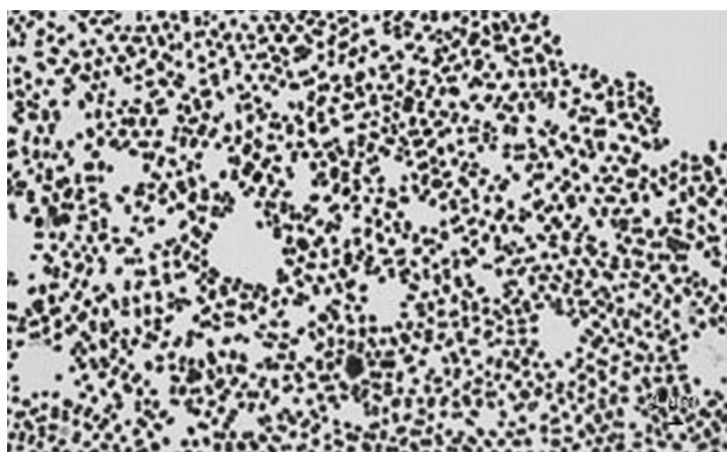


Рис. 31. Бактерии *Paracoccus yeei* [169].

Данные микроорганизмы дают отрицательные реакции на орнитин, малонат, сорбитол, индол, глюконат, капрат и цитрат, на наличие в ферментативной системе рамнозы, рафинозы, уреазы, желатиназы; и положительные реакции – на снижение нитратов (денитрифицирующая активность), аргинин, арабинозу и ассимиляцию малата. Отличаются хорошей

целлюлолитической активностью [169]. Бактерии *Paracoccus yeei* были найдены в различных средах. Последовательности генов 16S рРНК ряда природных *Paracoccus yeei* были представлены GenBank, эти штаммы были выделены из морских осадков сладкого перца, молочных продуктов, почвы [170]. Бактерии *Paracoccus* могут метаболизировать большой круг органических веществ.

Бактерии *Pseudomonas veronii* (семейства *Pseudomonadales*) представляют собой подвижные грамотрицательные неспорообразующие палочки (с размерами 0,6 мкм в ширину и 2,0 мкм в длину). Колонии на агаризованной среде LB бело-желтого цвета, слегка выпуклые и умеренно слизистые, с гладкими краями (рис. 32). Оптимальная температура роста составляет 28°C (мезофилы). Тем не менее, данные бактерии способны реплицироваться при 5°C в жидкой питательной среде LB. Рост при 37°C через 24 ч не наблюдался в этой среде культивирования [171].



Рис. 32. Бактерии *Pseudomonas veronii* [171].

Данные микроорганизмы обладают каталазной и оксидазной активностью, но характеризуются отсутствием в ферментативной системе липазы и лецитиназы. Бактерии *Pseudomonas veronii* дают положительные реакции на окисление D-рибозы, маннита, D-ксилозы, L-арабинозы, глюкозы, глюконата, D-маннозы, D-галактозы, D-фруктозы, сахарозы, пропионата, бутирата, изобутирата, валерата, капроата, малоната, глицерата, эритрита,

сорбита, инозита, п-гидроксибензоата, альфа-аминобутирата, D-аланина, L-серина, L-изолейцина, L-валина, L-фенилаланина, L-триптофана, этаноламина; и отрицательные реакции на деградацию L-рамнозы, изовалерата, D-малата, тартрата, адонита, D-миндальной кислоты, L-миндальной кислоты, бензоата, о-гидроксибензоата, фенилацетата, м-гидроксибензоата, D-триптофана, креатина, глицина, L-лизина, L-кинуруенина, бензиламина, гистамина, триптамина, бутиламина, амиламина и ацетамида [172]. Обладают уникальными катаболическими путями для деградации ряда трудноокисляемых ароматических соединений (бензол, толуол, нафталин, антрацен, флуорантен, пирен, 2-бутанон, 2-гексанол, метилкетоны, пентахлорфенол, дибензофуран, дибензо-п-диоксин и др.), поэтому часто используются в биопрепаратах, применяемых для биоремедиации почв и воды от нефтяных загрязнений. В статье [173] изучен геном бактерий *Pseudomonas veronii* 1YdVTEX2 и выявлена их толуол-деградирующая способность.

Представители вида *Pseudomonas veronii* являются весьма универсальными и способны колонизировать разнообразные среды обитания, в том числе людей, животных, растений, воды и почвы. Данный вид бактерий был выделен из корней здоровых виноградных кустарников в долине Мейпо (Центральное Чили) [171].

Для бактерий *Bacillus proteolyticus* характерны прямые, крупные подвижные за счет перитрихальных жгутиков палочки, формирующие длинные цепочки (размеры 5×1 мкм). По Граму не окрашиваются, считаются факультативными анаэробами и хемоорганогетеротрофами. Оптимум роста данных бактерий зафиксирован при температуре 30–32°C (мезофилы) и нейтральном pH (пределы pH 5,7–8,2). Известно, что данные бактерии способствуют разложению органических накоплений в прудах аквакультуры [174]. Штамм *B. proteolyticus* CFR3001 был выделен из отходов переработки рыбы [175].



#### 1.4.4. Определение ключевых метаболических, биокаталитических и физиолого-биохимических характеристик выделенных микроорганизмов

Для активного ила и выделенных из него микроорганизмов была проведена оценка спектра метаболической активности, стабильности функционирования в составе биорецептора и чувствительности БПК-биосенсора на ее основе (таблица 12). Для создания рецепторных элементов биосенсора был использован способ иммобилизации клеток физическим ограничением диализной мембраной.

Таблица 12. Сравнение субстратной специфичности рецепторных элементов на основе выделенных микроорганизмов активного ила.

Субстрат	<i>P. yeai</i> ВАА-599 <sup>Т</sup>	<i>P. veronii</i> DSM 11331 <sup>Т</sup>	<i>B. proteolyticus</i> TD42 <sup>Т</sup>	Активный ил
Метиловый спирт	слабый	нет	нет	слабый
Этиловый спирт	да	слабый	слабый	да
Пропиловый спирт	да	слабый	слабый	да
Бутиловый спирт	да	слабый	слабый	да
Изоамиловый спирт	слабый	слабый	слабый	слабый
Глицерин	да	слабый	да	да
D-глюкоза	да	да	да	да
Сахароза	да	да	да	да
D-галактоза	да	да	да	да
Лактоза	слабый	слабый	да	слабый
D-ксилоза	слабый	слабый	слабый	слабый
Метаналь	нет	нет	слабый	слабый
Метановая кислота	да	да	да	да
Этановая кислота	слабый	да	слабый	слабый
Глутамат	да	да	да	да
Лизин	слабый	да	да	да
Додецилсульфат Na	да	слабый	да	да

Додецилбензосульфонат Na	да	слабый	да	да
Спектр метаболической активности, % от числа субстратов	94	89	94	100

«да» – значимый отклик сенсора,

«слабый» – слабый отклик сенсора (менее 30% от максимального отклика),

«нет» – отсутствует отклик сенсора.

Бактерии *Paracoccus yeei*, выделенные из активного ила, характеризуются высокой чувствительностью к глюкозе, галактозе и сахарозе. При этом окисление дисахаридов проходило так же интенсивно, как и моносахаридов. Из анализируемых спиртов достаточно активно проходило окисление этанола, пропанола и бутанола. Низкая окислительная активность данных бактерий наблюдается по отношению к метанолу. Бактерии *Pseudomonas veronii* характеризуются высокой скоростью окисления многих углеводов, в том числе дисахаридов. Они с низкой скоростью метаболизируют одноосновные и многоосновные спирты, за исключением метилового. Бактерии *Bacillus proteolyticus* также с высокой скоростью метаболизируют моносахариды. Окисление дисахаридов проходило медленнее, чем моносахаридов. Исходя из полученных результатов, выделенные бактериальные микроорганизмы имеют широкие перспективы использования в БПК-анализаторах благодаря широкому кругу окисляемых веществ.

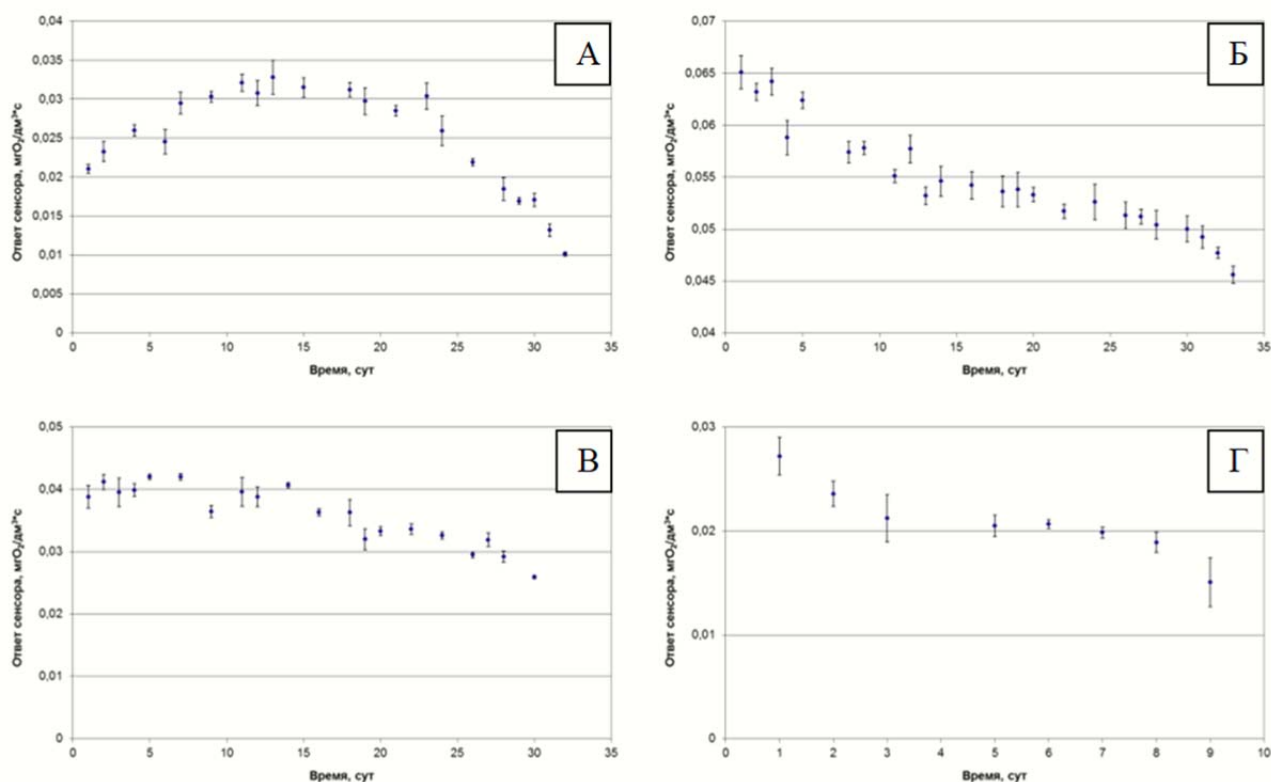


Рис. 33. Долговременная стабильность биосенсора с рецепторным элементом на основе: А – *P. yeii*; Б – *P. veronii*; В – *B. proteolyticus*; Г – активного ила.

Биосенсоры на основе всех трех выделенных из активного ила бактериальных микроорганизмов обладают близкой стабильностью (рис. 33). Сводные результаты по долговременной стабильности биосенсоров на основе выбранных микроорганизмов приведены в таблице 13. Для сопоставления биокаталитических характеристик исследуемых микроорганизмов проведен сравнительный анализ чувствительности биосенсоров на их основе (рис. 34).

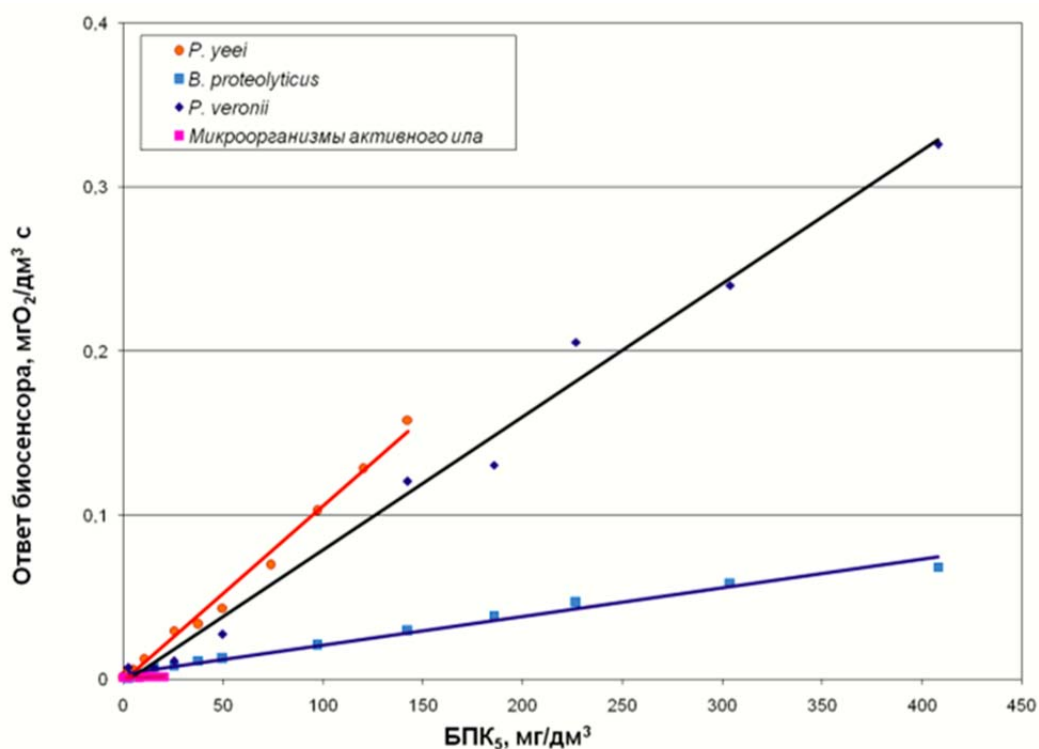


Рис. 34. Зависимость ответов биосенсоров на основе выделенных бактерий от БПК<sub>5</sub> (линейные участки).

Сводные характеристики биосенсоров на основе микроорганизмов активного ила представлены в таблице 13.

Таблица 13. Основные характеристики биосенсоров на основе выделенных бактерий.

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

Биосенсоры на основе индивидуальных микроорганизмов существенно превосходят биосенсор на основе естественного сообщества по

чувствительности и стабильности работы. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что биосенсор на основе бактерий *P. yeii* ВАА-599<sup>Т</sup> характеризуется наиболее высокой чувствительностью и спектром окисляемых субстратов, что делает данные бактерии перспективными в дальнейшей работе по созданию БПК-биосенсора.

Данные микроорганизмы ввиду своей перспективности в аналитической биотехнологии для создания БПК-биосенсоров были охарактеризованы (таблица 14) и депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером В-3302 (Приложение 1). Нуклеотидная последовательность микроорганизмов размещена в DDBJ/ENA/GenBank под номером MG280783.

Таблица 14. Характерные признаки штамма *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302.

Признак	Характеристика
Морфология	кокки
Размер клеток	0,5-1 мкм
Клеточная стенка и реакция по Граму	отрицательные
Спорообразование, количество, расположение в клетке и форма спор	не спорообразующие
Тип деления, почкование	бинарный
Простеки	нет
Подвижность	неподвижные
Жгутикование	отсутствует
Пигментация колоний/биомассы на стандартной среде	желтые
Выделяемый в среду пигмент	нет
Оксидаза	положительная
Каталаза	положительная

Отношение к кислороду	аэробы
Используемые источники углерода	этанол, бутанол, глицерин, ацетат натрия, глюкоза, фруктоза, ксилоза, галактоза, манноза, сахароза, лактоза.

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

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

### ***1.5.1. Влияние рН на окислительную активность микроорганизмов***

Одним из факторов, оказывающих влияние на активность ферментных систем микроорганизмов, является рН среды. Ферменты меняют свою активность при изменении рН, при этом оптимальной ферментативной активности соответствует характерная область рН, а увеличение или уменьшение рН ведет к снижению ферментативной активности. Указанная зависимость определяется значениями констант диссоциации ионогенных групп в молекулах ферментов. Особенно сильное влияние оказывают ионогенные группы, находящиеся в активном центре фермента. Таким образом, для работы с клетками микроорганизмов важно поддерживать определенные значения рН с помощью соответствующих буферных растворов.

В работе определена зависимость дыхательной активности выбранных микроорганизмов *Paracoccus yeii* (рис. 35), *Debaryomyces hansenii* (рис. 36), и

ассоциации (рис. 37) в зависимости от водородного показателя среды в диапазоне 5,6–7,8.

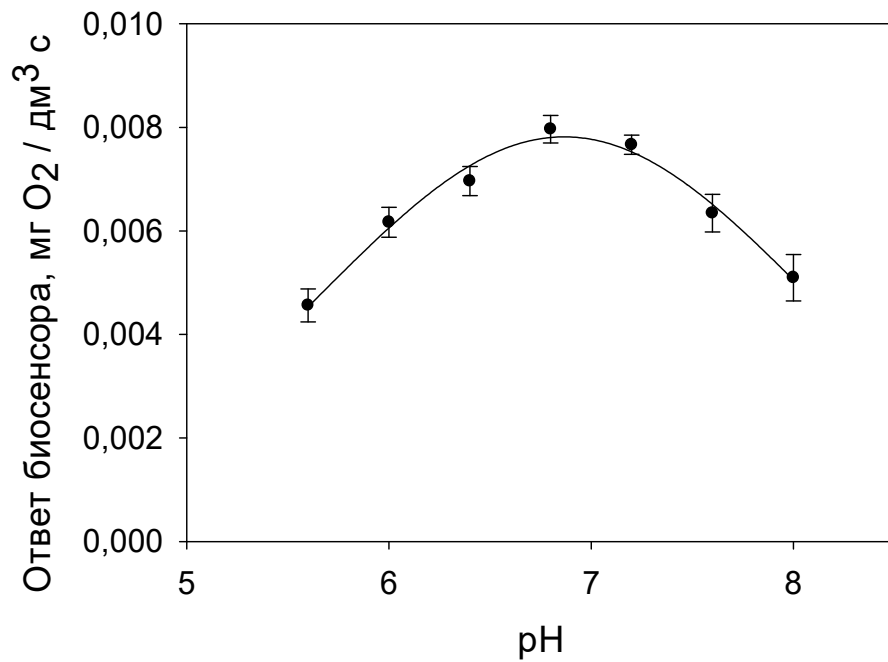


Рис. 35. Зависимость дыхательной активности *D. hansenii* от pH.

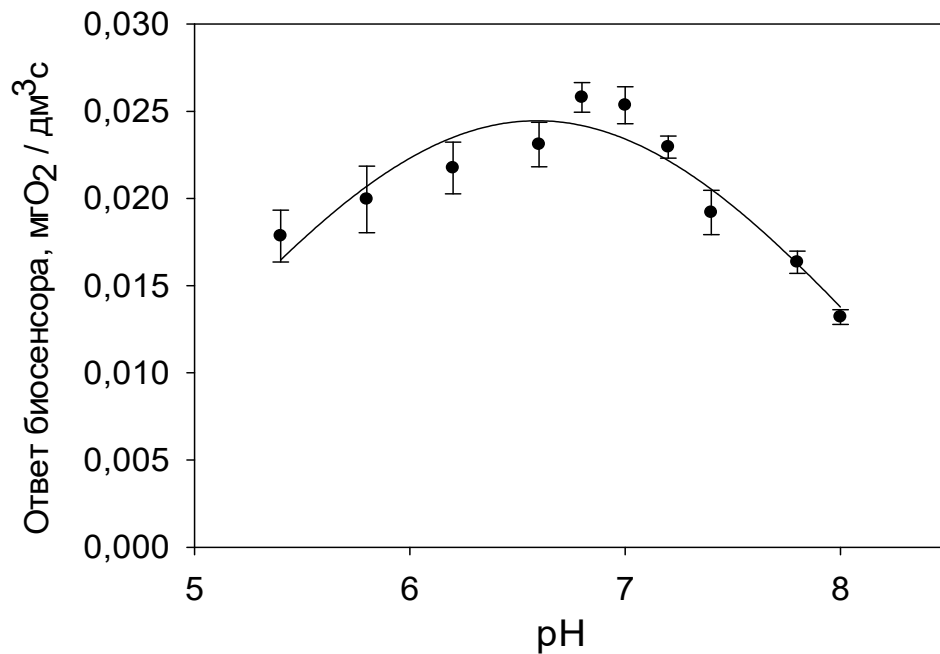


Рис. 36. Зависимость дыхательной активности *P. yeii* от pH.

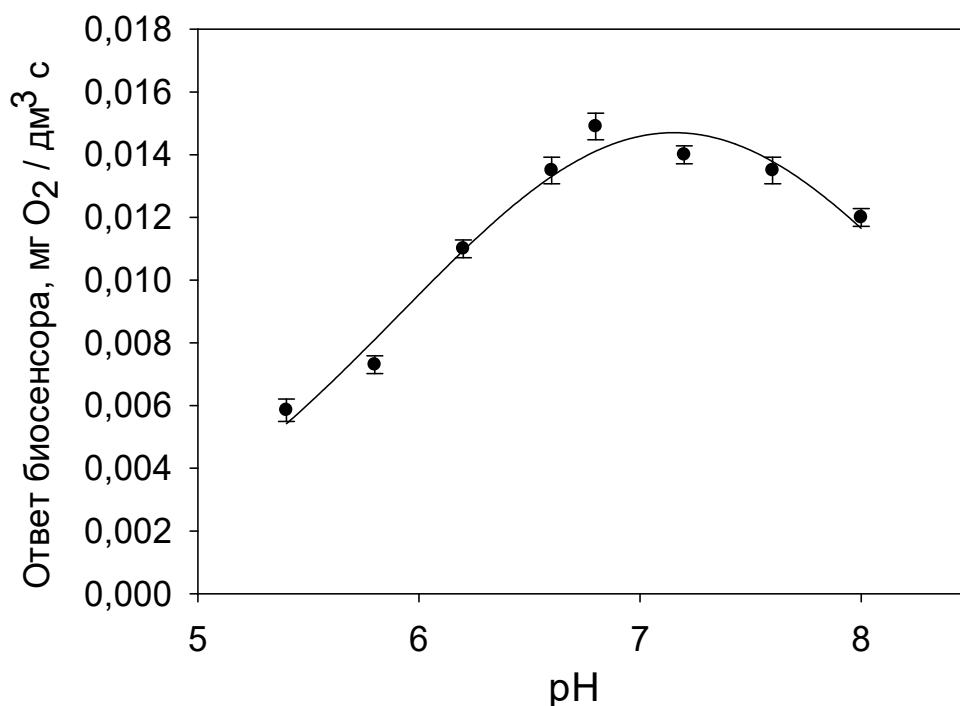


Рис. 37. Зависимость дыхательной активности ассоциации от pH.

Таким образом, наибольшая дыхательная активность *Debaryomyces hansenii* отмечается при pH = 6,8, что соответствует описанному в литературе оптимальному диапазону для культивирования 4,0–7,0 [176]. Для бактерий *P. yeii* максимальный ответ биосенсора наблюдается при pH = 6,6. При иммобилизации ассоциации дрожжей наибольшая дыхательная активность соответствует pH = 7,2.

### **1.5.2. Влияние ионной силы раствора на дыхательную активность микроорганизмов**

Повышение ионной силы среды, как правило, негативно влияет на окислительную активность микроорганизмов. Осмотическое давление внутри клетки поддерживается клеточной мембраной. При повышении осмотического давления внешней среды в клетках происходит плазмолиз, а при снижении осмотического давления будет происходить обратный процесс – деплазмолиз. Известно, что дрожжи *D. hansenii* выделены из сред с высоким солесодержанием, например из концентрированных рассолов, морской воды и



соленой пищи [177, 178]. *Debaryomyces hansenii* являются одним из наиболее галотолерантных видов дрожжей, они способны к росту в среде, содержащей до 23% NaCl. Дрожжи *Blastobotrys adeninivorans*, как и *Debaryomyces hansenii*, относятся к галотолерантным [91]. Для дрожжей *Og. angusta* и бактерий *P. yeii* таких сведений нет. В работе исследована окислительная активность выбранных микроорганизмов и их ассоциаций по отношению к ГГС в диапазоне содержания хлорида натрия 0,5–25% (рис. 38–40).

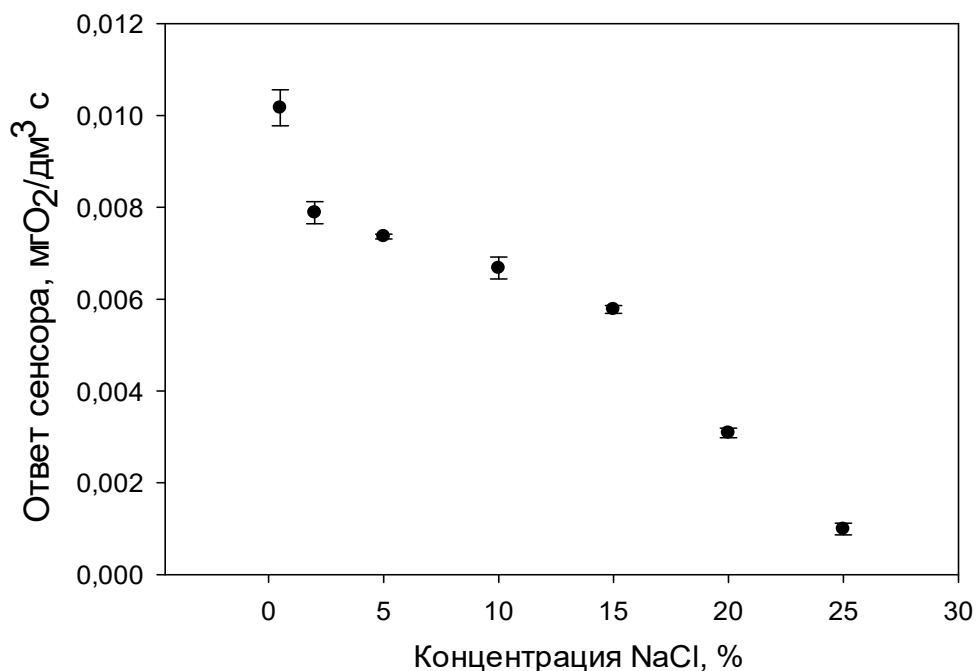


Рис. 38. Влияние содержания хлорида натрия на дыхательную активность *D. hansenii*.

Как и предполагалось, дрожжи *D. hansenii* могут проявлять окислительную активность в средах с содержанием хлорида натрия до 25%. При содержании хлорида натрия в среде 25% ответ биосенсора составил 8% от исходного. Перегиб на полученном графике можно объяснить изменением доминирующего механизма сохранения внутриклеточного осмотического давления. Таким образом, полученные результаты подтверждают литературные данные об устойчивости ферментативных дрожжей *Debaryomyces hansenii* в средах с высоким содержанием солей.

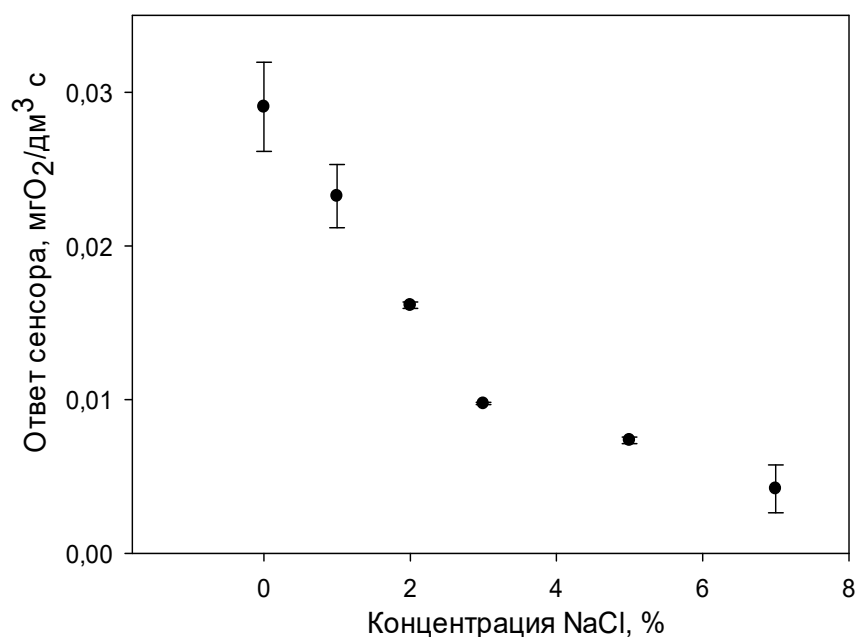


Рис. 39. Влияние содержания хлорида натрия на дыхательную активность *P. yeii*.

Уменьшение дыхательной активности при увеличении содержания хлорида натрия можно объяснить тем, что бактерии *Paracoccus yeii* плохо адаптируются к высокой ионной силе среды. Уже при содержании хлорида натрия 8% ответа сенсора не наблюдается. Использование данного вида бактерий для определения БПК воды с повышенным содержанием солей нежелательно, т. к. уже при концентрации 2% NaCl ответ биосенсора снижается в два раза. Полученные результаты следует учитывать при разработке БПК-биосенсоров для анализа водных объектов с повышенным содержанием солей.

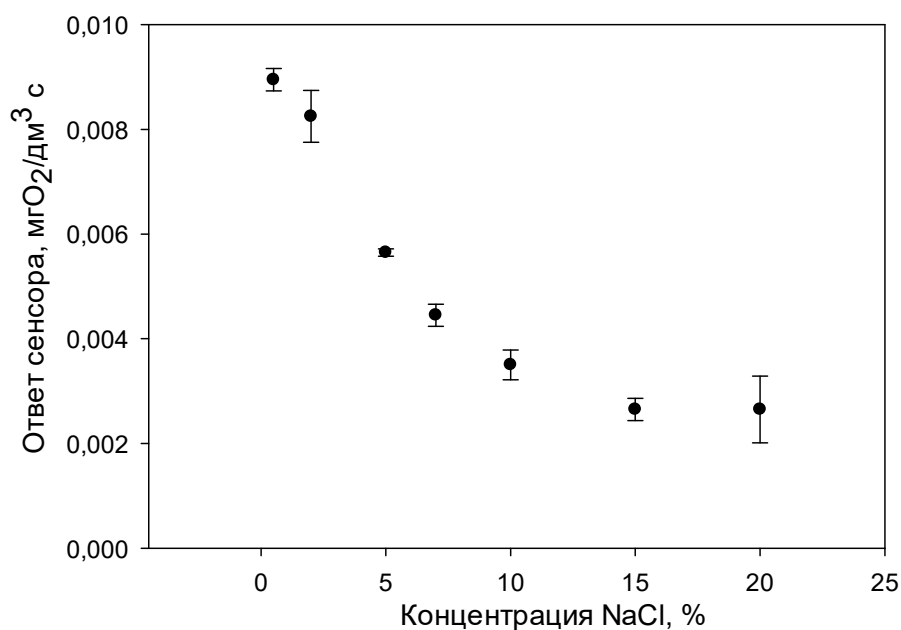


Рис. 40. Влияние NaCl на окислительную активность ассоциации дрожжей *Og. angusta*, *B. adenivorans* и *D. hansenii*.

Дрожжи *D. hansenii* и *B. adenivorans* являются галотолерантными, что подтверждает их окислительная активность по отношению к растворам ГСС с различным содержанием хлорида натрия. Снижение окислительной активности ассоциации обусловлено токсичным влиянием хлорида натрия на метилотрофные дрожжи *Og. angusta* в составе ассоциации.

### **1.5.3. Влияние температуры на дыхательную активность микроорганизмов**

Температура – одно из ключевых условий роста и развития всех микроорганизмов. Всем процессам в клетках микроорганизмов соответствует своя оптимальная температура. У большинства микроорганизмов минимальная температура роста находится в районе 0–5°C, а максимальная – 30–40°C. В настоящей работе изучена зависимость дыхательной активности клеток дрожжей и бактерий от температуры в диапазоне 5–40 °C (рис. 41–43).

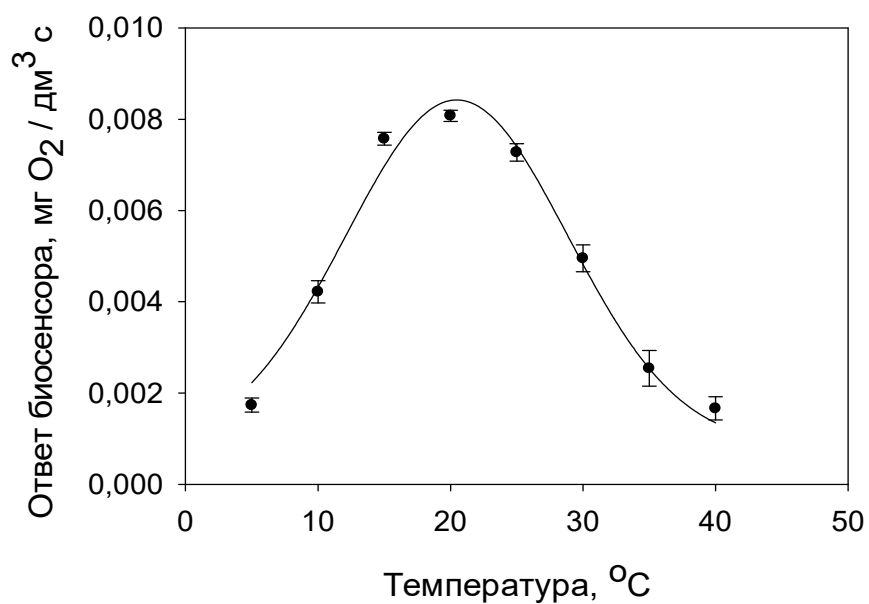


Рис. 41. Зависимость окислительной активности дрожжей *D. hansenii* от температуры.

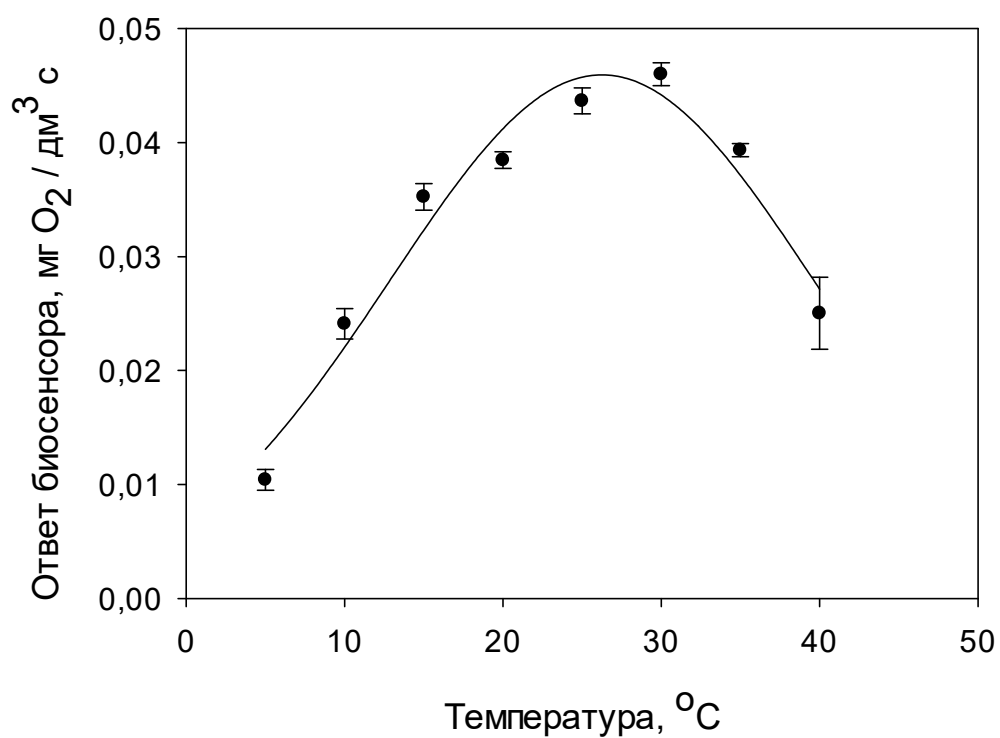


Рис. 42. Зависимость окислительной активности бактерий *P. yeii* от температуры.

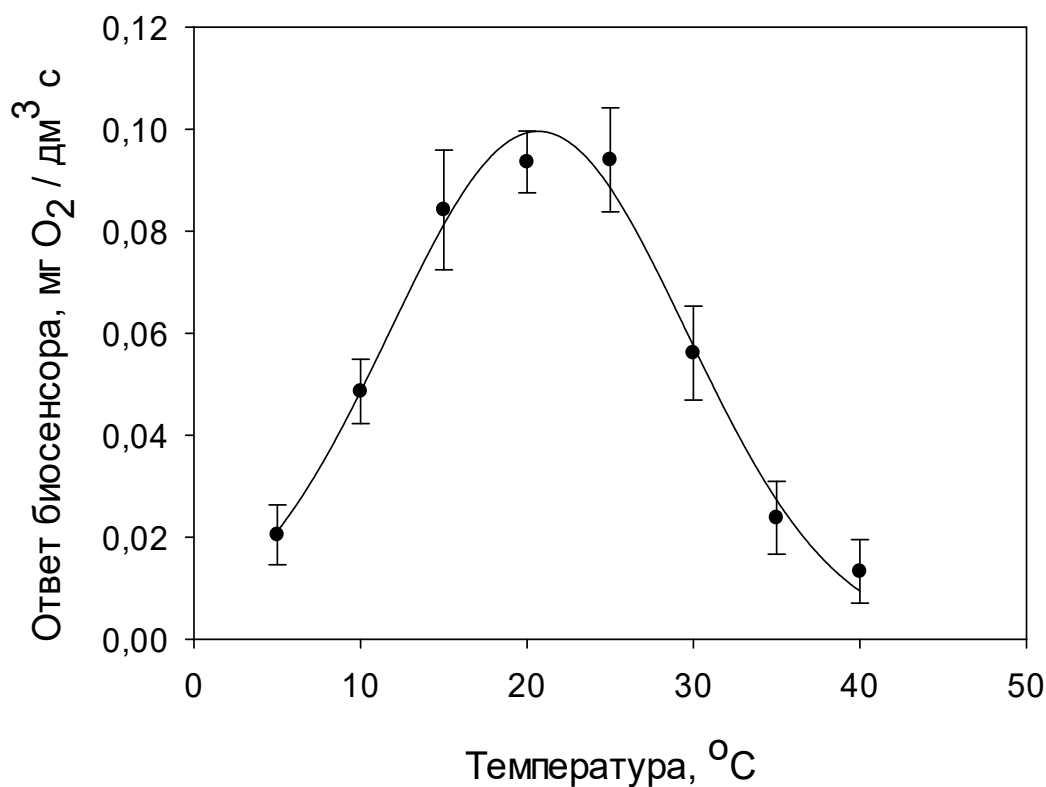


Рис. 43. Зависимость окислительной активности ассоциации микроорганизмов *Og. angusta*, *B. adenivorans* и *D. hansenii* от температуры.

Дыхательная активность дрожжей *D. hansenii* и ассоциации дрожжевых микроорганизмов в присутствии субстратов максимальна в диапазоне 15–25°C, что подтверждает литературные данные [84, 99]. Для бактерий *P. yeai* оптимальная температура несколько выше и лежит в пределах от 20°C до 30°C. Таким образом, для увеличения правильности экспресс-анализа БПК следует использовать систему термостатирования.

#### ***1.5.4. Влияние ионов тяжелых металлов на дыхательную активность микроорганизмов***

Еще одним фактором, оказывающим негативное влияние на микроорганизмы, может быть наличие ионов тяжелых металлов в сточных водах. В настоящей работе для исследования влияния тяжелых металлов была получена зависимость дыхательной активности микроорганизмов *D. hansenii*, *P.*

уеи и ассоциации от наличия в пробах ионов меди (II), свинца (II), никеля (II), цинка (II), висмута (III), кобальта (II), железа (III) и дихромат-иона. В качестве опорных значений концентраций использованы предельно допустимые концентрации ионов в водоемах (ГН 2.1.5.1315-03). В качестве аналитического сигнала использовали отклик сенсора на глюкозо-глутаматную смесь с ионом металла, в процентах от контрольного значения ответа на глюкозо-глутаматную смесь без добавления ионов металлов (рис. 44–46).

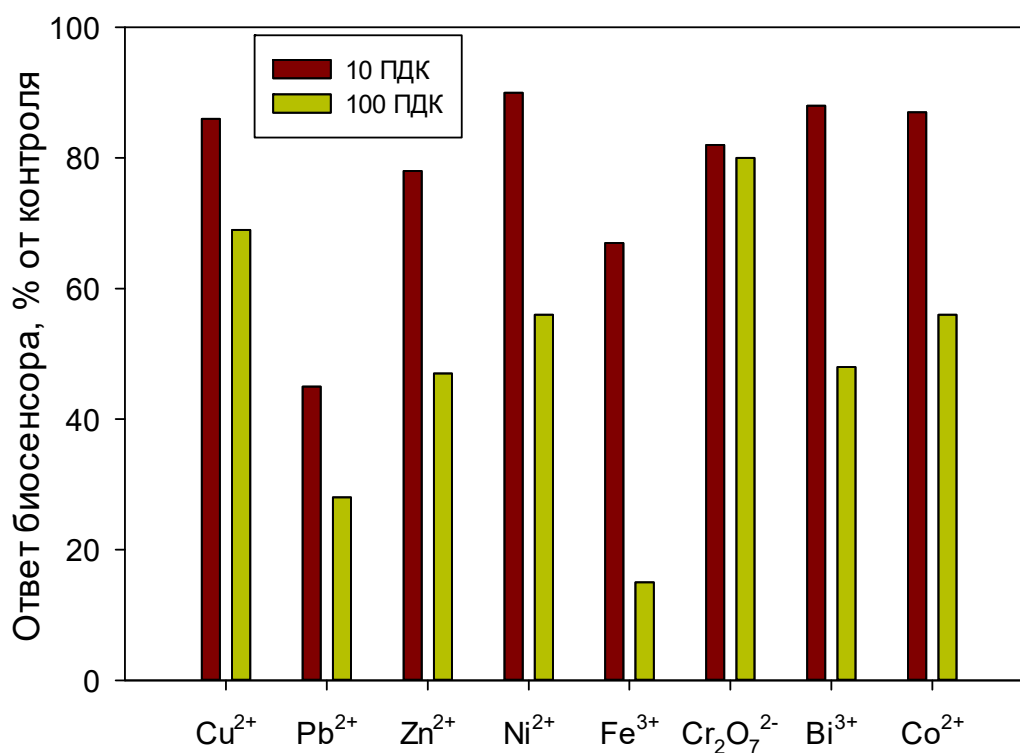


Рис. 44. Дыхательная активность *D. hansenii* при разных концентрациях ионов металлов.

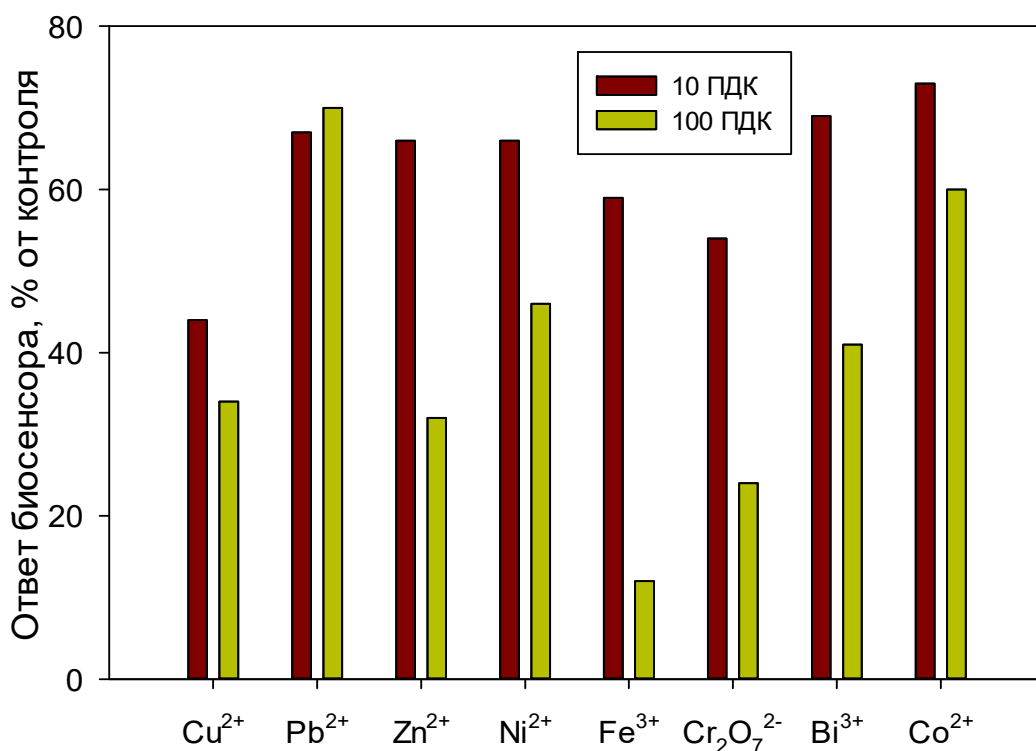


Рис. 45. Дыхательная активность *P. yeii* при разных концентрациях ионов металлов.

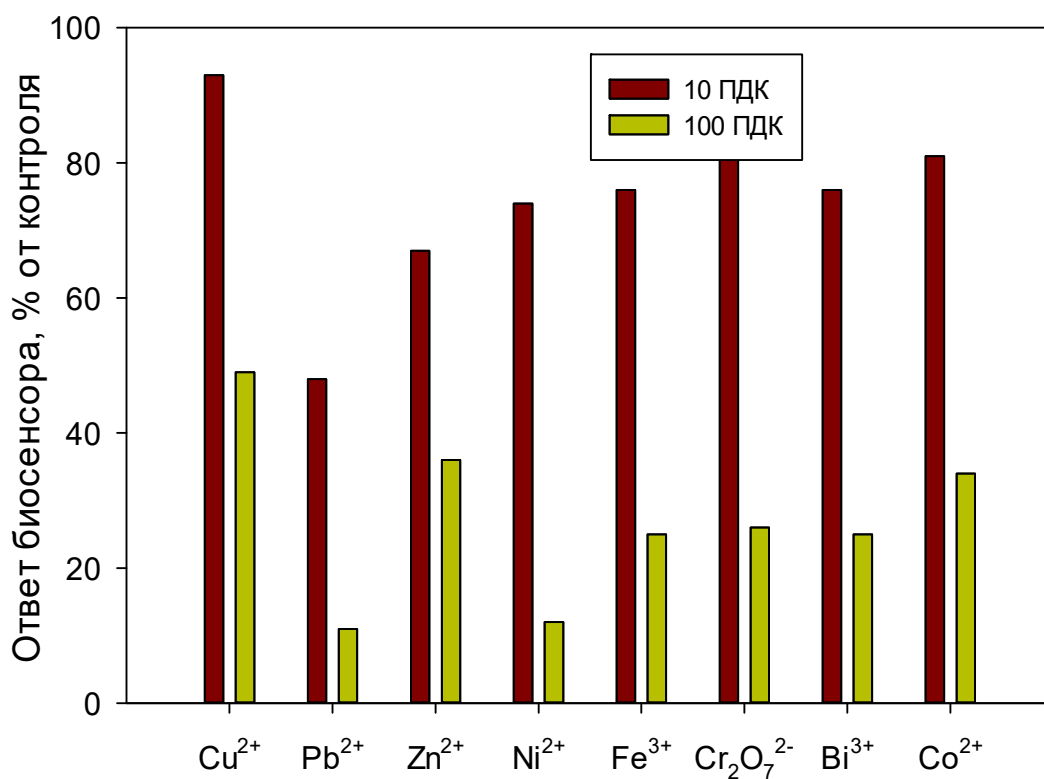


Рис. 46. Дыхательная активность созданной ассоциации при разных концентрациях ионов металлов.

Данные по дыхательной активности используемых микроорганизмов при разных концентрациях ионов металлов приведены в таблице 15.

Таблица 15. Дыхательная активность используемых микроорганизмов в присутствии ионов металлов.

Ион (ПДК, мг/дм <sup>3</sup> )	Сигнал сенсора, % от контрольного значения					
	<i>Debaryomyces hansenii</i>		<i>Paracoccus yeai</i>		<i>Blastobotrys adenivorans</i> , <i>Ogataea angusta</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i>	
	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

При концентрации ионов выбранных для исследования тяжелых металлов равной 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 стрессоустойчивости данных дрожжей. Ассоциация дрожжей подвержена более сильному влиянию ионов тяжелых металлов (как и в присутствии хлорида натрия), чем индивидуальный штамм дрожжей *D. hansenii*. Наибольшее влияние на дыхательную активность иммобилизованных бактерий *P. yeai* 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 стандартный метод определения 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 основе кислородного электрода.

### **2.1. Методы иммобилизации микроорганизмов в биосенсорных анализаторах**

#### **2.1.1. *Общий подход к иммобилизации микроорганизмов в биосенсорных анализаторах***

Иммобилизация (англ. «*immobilization*» – фиксация, уменьшение подвижности) – это искусственное ограничение подвижности биоматериала во

внешней среде путем удерживания его каким-либо носителем. Иммобилизацию можно представить как разделение микроорганизмов и растворителя, при котором субстрат и продукты реакций могут достаточно легко перемещаться. Иммобилизацию можно считать пригодной в том случае, если после прикрепления к носителю микроорганизмы сохраняют высокую стабильность и метаболическую активность. Методы иммобилизации клеток достаточно подробно описаны в литературе [179, 180].

Чаще всего методы иммобилизации микроорганизмов классифицируют по принципу их обратимости (рис. 47). При проведении обратимой иммобилизации микроорганизмы могут быть отделены от носителя без существенного снижения своей физиологической активности. Обратимо иммобилизованные микроорганизмы можно получить капсулированием, адсорбцией на носителях, ионным, аффинным и металлохелатным связыванием компонента с поверхностью преобразователя. К необратимым методам как правило относят: сшивку частиц биоматериала с преобразователем или между собой и включение в полимерную матрицу.

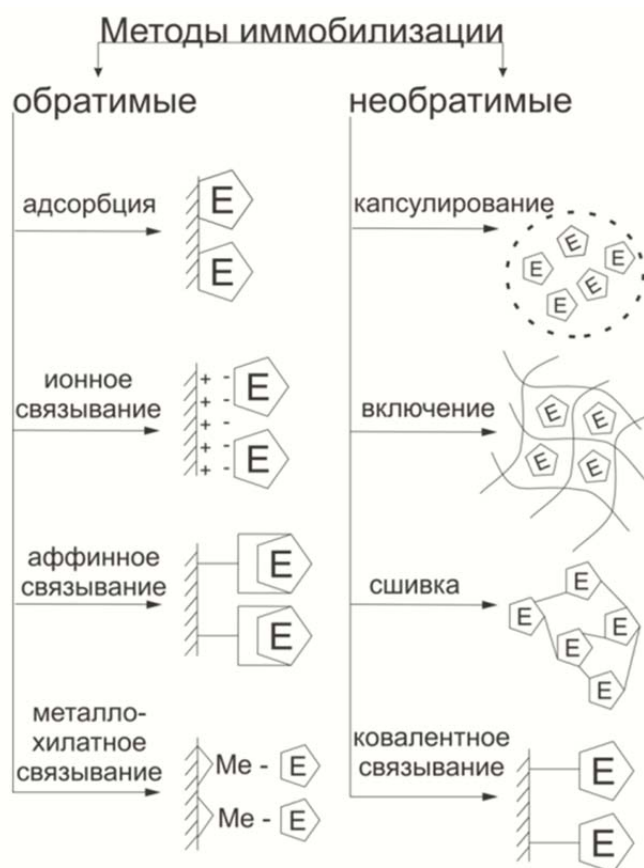


Рис. 47. Схемы основных методов иммобилизации микроорганизмов.

По типу связей биоконфнента с носителем выделяют ковалентные (химические) и нековалентные (физические) методы иммобилизации. Физическая (нековалентная) иммобилизация не предполагает образования прочных ковалентных связей между биополимером и носителем. Ковалентная иммобилизация предполагает образование одной или нескольких ковалентных связей между функциональными группами носителя и биологического компонента. В ковалентной иммобилизации также выделяют кросс-сшивку биополимеров между собой или с носителем бифункциональными сшивающими реагентами.

Развитие биотехнологических методов, связанных с использованием целых клеток микроорганизмов в различных процессах, дало толчок к изучению физиологии микроорганизмов в иммобилизованном состоянии. В ряде работ показано, что стабильность иммобилизованных микроорганизмов выше стабильности свободно культивируемых клеток [181]. Увеличение

стабильности проявляется в более длительном активном функционировании клеток, расширении оптимальных значений pH и температуры, повышении устойчивости к негативным воздействиям факторов окружающей среды. Кроме того, иммобилизованные микроорганизмы ингибируются более высокими концентрациями продуктов ферментативных реакций, чем свободные.

Когда вопрос о принципиальной возможности и необходимости создания аналитической системы на основе иммобилизованных микроорганизмов решен, возникает проблема выбора способа иммобилизации. Анализ литературных данных показывает, что в настоящее время не существует четких критериев, ориентируясь на которые исследователь может безошибочно определить, каким именно способом ему воспользоваться [179, 182]. В целом при выборе способа иммобилизации и носителя для создания высокоэффективного и стабильного биокатализатора следует руководствоваться физиологическими и метаболическими особенностями используемых микроорганизмов. Детальное знание условий окружающей среды, требующихся конкретному микроорганизму для его высокой метаболической активности, позволяет оценить уже существующие и новые методы иммобилизации и отобрать из них наиболее перспективные.

### ***2.1.2. Химические методы иммобилизации микроорганизмов***

Подходы к химической иммобилизации микроорганизмов основаны на образовании ковалентных химических связей между клеточной мембраной и поверхностью преобразователя или подложки. Причем образование таких ковалентных связей может происходить не только на какой-либо поверхности, но и в объеме полимерного носителя (когда при формировании полимерной матрицы в присутствии микроорганизмов происходят химические реакции с функциональными группами на клеточной мембране). Метод ковалентного связывания микроорганизмов с поверхностью физико-химического датчика позволяет создавать биосенсоры, в которых биоматериал остается

иммобилизованным в течение длительного срока. В данном методе должно быть заранее известно, какие химические группы будут участвовать в пришивке биоматериала к носителю. Однако необходимые функциональные группы не всегда находятся на поверхности, поэтому чаще всего преобразователь модифицируют [180]. Для образования связей с белками стараются задействовать радикалы аминокислот, отсутствующих в активном центре. Чаще всего реакции проводят по карбоксильной, амино- и гидроксильной группам. Так, например, описан микробный БПК-биосенсор на основе *Bacillus subtilis*, ковалентно связанных с золотым электродом [63]. Аминофункциональные группы на поверхности микроорганизмов были связаны с электродом, модифицированным карбоксильными группами.

Иногда микроорганизмы химически сшивают между собой, а полученные матрицы из биоматериала удерживаются у поверхности преобразователя физически [183]. Для сшивки применяют различные бифункциональные соединения (рис. 48).

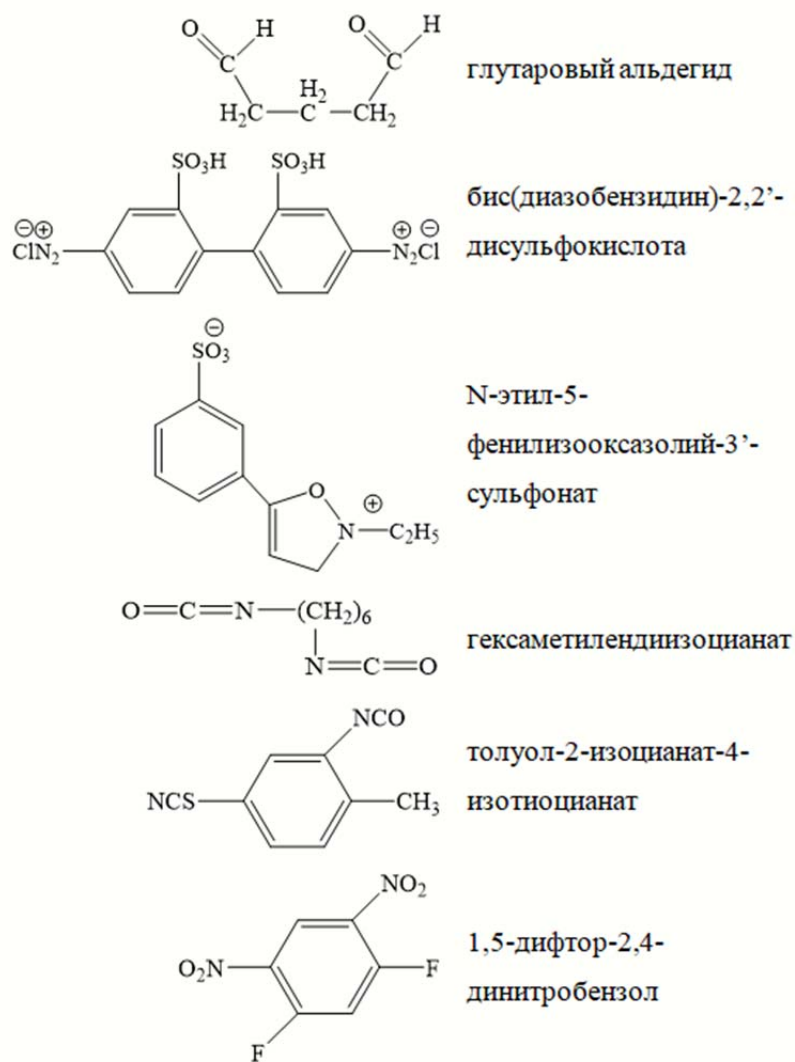


Рис. 48. Бифункциональные реагенты для сшивки белков.

Химические методы иммобилизации дают возможность достичь прочной фиксации биоматериала и обеспечивают высокую устойчивость биокатализатора к внешним факторам, таким как температура и кислотность среды. Однако такие методы редко используются для иммобилизации живых микроорганизмов, поскольку клетки после химической модификации теряют значительную часть своей активности.

### ***2.1.3. Адсорбция микроорганизмов на носителях***

Адсорбция на пористых носителях представляет собой самый простой подход к иммобилизации микроорганизмов. При своей простоте данный метод

иммобилизации достаточно технологичен. При адсорбции микроорганизмы закрепляются на носителе за счет водородных связей, электростатических взаимодействий и Ван-дер-Ваальсовых сил. Однако прочность связывания разных микроорганизмов с носителями разной химической природы может достаточно сильно различаться. Для иммобилизации можно использовать как сорбенты органической, так и неорганической природы. Неорганические адсорбенты обладают высокой прочностью, доступны, дешевы, биосовместимы и легко регенерируются.

Широкие требования, разнообразие решаемых задач и многообразие свойств применяемых клеток не позволяют воспользоваться каким-либо одним адсорбентом и обуславливают существование широкого набора применяемых для данного подхода к иммобилизации материалов. Достоинством иммобилизации методом адсорбции является отсутствие необходимости использования каких-либо специальных реагентов. Метод обычно не предполагает использования токсичных соединений и делает возможным сохранение высокой биологической активности микроорганизмов. Положительными качествами данного метода иммобилизации также являются: относительная дешевизна носителей и отсутствие диффузионных затруднений. Недостатком метода адсорбции является слабая прочность удерживания микроорганизмов и очень ограниченное количество клеток, адсорбируемое поверхностью носителя. Кроме того, адсорбированные микроорганизмы чувствительны к изменениям pH, температуры, ионной силы среды и концентрации субстратов.

Несмотря на описанные недостатки в литературе представлено достаточно примеров использования иммобилизации методом адсорбции для создания микробных биосенсоров, в частности для определения БПК. Так, описан БПК-биосенсор на основе термически обработанного препарата активного ила, иммобилизованного адсорбцией на мембрану из поликарбоната [54]. В работе [27] описан микробный БПК-биосенсор, основанный на использовании ассоциации микроорганизмов, иммобилизованных адсорбцией



на нейлоновой мембране. Результаты создания БПК-биосенсора с рецепторным элементом на основе *Pseudomonas putida*, иммобилизованных на нитратцеллюлозной мембране, представлены в исследовании [58]. Использование частиц силикагеля для иммобилизации дрожжей *Candida krusei* при создании БПК-биосенсора описано в работе [59]. Таким образом, круг используемых в качестве носителей для адсорбции микроорганизмов материалов достаточно многообразен.

#### ***2.1.4. Капсулирование микроорганизмов***

Еще одним широко используемым физическим методом иммобилизации микроорганизмов, который применяется при разработке электрохимических биосенсоров, является капсулирование. Данный метод заключается в том, что клетки микроорганизмов помещают вблизи электрода и отделяют от внешней среды полупроницаемой мембраной. Таким образом, через данную мембрану могут проходить молекулы субстратов и продукты каталитических реакций. Микроорганизмы фактически находятся в свободном состоянии, и при этом они локализованы вблизи поверхности сенсора.

В отличие от других подходов к иммобилизации микроорганизмов при капсулировании важным является удержание раствора, окружающего клетки. При проведении капсулирования применяют различные полупроницаемые мембраны, отличающиеся размером пор. С использованием таких мембран осуществляется контроль размеров молекул, проходящих к биологическому материалу. Крупные молекулы и частицы удерживаются внутри капсулы, а относительно небольшие молекулы субстратов и продуктов могут свободно перемещаться. Одним из важных преимуществ метода капсулирования перед методом адсорбции является большая активная площадь поверхности иммобилизованного биокатализатора. Это позволяет создавать биосенсоры, обладающие высокой чувствительностью. Данный метод иммобилизации легко применим к разным моделям биосенсоров каталитического типа. Он

обеспечивает хорошую воспроизводимость работы сенсора и защищает биоматериал от загрязнений и разрушения.

При капсулировании используют несколько типов мембран. Помимо широко используемых мембран из ацетата целлюлозы (диализных), применяют мембраны из поликарбоната, коллагена и политетрафторэтилена. Применение полупроницаемых мембран, в том числе полученных из растворимых полимеров, позволяет повысить селективность определения с помощью микробных сенсоров одного компонента в присутствии других. Например, чешским ученым [184] удалось сконструировать амперометрический медиаторный биосенсор с рецепторным элементом на основе уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованных с помощью водорастворимого ацетатцеллюлозного полимера, который позволял определять содержание этилового спирта в биотехнологических средах в присутствии глюкозы. Следует отметить, что эти бактерии прекрасно метаболизируют оба субстрата, следовательно, образовавшаяся мембрана создала затруднения в транспорте глюкозы к иммобилизованным бактериям. Отмечены примеры использования иммобилизации капсулированием и для создания неселективных БПК-биосенсоров. Так, датчик на основе штамма *Aeromonas hydrophila* P69.1, иммобилизованного с помощью полупроницаемой мембраны, давал возможность анализировать БПК в интервале 5–45 мг/дм<sup>3</sup> и стабильно работал в течение 110 суток [11].

### ***2.1.5. Иммобилизация микроорганизмов путем включения в гидрогели***

Самым удобным и перспективным подходом для иммобилизации клеток бактерий и дрожжей является включение в массу носителя. Используемые для этого гидрогели прочно удерживают микроорганизмы и дают возможность легкой диффузии исходных веществ и продуктов их биохимических реакций. Гидрогели обычно определяют как коллоидные структуры полимерных цепей, характеризующиеся трехмерной сшитой сеткой [185]. Их наиболее важным

свойством является набухание: способность впитывать и удерживать определенное количество воды с последующим увеличением объема. Благодаря высокому содержанию воды, пористости и консистенции они обладают высокой гибкостью и биосовместимостью, поэтому их можно применять во многих биотехнологических и биомедицинских целях [186]. Гидрогели обычно разделяют в зависимости от типологии сшивки их структуры на химически сшитые гидрогели (ковалентные гели) и физически сшитые гидрогели (нековалентные) (рис. 49) [187]. Химически сшитые гидрогели имеют сеть, образованную ковалентными связями, и в воде они не растворяются, в то время как физически сшитые гидрогели имеют переходные соединения с динамическим сшиванием на основе нековалентных связей. Кроме этого, выделяют категорию ионотропных гелей, которые сшиваются за счет образования солевых мостиков. Гидрогели могут находиться в самых разнообразных физических формах с множеством типологий, методологий и методик функционализации полимеров [188]. Гидрогели подразделяются на натуральные, синтетические и полусинтетические в зависимости от их происхождения, кроме того, они могут быть долговечными или биоразлагаемыми в зависимости от их стабильности в физиологической среде.

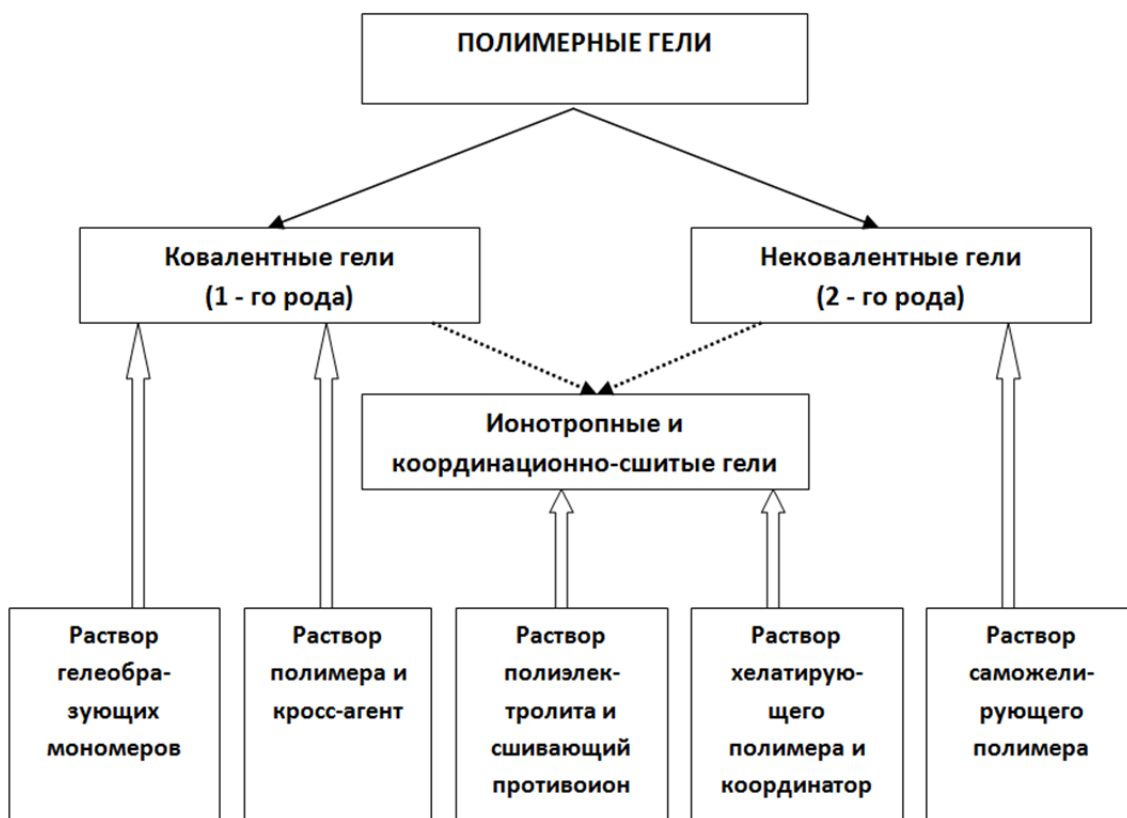


Рис. 49. Гелеобразование в полимерных системах.

Очень важным параметром, которому в последние годы уделяется все больше внимания, является форма гелей. Разное применение может требовать разных размеров и конфигурации пор, и из-за этого с годами были разработаны новые стратегии для правильного синтеза этих структур. Наглядный пример этого – гели микрогранул (гели в форме частиц), которые являются очень полезными системами в различных приложениях, таких как имплантанты тела [189], благодаря их структурам, зависящим от малых углов. В любом случае одна из главных характеристик любых гидрогелевых структур – это их способность реагировать на внешние раздражители благодаря набуханию и большой проницаемости для химических веществ. Более того, эту особенность можно регулировать: если вставить в каркас полимера подходящие функциональные группы, гидрогели смогут реагировать на определенные химические, физические или биологические стимулы окружающей среды. Точно так же размер ячейки, степень сшивки, ионный заряд каркаса – все это элементы, которые могут влиять на способность структуры гидрогеля

реагировать на внешнюю и внутреннюю среду. Преимущества использования гидрогелей для иммобилизации микроорганизмов в биосенсорах достаточно очевидны [191]: сшитая сеть гидрогеля гарантирует высокую скорость газообмена и транспортировку питательных веществ к клеткам, иммобилизованным в матрице. Более того, вся система характеризуется высокой биосовместимостью, проницаемостью и чувствительностью к субстратам. Такие свойства позволяют широко использовать гидрогели в различных химических и биологических сенсорных системах [192].

#### **2.1.5.1. Включение клеток в гидрогели на основе поливинилового спирта**

Поливиниловый спирт (ПВС) – синтетический, водорастворимый и нетоксичный полимер, его гидроксильные группы (рис. 50) могут образовывать водородные связи. Водные растворы ПВС постепенно превращаются в гель. ПВС характеризуется хорошими эмульгирующими, адгезионными и пленкообразующими свойствами, обладает высокой прочностью на разрыв и гибкостью.

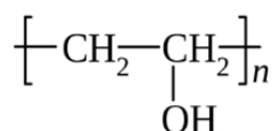


Рис. 50. Химическая структура ПВС.

Реакции поливинилового спирта являются реакциями, типичными для многоатомных спиртов. Он способен образовывать сложные и простые эфиры, реагировать с альдегидами и кетонами. Важно отметить, что ПВС — это очень доступный и дешевый продукт многотоннажного синтеза. Известно достаточно много марок ПВС, при этом каждая из них стандартизована и обладает известными свойствами.

Для получения рецепторных элементов на основе ПВС его растворяют в воде, вносят суспензию микроорганизмов и высушивают. Гидрогели на основе

ПВС обладают микробиологической стабильностью и биосовместимостью. Сшитые гели ПВС получают путем воздействия УФ-облучения на водные растворы ПВС. При таком воздействии в полимерных цепочках возникают свободные радикалы, которые взаимодействуют друг с другом и образуют сшивки между цепями ПВС. Скорость такой полимеризации определяется дозой и интенсивностью облучения, температурой, природой полимера, средой, наличием ингибиторов и кислорода. В результате облучения полимера из-за распада связей С–Н или других возникают свободно радикальные центры. Эти центры инициируют свободно радикальную полимеризацию добавленного мономера.

Еще одним возможным подходом к созданию гелей ПВС являются криогели. Полимерными криогелями являются гелевые материалы, которые получают в неглубоко замороженных растворах предшественников. Криогели ПВС представляют собой гетеропористые вязкоупругие структуры, которые получают при замораживании концентрированных растворов ПВС. Из-за наличия гидроксильной группы у каждого второго атома углерода ПВС в водных растворах образует многочисленные водородные связи (рис. 51).

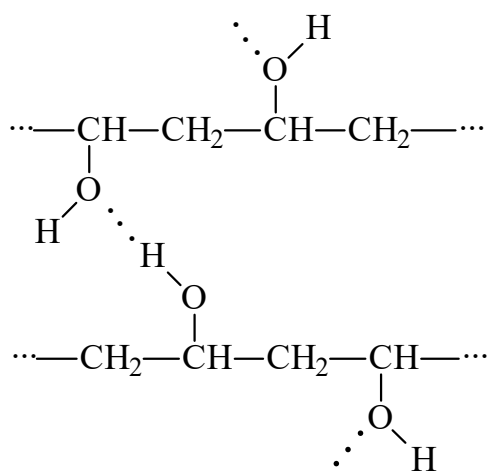


Рис. 51. Структура криогеля ПВС.

Пористая структура таких криогелей обеспечивает благоприятное окружение и легкую диффузию субстратов для микроорганизмов. Пример использования криогеля ПВС представлен в работе [193]. В данной статье

проведены исследования по биодegradации фенантрена как модельного загрязнителя, микробным консорциумом (активным илом), включенным в криогель поливинилового спирта, полученный методом замораживания–оттаивания.

Однако во многих случаях ПВС в чистом виде плохо подходит для создания биокатализаторов из-за низкой механической устойчивости гидрогеля. Описан синтез прочных гидрогелей на основе поливинилового спирта, сшитого с N-винилпиридином [192]. К сожалению, данный подход основан на применении борной кислоты, негативно влияющей на биоматериал.

Для иммобилизации биоматериала может использоваться не только поливиниловый спирт, но различные его производные. Так, для иммобилизации биоматериала применяется гель на основе ПВС со стирилпиридиновыми группами (рис. 52). Подобный гидрогель успешно был использован для иммобилизации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при создании оптического БПК-биосенсора [35].

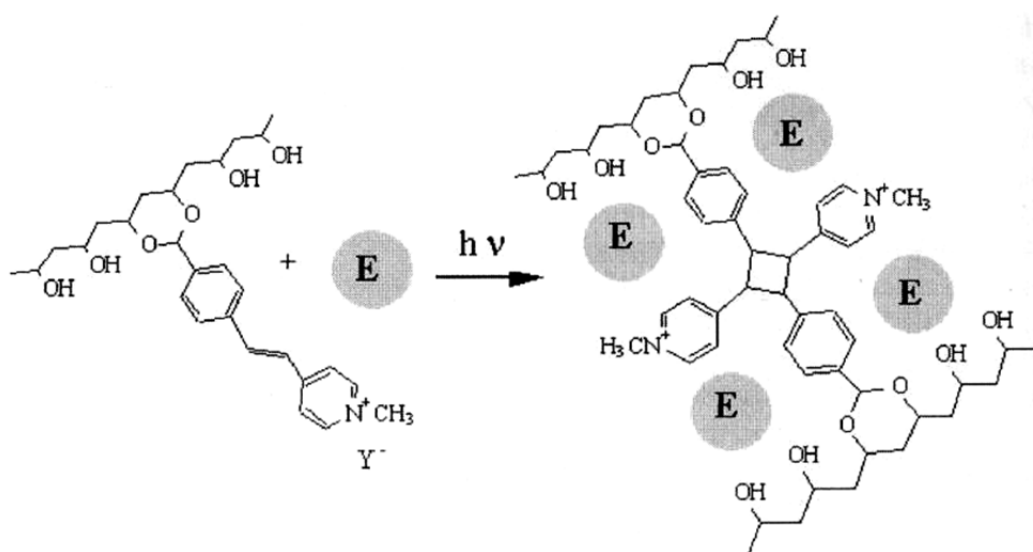


Рис. 52. Включение биоматериала в гель на основе ПВС со стирилпиридиновыми группами [180].

Для большинства областей применения геля ПВС он должен быть нерастворим в воде, что достигается путем сшивания полимера или введения гидрофобных сегментов в структуру ПВС. Кроме того, модификация

поливинилового спирта с использованием бифункциональных или многофункциональных реагентов привела к возможности его биомедицинского и биотехнологического применения [194].

Сшивка поливинилового спирта осуществляется такими сшивающими агентами как: эпихлоргидрин, глутаровый альдегид, дикарбоновые кислоты, терефталевый альдегид, тиодиацеталь и другое. На рисунке 53 представлена схема модификации поливинилового спирта с помощью эпихлоргидрина [195].

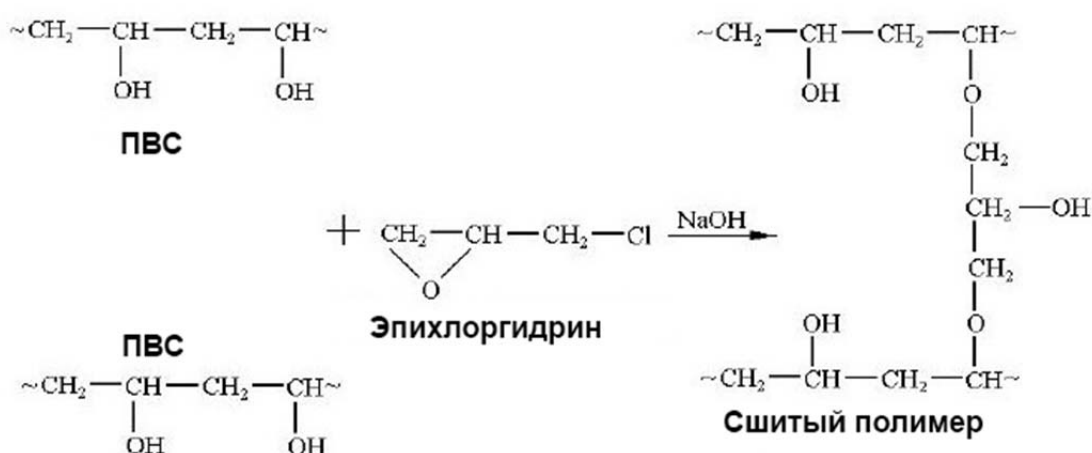


Рис. 53. Сшивка ПВС с помощью сшивающего агента эпихлоргидрина.

На рисунке 54 описан один из возможных продуктов сшивки поливинилового спирта с глутаровым альдегидом. В роли сшивающего агента для ПВС могут выступать как альдегиды, так и дикарбоновые кислоты. Процесс сшивки происходит в соответствии со схемой, представленной на рисунке 54 [196].



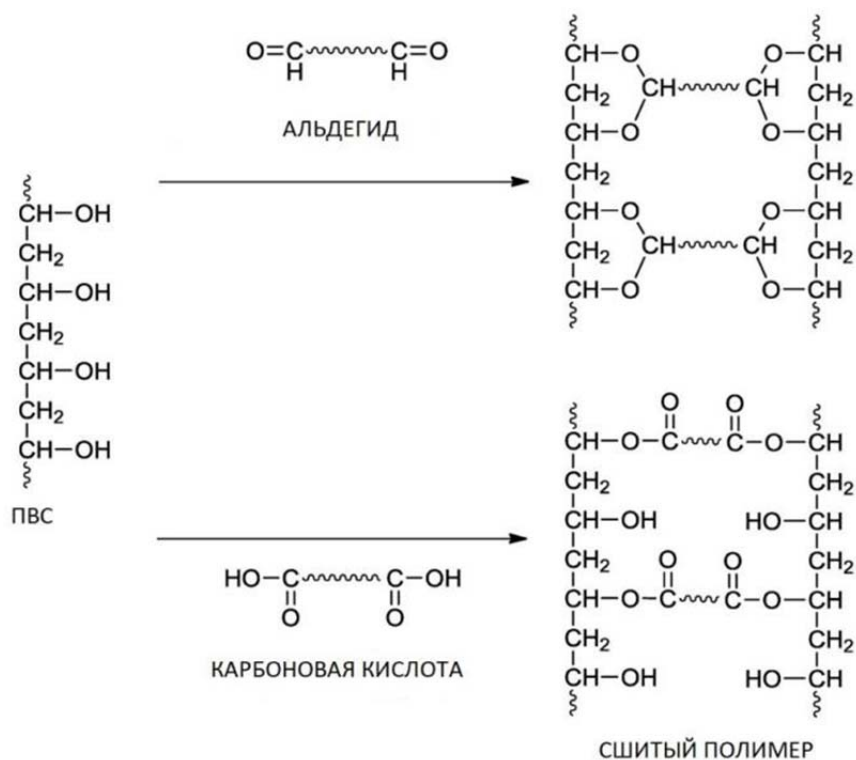


Рис. 54. Схема образования полимера ПВС, сшитого с альдегидом и карбоновой кислотой.

В работе [197] в качестве сшивающего агента для ПВС использовали поли(3-гексилтиофен). Поли(3-гексилтиофен) был сшит с поливиниловым спиртом посредством простой химической окислительной полимеризации с  $\text{FeCl}_3$  в трех разных растворителях (рис. 55), а именно ацетонитриле, хлороформе и гексане. Среди этих растворителей гексан лучше всего стимулирует привитие поли(3-гексилтиофена) к ПВС.

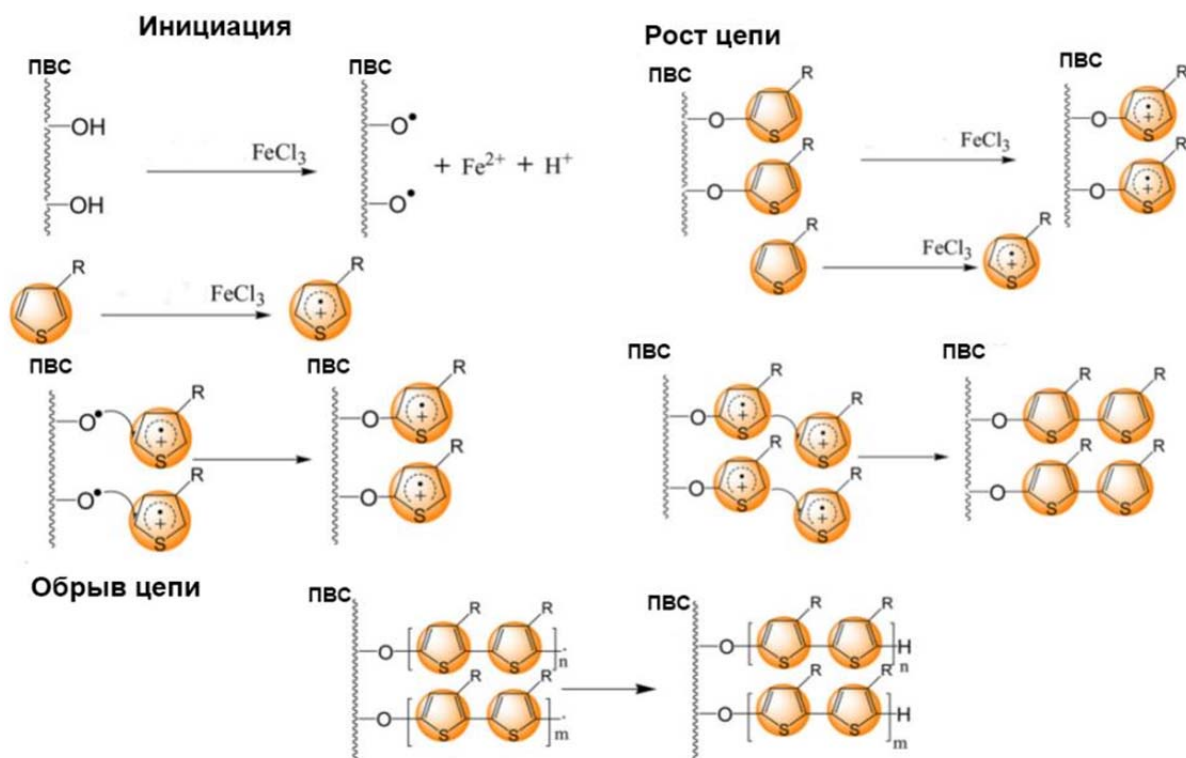


Рис. 55. Механизм шивки поли(3-гексилтиофена) с ПВС [197].

В статье [198] представлена химическая модификация поливинилового спирта для иммобилизации алкогольдегидрогеназы с целью повышения ее стабильности в широком диапазоне значений pH, продления активности при хранении и возможности повторного использования. Стратегия иммобилизации фермента включала функционализацию волокнистого носителя хлорпропиноилхлоридом с последующим аминированием этилендиамином. Привязка фермента (алкогольдегидрогеназы) к каркасу поливинилового спирта была достигнута с помощью глутарового альдегида. Профиль активности иммобилизованного фермента сравнивали с растворимым ферментом в зависимости от pH, температуры и возможности повторного использования. Иммобилизация алкогольдегидрогеназы на волокнистом носителе ПВС сместила оптимальный pH реакции с 7 до 9 и улучшила термостабильность при 60°C. Кроме того, иммобилизованный фермент сохранил 60% своей первоначальной активности после восьми циклов повторного использования.

В работе [199] сшитый альгинатом натрия поливиниловый спирт использовали для иммобилизации аммиак окисляющих бактерий. Иммобилизованные бактерии проявили сильную способность к окислению аммиака даже после четырехкратной переработки. По сравнению с бактериями, иммобилизованными только альгинатом натрия, бактерии, иммобилизованные с помощью ПВС и альгината натрия, превосходили первые в отношении устойчивости к рН, количества повторных использований, стоимости материала, термостойкости и способности к окислению аммиака.

### **2.1.5.2. Включение микроорганизмов в гели на основе белков**

Еще один подход к иммобилизации микроорганизмов основан на создании гидрогелей на основе белков. Наиболее простым способом создания таких гидрогелей является сшивка полипептидных цепей диальдегидами. Для создания таких гелей обычно применяют наиболее доступные белки, такие как желатин и различные сывороточные альбумины. Упрощенная схема сшивки белка альдегидом (на примере глутарового альдегида) представлена на рис. 56. Однако исследования показали, что образующиеся связи белковых молекул гораздо сложнее и зависят от рН среды и концентрации исходных веществ [200].

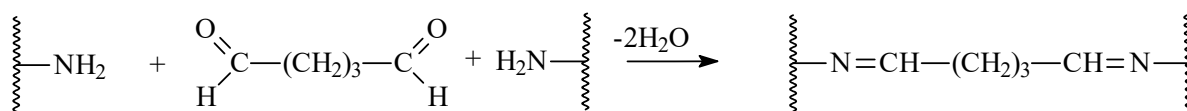


Рис. 56. Связывание аминогрупп белка глутаровым альдегидом.

Синтезируемые в таком случае матрицы обеспечивают естественное белковое окружение для микроорганизмов, при этом давая возможность свободной диффузии субстратов и продуктов реакций. Однако необходимость применения для сшивки белков токсичных бифункциональных реагентов

усложняет получение чувствительных биокатализаторов для создания рецепторов биосенсоров.

Хотя белковые гидрогели традиционно синтезировали с использованием химической сшивки, современные разработки в области ферментативного синтеза быстро становятся альтернативными инструментами «зеленой химии». Ферменты обладают большим потенциалом для синтеза сложных многофункциональных гидрогелей на основе белков [201] (рис. 57). Наиболее часто для такого подхода к синтезу белковых гидрогелей применяются: окислительные ферменты, особенно пероксидазы (ЕС 1.11.1.7), лакказы (ЕС 1.10.3.2), тирозиназы (ЕС 1.14.18.1) и трансферазы, такие как трансклутаминазы (ЕС 2.3.2.13).

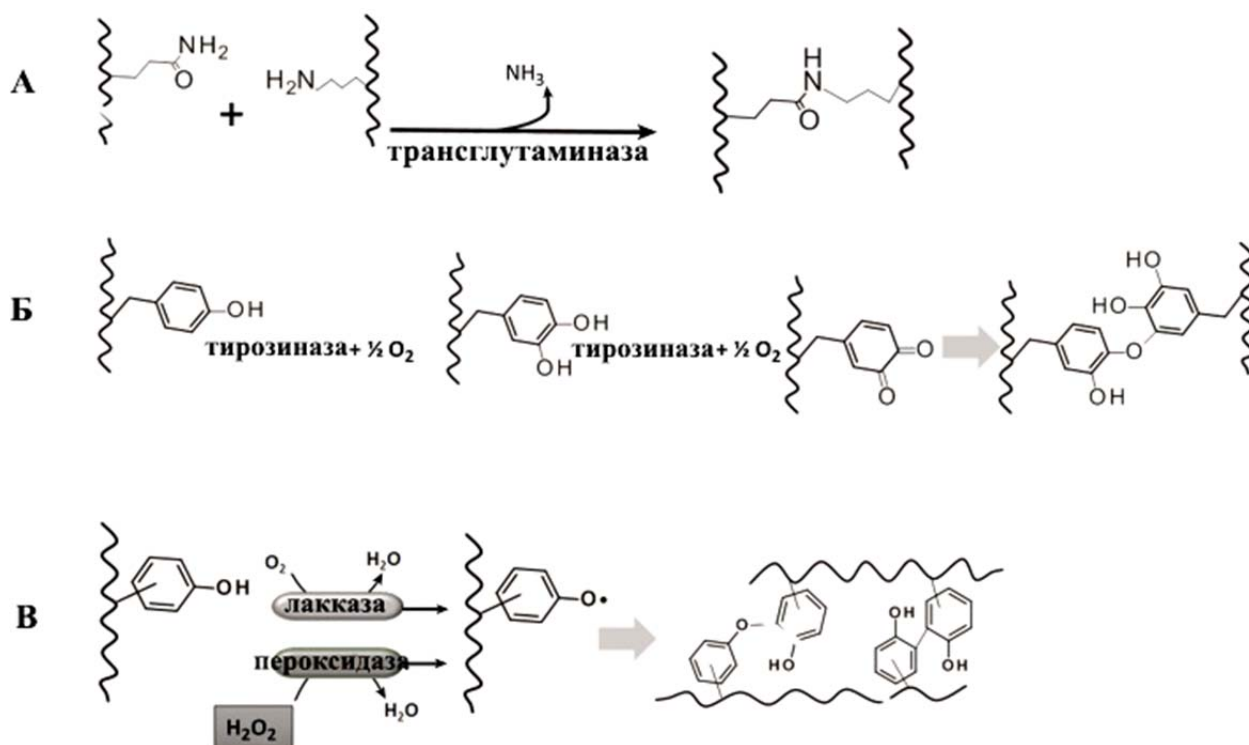


Рис. 57. Общие механизмы реакции различных ферментов при синтезе гидрогелей [201]: А – трансклутаминазы катализируют реакцию переноса ацила между  $\gamma$ -карбоксамидными группами пептидных остатков глутамина и  $\epsilon$ -аминогруппами остатков лизина и образуют изопептидную связь  $\epsilon$ - ( $\gamma$ -глутамил) лизина; Б – тирозиназа гидроксилирует монофенол (тирозин) с последующим превращением о-дифенола в реакционноспособный о-хинон,

которые соединяются друг с другом с образованием полимерной сети; В – фенольные или привитые молекулы предшественника гидрогеля окисляются пероксидазами или лакказами, образуя радикалы, которые реагируют, что приводит к образованию гидрогеля.

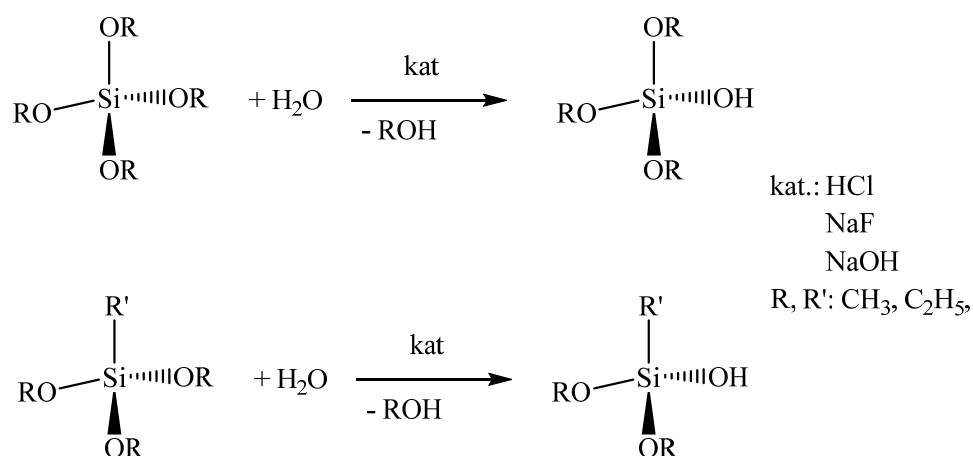
### **2.1.5.3. Включение микроорганизмов в кремниевые золь-гель матрицы**

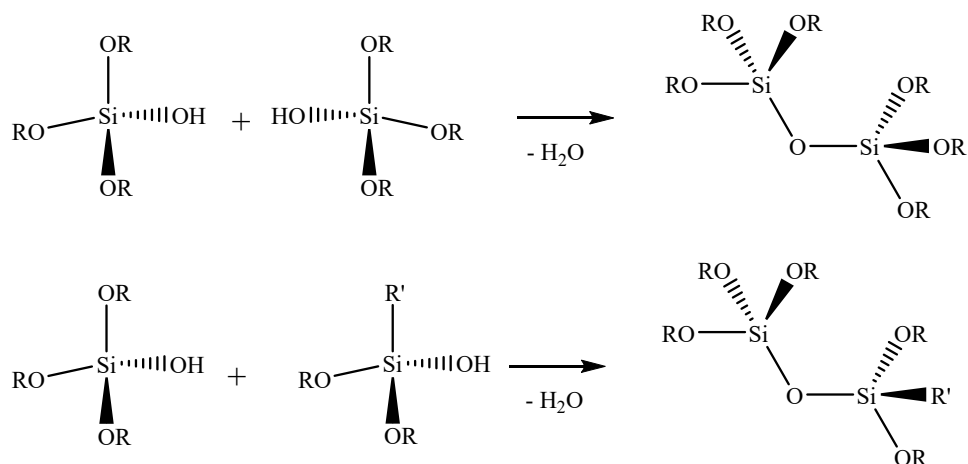
В настоящее время золь-гель технологии неорганических материалов интенсивно развиваются. Наиболее часто золь-гель технологии используют для получения наноструктурных материалов на основе соединений кремния. Эти материалы с различной структурой и свойствами применяются в самых разных областях промышленности, например, при разработке разделительных мембран, катализаторов, фото- и электроматериалов. В последнее время большой интерес вызывает получение и исследование нанокомпозитов, особенно органо-неорганических нанокомпозитов на основе алкоксидов кремния, в частности органомодифицированных силанов (ОРМОСИЛов) [202].

Силикатные и органосиликатные полимеры синтезируются золь-гель методом, который включает в себя гидролиз исходных соединений кремния (прекурсоров) и дальнейшую конденсацию продуктов гидролиза. Это является одной из химических особенностей соединений кремния. Прекурсорами в данном процессе служат кремнийорганические соединения, которые подразделяют на "мономерные", содержащие один или несколько атомов Si, и кремнийорганические полимеры. Обычно для этих целей применяют различные алкоксисиланы. В ходе гидролиза и конденсации алкоксисиланов сначала образуются небольшие частицы золя, которые в ходе старения переходят в гель. Основным достоинством метода является то, что он дает возможность получить твердые вещества, которые трудно синтезировать обычными методами. К недостаткам можно отнести высокую стоимость прекурсоров, трудности при синтезе монолитных структур геля [203].

Золь-гель процесс является одним из популярных и быстро развивающихся направлений в области нанобиотехнологий и создания биоматериалов. Этот материал используют в качестве матрицы (каркаса) для иммобилизации биоматериала. Преимуществами этого метода иммобилизации по отношению к биомолекулам и живым клеткам являются мягкие условия синтеза и нетоксичность формирующейся полимерной матрицы, которая, кроме того, обеспечивает прочное удерживание биоконпонентов и диффузию низкомолекулярных соединений к иммобилизованному биоматериалу [204].

В общем, золь-гель процесс включает гидролиз алкоксидов в кислотных или щелочных условиях с последующей конденсацией и поликонденсацией гидроксильированных производных, что приводит к образованию пористого геля. Обычно в качестве прекурсоров используются алкоксиды кремния, такие как тетраметоксисилан (ТМОС), или тетраэтоксисилан (ТЭОС). Гидролиз алкоксида приводит к образованию силанольной группы (Si-OH); в процессе конденсации эти силанольные фрагменты реагируют и образуют силоксаны (Si-O-Si), затем в процессе поликонденсации силанолов и силоксанов образуется пространственная сетка матрицы SiO<sub>2</sub>:

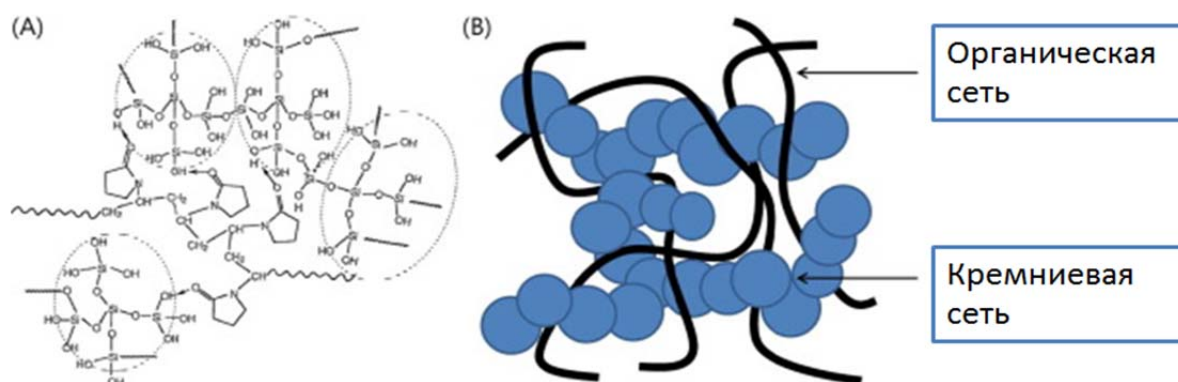




Полученный золь-гель представляет собой взаимосвязанную жесткую сеть с порами субмикрометровых размеров и полимерными цепями, средняя длина которых больше микрометра. В качестве катализаторов чаще всего используют HCl и аммиак. Помимо них также используются такие вещества, как уксусная кислота, KOH, амины, KF и HF [205]. На скорость и полноту гидролиза в основном влияют сила и концентрация кислотного или основного катализатора. Обычно слабые кислоты требуют большего времени реакции для достижения одинаковой степени реакции по сравнению с сильными кислотами. Катализируемый основанием гидролиз алкоксидов кремния протекает гораздо медленнее, чем катализируемые кислотой при эквивалентной концентрации катализатора [206].

При разработке кремнийорганических биокатализаторов в реакционную смесь вносят как природные, так и синтетические полимеры, которые способны к формированию пространственных структур в водных средах. Также они служат затравкой для начала гелеобразования и для придания гибкости конечной структуре. В этом отношении их можно рассматривать как структуроуправляющие агенты, которые оказывают сильное влияние на формирующуюся структуру, а в случае, когда после завершения синтеза их удаляют из системы (выжигание и т. д.), т.е. в случае темплатного синтеза, то их можно рассматривать еще и как темплатны.

Органические/неорганические гибриды могут быть синтезированы путем введения полимера на ранней стадии, например, на стадии гидролиза. Благодаря этому происходит улучшение механических свойств по сравнению с композитами, а также данные материалы демонстрируют гораздо лучшую биологическую активность из-за смешения стекла и полимера в молекулярном масштабе. Поэтому благодаря этим преимуществам данные гибриды привлекают много внимания. На рисунке 58 показана принципиальная схема гибридного материала, который имеет взаимопроникающую структуру  $\text{SiO}_2$  и органическую структуру геля. Проникающие 3D-сети образуются путем одновременного гелеобразования органических и неорганических компонентов. Поскольку полимерную фазу часто осаждают в растворителях на водной основе, в качестве органического компонента выбирают циклические алкенильные мономеры, которые полимеризуются путем метатезиса раскрытия цикла, или ненасыщенные спирты, которые полимеризуются радикальным механизмом. Благодаря этому подходу получают эластичный гидрогель, гибкую резину и твердое стекло с мезопористыми сетями, которые обладают высокой биосовместимостью, демонстрируют уменьшение усадок и хорошую физико-химическую стабильность [203].





Для биомедицинских целей, а также в биотехнологических процессах широко используются разлагаемые синтетические или природные биополимеры, включая ПВС [207], поли ( $\epsilon$ -капролактон) [208], желатин [209], хитозан [210] и полиэтиленгликоль [211]. Как правило, эти типы гибридных материалов получают смешиванием раствора полимера с золем на основе кремнезема с последующим гелеобразованием.

Золь-гель системы особенно хорошо подходят для инкапсулирования живых клеток. Клетки, которые были инкапсулированы, включают дрожжевые клетки, различные бактерии и клетки растений или животных. Как правило, клетки сохраняют свою активность, хотя их жизнеспособность внутри неорганических гелей нуждается в улучшении. Иммобилизация биоматериала в органосиликатную матрицу позволяет создать биогриды, которые можно использовать как биокатализаторы, в том числе при разработке биосенсоров. Так, на основе микроорганизмов с широкой субстратной специфичностью инкапсулированных в органосиликатную матрицу, можно разрабатывать БПК-биосенсоры. Например, в работе [47] проведена иммобилизация активного ила в кремнийорганический золь-гель на основе кремниевой кислоты и привитого сополимера поливинилового спирта и 4-винилпиридина. Нижняя граница анализируемых значений БПК<sub>5</sub> созданного биосенсора составила 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, а время стабильной работы – 50 суток. В работе [12] бактерии *Exiguobacterium marius*, *Bacillus horikoshii* и *Halomonas marina* были имобилизованы в кремнийорганический золь-гель с ПВС. Созданный медиаторный биосенсор позволил определять БПК<sub>5</sub> в диапазоне 1,2–40 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. В работе [41] иммобилизация микроорганизмов *Bacillus licheniformis*, *Dietzia maris* и *Marinobacter marinus* в поливиниловый спирт и кремнийорганическую золь-гель матрицу позволило создать оптический БПК-биосенсор, который давал возможность определять БПК<sub>5</sub> в диапазоне 0,2 до 40 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> и характеризовался очень высокой долговременной стабильностью – до 1 года.

#### 2.1.5.4. Включение микроорганизмов в гидрогели на основе полисахаридов

Растущий спрос на устойчивые, биоразлагаемые и биологически безопасные материалы привел к разработке гидрогелей на основе полисахаридов. При этом переход исследований отдельных гидрогелей на основе полисахаридов в их практическое применение незначителен [212]. Это связано с их недостаточной механической прочностью, невысокой стабильностью и ограничением возможности их модификации для получения желаемых свойств.

Натуральные гидрогели на основе полисахаридов используются на практике в течение последних нескольких десятилетий, поскольку их получают из биовозобновляемых ресурсов. Они предпочтительнее синтетических или полученных химическим путем гидрогелей из-за их ряда полезных свойств. Они привлекли большое внимание из-за их высокой биосовместимости, низкой токсичности или отсутствия токсичности [213]. В последние годы разработка гидрогелей на основе полисахаридов была в центре внимания многих исследований. Наблюдается значительный рост их использования из-за их экологичной природы. Более того, полисахариды обладают различными преимуществами по сравнению с традиционными синтетическими полимерами, поскольку они обладают высокой водопоглощающей способностью, высокой прочностью геля и длительным сроком хранения [214]. Такие гидрогели, полученные из природных полимеров, интенсивно изучаются и модифицируются, чтобы сократить и заменить использование синтетических полимерных материалов. Многие природные полисахариды получают из нескольких источников, таких как растения, бактерии, водоросли, грибы и т. д., включая хитозан, альгинат и каррагинан, пектин, целлюлозу, агарозу и другие.

Агар-агар является смесью растворимых в воде полисахаридов, в основном представленных агарозой и агаропектином. Он представляет собой полисахариды клеточной стенки, которые экстрагируют водой из семейств

морских водорослей *Gelidiaceae* и *Gracilariaceae*. Агароза представляет собой полисахарид, состоящий из чередующихся фрагментов (1–4) -d-галактозы и повторяющихся – (1–3) -3,6-ангидро-1-галактозы (рис. 60А). Этот дисахарид может быть замещен сложными сульфатными эфирами и метоксилом, а также может нести остатки пировиноградной кислоты [215]. Тип, количество и расположение этих заместителей влияют на физические свойства геля и, следовательно, на его функциональность. Известно, что агар плавится при нагревании и восстанавливается при охлаждении. Этот цикл можно повторять неограниченное количество раз без ухудшения механических свойств геля. Желирующая способность агара связана не только с химическими характеристиками молекулы, но и с молекулярной массой. Агар широко используется в системах доставки лекарств, а также в качестве гелеобразующих агентов, загустителей, водоудерживающих агентов и стабилизаторов в пищевой промышленности [215].

С точки зрения применения агара для иммобилизации микроорганизмов необходимо обратить внимание, что его гель имеет несколько большие поры, чем химически сшитые гидрогели. Это может быть полезно для более легкой диффузии субстратов и продуктов реакции через биокатализатор. Еще одно важное качество гелей агара, которое нужно учитывать при иммобилизации микроорганизмов, это термотропность. Таким образом, микроорганизмы, используемые для иммобилизации в агаровую матрицу, должны быть устойчивы при кратковременном воздействии температур порядка 50–60<sup>0</sup>С. Физические и механические свойства гелей агара и агарозы зависят от их концентрации. У гидрогелей агарозы с концентрацией менее 0,3% размер пор составляет около 1 мкм, что соответствует размерам бактериальных клеток. Однако для иммобилизации микроорганизмов обычно используют гели с концентрацией более 1%, так как они более механически прочные.

Ввиду своей высокой биосовместимости и простоты изготовления гидрогели на основе агара и агарозы могут быть применены для создания рецепторных элементов БПК-биосенсоров [192]. Так в работе [55] описан БПК-

биосенсор с бактериями *Pseudomonas putida*, иммобилизованными в гель агарозы. Созданный биосенсор обладал хорошими характеристиками: диапазон измеряемых значений БПК<sub>7</sub> составил 0–50 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>, время измерения 15–45 мин. В исследовании [11] описан биосенсор на основе *Pseudomonas fluorescens* P75, включенных в гидрогель агарозы. Диапазон анализируемых значений БПК<sub>7</sub> составил 5–40 мг/дм<sup>3</sup>, а время измерения – до 20 мин.

Еще один часто применяемый при иммобилизации микроорганизмов полисахарид – хитозан. Это природный катионный сополимер, который представляет большой интерес для создания биокатализаторов [216]. Этот полимер имеет гидрофильную природу со способностью разлагаться с помощью ферментов человека, что приводит к биосовместимости и биоразлагаемости – двум биологическим свойствам, обычно необходимым для биологических устройств. Хитозан получают путем частичного деацетилирования нерастворимого природного хитина, полученного из экзоскелетов ракообразных, грибов и насекомых [217]. Хитин имеет жесткую кристаллическую структуру из-за взаимодействия водорода между ацетамидными и гидроксильными группами. Когда хитин частично деацетилирован и превращается в хитозан (рис. 59Б), количество аминогрупп и его растворимость в воде увеличиваются. Происходит пропорциональное повышение биосовместимости и биоразлагаемости. Полисахаридная структура хитозана состоит из глюкозамина и N-ацетилглюкозамина. Плотность заряда хитозана зависит от степени деацетилирования, которая представляет собой плотность аминогруппы. Хитозан – слабое основание с  $pK_a = 6,5$ , которое может растворяться в разбавленных кислотах. Из-за наличия амино- и гидроксильных групп молекулы хитозана могут образовывать водородные связи, приводящие к кристаллической структуре полимера [218]. Хитозан бывает с разной молекулярной массой и степенью ацетилирования. Средняя молекулярная масса хитозана находится в пределах 50–2000 кД. Межмолекулярные силы между полисахаридными цепями хитозана

представляют собой водородные, гидрофобные и ионные взаимодействия. На эти взаимодействия влияют молекулярная масса и ионная сила [219].

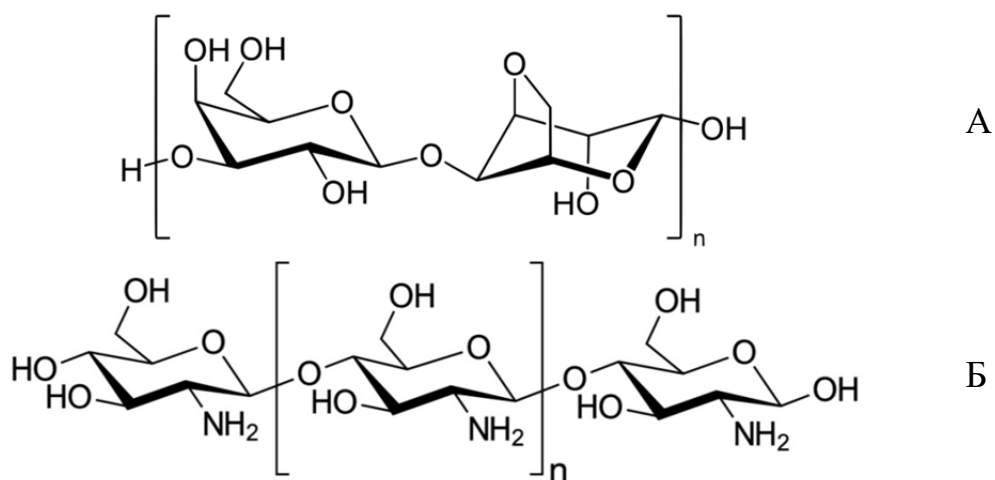


Рис. 59. Химическое строение: А – агарозы; Б – хитозана.

Образование ионотропных гидрогелей хитозана происходит в присутствии анионов, создающих солевые мостики. В качестве таких ионов применяют: фосфат-ионы, хлорид-ионы, сульфат-ионы, либо различные полимерные анионы. Ионотропные гели на основе хитозана стабильны при нейтральном и щелочном pH. Химически сшитые гидрогели хитозана образуются за счет ковалентного связывания макромеров хитозана, где образование связи необратимо. Самый простой случай химического образования гидрогеля хитозана происходит, когда он вступает в реакцию сшивки с другой собственной полимерной цепью. Амино- и гидроксильные группы, расположенные в цепях хитозана, достаточно легко вступают в химическое связывание. Такое сшивание может происходить через различные бифункциональные реагенты или реакции фотополимеризации [217].

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

### ***2.2.1 Формирование рецепторных элементов БПК-биосенсора на основе различных способов иммобилизации микроорганизмов***

Как следует из представленного выше обзора литературы, наиболее эффективным способом иммобилизации микроорганизмов является 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 работе формирование рецепторных элементов проводили путем включения клеток микроорганизмов в гидрогели на основе полисахаридов – агара и хитозана, белковый гидрогель на основе поперечно-сшитого БСА, синтетические гидрогели на основе ПВС и кремнийорганический золь-гель на основе тетраэтоксисилана, а также путем физического ограничения диализной мембраной и адсорбции на стекловолокне.

Одним из наиболее простых способов иммобилизации микроорганизмов является физическое ограничение диализной мембраной. Данный способ является наиболее простым и дешевым способом иммобилизации и в силу своей безреагентности позволяет в меньшей степени разрушать клетки и находящиеся в них ферменты. Кроме того, он дает возможность определить физиолого-биохимические характеристики сразу после формирования сенсора. Применяемая диализная мембрана с пределом пропускания 12000 Да удерживает микроорганизмы и дает возможность для легкой диффузии субстратов.

Метод адсорбции на стекловолокне также является одним из самых простых и дешевых, однако адсорбированные микроорганизмы могут легко десорбироваться в процессе измерения. Для иммобилизации микроорганизмов в работе был использован фильтр Whatman GF/A (рис. 60). Данный

стекловолоконный материал имеет высокоразвитую поверхность, что позволяет прочно удерживать адсорбированный биоматериал. Для проведения иммобилизации на подложку из стекловолокна площадью 3×3 мм наносилась суспензия клеток объемом 5 мкл, полученный биорецептор фиксировался на электроде нейлоновой сеткой.

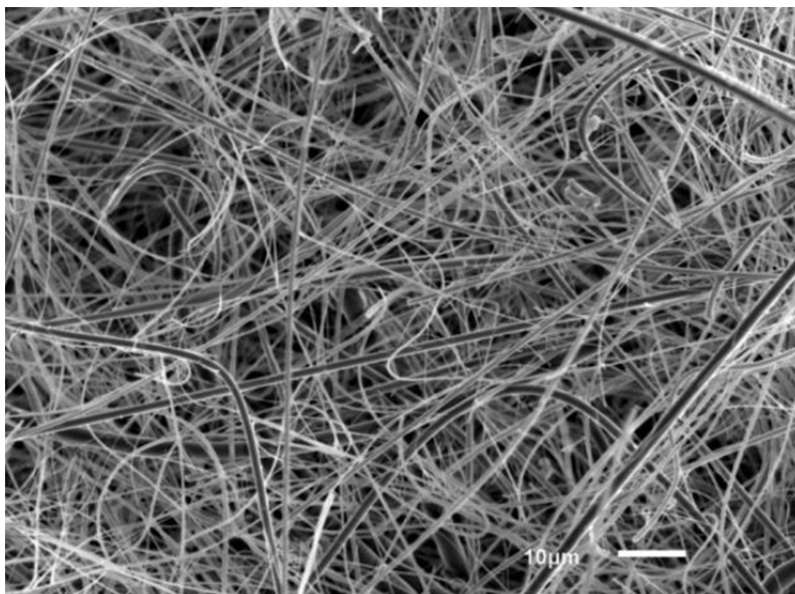


Рис. 60. Поверхность используемого стекловолоконного фильтра Whatman GF/A (метод СЭМ).

Одним из возможных подходов к созданию биосовместимых гидрогелей является иммобилизация в белковые гидрогели. При взаимодействии БСА с глутаровым альдегидом проходят реакции поликонденсации, которые приводят к получению полимерного гидрогеля. Сшивка БСА глутаровым альдегидом осложнена альдольно-кетоновой конденсацией последнего, которая может приводить к удлинению цепочек образующихся сшивок [200] (рис. 61). Основания Шиффа могут быть нестабильны, особенно в кислой среде, таким образом, образование основания Шиффа между аминогруппой лизина и свободным альдегидом (структура I) не является основным механизмом. Более вероятно, что мономерный циклический полуацеталь (структура IV) и его конденсированная форма (структура V) реагируют посредством реакций в уравнениях на рисунке 61. Однако при соблюдении всех основных условий иммобилизации, таких как концентрации реагентов и pH, образующиеся

гидрогели имеют воспроизводимую структуру. При изменении соотношения белка к сшивающему агенту меняются и свойства получаемых гелей. При высоком содержании глутарового альдегида увеличивается прочность пленки, однако падает ее проницаемость для субстратов. Кроме того, высокое содержание токсичного глутарового альдегида приводит к падению активности биоматериала.

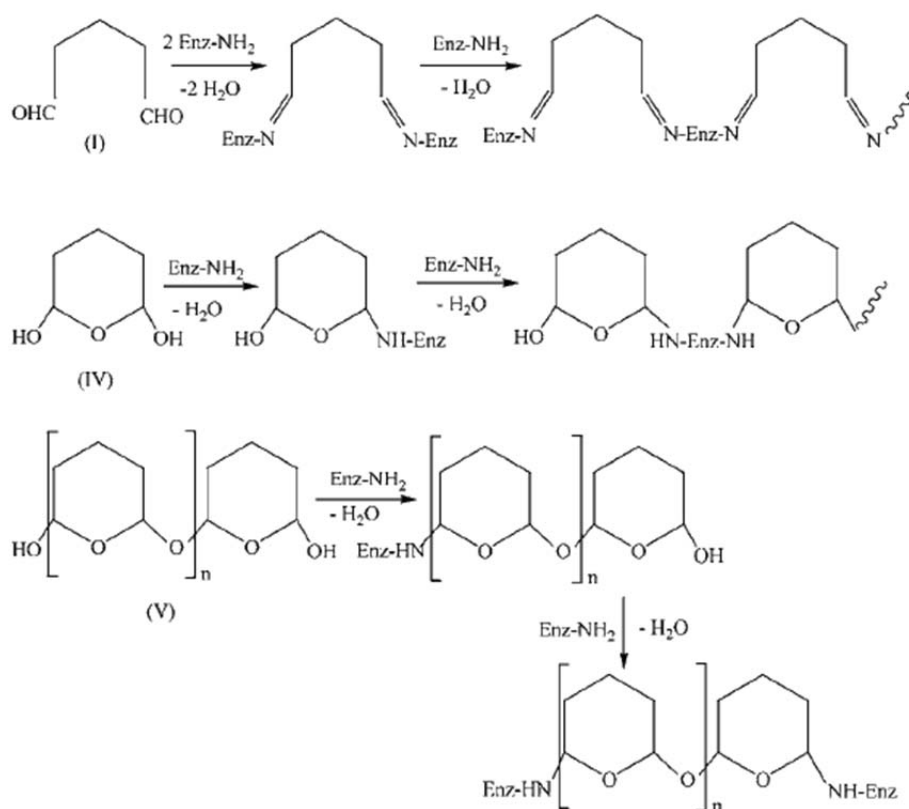


Рис. 61. Возможные реакции глутарового альдегида с белком в кислых или нейтральных условиях [200].

Нековалентные гидрогели на основе агары могут быть эффективно использованы для иммобилизации микроорганизмов при условии их получения в приемлемом диапазоне температур [192]. В работе для создания биочувствительного элемента применяли агаровый гель, нагретый до 50<sup>0</sup>С. Важно отметить, что нагревание было кратковременным и физиологические процессы в клетках не нарушались. Такой подход позволял относительно просто создавать более стабильные рецепторные элементы, чем при адсорбции микроорганизмов.



В качестве еще одного биосовместимого природного полимера для иммобилизации микроорганизмов из-за своей биосовместимости и доступности был использован гидрогель хитозана. Хитозан из-за наличия большого количества аминогрупп хорошо растворим в слабокислой среде, например в слабом растворе уксусной кислоты [220]. При добавлении противоионов используемого буфера данные растворы могут образовывать ионотропные гелевые матрицы [221] (рис. 62).

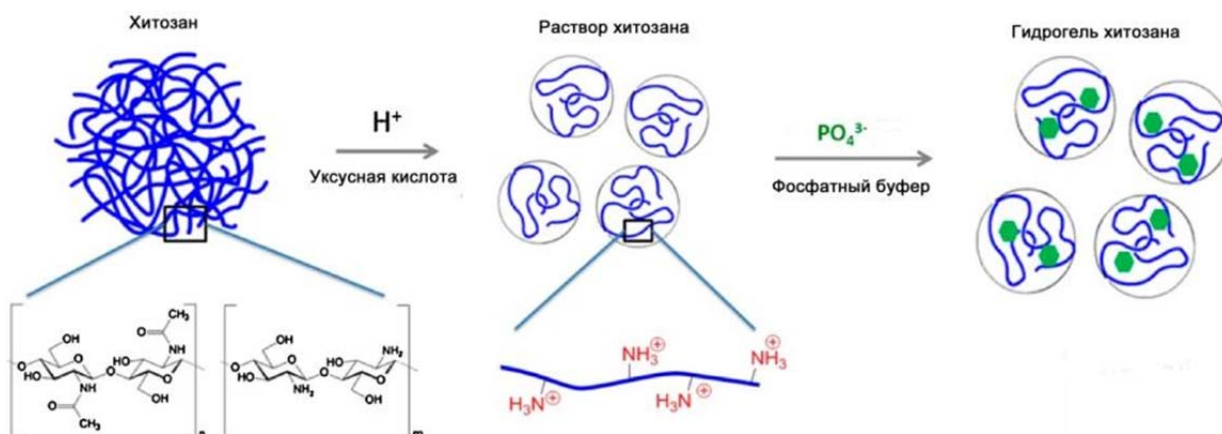


Рис. 62. Механизм образования гидрогеля хитозана.

В данной работе был использован низкомолекулярный хитозан ( $M_r=30$  кДа) со степенью деацетилирования около 85%. Такой полимер позволяет создавать матрицы с эффективной диффузией субстратов и продуктов, обеспечивая надежное закрепление клеток внутри гидрогеля. Для образцов хитозана до и после формирования гидрогеля получены ИК-спектры (рис. 63).

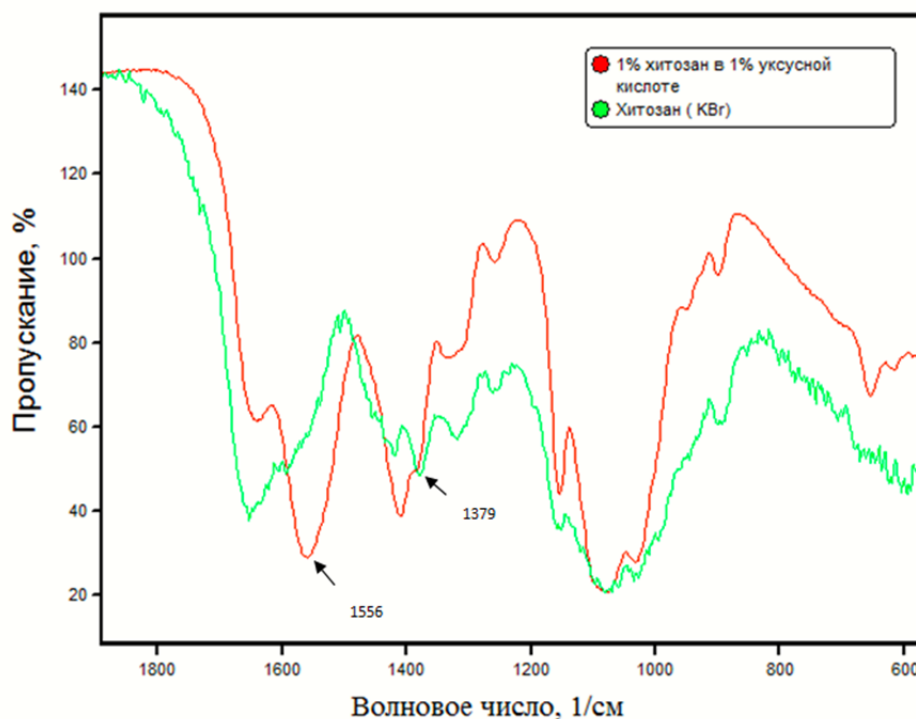


Рис. 63. ИК-спектры 1% хитозана в 1% уксусной кислоте и хитозана (KBr) ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ , приставка МНВПО): 1556 – деформационные колебания  $-\text{NH}_3^+$ ; 1379 – деформационные колебания  $-\text{OH}$  – связи.

В качестве сравнения на рис. 63 представлены ИК-спектры образцов 1% хитозана в 1% уксусной кислоте и хитозана (KBr). На спектре 1% хитозана в 1% уксусной кислоте наблюдается появление полосы поглощения при частоте  $1556 \text{ см}^{-1}$ , что соответствует деформационным колебаниям  $-\text{NH}_3^+$ . Это подтверждает наличие реакции протонирования аминогруппы хитозана раствором уксусной кислоты. Уменьшение деформационных колебаний  $-\text{OH}$  связи при частоте  $1379 \text{ см}^{-1}$  связано с появлением объемного заместителя в соседнем положении.

Как было указано выше, ПВС обладает рядом полезных свойств (нетоксичность, стабильность и т. д.) при использовании его для иммобилизации микроорганизмов [180]. ПВС состоит из линейных макромолекул, и гидрогели на его основе растворимы в воде. Для создания биорецептора на основе ПВС гидрогель должен иметь трехмерную сетчатую структуру, которую могут обеспечить сшивающие агенты [222]. В настоящей

работе для получения сетчатого, нерастворимого в воде полимера использовали реакцию этерификации ПВС с янтарной кислотой. Для чего к 5% раствору ПВС при 40<sup>0</sup>С добавляли навеску янтарной кислоты в отношении ПВС : кислота = 50 : 1 (по массе). Янтарная кислота не только не токсична, но и участвует в процессе клеточного дыхания аэробных организмов, что делает ее перспективным агентом для сшивки ПВС при получении рецепторных элементов биосенсоров.

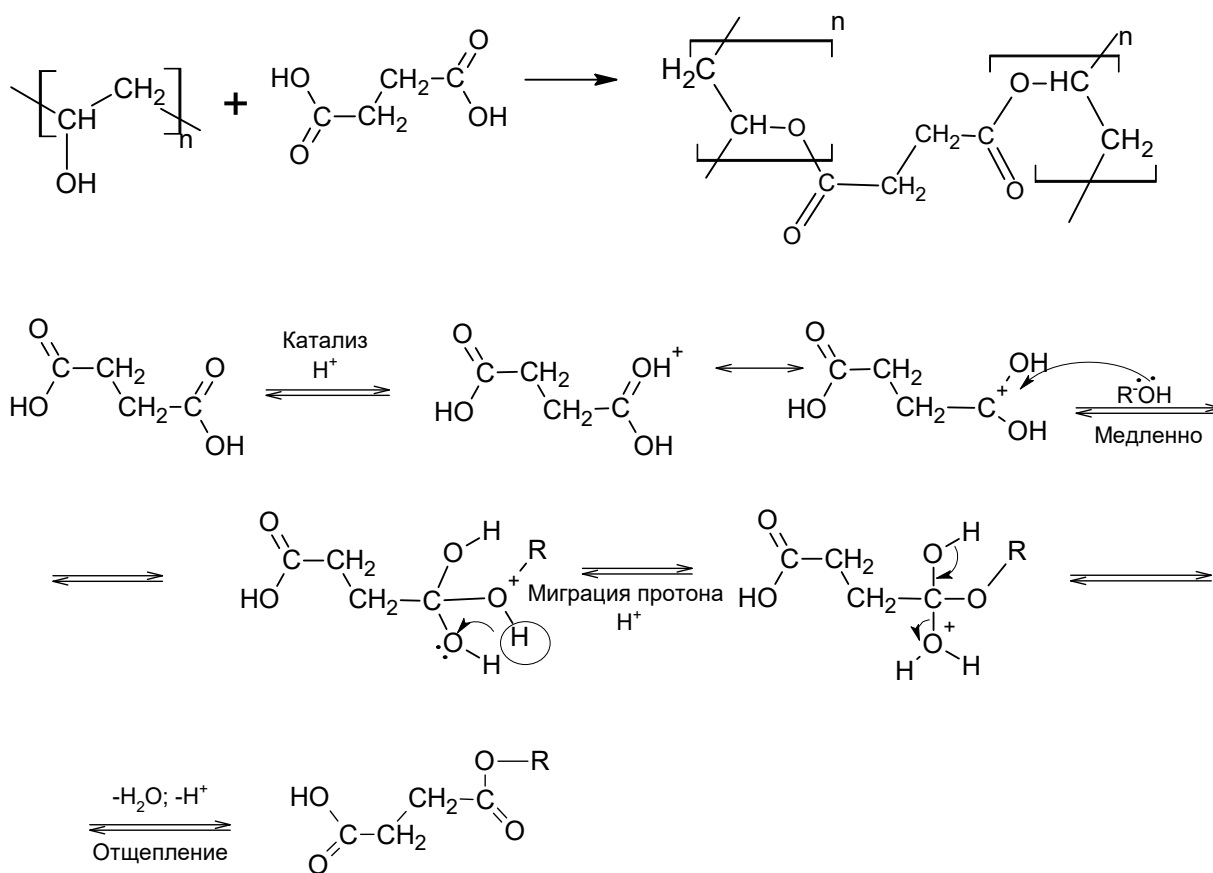


Рис. 64. Схема сшивки ПВС янтарной кислотой и механизм реакции этерификации.

Механизм реакции этерификации протекает через несколько стадий (рис. 64). Сначала в ходе кислотного катализа происходит образование двух резонансных структур янтарной кислоты, затем медленно происходит присоединение нуклеофила – молекулы спирта (ПВС), затем миграция протона, и в конце реакция дегидратации, то есть отщепление воды и отщепление

протона. Для доказательства наличия сложноэфирной группы в полимере были получены ИК-спектры гидрогелей модифицированного и исходного ПВС при комнатной температуре. В ИК-спектрах использованной карбоновой кислоты наблюдается характеристическая полоса поглощения в области (1698–1688 см<sup>-1</sup>) [223].

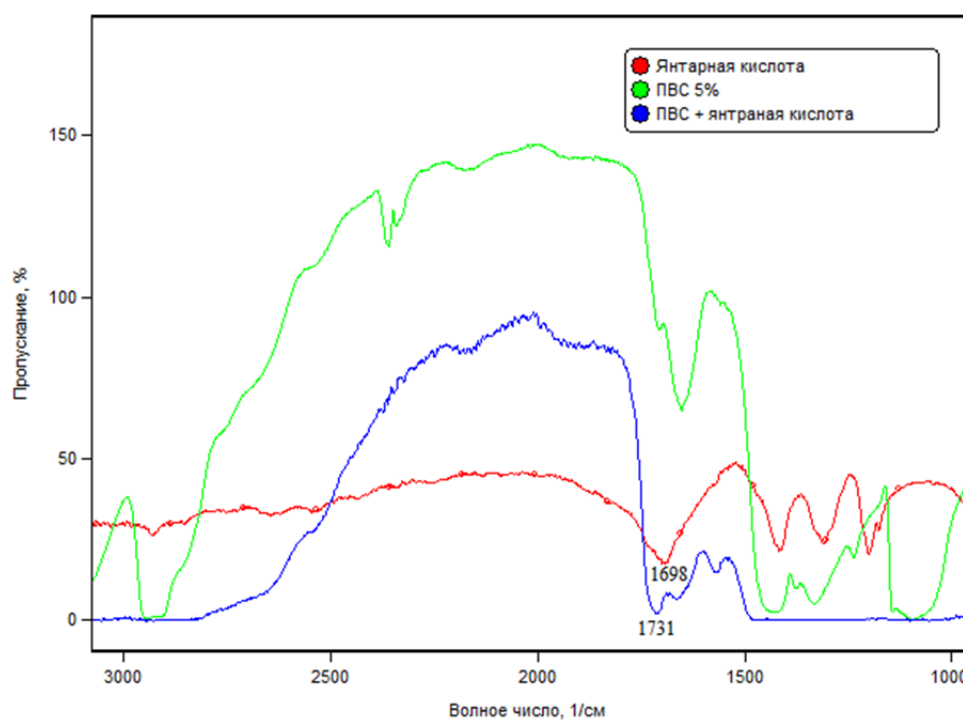


Рис. 65. ИК-спектр ПВС, сшитого янтарной кислотой ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1695 см<sup>-1</sup> – колебания ацетильной группы остаточного поливинилацетата; 1698 см<sup>-1</sup> – валентные колебания карбоксильной –COOH группы; 1731 см<sup>-1</sup> – валентные колебания сложноэфирной –COO– группы.

На рисунке 65 представлен ИК-спектр ПВС, модифицированного янтарной кислотой. В нем можно наблюдать исчезновение полосы поглощения карбоксильной группы при 1698 см<sup>-1</sup> и появление полосы поглощения при 1731 см<sup>-1</sup>, характерной для сложных эфиров.

Новым подходом при иммобилизации микроорганизмов, 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. Синтез сетчатого полимера на основе ПВС проводили путем модификации линейного полимера N-винилпирролидоном в присутствии нитрата аммония церия (IV) в качестве инициатора радикальной сшивки. Синтез проходил в атмосфере азота. Для подтверждения сшивки получающегося полимера было проведено изучение продукта синтеза и смеси исходных веществ методом ИК-спектроскопии (рис. 66).

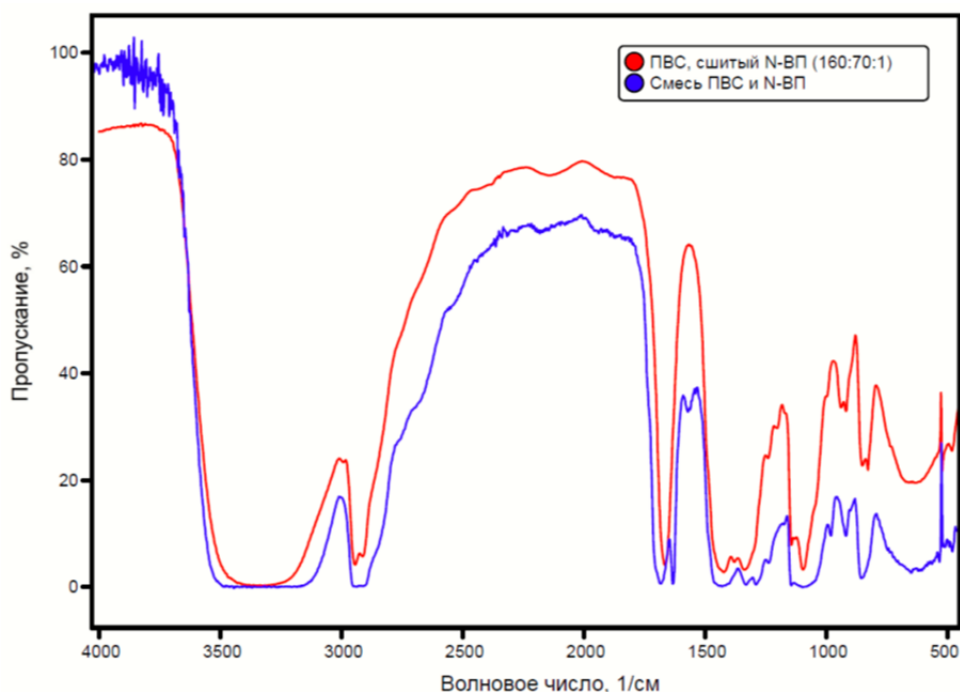


Рис. 66. ИК-спектры ПВС модифицированного N-ВП и смеси исходных соединений.

В исследуемом ИК-спектре продукта реакции нет полосы поглощения связей C=C ( $1625 \text{ см}^{-1}$ ), что говорит об их разрыве в молекуле N-винилпирролидона. При этом в образце, полученном без внесения катализатора, полоса поглощения связей C=C сохраняется. Полоса поглощения связей C=O в молекуле N-винилпирролидона остается в продукте сшивки. Кроме того, в продукте реакции появляются три полосы поглощения  $1136 \text{ см}^{-1}$ ,

935  $\text{cm}^{-1}$  и 917  $\text{cm}^{-1}$ , соответствующие образованию связи  $\text{CH-O-CH}$ , что подтверждает образование связей между молекулами ПВС за счет их сшивки N-винилпирролидоном.

ПВС может быть использован не только в виде химически-модифицированного полимера и в виде структуроуправляющего агента в кремниевой золь-гель матрице [41]. Такой подход позволяет создать композиционный материал на основе ПВС, характеризующийся нерастворимостью в воде при сохранении присущей ПВС нетоксичности и биосовместимости. Известно, что кремнеземы на основе алкоксисиланов инертны, нетоксичны, биосовместимы и не растворяются в воде, а синтез материалов на их основе можно проводить в мягких условиях, с использованием золь-гель технологий [224]. При использовании золь-гель технологии возможно более легкое и простое формирование электрохимических и оптических биосенсоров, которые можно применять для определения концентрации различных аналитов в тестируемых растворах [225]. Имобилизация микроорганизмов в органосиликатные матрицы на основе тетраэтоксисилана позволяет инкапсулировать каждую клетку индивидуально, что препятствует ее дальнейшему делению. В данной работе для синтеза золь-гель матрицы с ПВС использовали тетраэтоксисилан, который является наиболее популярным силановым прекурсором (рис. 67).

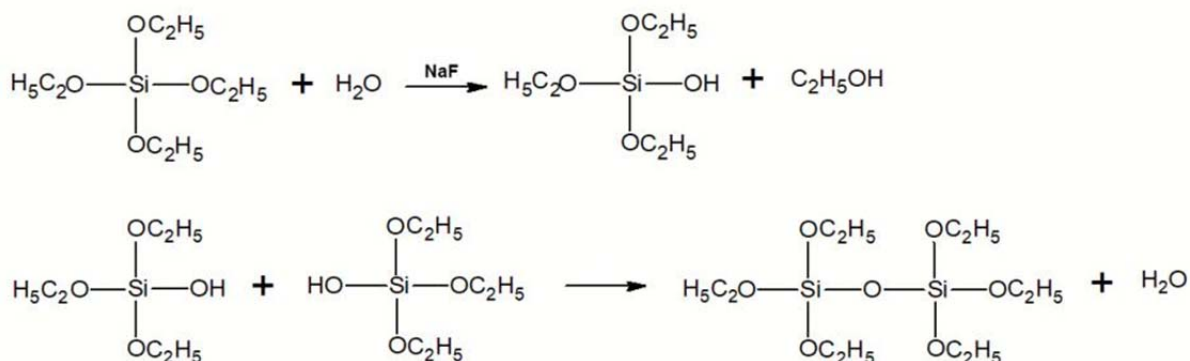


Рис. 67. Реакция синтеза золь-гель матрицы на основе ТЭОС.

Полученные ИК-спектры золь-гель матриц при использовании в качестве структурообразователя ПВС в условиях основного катализа представлены на рисунке 68.

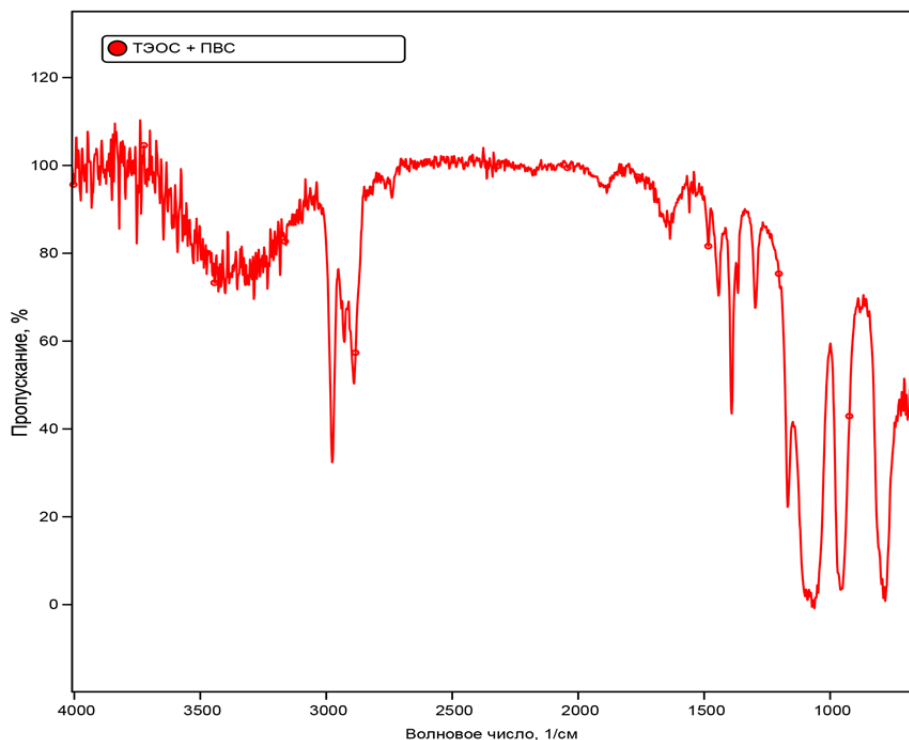


Рис. 68. ИК-спектр золь-гель матрицы на основе ТЭОС и ПВС.

В ИК-спектрах присутствует полоса поглощения  $1100\text{ см}^{-1}$ , которая принадлежит валентным колебаниям Si-O-Si групп, что подтверждает образование кремниевого полимера. Имеются интенсивные полосы поглощения  $1070$  и  $770\text{--}790\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к валентным (асимметричным и симметричным) колебаниям Si-O. Полосы  $2970\text{--}2980\text{ см}^{-1}$  и  $1380\text{--}1390\text{ см}^{-1}$  относятся к  $\nu_{\text{C-H}}$  и  $\delta_{\text{C-H}}$  колебаниям  $\text{CH}_3$ -групп соответственно, а  $2880\text{--}2890\text{ см}^{-1}$  — к  $\nu_{\text{C-H}}$   $\text{CH}_2$ -групп. Также присутствуют полосы  $3650\text{--}3590\text{ см}^{-1}$ ,  $3400\text{ см}^{-1}$ ,  $1640\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к колебаниям OH-группы. Все полученные результаты хорошо согласуются с литературой [226].

Для изучения влияния метода иммобилизации на характеристики биорецепторных элементов в качестве модельных микроорганизмов использовали бактерии *P. yeai*, которые являются типичными представителями

микроорганизмов активного ила, используемого в стандартном методе. Каждый рецепторный элемент содержал одинаковое количество биомассы (100 мг).

### ***2.2.2. Характеристики БПК-биосенсоров на основе иммобилизованных разными способами бактерий *P. uvei****

Для выбора метода иммобилизации микроорганизмов было произведено сравнение основных характеристик биосенсоров на основе рецепторных элементов с бактериями *P. uvei*, иммобилизованными выбранными способами: операционной стабильности, долговременной стабильности, диапазона анализируемых значений БПК и экспрессности анализа.

Операционная стабильность характеризует стабильность отклика биосенсора на одинаковые концентрации аналита несколько раз подряд. С точки зрения метрологии химического анализа она связана с характеристикой – повторяемостью. Для расчета операционной стабильности 15 раз последовательно измеряли отклик биосенсора при добавлении в кювету раствора ГГС и рассчитывали относительное стандартное отклонение результатов. Временной промежуток между измерениями был приблизительно 30 минут. Эксперименты проводились через 5 суток после формирования биорецептора. Пример полученных результатов по определению операционной стабильности представлен на рисунке 69. В таблице 2 приведены относительные стандартные отклонения при  $n=15$  и  $P=0,95$  для созданных биосенсоров.



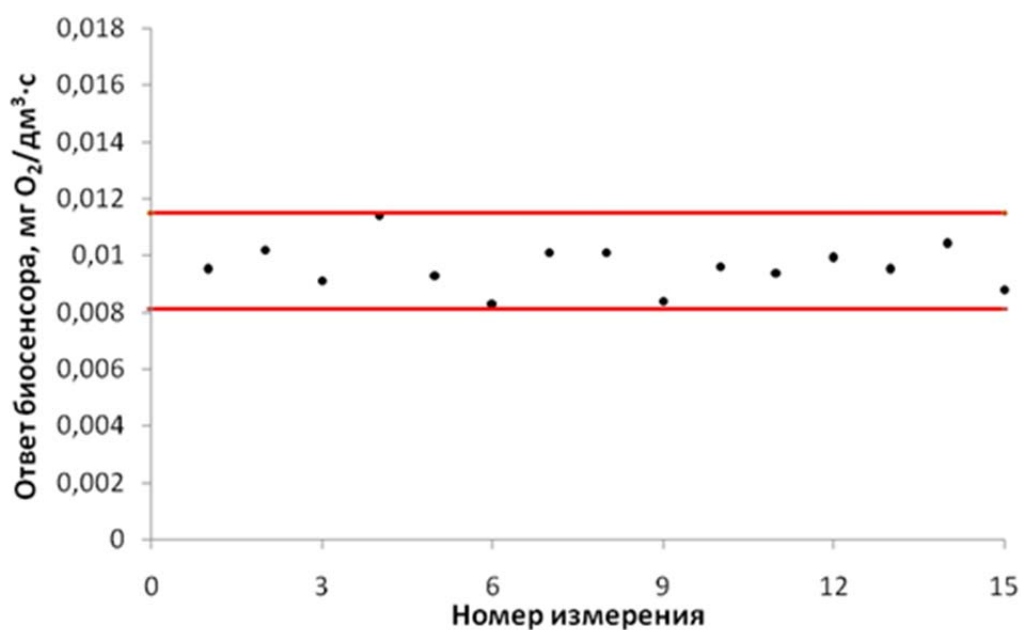
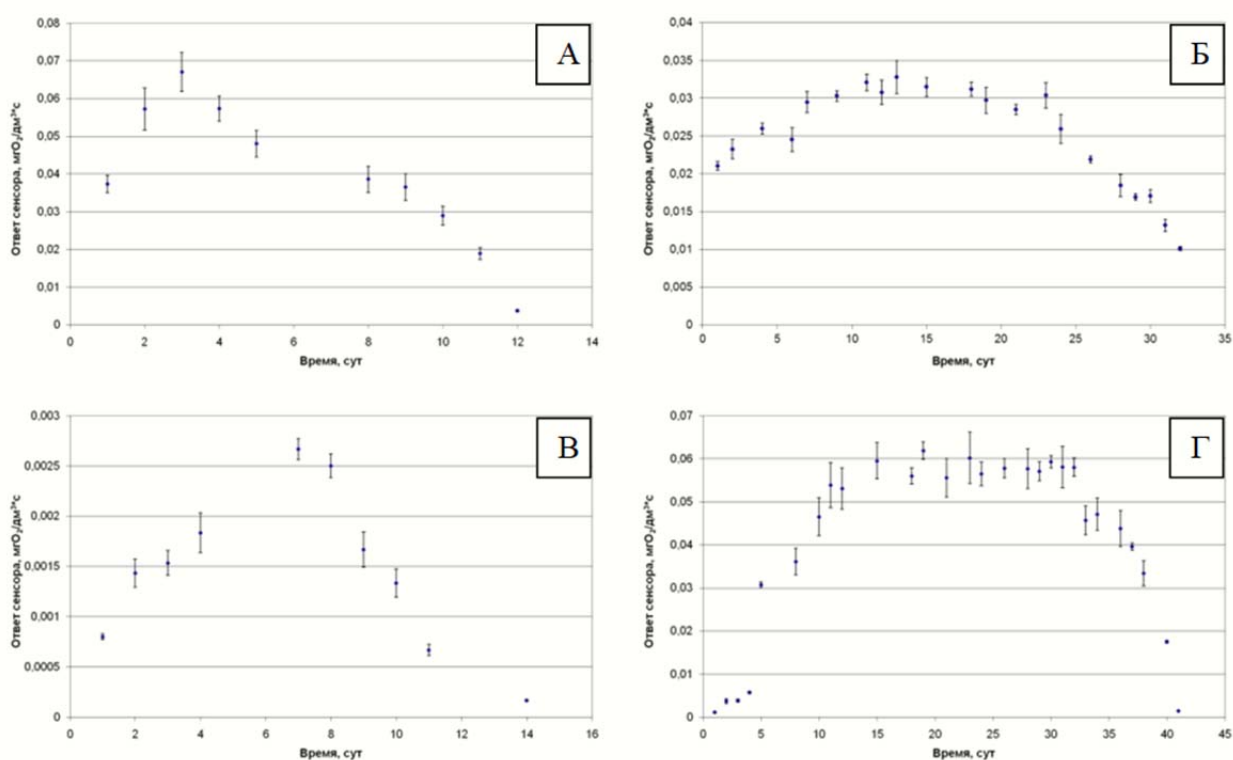


Рис. 69. Операционная стабильность биосенсора на основе *P. yeii*, иммобилизованных с использованием диализной мембраны.

Время работы рассчитывали как время, за которое ответ сенсора не падал более чем на 25% от начального. Для этого определяли ответ сенсора при введении в измерительную ячейку одинаковой концентрации ГГС. Вид зависимости ответа созданных сенсоров от времени приведен на рисунке 70.



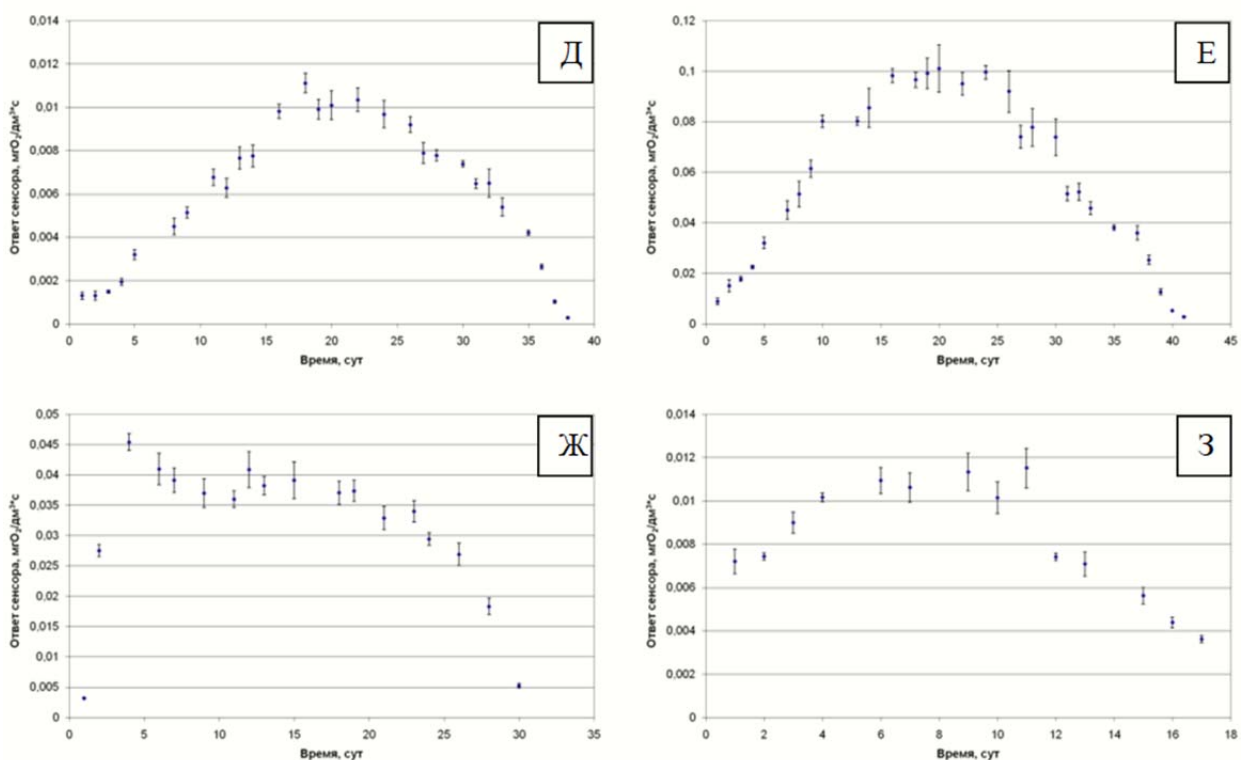


Рис. 70. Долговременная стабильность биосенсора с рецепторным элементом на основе бактерий *P. uvei*, иммобилизованных: А – адсорбцией на стекловолкне; Б – физическим ограничением диализной мембраной; В – включением в золь-гель на основе ТЭОС; Г – включением в гель хитозана; Д – включением в гель ПВС, сшитого янтарной кислотой; Е – включенных в гель ПВС, сшитого N-ВП; Ж – включенных в гель поперечно-сшитого БСА; З – включенных в агаровый гель.

Как видно из представленных рисунков, сразу после проведения иммобилизации ответ большинства биосенсоров увеличивается, что связано с восстановлением физиологической активности клеток после стресса, вызванного иммобилизацией. Кроме того, характерный вид кривых долговременной стабильности может говорить о росте микроорганизмов в матрицах. В таблице 16 приведены сводные данные по операционной и долговременной стабильности разработанных биосенсоров на основе созданных рецепторных элементов.

Таблица 16. Стабильность БПК-биосенсоров на основе разных способов иммобилизации.

Метод иммобилизации	Повторяемость, % (n=15, P=0,95)	Время работы, сут.
Адсорбция	5,4	10
Физическое ограничение мембраной	8,4	30
Включение в гель БСА	5,9	30
Включение в золь-гель на основе ТЭОС	7,1	11
Включение в гель хитозана	6,1	40
Включение в гель ПВС, сшитого янтарной к-той	6,3	36
<b>Включение в гель ПВС, сшитого N-ВП</b>	<b>2,3</b>	<b>40</b>
Включение в агаровый гель	5,8	15

Наименьшим стандартным отклонением результатов обладает биосенсор с иммобилизованными в ПВС, сшитый N-ВП бактериями. Этот же сенсор обладает и наибольшим временем стабильной работы. Еще одним методом иммобилизации, который позволяет создавать стабильные биочувствительные элементы, является включение в гель хитозана.

Иммобилизация микроорганизмов может накладывать диффузионные ограничения на ферментативные реакции в клетках, что может проявляться в снижении чувствительности биосенсора. Наиболее важным количественным критерием чувствительности биосенсора является нижняя граница анализируемых значений БПК ( $C_n$ ) — это минимальная концентрация или значение показателя, которое можно количественно выявить с заданной

степенью точности. Для определения данного параметра находили стандартные отклонения при различных БПК<sub>5</sub>. По построенным зависимостям определяли значение БПК<sub>5</sub>, начиная с которого величина стандартного отклонения становится меньше, чем 0,33 [227]. В качестве модельного субстрата была использована ГГС. На рис. 71 в качестве примера, показаны экспериментальные зависимости относительного стандартного отклонения от БПК<sub>5</sub> для биосенсора с иммобилизованными ограничением диализной мембраной бактериями. Полученные значения нижней границы представлены в таблице 17.

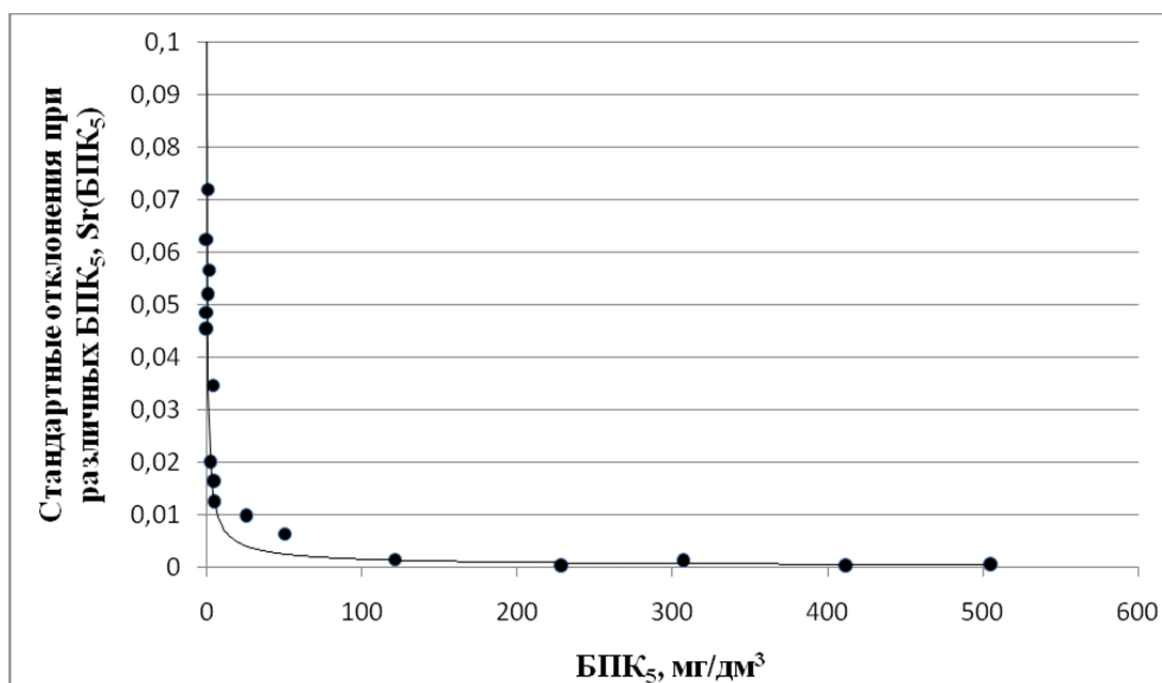


Рис. 71. Экспериментальная зависимость относительного стандартного отклонения от БПК для биосенсора с иммобилизованными ограничением диализной мембраной бактериями.

Таблица 17. Чувствительность БПК-биосенсоров на основе бактерий *P. yeai* ВКМ В-3302, иммобилизованных разными способами.

Метод иммобилизации	Нижняя граница анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг/дм <sup>3</sup>
Адсорбция	1,3
Физическое ограничение мембраной	0,6
Включение в гель БСА	0,29
Включение в золь-гель на основе ТЭОС	0,1
Включение в гель хитозана	1,41
Включение в гель ПВС, сшитого янтарной к-той	0,9
<b>Включение в гель ПВС, сшитого N-ВП</b>	<b>0,1</b>
Включение в агаровый гель	1,86

Исходя из полученных результатов, лучшей чувствительностью характеризуется биосенсор, полученный иммобилизацией микроорганизмов в гидрогель ПВС, модифицированного N-ВП. Важным потребительским качеством методики анализа служит его время. Для анализа с использованием биосенсора общее время анализа состоит из времени отклика сенсора и времени промывки кюветного отделения и рецептора. Результаты определения временных характеристик биосенсоров с разными методами иммобилизации приведены в таблице 18.

Таблица 18. Характеристики экспрессности БПК-биосенсоров на основе иммобилизованных разными способами бактерий.

Метод иммобилизации	Время отклика, мин	Время промывки системы, мин	Время анализа, мин
Адсорбция	2–3	5–7	7–10
Физическое ограничение мембраной	2–3	4–5	6–8
Включение в гель БСА	3–4	7–9	10–13
Включение в золь-гель на основе ТЭОС	2–3	4–10	6–13
Включение в гель хитозана	2–3	2–3	4–6
Включение в гель ПВС, сшитого янтарной к-той	3–4	4–6	7–10
<b>Включение в гель ПВС, сшитого N-ВП</b>	2–3	2–3	<b>4–6</b>
Включение в агаровый гель	3–6	7–15	10–21

Из представленных данных следует, что с точки зрения экспрессности анализа лучшим способом иммобилизации является включение в гели хитозана и ПВС, сшитого N-ВП. Суммарные данные по характеристикам биосенсора с разными способами иммобилизации представлены в таблице 19.

Таблица 19. Характеристики БПК-биосенсоров на основе иммобилизованных разными способами бактерий.

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
Адсорбция	5,4	10	1,3	7–10
Физическое ограничение мембраной	8,4	30	0,6	6–8
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

Таким образом, по сумме всех параметров и потребительских качеств лучшим является биосенсор с рецепторными элементами 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.

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

Для синтеза модифицированного полимера, который можно эффективно использовать для включения биоматериала, важно определить влияние параметров реакции на свойства получаемого гидрогеля. Синтез сетчатого полимера на основе ПВС проводили путем модификации линейного полимера N-винилпирролидоном в присутствии нитрата аммония церия (IV) в качестве инициатора радикальной сшивки. В ходе исследования варьировали продолжительность синтеза и соотношение реагентов и инициатора (таблица 20). Качество полученных матриц оценивали по ИК-спектрам, доле сшитого полимера и чувствительности определения БПК с помощью биосенсоров с рецепторными элементами на основе иммобилизованных в эти матрицы микроорганизмов.

Образцы всех гелей поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном при разном соотношении компонентов, изучены методом ИК-спектроскопии. Сравнение некоторых из спектров представлено на рисунке 72.



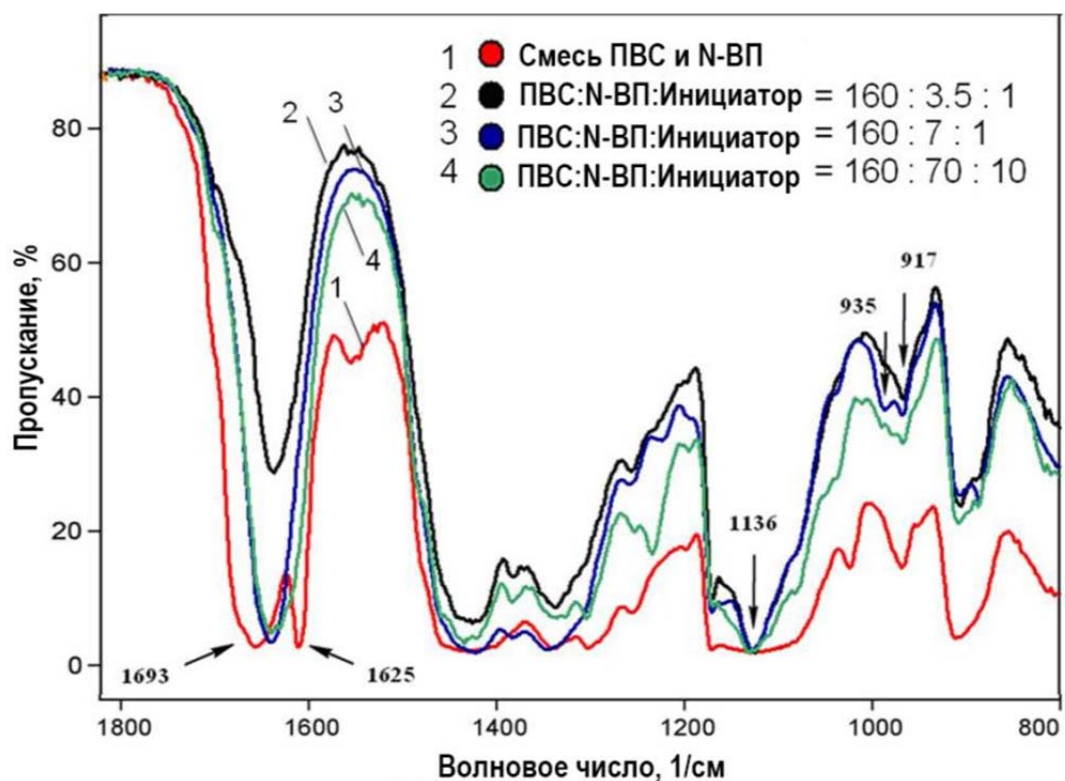


Рис. 72. ИК-спектры ПВС, модифицированного N-ВП, при варьировании соотношений исходных компонентов.

В исследуемом ИК-спектре продукта реакции вне зависимости от соотношения исходных реагентов нет полосы поглощения связей  $C=C$ , что говорит об их разрыве в молекуле N-винилпирролидона. Также при всех соотношениях исходных веществ в продукте реакции появляются три полосы поглощения  $1136\text{ см}^{-1}$ ,  $935\text{ см}^{-1}$  и  $917\text{ см}^{-1}$ , соответствующие образованию связи  $CN-O-CN$ , что подтверждает образование связей между молекулами ПВС за счет их сшивки N-винилпирролидоном. На рисунке 73 приведены ИК-спектры продукта модификации поливинилового спирта при разном времени реакции.

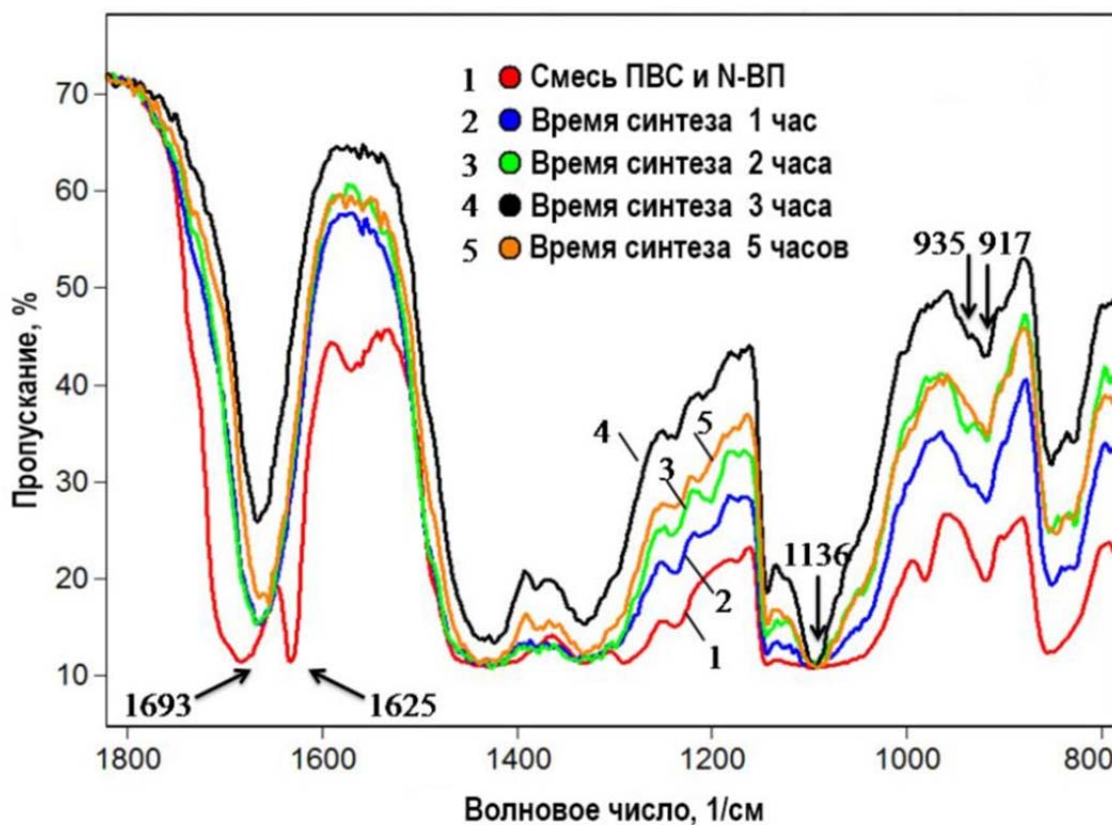


Рис. 73. ИК-спектры ПВХ, модифицированного N-ВП, при варьировании времени синтеза.

Из рисунка 73 видно, что интенсивность характеристической полосы поглощения при  $1136\text{ см}^{-1}$  увеличивается при увеличении продолжительности реакции от 1 до 5 часов. Также при любом используемом времени синтеза наблюдается исчезновение полосы поглощения связей  $\text{C}=\text{O}$  в молекуле N-винилпирролидона.

Таблица 20. 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 О <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

На свойства полученного полимера оказывает влияние соотношение исходных компонентов. Недостаток N-ВП приводил к растворению образцов полученного полимера при температуре 60 °С. При более высокой степени сшивки получали стабильные рецепторные элементы. Максимальная доля сшитого полимера (70%) была получена в полимере при соотношении ПВС: N-ВП: инициатор = 160:70:10 и времени синтеза 3 ч. Однако этот полимер, как и полимер с соотношением исходных компонентов 160:35:5, значительно затруднял диффузию кислорода и окисляемых веществ из пробы к иммобилизованным в гидрогеле микроорганизмам. Таким образом, увеличение доли сшивки более 55% приводило к снижению чувствительности биосенсора. На основе полученных результатов для дальнейшей работы был использован полимер с соотношением компонентов 160:7:1 и временем синтеза 3 часа.

Для выбора оптимального содержания дрожжевых и бактериальных микроорганизмов получены и протестированы биорецепторы с разным количеством клеток (рис. 74, 75).

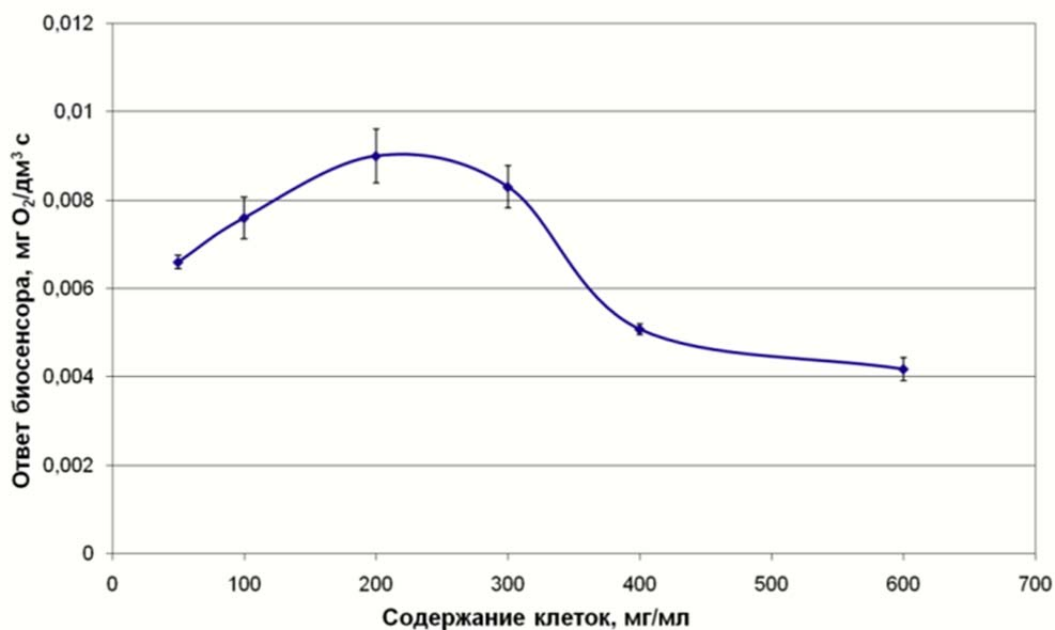


Рис. 74. Зависимость аналитического сигнала биосенсора от содержания дрожжей *D. hansenii* в биорецепторе (ответ на 20 мг/дм<sup>3</sup> ГГС).

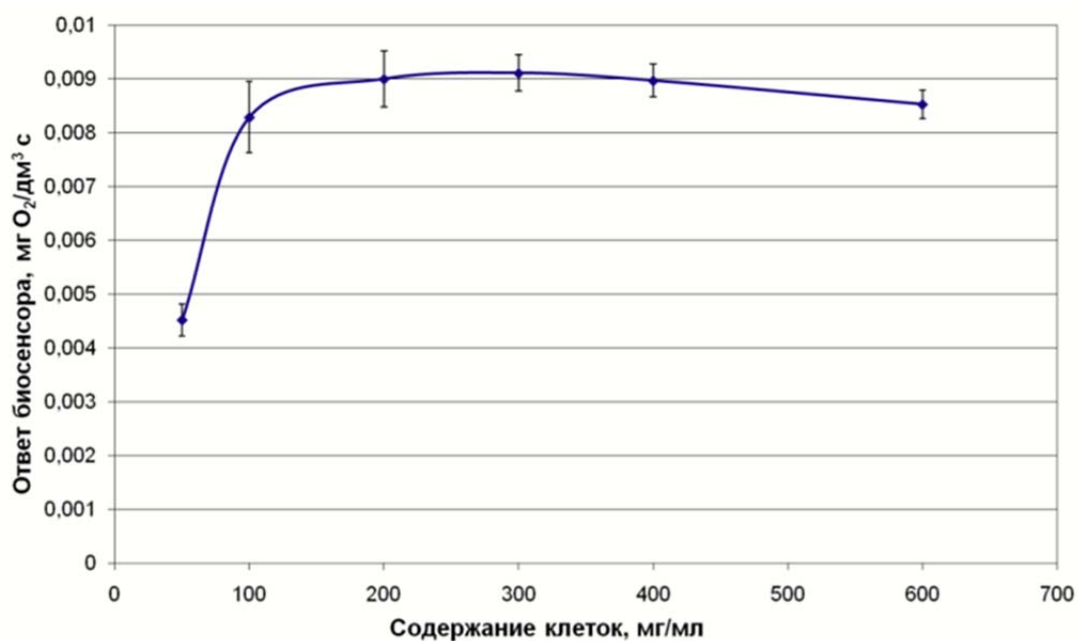


Рис. 75. Зависимость аналитического сигнала биосенсора от содержания бактерий *P. yeii* в биорецепторе (ответ на 20 мг/дм<sup>3</sup> ГГС).

Повышение содержания микроорганизмов в геле до определенных значений приводит к росту чувствительности анализа, дальнейшее увеличение содержания микроорганизмов приводит к пропорциональному

увеличению фонового сигнала сенсора и сокращению линейного диапазона биосенсора. Увеличение массы клеток (особенно более крупных дрожжей) более 300 мг в мл геля приводит к ухудшению его механических свойств и вымыванию клеток. Исходя из этого, оптимальным является содержание микроорганизмов равное 200 мг/мл. На рисунке 76 показана зависимость аналитического сигнала от толщины рецепторного элемента.

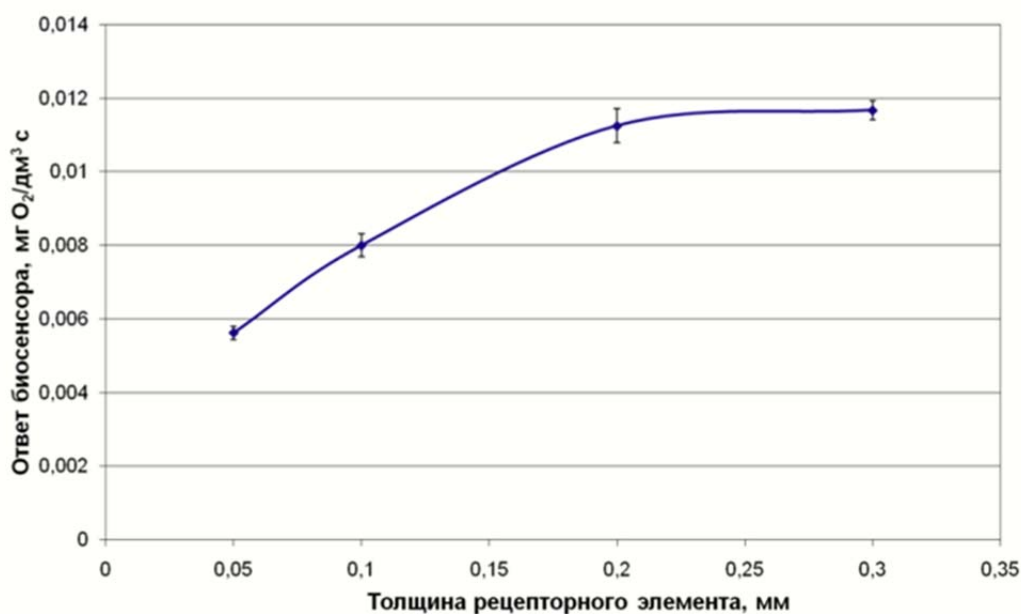


Рис. 76. Зависимость аналитического сигнала биосенсора от толщины рецепторного элемента на основе бактерий *P. yeii*.

Повышение толщины биорецептора приводит к пропорциональному увеличению массы биокатализатора, что в свою очередь приводит к увеличению чувствительности биосенсора. Однако дальнейшее увеличение толщины рецепторного элемента более 0,2 мм приводит к появлению диффузионных затруднений и отсутствию чувствительности.

#### **2.4. Изучение химической структуры полимера ПВС, сшитого N-винилпирролидоном**

Для определения химической структуры синтезированного полимера продукты реакции изучены методами одно- и двухмерной ЯМР-спектроскопии

(методы:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -DEPT, COSY, HSQC и HMQC). Для исследования были взяты соотношения ПВС: N-ВП: инициатор = 160:70:10 и 160:7:1. Протонный и углеродные спектры приведены на рисунках 77–82.

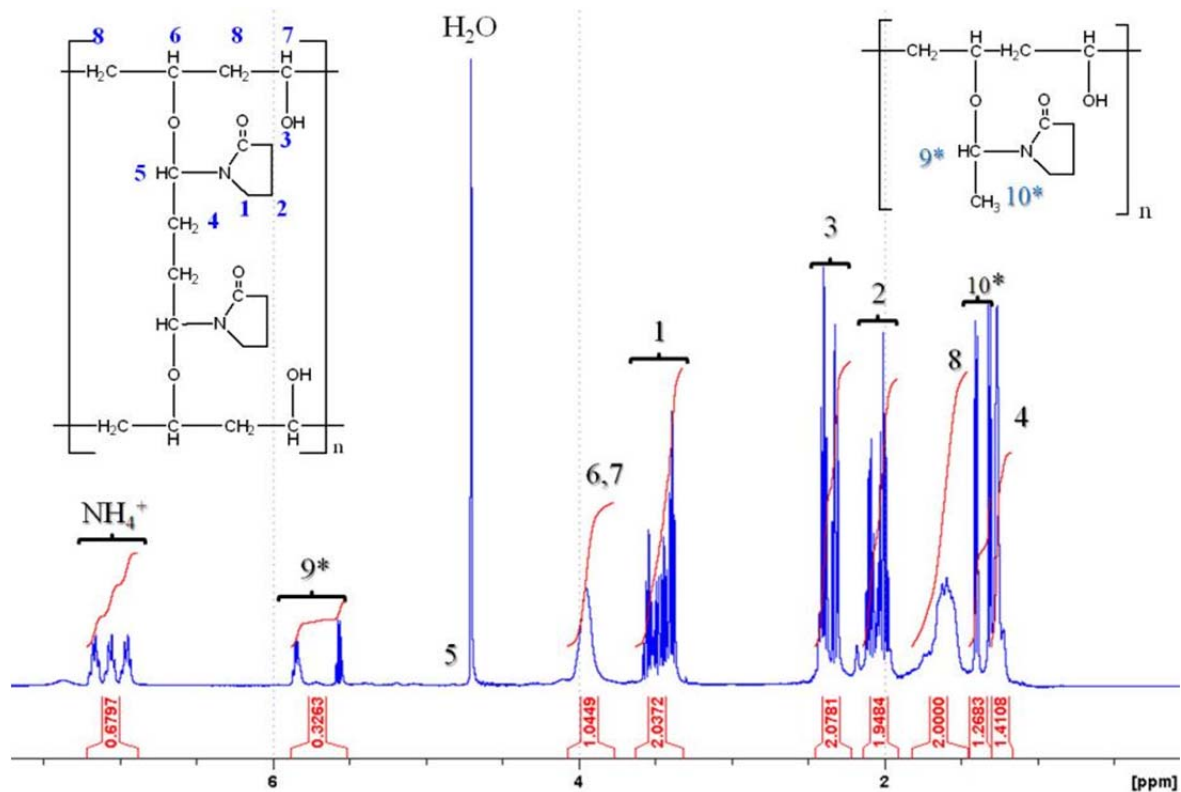


Рис. 77.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр синтезированного полимера (соотношение компонентов 160:70:10).

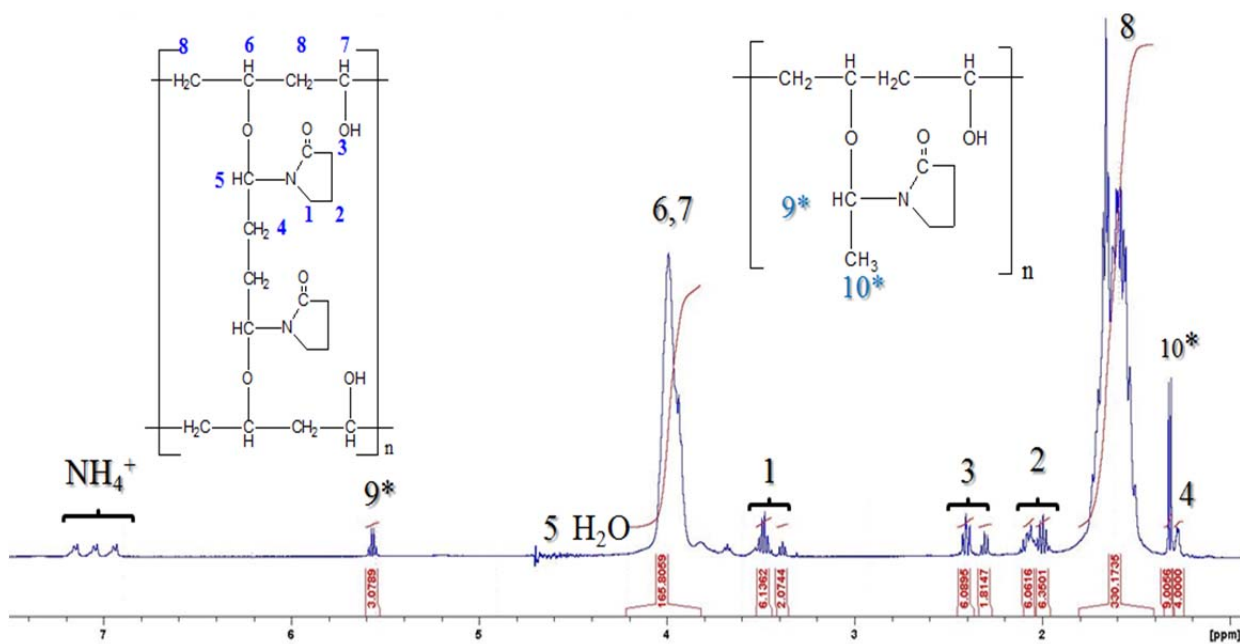


Рис. 78.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр синтезированного полимера (соотношение компонентов 160:7:1).

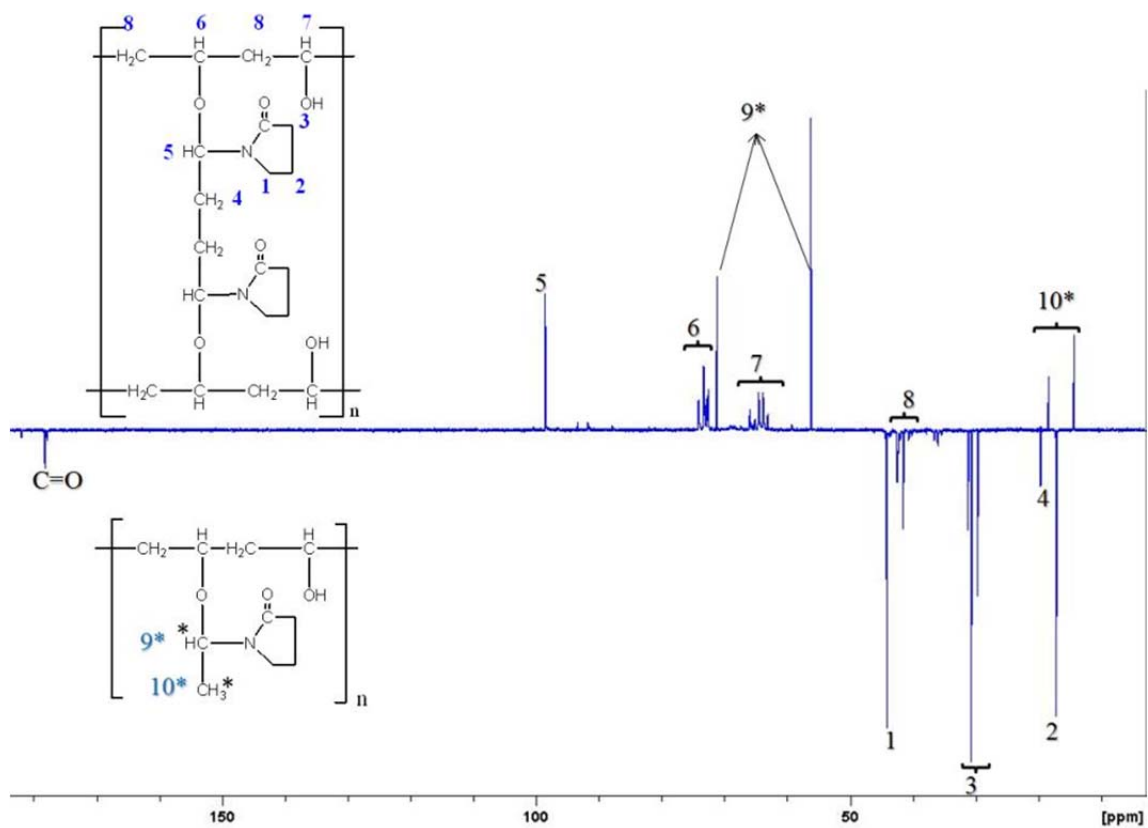


Рис. 79.  $^{13}\text{C}$  (DEPT) ЯМР-спектр синтезированного полимера (соотношение компонентов 160:70:10).

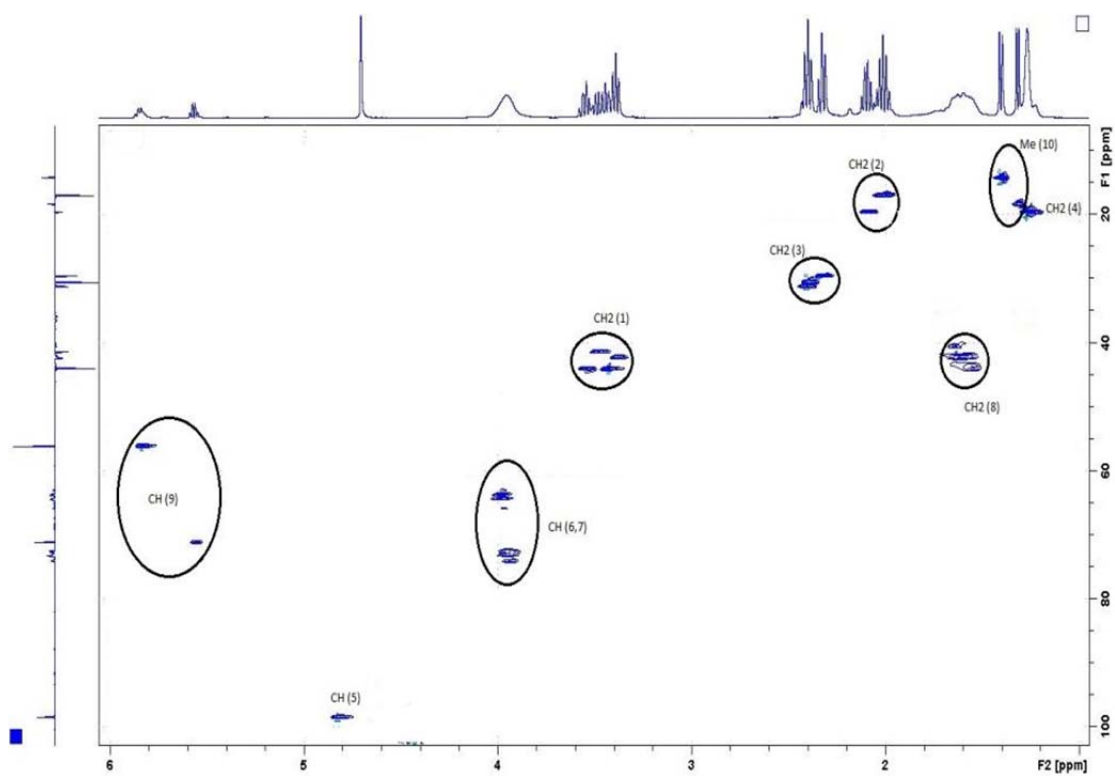


Рис. 80. HSQC ЯМР-спектр синтезированного полимера (соотношение компонентов 160:70:10).

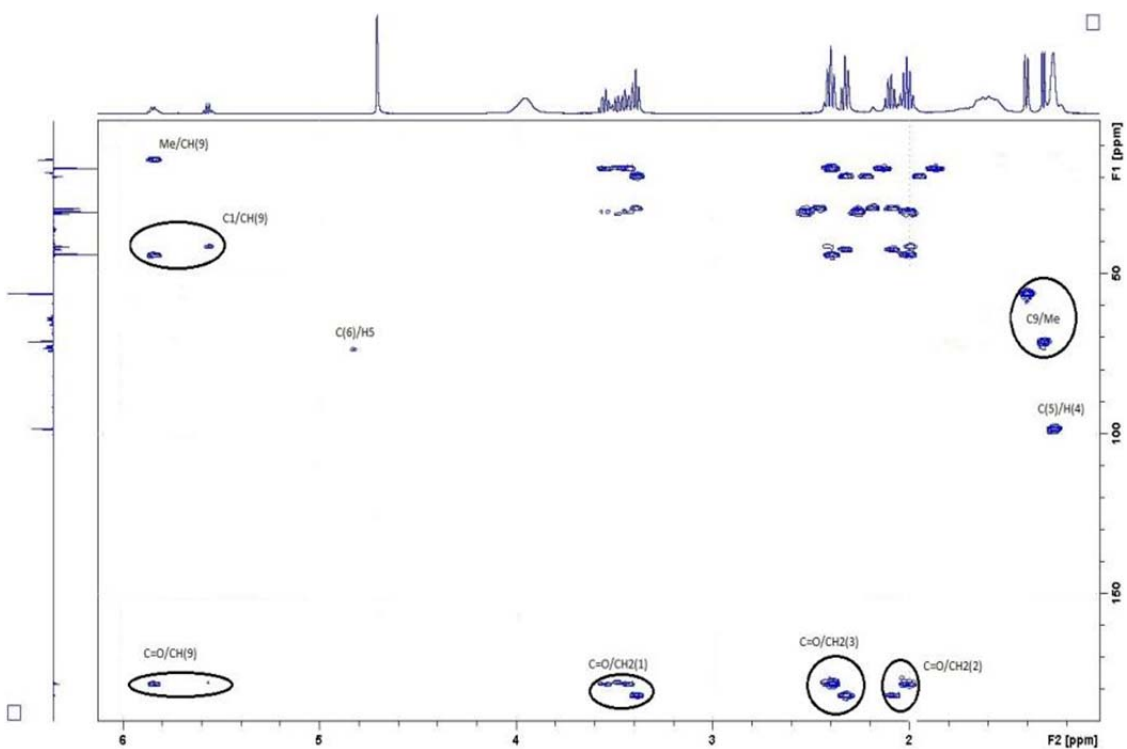


Рис. 81. HMBC ЯМР-спектр синтезированного полимера (соотношение компонентов 160:70:10).

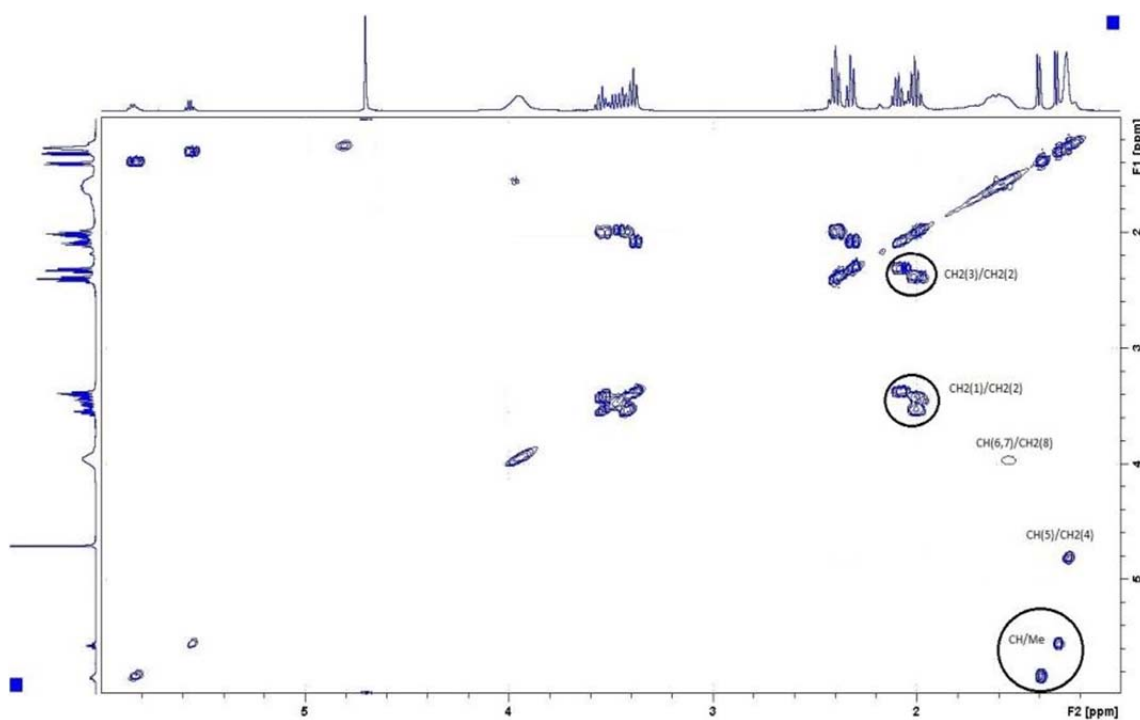
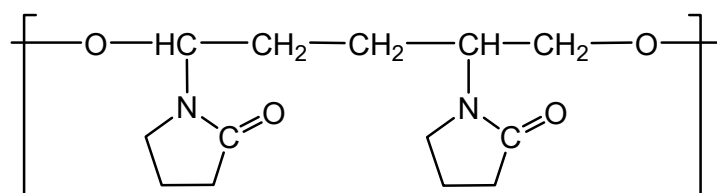


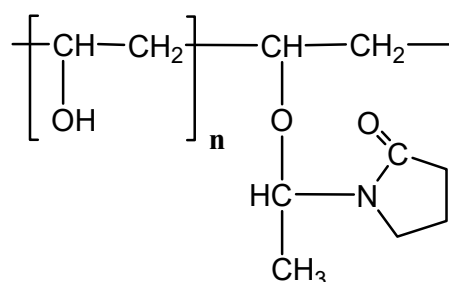
Рис. 82. COSY ЯМР-спектр синтезированного полимера (соотношение компонентов 160:70:10).



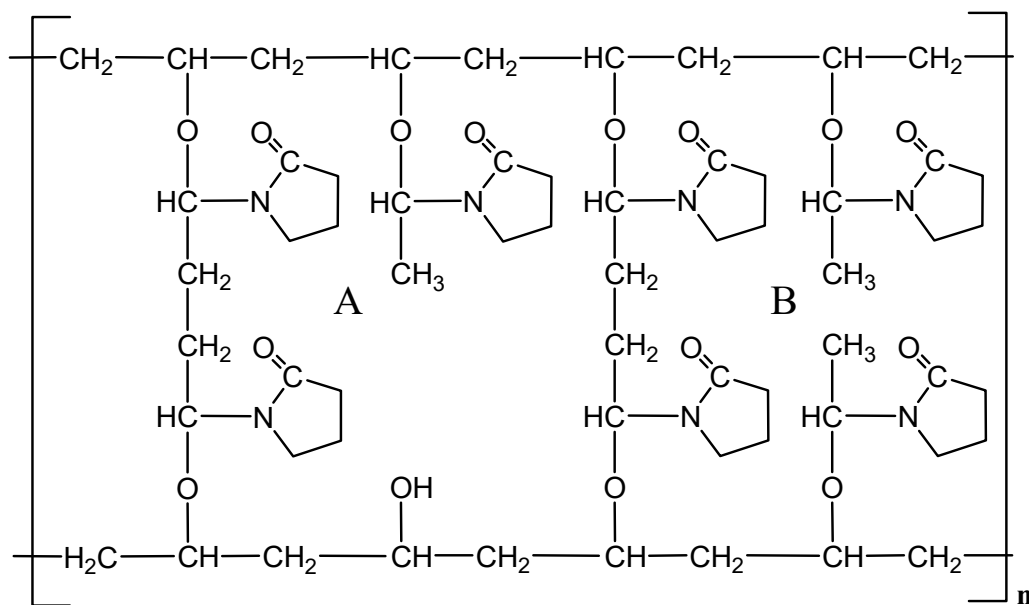
На  $^1\text{H}$  спектре поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном, наблюдается сигнал аммонийной группы инициатора (6.90–7.22 м.д.) и не наблюдаются сигналы  $\text{CH}_2=\text{CH}$ -группы N-винилпирролидона. Также наблюдаются сигналы групп ПВС ( $\text{CH}_2$ (8) – 1.50–1.70 м.д. и  $\text{CH}$  (6,7) – 3.86–4.06 м.д.). В  $^{13}\text{C}$  спектре группам цепочки полимера соответствуют сигналы: 42.0–42.7 м.д. ( $\text{CH}_2$ ), 63.2–66.6 м.д. ( $\text{CH}$ ) и 72.3–74.7 м.д. ( $\text{CH}$ ). Появление второй группы сигналов  $\text{CH}$  говорит о нахождении в продукте сшивки ПВС с N-винилпирролидоном через гидроксильную группу. Проводя совместный анализ полученных спектров ( $^1\text{H}$ , DEPT и HSQC), можно определить атомы углерода с разным числом атомов водорода в окружении. На спектре HSQC наблюдается еще один сигнал  $\text{CH}_2$ -группы (4) (1.27 м.д., или 19.7 м.д. в  $^{13}\text{C}$  спектре), которую можно отнести к фрагменту поперечной сшивки в полимере:



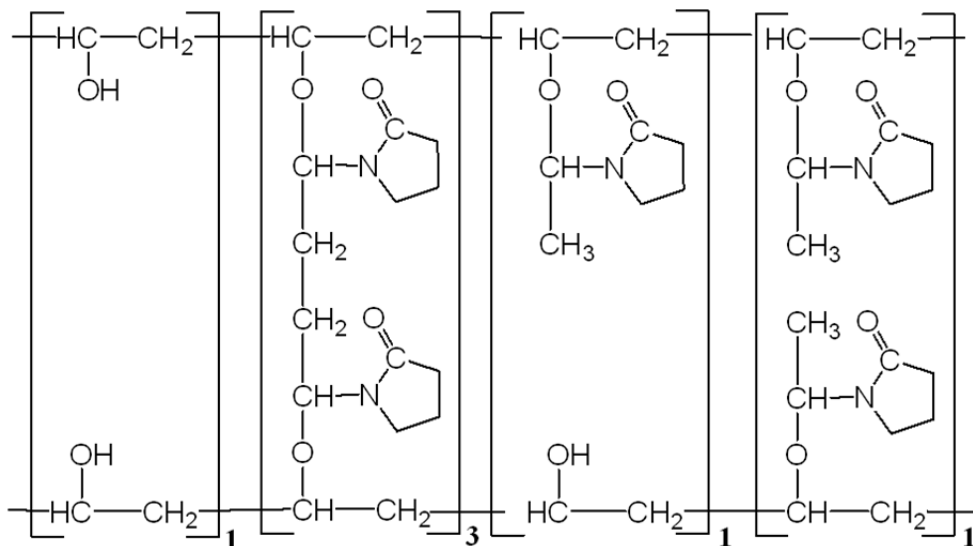
Сигналы  $\text{CH}$ -группы (5) (4.82 м.д. в  $^1\text{H}$  и 98.5 м.д.  $^{13}\text{C}$ ) можно выявить с использованием двумерных HMBC (рис 82) и COSY (рис 83) спектров. Кроме сигналов фрагмента сшивки в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  спектрах также наблюдаются сигналы групп  $\text{CH}_3$ (10) (1.32 и 1.40 м.д. в  $^1\text{H}$ ; 14.3 и 18.4 м.д. в  $^{13}\text{C}$ ) и  $\text{CH}$ -групп (9) (5.57 и 5.85 м.д. в  $^1\text{H}$ ; 56.2 и 71.3 м.д. в  $^{13}\text{C}$ ). Пересекающиеся пики протонов  $\text{CH}$  и  $\text{CH}_3$  групп в спектрах COSY и HMBC и зависимость между карбонильными углеродами и атомами водорода  $\text{CH}$ -групп в HMBC говорит о присутствии в продукте этилпирролидинового фрагмента:



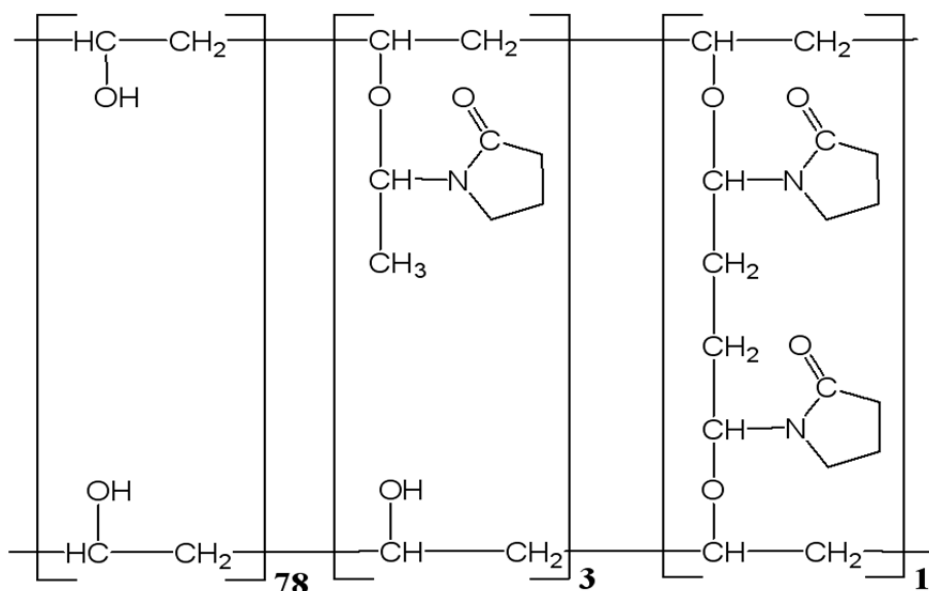
Отличающиеся наборы сигналов данного фрагмента могут говорить о наличии фрагментов с различной стерической затрудненностью (А и В):



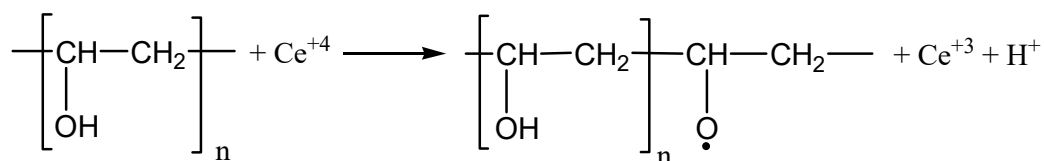
Так как другие сигналы в полученных спектрах отсутствуют, то химическую структуру синтезированного в работе полимера при соотношении компонентов 160:70:10 можно представить в виде:



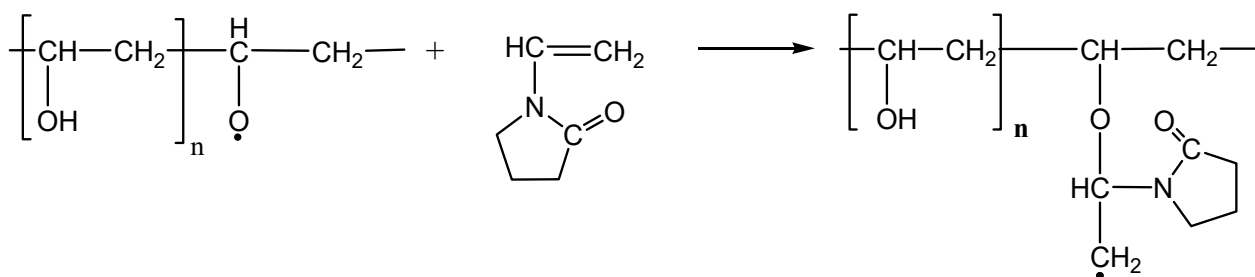
Соотношение фрагментов в получающемся полимере было определено путем интегрирования сигналов протонного ЯМР-спектра. При использовании соотношения компонентов 160:7:1 продукт также имеет фрагмент аналогичной сшивки, но с другим соотношением химических групп. Таким образом, химическая структура синтезированного полимера может быть представлена следующим образом:



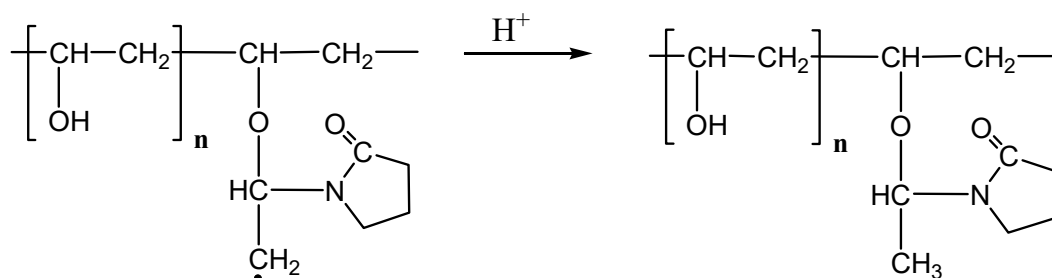
Исходя из установленной химической структуры синтезированного полимера можно установить механизм сшивки. Процесс начинается с образования оксильных радикалов под действием инициатора:



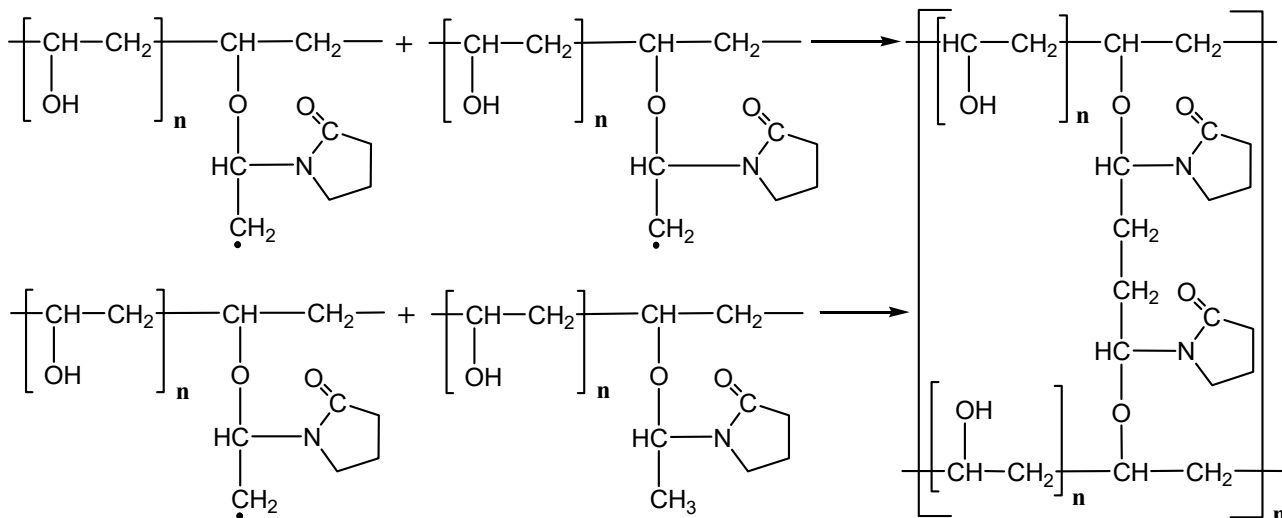
На второй стадии радикалы реагируют с N-ВП. Это сопровождается разрывом связи C=C в N-ВП, что подтверждают результаты ИК и ЯМР-спектроскопии:



Далее получающиеся полимер-радикалы превращаются в этилпирролидоновую группу:



Затем происходит сшивка – рекомбинация образовавшихся полимер-радикалов. Может происходить как реакция между полимер-радикалами, так и реакция между полимер-радикалом и этилпирролидоновой группой. Однако обе реакции ведут к образованию одного и того же полимера:



Поскольку в полученных ЯМР-спектрах нет сигналов других продуктов реакции, данный механизм является единственным путем протекания реакции сшивки ПВС и N-винилпирролидона в присутствии ионов  $\text{Ce}^{+4}$  в качестве инициатора.

## 2.5. Изучение молекулярной структуры ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном

Для образцов синтезированного полимера было проведено изучение структуры методом сканирующей электронной микроскопии. Как показано методом ИК-спектроскопии, время синтеза не оказывает существенного влияния на структуру сополимера. Эти данные были подтверждены методом электронной микроскопии. Пленки, синтезированные в течение менее 1 часа, частично растворялись при набухании в процессе пробоподготовки и не имели четко выраженной микроструктуры (рис. 83).

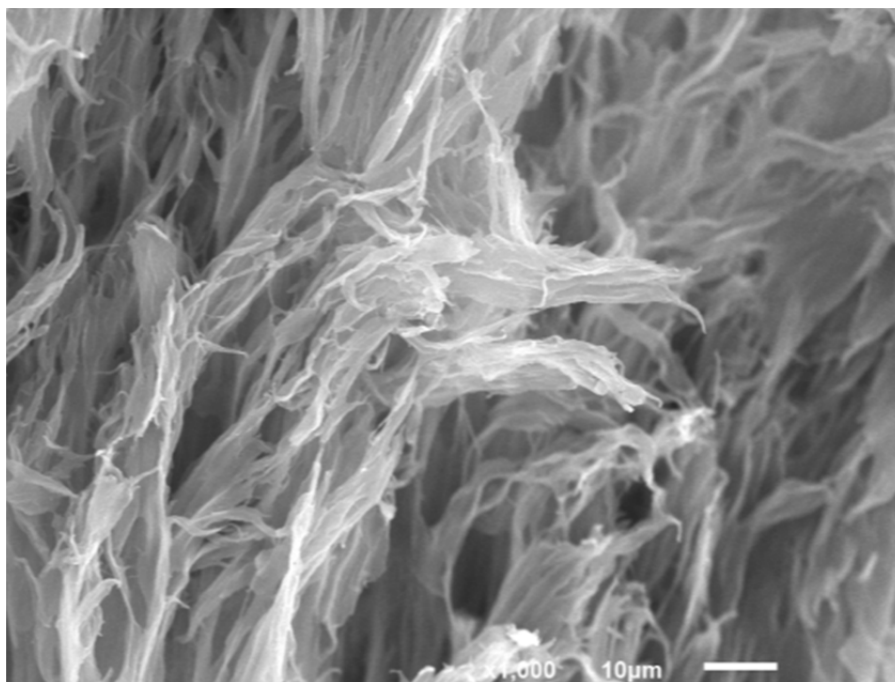


Рис. 83. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном (соотношение реагентов 160:7:1, время синтеза 30 минут) (после набухания в течение 1 часа в воде).

Пленки, синтезированные в течение нескольких часов, имели четко выраженную структуру с различными порами (рис. 84, 85).

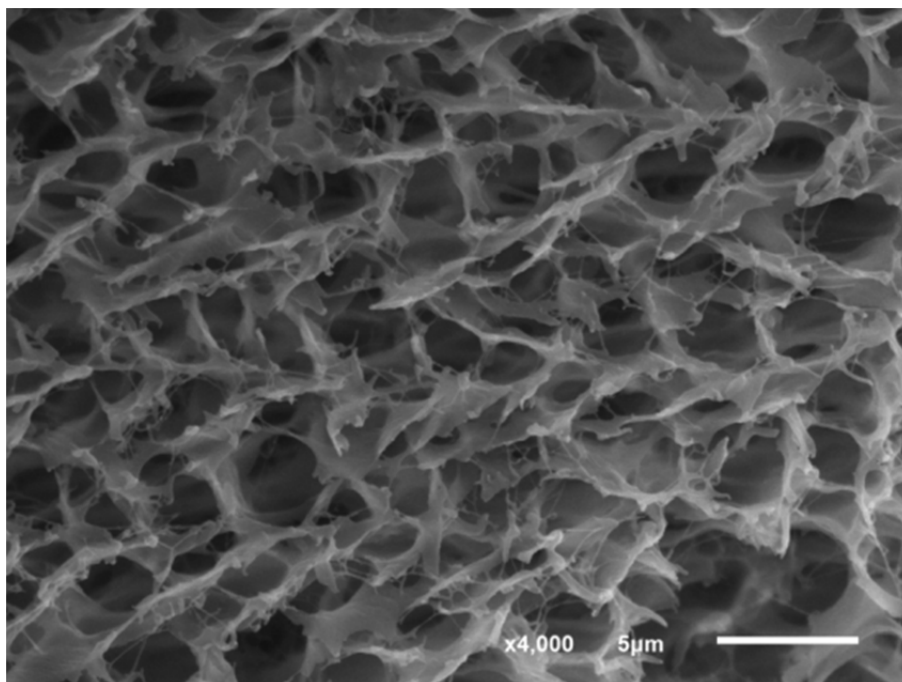


Рис. 84. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном (соотношение реагентов 160:7:1, время синтеза 3 часа) (после набухания в течение 1 часа в воде).

На изображении полученной матрицы в большом масштабе (рис. 85) четко видна периодическая ячеистая структура матрицы.

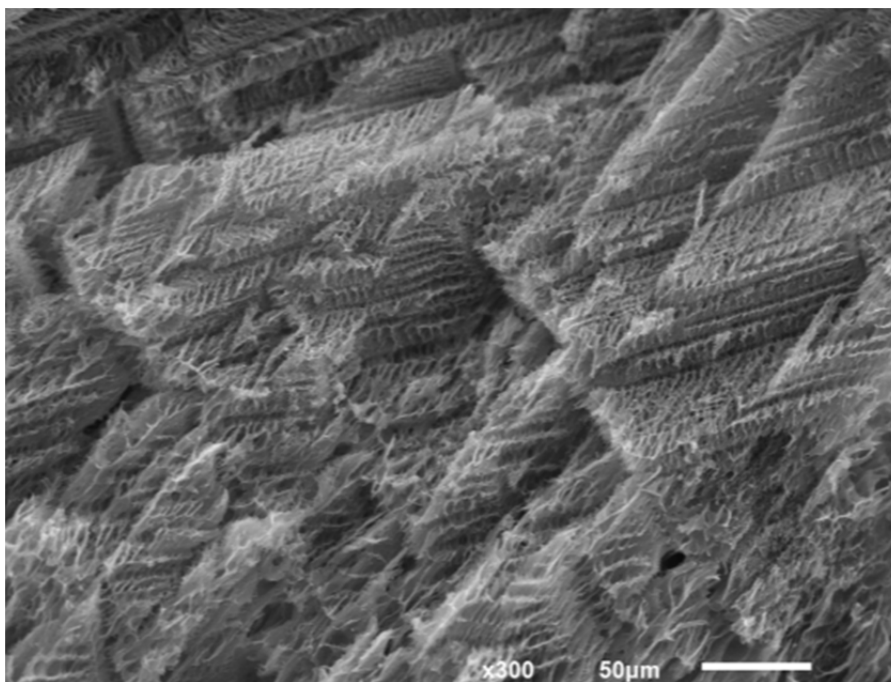


Рис. 85. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном (соотношение реагентов 160:7:1, время синтеза 3 часа) (после набухания в течение 1 часа в воде).

При увеличении количества N-винилпирролидона и инициатора получалась более сшитая и плотная структура (рис. 86).

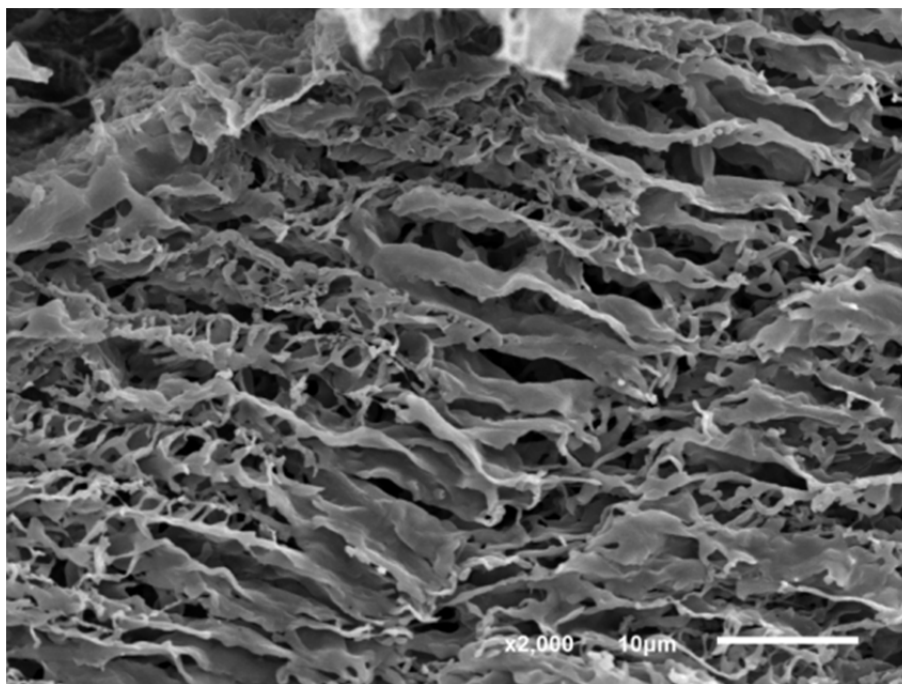


Рис. 86. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном (соотношение реагентов 160:70:10, время синтеза 3 часа) (после набухания в течение 1 часа в воде).

Таким образом, при сшивке ПВС N-ВП образуется гидрогель с сетчатой структурой. При мольном соотношении компонентов 160:7:1 формируется гидрогель с размером пор от 1 до 5 мкм, что соответствует размерам используемых дрожжевых и бактериальных микроорганизмов. При мольном соотношении компонентов 160:70:10 образуется более плотная структура. На рисунках 87–90 представлены фотографии дрожжей *D. hansenii* и бактерий *P. yeii* в созданном гидрогеле с соотношением компонентов 160:7:1.



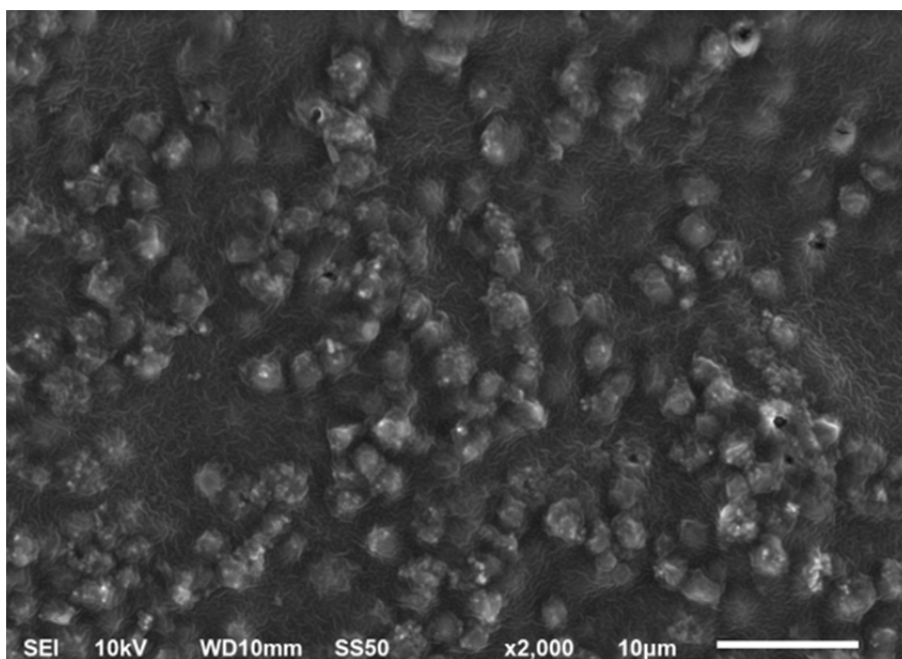


Рис. 87. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном с микроорганизмами *D. hansenii* (ПВС без набухания в воде).

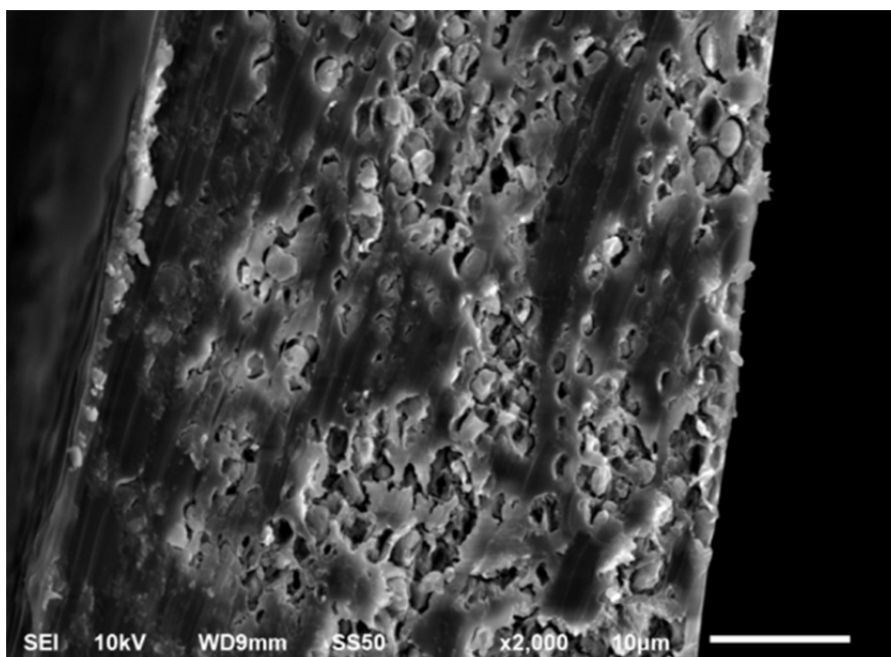


Рис. 88. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном с микроорганизмами *D. hansenii* в разрезе (ПВС без набухания в воде).

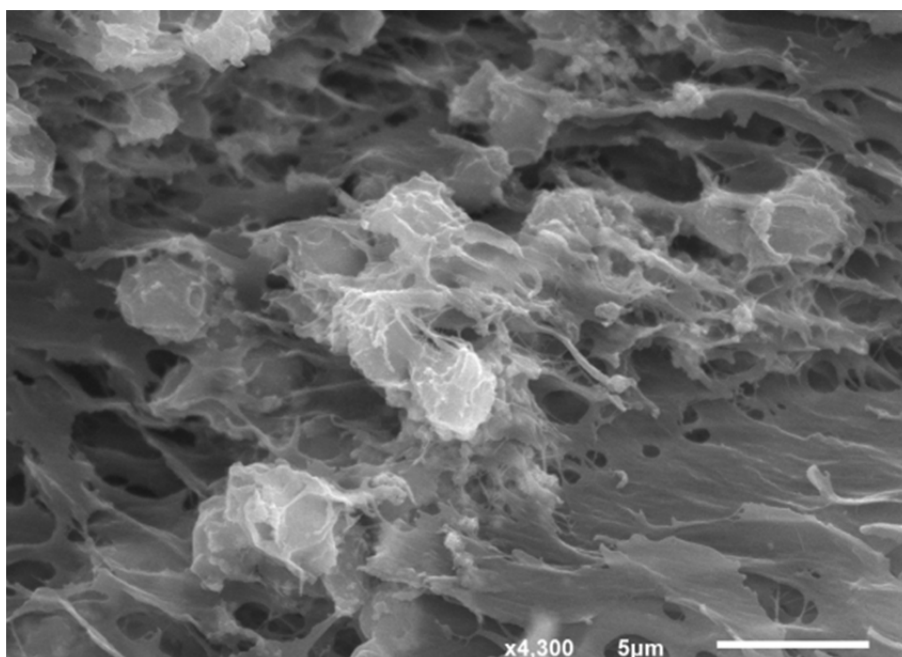


Рис. 89. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном с микроорганизмами *D. hansenii* (после набухания в течение 1 часа в воде).

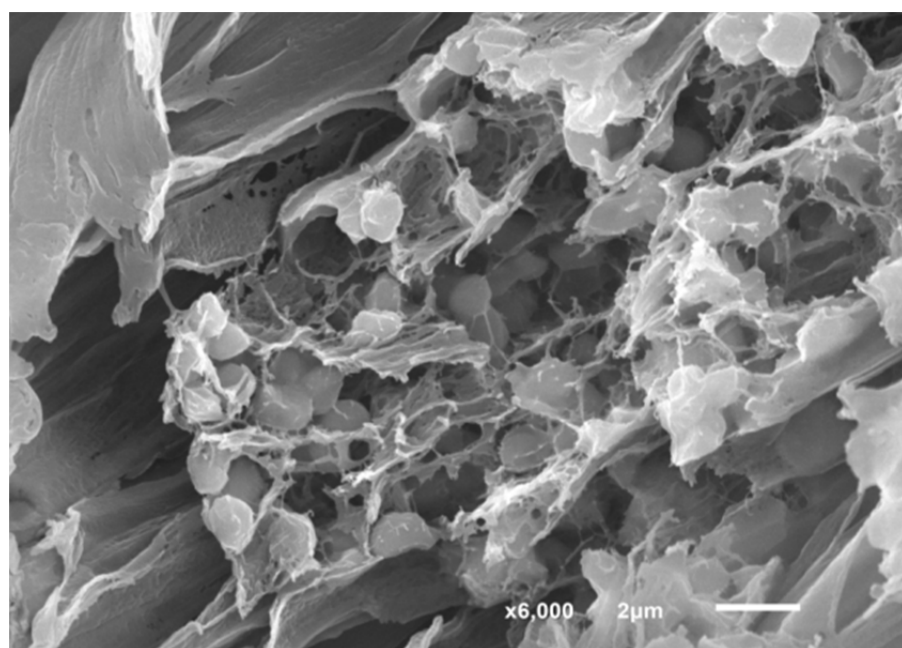


Рис. 90. Электронная микроскопия поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном с микроорганизмами *P. yeii* (после набухания в течение 1 часа в воде).

Из представленных фотографий видно, что дрожжи *Debaryomyces hansenii* равномерно располагаются в структуре полученного гидрогеля как в сухом, так и в набухшем виде. Дрожжи имеют значительно больший размер, чем бактерии (диаметр бактерий *P. yeai* около 0,5–1 мкм, диаметр дрожжей *D. hansenii* около 2–4 мкм), что практически совпадает с размером пор геля при соотношении реагентов 160:7:1. Таким образом, клетки равномерно встраиваются в структуру геля, что может обеспечить высокую долговременную стабильность разработанных биокатализаторов. После проведения процесса иммобилизации микроорганизмы удерживаются в матрице, а сама матрица имеет достаточно пористую структуру, что способствует пропусканию кислорода и органических веществ к микроорганизмам и выведению продуктов ферментативных реакций от них. Таким образом, полученная матрица может быть эффективно использована для создания БПК-биосенсора.

## **2.6. Определение физико-механических свойств ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном**

Набухание полимеров является важным показателем образования сетчатой структуры. При этом неограниченное набухание является началом процесса растворения полимера, а ограниченное набухание лимитируется его химической структурой и не приводит к растворению [228]. В работе определяли кинетику набухания в воде для синтезированного полимера. К наиболее важным параметрам, которые оказывают влияние на кинетику процесса набухания, можно отнести: условия синтеза полимера, его химическую природу, количество образующихся в полимере сшивок и геометрическую форму образца. Определяя степень набухания полимера через определенные промежутки времени, были получены кривые, характеризующие кинетику процесса набухания (рис. 91).

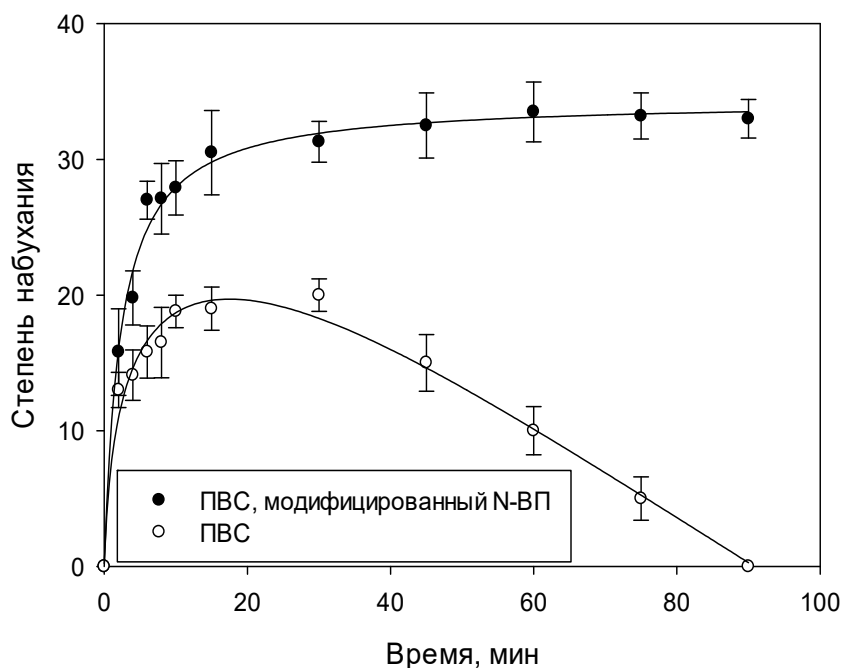


Рис. 91. Кинетика набухания гидрогелей на основе модифицированного и немодифицированного ПВС в воде.

По полученным кинетическим зависимостям можно сделать вывод, что немодифицированный ПВС относится к полимерам с неограниченным набуханием, а сшитый N-винилпирролидоном ПВС относится к полимерам, у которых происходит быстрое ограниченное набухание с малым значением предельного набухания. Этот факт объясняется тем, что сшитый ПВС имеет сетчатое строение и даже при повышении температуры набухание будет оставаться ограниченным.

Для применения полученного модифицированного полимера поливинилового спирта в качестве гидрогеля для иммобилизации микроорганизмов необходимо знать его физико-механические характеристики. В данной работе для синтезированного полимера ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном (при соотношении реагентов 160:7:1), определяли деформационные и прочностные характеристики: относительное удлинение, максимальную нагрузку, несущую способность материала, предел прочности и модуль Юнга.

Определение прочностных и деформационных характеристик ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном, проводили на универсально-разрывной машине Instron, согласно ГОСТ 14236-81. Для расчета характеристик с образцами сшитого полимера и исходного ПВС были получены деформационные кривые. Расчет характеристик проводили в автоматизированной программе Bluehill (таблица 21).

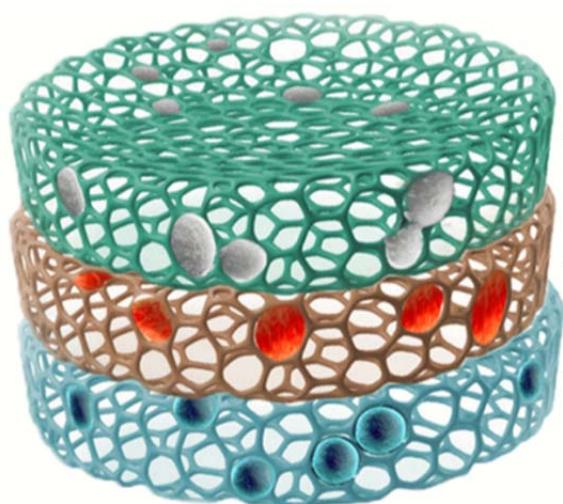
Таблица 21. Физико-механические свойства полимерных пленок на основе ПВС.

Образцы	Ширина $b$ , мм	Площадь сечения $S_0$ , мм <sup>2</sup>	Разрушающее напряжение, $F_p$ , Н	Предел прочности, $\sigma$ , МПа	Относительное удлинение, $\varepsilon$ , %	Несущая способность материала, $F_{нс}$ , Н/М	Модуль Юнга, $E$ , МПа
ПВС, сшитый N-ВП (160:7:1)	20	1,0	47±4	51±5	48±3	235±3	3100±200
ПВС	20	1,0	32±1	32±1	38±2	165±2	1700±100

Из полученных результатов видно, что при сшивке линейных молекул ПВС N-винилпирролидоном с образованием сетчатого полимера прочностные характеристики полученного полимера значительно превосходят характеристики исходного ПВС. Высокие физико-механические свойства полученного полимера позволяют рекомендовать его для иммобилизации микроорганизмов и получения рецепторных элементов биосенсоров.

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

Для биосенсоров на основе выбранного биоматериала и способа его иммобилизации было проведено определение аналитических и метрологических характеристик. Как показано ранее, биосенсор на основе используемых ассоциаций микроорганизмов позволяет детектировать широкий спектр веществ, что дает возможность 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 послойно, предположительно позволит создать биокатализатор, моделирующий окислительные свойства активного ила, но обладающий высокой стабильностью состава (рис. 92). Таким образом, в работе наряду с классическим включением микроорганизмов в гели предложена послойная иммобилизация целых клеток, которая может позволить уменьшить конкуренцию микроорганизмов за субстраты и замедлить вытеснение медленно растущих штаммов со временем, что приведет к повышению стабильности биораспознающих элементов. Ранее аналогичный подход был эффективно использован для иммобилизации ферментов [229]. Предположительно данный способ может быть эффективен и в случае микроорганизмов.



Дрожжи *Debaryomyces hansenii*  
в гидрогеле ПВС, модифицированном N-ВП

Дрожжи *Blastobotrys adenivorans*  
в гидрогеле ПВС, модифицированном N-ВП

Дрожжи *Ogataea angusta*  
в гидрогеле ПВС, модифицированном N-ВП

Рис. 92. Схема послойной иммобилизации дрожжевых микроорганизмов *Ogataea angusta*, *Blastobotrys adenivorans*, *Debaryomyces hansenii* в гель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном.

Для сравнения эффективности при анализе БПК созданных биосенсоров применяли рецепторы с оптимальным содержанием микроорганизмов (200 мг/мл в геле ПВС, сшитого N-ВП). Градуировочные зависимости ответов созданных биосенсоров приведены на рис. 93.

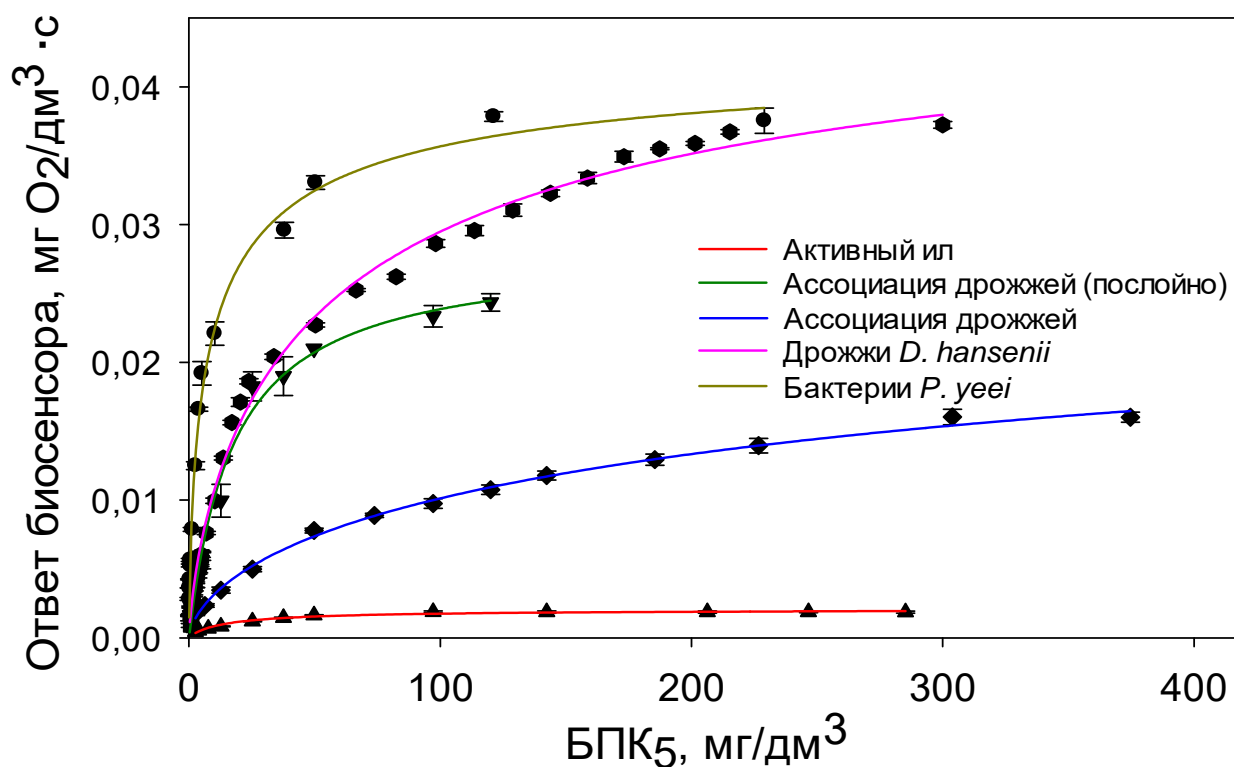


Рис. 93. Градуировочные зависимости для созданных биосенсоров.

Биочувствительные элементы на основе бактерий и дрожжей относятся к каталитическому типу, таким образом, отклик сенсора на их основе формируется за счет ферментативных реакций. Поэтому для аппроксимации градуировочных зависимостей применяли уравнение типа Михаэлиса – Ментен:

$$R = \frac{R_{max} [S]}{K'_M + [S]}, \quad (3)$$

где  $R_{max}$  – максимальный ответ биосенсора;  $K'_M$  – кажущаяся константа Михаэлиса. В работе использована кажущаяся константа Михаэлиса, так как она зависит от присутствия в системе активаторов или ингибиторов, pH среды, наличия многосубстратной и многоферментной системы (раствор ГГС и целые клетки микроорганизмов), а также дополнительных стадий ферментативных процессов. Параметры аппроксимации полученных градуировочных зависимостей представлены в таблице 22.

Таблица 22. Параметры аппроксимирующего гиперболического уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	$K'_M$ , мг/дм <sup>3</sup>	$R_{max}$ , мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> с	Коэффициент корреляции, R
Дрожжи <i>D.hansenii</i>	30±3	0,040±0,002	0,9939
Ассоциация дрожжей (послойно)	21±4	0,028±0,003	0,9934
Ассоциация дрожжей	80±10	0,019±0,002	0,9891
Бактерии <i>P. yeai</i>	5±1	0,037±0,003	0,9876
Активный ил	14±3	0,0020±0,0001	0,9871



Для непосредственного проведения анализа БПК, как правило, используют не гиперболическую зависимость, а ее линейный участок (рис. 94). Исходя из представленного уравнения типа Михаэлиса – Ментен, для биосенсоров сигнал будет линейно зависеть от концентрации субстрата при концентрациях значительно ниже  $K'_M$ . Таким образом, численное значение верхней границы линейного участка принимали равным кажущейся константе Михаэлиса. Параметры уравнений прямых ( $y = a + b \times x$ ), которые аппроксимируют линейные участки градуировочных зависимостей, приведены в таблице 23.

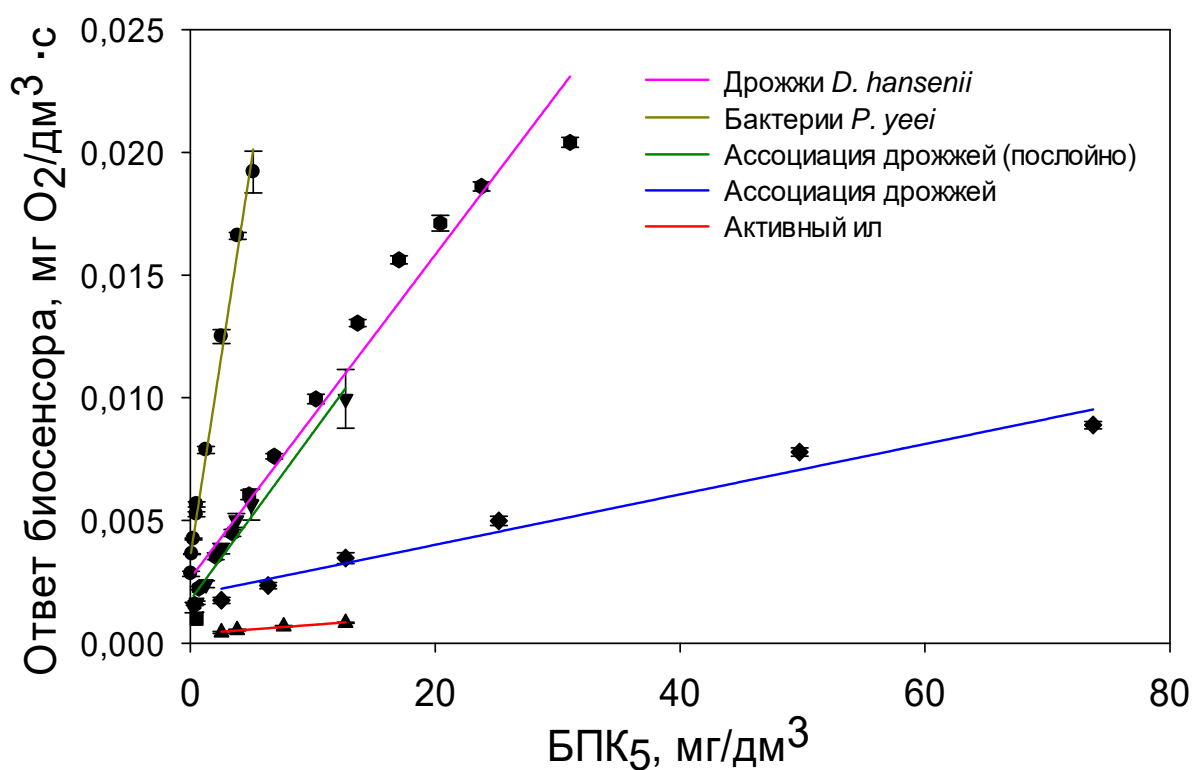


Рис. 94. Линейные участки градуировочных зависимостей для созданных биосенсоров.

Таблица 23. Параметры аппроксимирующего линейного уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	$b, c^{-1}$	$a, \text{мг O}_2/\text{дм}^3 \text{ с}$	Коэффициент корреляции, R
Дрожжи <i>D.hansenii</i>	0,00071±0,00002	0,0026±0,0003	0,9829
Ассоциация дрожжей (послойно)	0,00070±0,00004	0,0018±0,0002	0,9762
Ассоциация дрожжей	0,00010±0,00006	0,0020±0,0002	0,9818
Бактерии <i>P. yeai</i>	0,0035±0,0008	0,0035±0,0002	0,9941
Активный ил	0,00004±0,00001	0,0004±0,0002	0,9759

Значения коэффициентов корреляции больше 0,95 для всех созданных сенсоров говорят о достоверности выбора линейного участка. Для сравнения возможностей биосенсоров по анализу низких значений БПК использовали коэффициент чувствительности. Чем выше коэффициент чувствительности, тем меньшие значения БПК можно количественно определить [230]. Таким образом, из таблицы видно, что наибольшей чувствительностью характеризуется биочувствительный элемент на основе бактерии *P. yeai*.

Для сравнения созданных рецепторных элементов кроме коэффициента чувствительности сопоставляли их пределы обнаружения БПК и нижние границы анализируемых значений БПК (таблица 24). Предел обнаружения БПК определяли как сигнал сенсора, значимо отличимый от сигнала фонового раствора [227]. При  $P=0,95$  предел обнаружения можно вычислить по формуле:

$$C_{\min} = \frac{3 \cdot S_r}{b}, \quad (4)$$

где  $S_r$  – стандартное отклонение холостого опыта (при введении в кювету буферного раствора),  $b$  – коэффициент чувствительности.

Таблица 24. Характеристики чувствительности биосенсоров.

Сенсорный элемент	Предел обнаружения, мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	Нижняя граница анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>
Дрожжи <i>D.hansenii</i>	0,1	0,16
Ассоциация дрожжей (послойно)	0,2	0,7
Ассоциация дрожжей	0,9	2,4
Бактерии <i>P. yeii</i>	0,02	0,05
Активный ил	0,8	2,6

Наименьшей нижней границей анализа БПК<sub>5</sub> характеризуется биосенсор с рецептором на основе *P. yeii* в гидрогели ПВХ, сшитого N-ВП. Биосенсоры на основе единичных микроорганизмов *P. yeii* и *D. hansenii* дают возможность анализировать образцы поверхностных вод категории «очень чистые» (БПК<sub>5</sub>: 0,5–1,0 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>).

На следующем этапе работы определяли стабильность биосенсоров на основе созданных рецепторных элементов. Пример графика зависимости ответа биосенсора от количества измерений представлен на рис. 95, графики долговременной стабильности приведены на рисунке 96. Полученные результаты представлены в таблице 25.

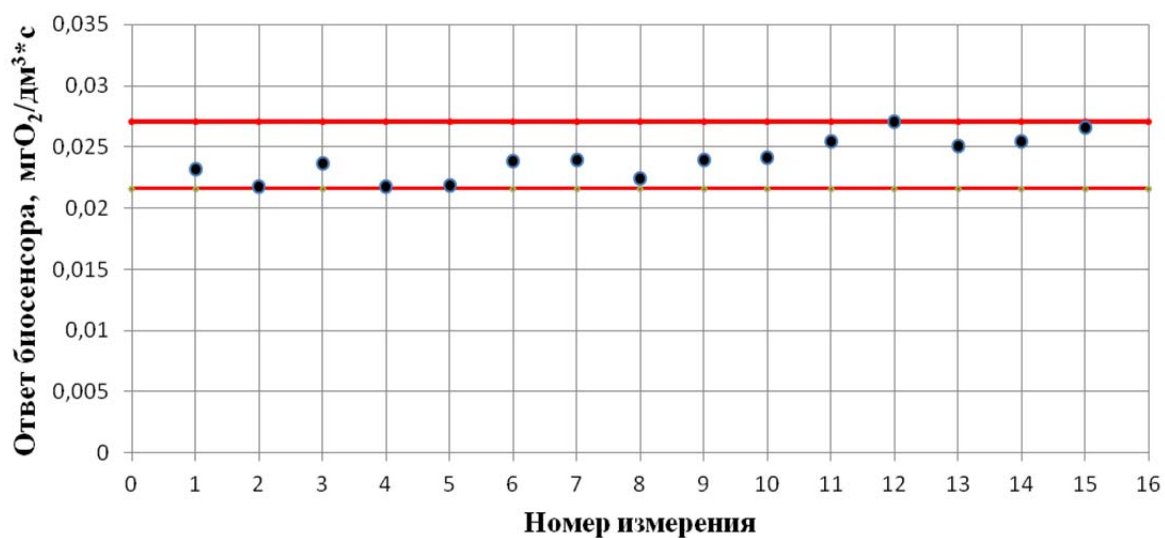
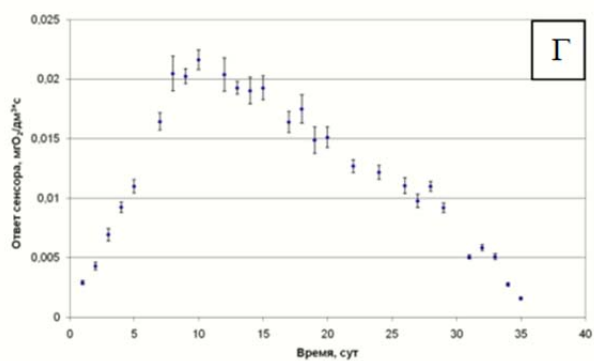
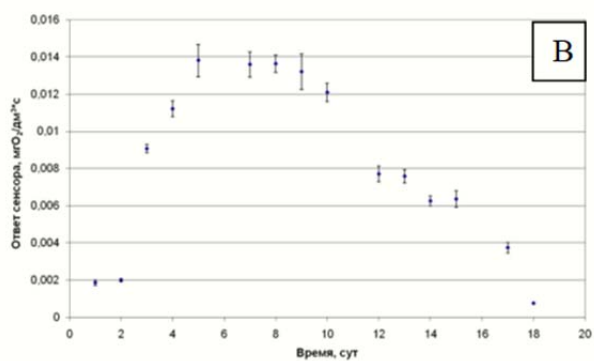
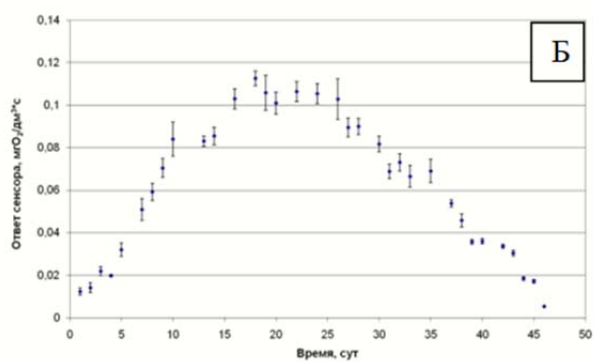
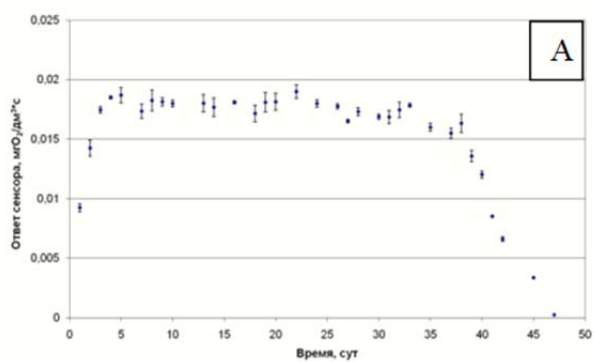


Рис. 95. Операционная стабильность биосенсора на основе бактерий *Parasoccus yeei*, иммобилизованных в гидрогель модифицированного ПВС.



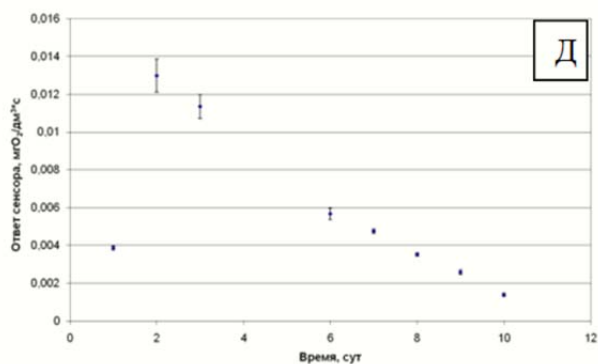


Рис. 96. Долговременная стабильность биосенсора с рецепторным элементом на основе: А – дрожжей *D. hansenii*, иммобилизованных в гидрогель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном; Б – бактерий *P. yeii*, иммобилизованных в гидрогель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном; В – ассоциации дрожжей, иммобилизованных в гидрогель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном; Г – ассоциации дрожжей, иммобилизованных послойно в гидрогель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном; Д – активного ила, иммобилизованного в гидрогель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном.

Так же как и в случае иммобилизации в диализную мембрану, у большинства сформированных рецепторных элементов биосенсоров наблюдается некоторое снижение активности в первые дни после иммобилизации, что вероятно объясняется адаптацией микроорганизмов к изменившимся условиям внешней среды. В первые четыре дня после формирования рецепторного элемента бактерии *Paracoccus yeii* (рис. 96), иммобилизованные в гидрогель модифицированного ПВС, имеют низкую активность, которая к 10 суткам увеличивается почти в 4 раза. С 15 дня по 25 день наблюдается стабилизация активности сенсора. У дрожжей *Debaryomyces hansenii* после адаптации микроорганизмов происходит стабилизация их дыхательной активности в течение более 30 суток. Такая стабилизация ответов является преимуществом данного рецепторного элемента, так как упрощает градуировку анализатора. Аналогичные тенденции наблюдаются и для рецепторных элементов на основе ассоциаций микроорганизмов.

Таблица 25. Стабильность созданных БПК-биосенсоров.

Сенсорный элемент	Стандартное отклонение, мг/дм <sup>3</sup> ·с (n=15, P=0,95)	Относительное стандартное отклонение (повторяемость), % (n=15, P=0,95)	Время работы, сут.
Дрожжи <i>D.hansenii</i>	0,00009	2	42
Ассоциация дрожжей (послойно)	0,0014	6,6	34
Ассоциация дрожжей	0,0016	8,9	17
Бактерии <i>P. yeai</i>	0,0017	7	45
Активный ил	0,0016	7,6	9

Таким образом, наименьшим стандартным отклонением результатов характеризуется биосенсор на основе *D. hansenii* (таблица 25). Биосенсоры на основе дрожжей *D. hansenii* и бактерий *P. yeai* также характеризуются наиболее высокой долговременной стабильностью.

Таблица 26. Характеристики экспрессности разработанных биосенсоров.

Сенсорный элемент	Время отклика, мин	Время промывки системы, мин	Время анализа, мин
Дрожжи <i>D.hansenii</i>	1–2	3–5	5–7
Ассоциация дрожжей (послойно)	2–4	3–8	5–12
Ассоциация дрожжей	1–2	3–5	5–7

Бактерии <i>P. yeii</i>	1–2	3–4	4–6
Активный ил	1–2	3–5	5–7

Таким образом, лучшими по экспрессности являются биосенсоры на основе одиночных культур дрожжей *D.hansenii* и бактерий *P. yeii* (таблица 26). В таблице 27 приведены основные характеристики созданных биосенсоров.

Таблица 27. Характеристики созданных биосенсоров.

Характеристики	<i>Paracoccus yeii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ассоциация дрожжей	Ассоциация дрожжей (послойно)	Активный ил
Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	<b>0,05–5,0</b>	<b>0,16–30</b>	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 на основе дрожжей *D. hansenii* и бактерий *P. yeii* дают возможность определять БПК<sub>5</sub> в пределах ПДК (2 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>) и характеризуются длительным временем стабильной работы. Созданные сенсоры на основе активного ила и ассоциации дрожжей обладают худшими характеристиками. При использовании подхода послойной иммобилизации чувствительность биосенсора значительно возрастает, что может объясняться снижением конкуренции за субстрат и его доступности каждому из клеточных слоев.

Биосенсор на основе дрожжей *D. hansenii* дает возможность анализировать образцы с низким БПК и имеет высокую долговременную стабильность. Использование бактерий *P. yeai* позволило улучшить основные характеристики биосенсора по сравнению с аналогом на основе *D. hansenii*. Созданные биосенсорные анализаторы превосходят по характеристикам и потребительским качествам многие аналоги, в частности, имеют меньшее время анализа. Кроме того, сенсоры на основе бактерий *P. yeai* и дрожжей *D. hansenii* опережают описанные аналоги по чувствительности и времени работы [3, 9].

Оценка спектра анализируемых субстратов созданных биосенсоров выполнена по соединениям различных классов, которые могут находиться в образцах воды разнообразного происхождения (промышленные и бытовые стоки, поверхностные воды) (рис. 97).



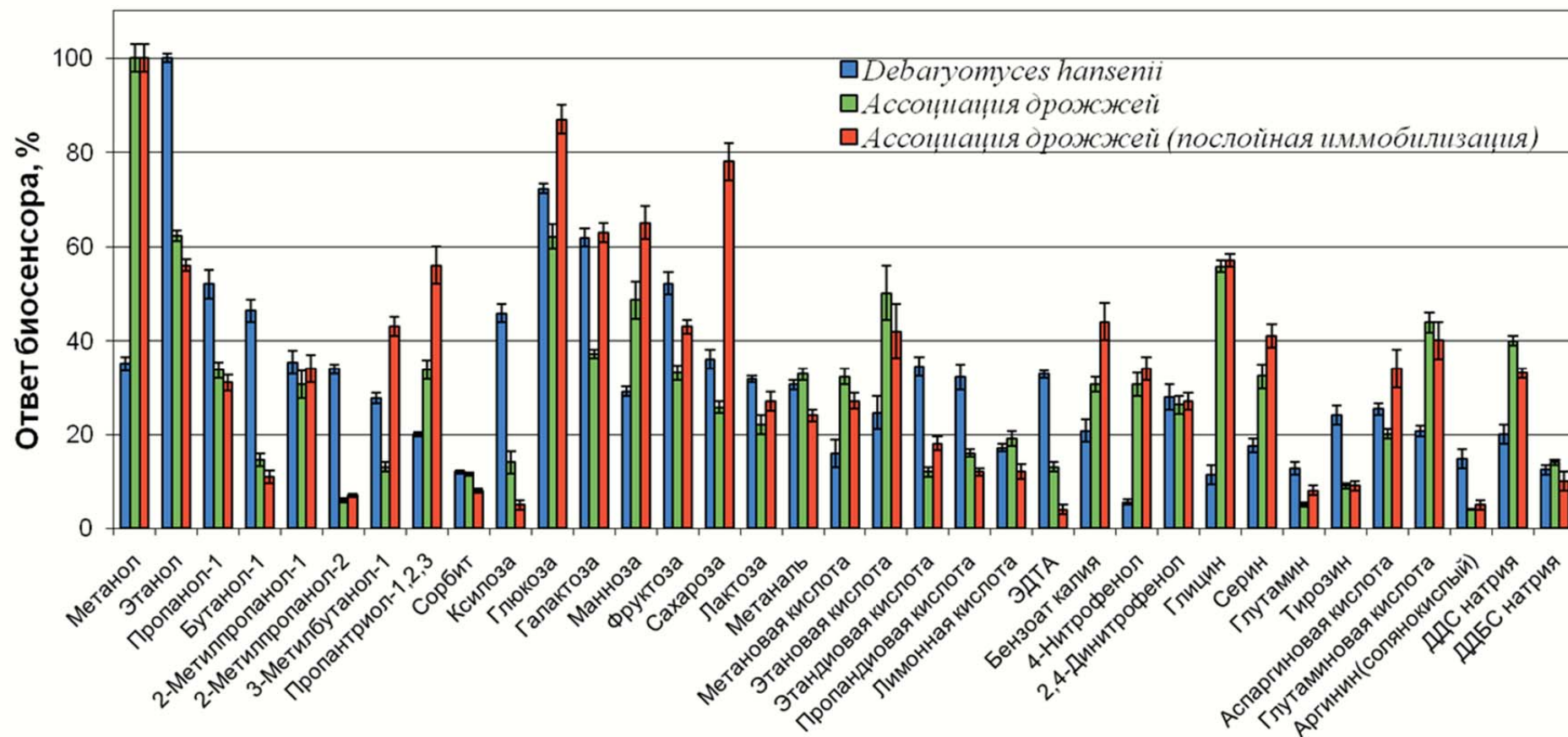


Рис. 97. Профиль детектируемых веществ для биосенсоров с wybranными дрожжевыми микроорганизмами, иммобилизованными в матрицу ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном (концентрация субстратов 0,04 моль/дм<sup>3</sup>).

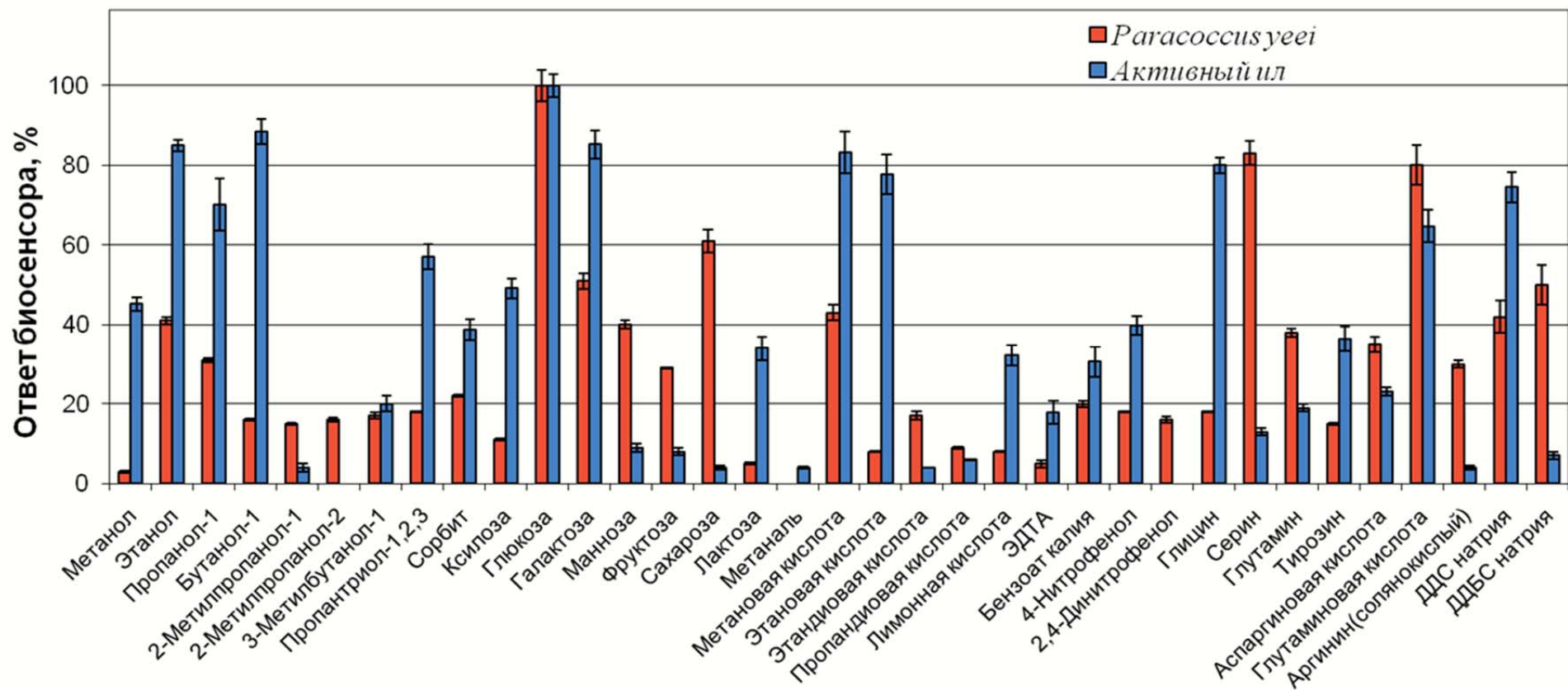


Рис. 98. Профиль детектируемых веществ для биосенсоров с выбранными бактериальными микроорганизмами, иммобилизованными в матрицу ПВХ, модифицированного N-винилпирролидоном (концентрация субстратов 0,04 моль/дм<sup>3</sup>).

Биосенсор на основе *D. hansenii*, включенных в полимер ПВС-N-ВП, наиболее чувствителен к этанолу. При усложнении структуры радикалов спиртов отмечается падение откликов биосенсора на основе данных дрожжей. Такая особенность, вероятнее всего, может объясняться меньшим сродством соответствующих ферментов *Debaryomyces hansenii* к вторичным и третичным спиртам. Величина ответов биосенсора на кетозы выше, чем на альдозы. Ответы биосенсора на основе *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном, на дисахариды (сахароза и лактоза) значительно ниже, чем на моносахариды.

Величина ответа биосенсора на основе *D. hansenii* на аминокислоты коррелирует с химической структурой и зарядом радикала и снижается в ряду: аспаргиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, глутамин, глицин. Также наблюдается ответ биосенсора и на тирозин, содержащий ароматический радикал. Формальдегид сильно токсичен для живых клеток. В работе показано отсутствие токсичного действия метанала на иммобилизованные дрожжи *Debaryomyces hansenii*. Это является важным достоинством созданного рецепторного элемента. Окисление дикарбоновых кислот иммобилизованными дрожжами проходило более быстро, чем монокарбоновых кислот. Этилендиаминтетрауксусная кислота применяется при технологической мойке различного оборудования и производстве химической продукции. Наличие ответа биосенсора на основе *D. hansenii* на ЭДТА важно с точки зрения точности анализа, так как он часто встречается в сточных водах. Бензоат калия является пищевой добавкой, которая оказывает негативное действие на микроорганизмы за счет снижения активности клеточных ферментов. Еще одним важным промышленным токсикантом являются нитрофенолы, которые часто встречаются в сточных водах. Иммобилизованные дрожжи *D. hansenii* окисляют указанные токсичные вещества без потери своей активности, что важно для практического применения биосенсора на их основе. Кроме того, с практической точки зрения, важна способность иммобилизованных дрожжей *D. hansenii* окислять

додецилсульфат и додецилбензосульфат натрия, которые являются основными компонентами многих моющих средств и часто встречаются в коммунальных сточных водах. Таким образом, биосенсор на основе дрожжей *D.hansenii* реагирует на вещества всех представленных классов, что делает его перспективным для практического внедрения.

Таким же широким спектром окисляемых веществ обладает иммобилизованная в модифицированный ПВС ассоциация дрожжей. Токсичные вещества, такие как: формальдегид, п-нитрофенол и бензоат калия дают отклик биосенсора на основе данной ассоциации без потери активности биоматериала.

Биосенсор на основе *P. yeii* характеризуется высокой чувствительностью по отношению к углеводам (глюкозе и галактозе). Важно отметить, что окисление дисахаридов (сахароза) проходило почти так же интенсивно, как и моносахаридов (глюкоза, манноза, галактоза). Среди спиртов наибольшая величина ответов сенсора наблюдается на одноатомный спирт – этанол. Окисление пропанола, бутанола и изопропанола осуществлялось на одном близком уровне. Наименьший ответ сенсора наблюдается на метанол. Данная особенность может быть объяснена высокой токсичностью данного спирта.

Ответа биосенсора на основе бактерий *Paracoccus yeii*, иммобилизованных в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном, на формальдегид не наблюдается, что вероятно связано с его токсичным действием. Окисление одноосновных кислот проходило более интенсивно, чем дикарбоновых. Величины откликов сенсора на аминокислоты составляли от 15% (тирозин) до 82% (серин). Необходимо отметить и отсутствие негативного воздействия токсичных субстратов на иммобилизованные бактерии *P. yeii* в биорецепторе.

Таким образом, биосенсоры на основе бактерии *P. yeii*, так же как и дрожжей *D. hansenii*, реагируют на вещества всех представленных классов за исключением метанола. В целом спектр окисляемых субстратов всех

используемых биорецепторов достаточно широкий. Это позволяет добиться высокой корреляции между анализом с использованием созданных биосенсоров и классическим методом БПК<sub>5</sub> при анализе широкого спектра образцов.

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

Серьезным ограничением биосенсоров на основе 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 при экспресс-анализе БПК 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. 99). Такие процессы можно зарегистрировать при наложении на электрохимическую ячейку потенциала, соответствующего редокс-потенциалу медиатора. Это приводит к появлению электродного тока, значение которого пропорционально содержанию окисляемых клетками органических веществ.

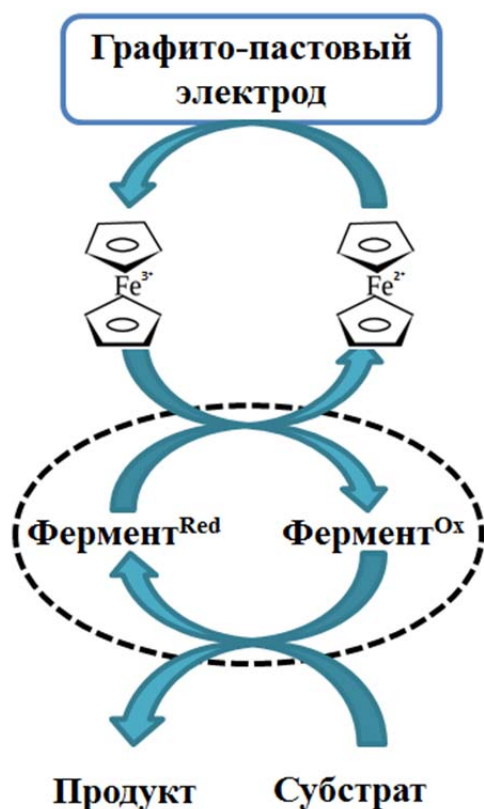


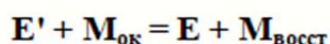
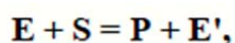
Рис. 99. Принцип работы биосенсора на базе медиаторного электрода с ферроценом.

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 формированию систем «микроорганизмы–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 биоэлектрокатализа. Это даст возможность выявить наиболее эффективный медиатор для применяемых бактерий или дрожжей, а также определить фундаментальные причины плохих характеристик биосенсоров и способы их улучшения.

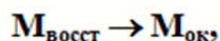
### 3.1. Особенности применения амперометрических медиаторных биосенсоров для экспресс-анализа БПК

#### 3.1.1. Закономерности функционирования медиаторных биосенсоров

Соединение, обладающее медиаторными свойствами, должно быстро восстанавливаться при взаимодействии с микроорганизмами, окисляться в электродной реакции, осуществляя при этом перенос электронов на электрод. Данный процесс получил название опосредованного переноса электронов. При этом медиатор постоянно проходит новые циклы окисления и восстановления (рис. 100).



На электроде:



где E, E' – клеточный фермент до и после реакции с субстратом S соответственно; P – продукт ферментативной реакции; M<sub>ок</sub>, M<sub>восст</sub> – окисленная и восстановленная формы используемого медиатора.

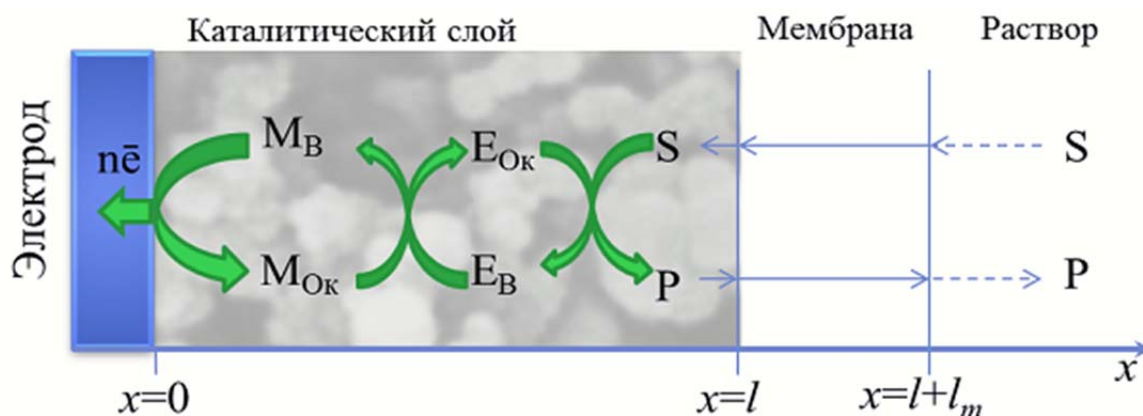
Рис. 100. Медиаторный перенос электронов в биосенсорах.

Медиаторные микробные электроды представляют собой рабочие электроды в биосенсорах. Использование медиаторов при создании рабочих электродов биосенсоров дает несколько преимуществ. Во-первых, результаты измерений становятся практически независимыми от содержания кислорода в анализируемой среде. Это важное преимущество, которое соблюдается при условии, что восстановленная форма медиатора не реагирует с кислородом. Во-вторых, рабочий потенциал медиаторного биосенсора теперь будет определяться формальным окислительно-



восстановительным потенциалом используемого медиатора. Это особенно удобно, если значение окислительно-восстановительного потенциала мало, так как при этом снижается вероятность прохождения побочных реакций. В-третьих, если в реакции окисления используемого медиаторного соединения не участвуют ионы  $H^+$ , то медиаторный биосенсор является относительно устойчивым к варьированию pH в пределах его физиологических значений.

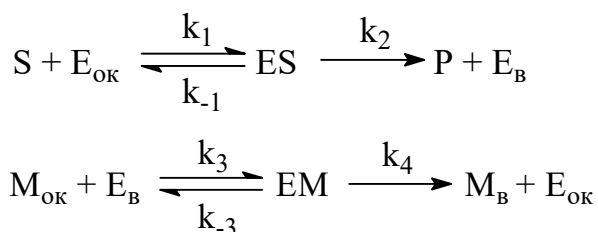
Для создания медиаторной биосенсорной системы обычно используют иммобилизованный биоматериал. Что касается использования медиатора, то тут возможно два подхода. В первом подходе медиатор вносится в электрохимическую ячейку и диффундирует к рабочему электроду [231]. Во втором подходе он помещается непосредственно на электрод путем простой адсорбции или ковалентного связывания с матрицей для иммобилизации биоматериала [232]. Независимо от типа используемой биосенсорной системы на поверхности рабочего электрода образуется биокаталитический слой, в котором происходят ферментативные реакции и медиаторный перенос электронов (рис. 101).



$l$  – толщина биокаталитического слоя,  $l_m$  – толщина полупроницаемой мембраны,  $x$  – координата реакции,  $E_{Ок}$  и  $E_{В}$  – окисленная и восстановленная форма фермента,  $P$  – продукт,  $S$  – субстрат,  $M_{В}$  и  $M_{Ок}$  – окисленная и восстановленная форма медиатора.

Рис. 101. Схема образуемого биокаталитического слоя.

В приведенной на рисунке 101 схеме биокаталитический слой закреплен на поверхности рабочего электрода с применением мембраны, проницаемой для субстрата и продукта реакции. Электроны, образующиеся в результате биохимической реакции, переносятся на электрод медиатором. Такой механизм двухсубстратной реакции принято называть «пинг-понг». В этом механизме последовательные стадии взаимодействия субстрата и медиатора с биоматериалом разделены необратимой химической реакцией [233]:



Суммарное уравнение для скорости реакции по механизму «пинг-понг»:

$$V = \frac{V_{max}}{1 + K_S/[S] + K_M/[M]} \quad (5) \quad .$$

При достижении стационарного состояния диффузия медиатора, сочетающаяся с ферментативной реакцией по механизму «пинг-понг», описывается уравнениями:

$$D_S \left( \frac{d^2[S]}{dx^2} \right) - \frac{k_{кат}[E]}{1 + K_S \frac{1}{[S]} + K_M \frac{1}{[M]}} = 0 \quad (6) \quad ,$$

$$D_M \left( \frac{d^2[M]}{dx^2} \right) - \frac{k_{кат}[E]}{1 + K_S \frac{1}{[S]} + K_M \frac{1}{[M]}} = 0 \quad (7) \quad ,$$

где  $k_{кат}$  – каталитическая константа,  $K_S$  – константа Михаэлиса для субстрата,  $K_M$  – константа Михаэлиса для медиатора,  $D_S$  – коэффициент диффузии субстрата,  $D_M$  – коэффициент диффузии медиатора ( $D_M = D_{Mок} = D_{Mв}$ ).

Таким образом, практическое применение моделирования биоэлектрохимических процессов переноса электронов невозможно без оценки ряда фундаментальных характеристик, таких как: коэффициент

диффузии медиатора, константа Михаэлиса для медиатора и гетерогенная константа скорости электрохимической реакции.

### 3.1.2. Медиаторные соединения различных классов

Возможность применения различных соединений для медиаторного биоэлектрокатализа зависит от их редокс-потенциала (таблица 28). Для протекания окислительно-восстановительной реакции необходимо, чтобы потенциал медиатора был больше, чем потенциал компонента цепи переноса электронов, с которого медиатор забирает электроны.

Таблица 28. Редокс-потенциалы для некоторых медиаторов и компонентов ЭТЦ относительно стандартного водородного электрода при рН=7,0 [234, 235].

Компонент дыхательной цепи	Потенциал, В	Редокс-соединение	Потенциал, В
Флавопротеин	-0,45	Нейтральный красный	-0,33
НАД <sup>+</sup> /НАДН	-0,32	Метиленовый синий	0,01
ФАД/ФАДН <sub>2</sub>	-0,22	Тионин	0,06
Сукцинат/фумарат	0,03	2,6-Дихлорфенолиндофенол	0,22
Цитохром b	0,07	1,1'-Диметилферроцен	0,35
Убихинон	0,11	Ферроцен	0,40
Цитохром с	0,25	Гексацианоферрат (III) калия	0,43
Цитохром а	0,38	Ферроценкарбоновая кислота	0,51
О <sub>2</sub> /Н <sub>2</sub> О	0,82		

Специфика медиаторного переноса электронов диктует и другие требования к таким соединениям, кроме высоких редокс-потенциалов, которые подробно представлены в работе [236]. Далее более детально описаны свойства и особенности медиаторов, наиболее часто используемых при формировании микробных биосенсоров.

### 3.1.2.1. Производные ферроцена

Ферроцен – это один из наиболее эффективных и изученных медиаторов электронного транспорта. По своей структуре он является  $\pi$ -ареновым комплексом железа (рис. 102). Преимущества ферроцена и его производных позволяют создать огромное количество электрохимических сенсоров, которые демонстрируют хорошие аналитические свойства. Такие сенсоры обладают высокой стабильностью [237].

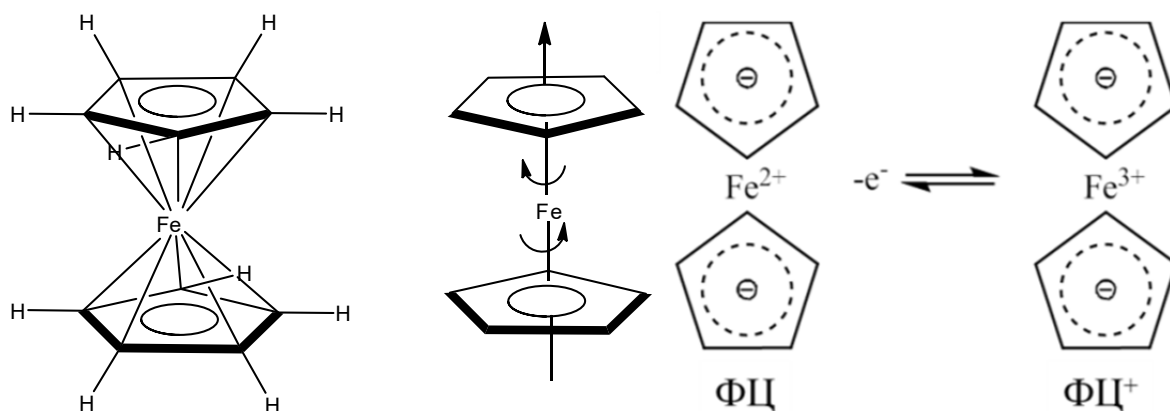


Рис. 102. Структура ферроцена и его окислительно-восстановительная пара.

Многие производные ферроцена имеют широкое применение в области биологии и медицины, такие как: противомаларийные, противоопухолевые, антибактериальные, противовоспалительные, при лечении анемии и ингибирование ферментативной активности [238]. Ферроцен характеризуется хорошей обратимостью, то есть легко может переходить из окисленной формы в восстановленную и наоборот. Это позволяет добиваться высоких ответов биосенсоров на его основе [239]. Менять свойства ферроцена

возможно при его модификации различными заместителями. Таким образом, редокс-потенциал производных ферроцена может быть от 0,15 до 0,60 В в зависимости от типа заместительной группы в кольце [235]. Растворимость ферроцена составляет  $3 \cdot 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup> в восстановленной и  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> в окисленной форме [240, 241]. Включение ферроцена в графитовую пасту дает возможность формировать безреагентные медиаторные биосенсоры. К сожалению, из-за более высокой растворимости катиона ферроцена в таких системах может наблюдаться постепенное падение сигнала. При введении различных заместителей меняется растворимость производных ферроцена, которую необходимо учитывать при разработке биосенсора. Так, 1,1'-диметилферроцен и ферроцен нерастворимы в воде, а ферроценмонокарбоновая кислота довольно хорошо в ней растворяется.

На сегодняшний день ферроцен достаточно часто используют в качестве медиатора для разработки датчиков. Например, был создан биосенсор с покрытием из модифицированного ферроценом полиэлектролита для количественного определения глюкозы. Результаты показали, что ферроценильные группы на полиэлектролитном каркасе действуют как посредник между окислительно-восстановительным центром глюкозооксидазы и электродом, что эффективно увеличивает перенос электронов между стеклоуглеродным электродом и глюкозооксидазой [242]. В работе [243] получен ряд примеров эффективности соединений ферроцена при использовании в микробных биосенсорах. Показано, что электроноакцепторные заместители увеличивают медиаторные свойства, а электронодонорные их снижают.

Ферроцен в качестве медиатора для биоаналитических систем имеет ряд положительных качеств: относительно низкий редокс-потенциал, позволяющий снизить вероятность побочных реакций; устойчивость восстановленной формы к кислороду; быстрота биохимических и электродных реакций, относительно низкая растворимость в воде, нетоксичность для большинства микроорганизмов.

### 3.1.2.2. 2,6-Дихлорфенолиндофенол

2,6-Дихлорфенолиндофенол относится к хинониминным красителям, которые являются рН и редокс-индикаторами (рис. 103). Медиатор 2,6-дихлорфенолиндофенол дает возможность определять метаболическую активность микроорганизмов как оптически (методом спектрофотометрии), так и электрохимически (методом вольтамперометрии). В окисленном виде в нейтральной среде 2,6-дихлорфенолиндофенол имеет синее окрашивание, которое обесцвечивается в восстановленном виде.

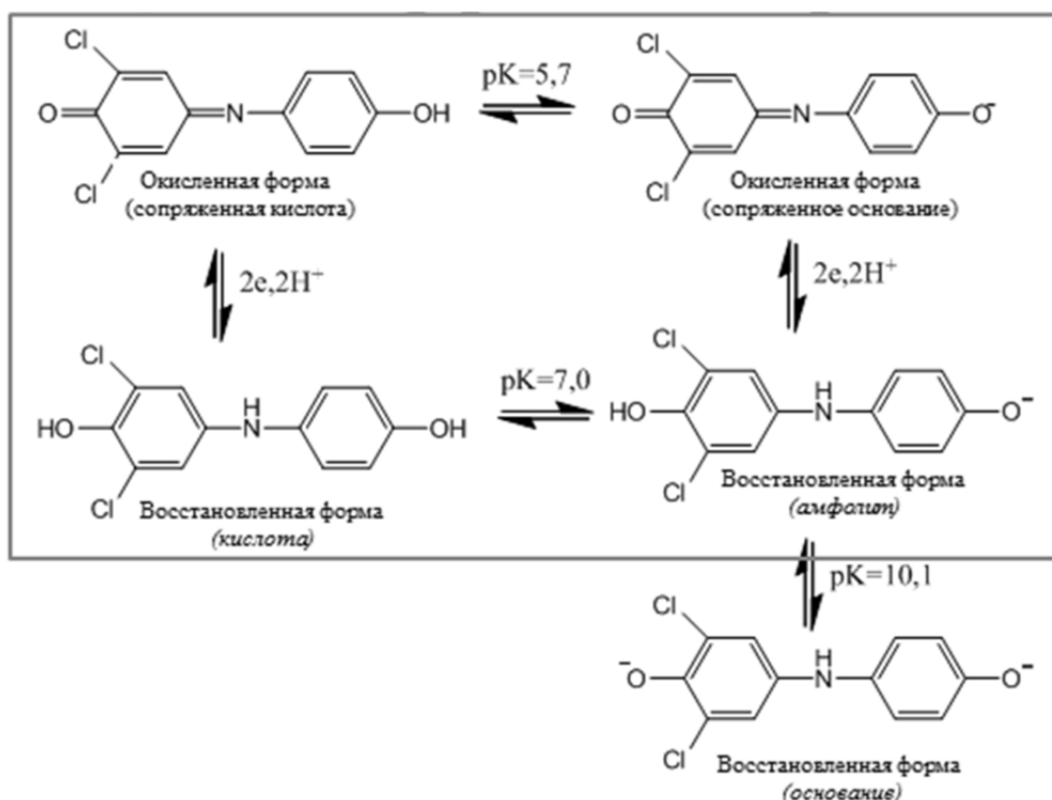


Рис. 103. Окислительно-восстановительные формы 2,6-дихлорфенолиндофенола [244].

Это соединение хорошо растворимо в воде, в то же время способно диффундировать через липидный слой мембран. В силу сравнительно высокого стандартного окислительно-восстановительного потенциала  $E^0 = +0,217$  В ДХФИФ способен взаимодействовать с различными участками

дыхательной цепи, известно, что он восстанавливается флавопротеиновыми ферментами и убихинонами. Липофильные свойства ДХФИФ позволяют применять его при создании БТЭ [245], двухмедиаторных биоаналитических систем на основе дрожжей [246] и анализа патогенной микрофлоры [247].

### 3.1.2.3. Гексацианоферрат (III) калия

Гексацианоферрат (III) калия – это неорганическое комплексное соединение трехвалентного железа с химической формулой  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Реакция перехода из окисленной в восстановленную форму имеет следующий вид (рис. 104):

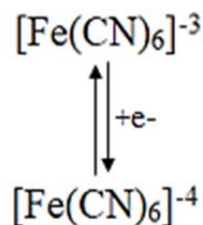


Рис. 104. Окислительно-восстановительная пара гексацианоферрата (III) калия.

Поскольку гексацианоферрат (III) калия имеет достаточно большой редокс-потенциал (таблица 1), он может быть хорошим медиатором для бактериальных клеток. Он может принимать электроны только с НАДФН-дегидрогеназ в клеточной мембране из-за своей липофобности. Так, например, определить активность эукариотических микроводорослей с использованием гексацианоферрата (III) калия оказалось невозможно из-за того, что их электронодонорные сайты находятся в хлоропластах [248]. С другой стороны, при использовании гексацианоферрата (III) калия с цианобактериями, долговременная стабильность биосенсора оказалась в семь раз выше, чем в случае применения липофильного бензохинона.

Гексацианоферрат (III) калия используется как эффективный медиатор для создания биосенсоров для анализа БПК, а также применяется при

разработке печатных лактатных электродов и электродов на основе глюкозооксидазы для определения содержания глюкозы в крови [16, 20, 60, 61]. Актуальным направлением является применение данного медиатора при формировании двухмедиаторных систем для разработки микробных биосенсоров.

#### 3.1.2.4. Феназины

Феназины – это ароматические азосоединения, которые применяют для окрашивания текстиля и древесины, а также в качестве клеточных красителей в микробиологии. Феназины имеют аминогруппы, связанные с бензольными кольцами, и простые углеводородные радикалы ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$ ). Один из атомов азота может замещаться на кислород или серу (рис. 105) [249].

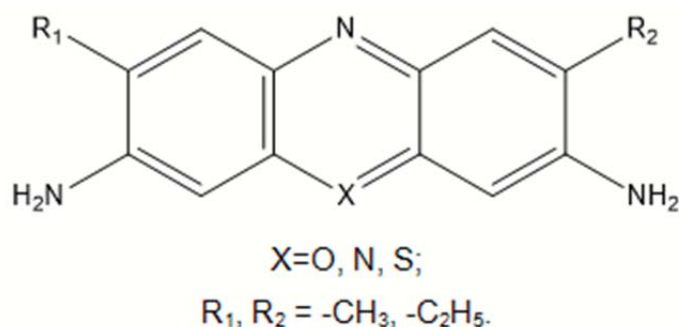


Рис. 105. Общая формула феназиновых соединений.

Многие феназины обладают медиаторными свойствами и способны образовывать проводящие полимеры, поэтому они находят широкое применение при создании биосенсоров. Наиболее часто применяемыми феназинами являются: метиленовый синий, нейтральный красный и тионин.

Нейтральный красный (3-амино-6-диметиламино-2-метилфеназин) относится к классу азинов, в кислой среде имеет красную окраску, может использоваться в качестве индикатора. Реакция его перехода из окисленной в восстановленную форму имеет следующий вид (рис. 106):



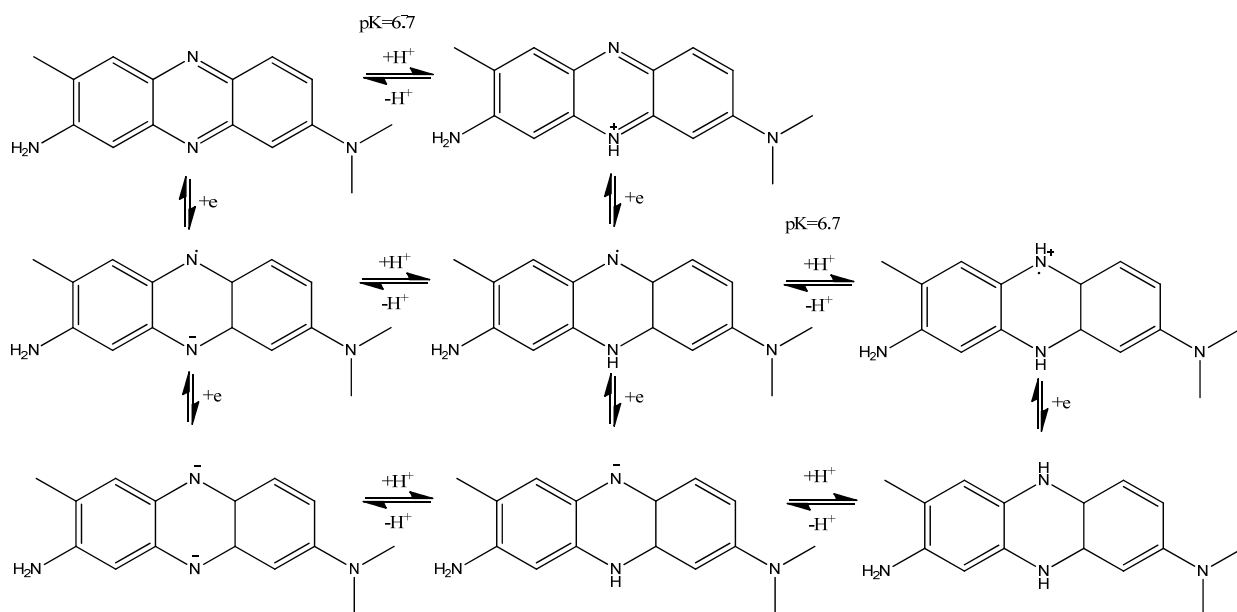


Рис. 106. Окислительно-восстановительные формы нейтрального красного [250].

Нейтральный красный облегчает перенос электронов между бактериями и электродом. Во многих работах этот медиатор показывает хорошие результаты. Так, на основе нейтрального красного было создано множество сенсоров для оценки БПК. Созданы новые датчики на основе электрохимической полимеризации нейтрального красного на поверхности электрода из углеродной пасты. Они показывают электрокаталитическую способность к одновременному определению пирокатехина и гидрохинона [251].

Известно, что катион нейтрального красного способен проникать через клеточную мембрану и накапливаться в органеллах [252, 253]. Эта особенность может ограничивать применение нейтрального красного в медиаторном биоэлектрокатализе. Ковалентное связывание нейтрального красного с поверхностью рабочего электрода может решить описанную проблему. Такое связывание можно проводить путем карбодиимидного синтеза. Модифицированный таким образом электрод использовался как анод БТЭ. При присутствии в системе бактерий *E. coli* ковалентно связанный нейтральный красный обеспечивал перенос электронов от микробных клеток

в анаэробных условиях [254]. В работе [255] нейтральный красный ковалентно связывали с карбоксилированными УНТ. Для создания биосенсора на поверхности полученного таким образом электрода иммобилизовали глюкозооксидазу.

При полимеризации нейтрального красного образуются электропроводящие гели поли(нейтрального красного). Такие гели можно использовать для формирования биосенсоров [19, 256, 257]. В статье [19] показана возможность использования пНК при формировании БПК-сенсора. пНК либо электрохимически синтезировали на электроде, либо брали в чистом виде и далее наносили микроорганизмы, либо проводили электрохимический синтез пНК в смеси с иммобилизованными микроорганизмами (рис. 107).

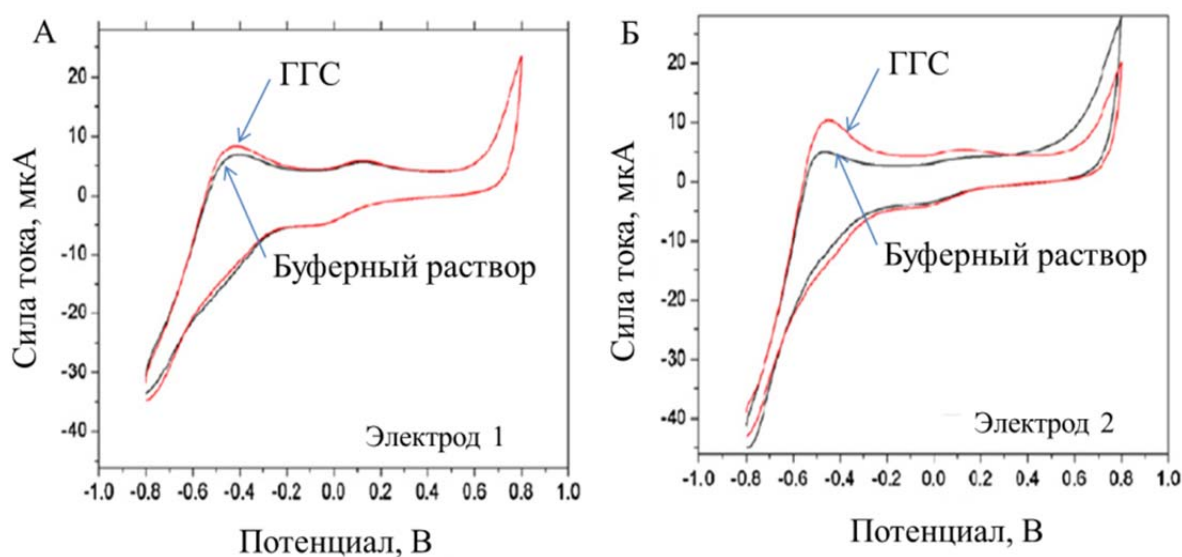


Рис. 107. Циклические вольтамперные зависимости созданных электродов [19].

При этом более высокая чувствительность сенсора была достигнута при полимеризации НК с микроорганизмами. Несмотря на то, что рецепторные элементы на основе микроорганизмов *E. coli* обладают узким спектром окисляемых веществ, данный недостаток биосенсора корректировался дополнительной пробоподготовкой. Для этого

анализируемые пробы воды подвергали фотокаталитической обработке с использованием нанотрубок  $\text{TiO}_2$ . Таким образом, в пробе образовывались более простые органические соединения, которые окислялись используемыми микроорганизмами.

Метиленовый синий и тионин являются фенотиазидами, то есть содержат серу в азиновом кольце. Метиленовый синий представляет собой темно-зеленые кристаллы с бронзовым блеском или же мелкий порошок темно-зеленого цвета. Метиленовый синий окрашен в голубой цвет в окисленном виде и бесцветный в восстановленном (рис. 108).

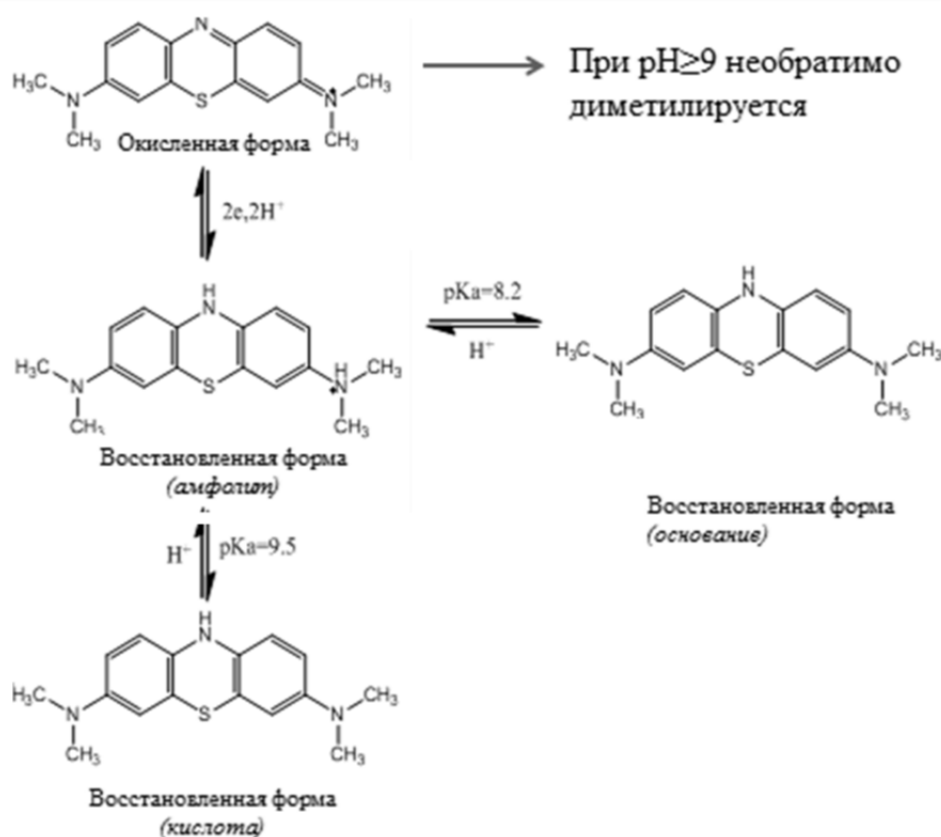


Рис. 108. Переход метиленового синего в восстановленную форму из окисленной.

Метиленовый синий часто используется в качестве медиатора электронного транспорта в биосенсорах и биотопливных элементах. Также он нашел широкое применение в биомедицине [258]. Он может проходить через клеточную мембрану внутрь клеток [259, 260]. Использование данного редокс-соединения для создания биосенсоров и БТЭ дало толчок к изучению

метаболизма клеток микроорганизмами в его присутствии [253]. Метиленовый синий может быть электрохимически полимеризован на электроде. Такие процессы могут быть использованы при создании ДНК-сенсоров [261].

Тионин также достаточно часто применяется как акцептор электронов в биосенсорах. В кислой среде он образует катион фиолетового цвета. При переходе к тионину одного электрона образуется бесцветный семитионин (рис. 109).

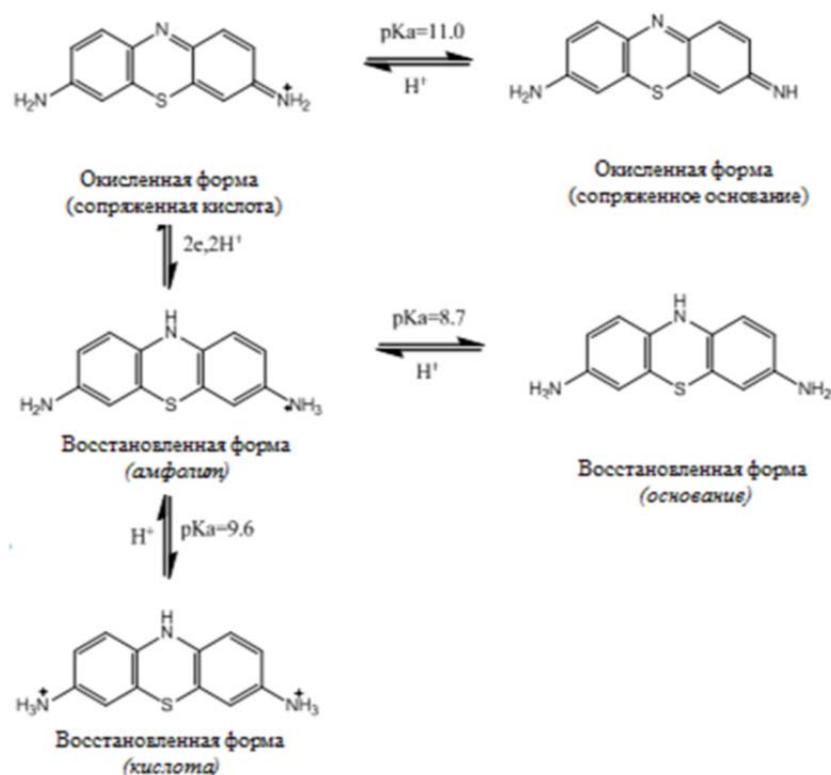


Рис. 109. Переход тионина из окисленной в восстановленную форму.

С использованием тионина разработаны биосенсоры для экологического анализа. На основе электрополимеризованного тионина созданы электрохимические ДНК-сенсоры [262]. В настоящее время разрабатываются ферментные биосенсоры с использованием электродов, полученных трафаретной печатью, модифицированных восстановленным оксидом графена и тионином [263].

В работе [264] описана ионная ассоциация тионина и микроорганизмов *E. coli*. Медиатор покрывал поверхность *E. coli* за счет сил

электростатического взаимодействия, что обеспечивало передачу электронов между дыхательной цепью микроорганизмов и электродом. Данный подход был использован при создании биосенсора для определения токсичности сточных вод. В другой работе тионин ковалентно связывали с гелем хитозана глутаровым альдегидом. Полученный редокс-активный полимер использовали для иммобилизации антитела С-вируса сальмонеллы при формировании иммуносенсора [265]. Созданный сенсор обладал высокой чувствительностью и воспроизводимостью.

### ***3.1.3. Электрохимические методы исследования медиаторного переноса электронов***

#### **3.1.3.1. Амперометрия**

Метод амперометрии лежит в основе функционирования многих биосенсоров. Однако этот метод можно применять как для количественного анализа, так и для изучения взаимодействия редокс-соединений с микроорганизмами. В работе [266] описана модель, позволяющая определить так называемый «индекс эффективности медиаторов», который рассчитывается как соотношение максимального тока биосенсора (соответствующего максимальной скорости) к константе Михаэлиса для медиатора в соответствии с описанным выше механизмом «пинг-понг».

Практическое применение описанной модели можно найти в работах [267–269]. В данной серии работ изучено взаимодействие микроорганизмов *G. oxydans* с широким спектром медиаторов различного строения. Количественный подход к выявлению эффективности редокс-соединений дал возможность определить влияние различных химических групп в молекуле ферроцена на их способность переносить электроны от микроорганизмов на электрод [243]. В работе [253] метод амперометрии и описанная модель применены для определения диффузионных характеристик растворимых редокс-соединений в системах с микроорганизмами *E. coli*. Для

амперометрических экспериментов был использован вращающийся дисковый электрод. Описанный подход рассматривает систему «микроорганизмы – медиатор – электрод», не углубляясь в протекающие процессы. Поэтому такой подход не дает возможность выявить причины низкой эффективности процессов переноса электронов.

### **3.1.3.2. Вольтамперометрия с линейной разверткой потенциала**

Метод циклической вольтамперометрии используется довольно часто для оценки термодинамики и кинетики электродных процессов. В общем виде схему установки для получения циклических вольтамперограмм можно представить в виде электрохимической ячейки с 3 электродами, а именно противоиэлектрода (вспомогательного ВЭ), электрода сравнения (ЭС) и рабочего электрода (РЭ), погруженных в жидкость и связанных с потенциостатом. Такой подход дает возможность контроля потенциала РЭ, минимизируя вклад омического снижения напряжения в растворе. В этой схеме ток, текущий через ЭС, также является минимальным, а разность потенциалов между РЭ и ЭС остается постоянной. При проведении вольтамперометрии к используемой электрохимической ячейке прикладывают потенциал, который изменяется с постоянной скоростью [270]. В качестве аналитического сигнала используют максимальный протекающий в системе ток. Поскольку при высоких потенциалах реакция окисления-восстановления на электроде протекает достаточно быстро по сравнению с диффузией редокс-соединения, зависимость тока от потенциала имеет вид пика. Зависимость предельного диффузионного тока ( $I_p$ ) от других факторов подчиняется уравнению Рэндлса–Шевчика:

$$I_p = 0,446 nFSC_0 \sqrt{\frac{DFnv}{RT}}, \quad (8)$$

где  $I_p$  – анодный ток,  $S$  – площадь РЭ,  $v$  – скорость наложения потенциала,  $D$  – коэффициент диффузии редокс-соединения,  $C_0$  – концентрация редокс-соединения.

Такой подход достаточно часто применяется при описании работы амперометрических медиаторных биосенсоров. Так, например, его применяли при создании сенсора на холестерин [271]. Сенсорная система являлась БТЭ, в котором катод и анод были сделаны в виде электродов из углеродной ткани (рис. 110). На обоих электродах находилась холестериноксидаза, иммобилизованная в золь-гель матрицу. Продукт ферментативной реакции –  $H_2O_2$  взаимодействовал с берлинской лазурью. Одновременно в анодном отделении проходило окисление холестерина в присутствии медиатора. Для электродов биотопливного элемента были получены кривые ток – потенциал. Было показано, что окисление холестерина наиболее эффективно при потенциале 350 мВ. Рост тока на катоде происходит из-за восстановления  $H_2O_2$ .

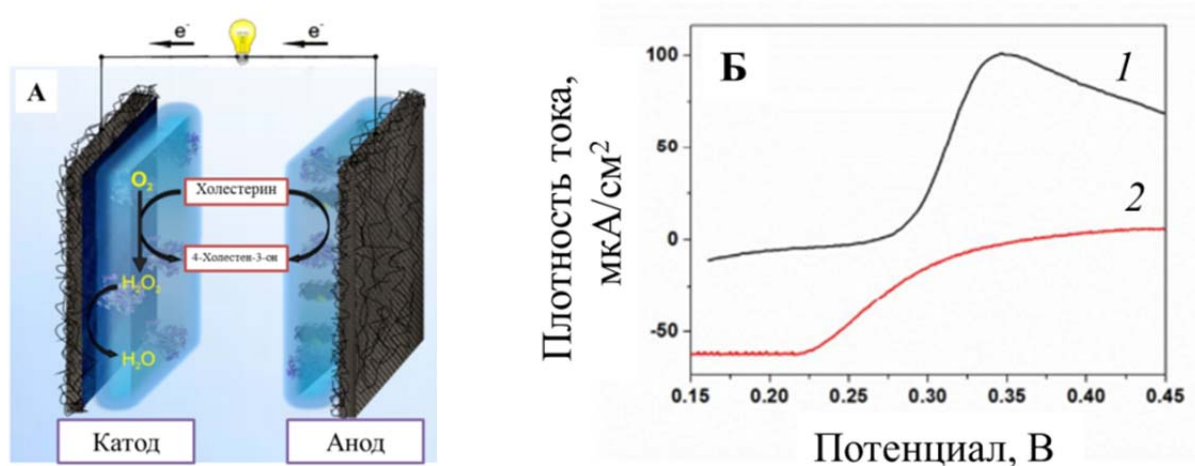


Рис. 110. Биосенсор для измерения холестерина [271]: А – принцип работы; Б – вольтамперные зависимости для представленной системы (анод – 1, катод – 2).

В статье [272] показано применение вольтамперометрии при создании биосенсора на фенольные соединения. В качестве медиатора был использован катехол. С использованием такого подхода изучали прямой и медиаторный перенос электронов в системах с лакказой.

### 3.1.3.3. Циклическая вольтамперометрия

Циклическая вольтамперометрия (ЦВА) – это электрохимический метод измерения токового отклика окислительно-восстановительного соединения в растворе при наложении линейной развертки потенциала. В отличие от описанного выше метода линейной вольтамперометрии в циклической вольтамперометрии подача потенциала на электрохимическую систему проводится в прямом и обратном направлениях. Этот процесс повторяется несколько раз во время сканирования. Изменяющийся ток между рабочим электродом и электродом сравнения измеряется устройством в реальном времени. В результате получается характерный замкнутый график, называемый циклической вольтамперограммой. Это полезный метод для быстрого получения информации о термодинамике окислительно-восстановительных процессов и кинетике реакций электронного переноса. Как и другие методы вольтамперометрии, в циклической вольтамперометрии используется трехэлектродная система, состоящая из рабочего электрода, электрода сравнения и противоэлектрода.

Предельный ток для обратимого электрохимического взаимодействия, скоростьопределяющей стадией которого служит диффузия редокс-соединения к РЭ, характеризуется представленным выше уравнением Рэндлса–Шевчика. При полностью обратимой реакции значение предельного тока одинаково при наложении потенциала в прямом и обратном направлениях. Разность потенциалов между пиками окисления и восстановления характеризуется уравнением [270]:



$$\Delta E_p = 2,218 \frac{RT}{nF}, \quad (9)$$

где  $\Delta E_p$  – разность потенциалов пиков;  $n$  – число электронов;  $T$  – температура;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $F$  – число Фарадея.

В работе [273] ЦВА применяли при изучении процессов взаимодействия медиаторов феназинового ряда с углеродным электродом, покрытым полиэтиленимином. Модификация поверхности электрода выполнялась для его функционализации  $\text{NH}_2$ -группами. Такой подход позволил улучшить закрепление микроорганизмов *S. cerevisiae* на его поверхности.

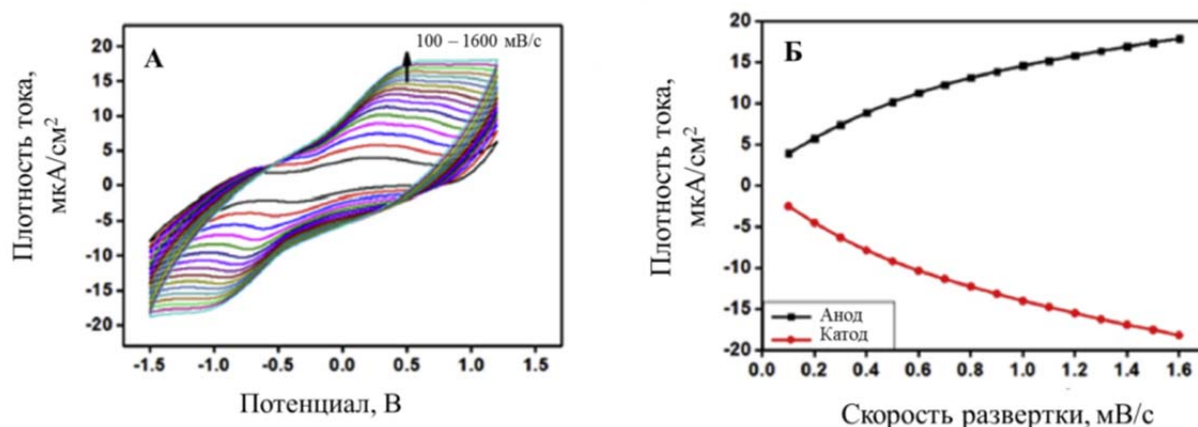


Рис. 111. Изучение электрохимических свойств разработанного электрода [273]: А – вольтамперограмма для метиленового синего в системе, Б – зависимости тока от скорости наложения потенциала.

Поскольку представленная на рисунке 111 зависимость нелинейна, то лимитирующей стадией электрохимических процессов является диффузия электроактивного вещества к электроду. Исходя из этого, с использованием уравнения Рэндлса–Шевчика были определены коэффициенты диффузии для применяемых медиаторов.

В исследовании [274] было показано, что процесс окисления-восстановления медиатора фенотиазина, иммобилизованного в золь-гель матрицу, контролируется его диффузией к поверхности печатного электрода.

Определение лимитирующей стадии проводили в соответствии с уравнением Рэндлса–Шевчика, исходя из линейности зависимости тока от квадратного корня скорости наложения потенциала. Полученные результаты также были использованы для определения коэффициентов диффузии медиатора. В работе [275] с использованием такого же подхода и стеклоуглеродного электрода был определен коэффициент диффузии модифицированного фенотиазина, растворенного в ацетонитриле, он составил  $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с.

Диффузия может быть скоростьюопределяющей стадией электрохимических процессов даже в том случае, когда редокс-соединение ковалентно связано с электродом. Например, в работе [261] при создании биосенсора для определения тромбина использовали пришивку НК к электроду. Применение к полученному сенсору описанной выше модели показало, что лимитирующей стадией процесса является диффузия. Для объяснения такого факта в работе предположили так называемый "прыжковый механизм" переноса электронов, характерный для редокс-активных полимеров.

Одной из важных особенностей метода ЦВА является возможность определения скорости переноса электрона от медиатора на электрод. В основополагающей работе [276] Николсон впервые показал принципиальную возможность применения метода ЦВА для определения константы скорости передачи электронов на РЭ. Основные допущения его моделирования:

1. Редокс-соединение находится в растворенном состоянии независимо от своей формы.
2. Массоперенос происходит за счет диффузии.

Николсон доказал, что в случае, если разница в потенциалах пиков окисления и восстановления лежит в интервале  $60n - 200n$  (мВ), то вклад коэффициента переноса допустимо не учитывать. Автор ввел эмпирический параметр  $\psi$ , при использовании которого можно рассчитать константу скорости гетерогенного переноса электронов ( $k_s$ ):

$$k_s = \psi \sqrt{\pi \frac{nFv}{RT} D}, \quad (10)$$

где  $\psi$  – эмпирический параметр [277];  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $\pi$  – 3,14;  $n$  – число электронов;  $D$  – коэффициент диффузии;  $v$  – скорость наложения потенциала;  $T$  – температура;  $F$  – число Фарадея.

При разработке модифицированного электрода на основе НАДН/НАД<sup>+</sup> было показано, что перенос электронов медиатором ГЦК лимитируется стадией диффузии. А константа  $k_s$ , определенная по описанному выше уравнению, составила  $3,78 \cdot 10^{-5}$  см/с [278]. Применение такого моделирования для определения  $k_s$  предложено и для изучения закономерностей функционирования других биосенсоров [279, 278].

В том случае, когда окисленная или восстановленная форма редокс-соединения адсорбирована на поверхности электрода, нужно принимать во внимание вклад скорости поверхностной реакции в общую скорость переноса электронов в системе. В исследовании [270] приведен вид циклических вольтамперных зависимостей для обратимых взаимодействий, в которых лимитирующей стадией является адсорбция редокс-соединения на электроде. В таком случае они описываются следующим уравнением:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v S \Gamma_0, \quad (11)$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $\Gamma_0$  – поверхностная концентрация редокс-соединения на электроде;  $n$  – число электронов;  $v$  – скорость наложения потенциала;  $S$  – площадь электрода;  $F$  – число Фарадея;  $T$  – температура.

Таким образом, основной критерий, который указывает, что лимитирующей стадией переноса электронов является адсорбция, это линейный вид зависимости генерируемого тока от скорости наложения потенциала. Такая модель также была использована для описания процессов

переноса электронов в медиаторных биосенсорах. Так, в работе [61] сформирован БПК-сенсор на основе микроорганизмов *P. aeruginosa*, иммобилизованных в полипиррольную матрицу совместно с медиатором гексацианоферратом (III) калия. Для полученного электрода исследованы вольтамперограммы (рис. 112).

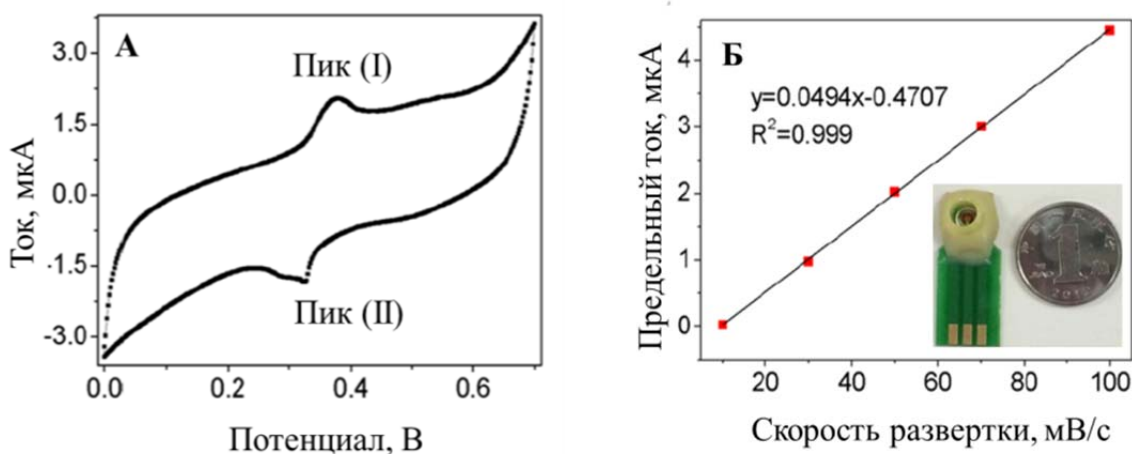


Рис. 112. Вольтамперная зависимость электрода на основе гексацианоферрата (III) калия, иммобилизованного в полипиррольную матрицу [61]: А – типичный вид вольтамперограммы электрода; Б – зависимость предельного тока на электроде от скорости развертки потенциала (вставка – внешний вид электрода).

На представленной зависимости видны 2 пика: пик окисления гексацианоферрата (III) калия при 0,328 В (I) и пик его восстановления при 0,317 В (II). Поскольку медиатор не теряет свою электрохимическую активность, то это указывает на успешную иммобилизацию ГЦК в полипиррольную мембрану на поверхности электрода [61]. Авторы показали, что процессы, происходящие на электроде, соответствуют лимитирующей стадии – адсорбции медиатора.

Для нахождения константы скорости переноса электронов на электрод в случае лимитирующей стадии адсорбции электроактивного вещества была предложена математическая модель (модель Лавирона) [281]. Модель основана на допущении, что редокс-соединение находится на поверхности

электрода и для него применима модель изотермы сорбции Ленгмюра. При выполнении условия  $\Delta E_p/n > 0,2$  В по экспериментальным данным можно определить коэффициент переноса ( $\alpha$ ) и значение  $k_s$ .

В работе [282] описанный подход был использован для определения  $\alpha$  в системе для графитовых электродов с УНТ и гемоглобином. При обработке вольтамперограмм построены зависимости  $E_p$  от  $\log v$  (рис. 113), из которых был определен коэффициент переноса  $\alpha$ , который составил 0,21.

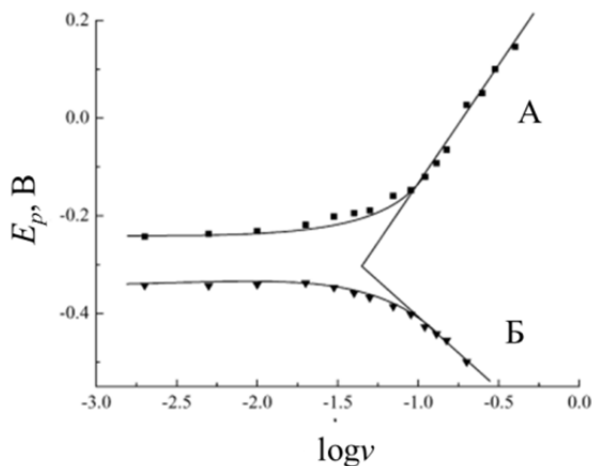


Рис. 113. График зависимости потенциалов анодного (А) и катодного (Б) пиков  $E_p$  от логарифма скорости развертки  $v$  [282].

Если известны значения коэффициентов переноса, константу скорости гетерогенного переноса электронов  $k_s$  можно определить по уравнению:

$$\log(k_s) = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log\left(\frac{RT}{nFv}\right) - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2,3RT}, \quad (12)$$

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

Описанная модель часто используется при вычислении  $k_s$  для биосенсоров на основе редокс-активных и проводящих полимеров. Например, при изучении электрохимических характеристик биосенсора для анализа молочной кислоты, содержащего графен и хиноновый медиатор

[283]. Для описания переноса электронов по данным ЦВА была построена зависимость тока от скорости наложения потенциала. Исходя из линейного вида данной зависимости, для расчета  $k_s$  было использовано описанное моделирование. В другом исследовании такое моделирование применяли для изучения характеристик сенсора для анализа N-ацетил-L-цистеина [284]. Сенсор был основан на применении графито-пастового электрода, модифицированного ферроценом и многостенными УНТ.

Циклическая вольтамперометрия позволяет не только фиксировать взаимодействия медиатора с электродом. В нескольких исследованиях описана возможность применение ЦВА и моделирования, описанного в работе [285] для определения констант скорости взаимодействия биоматериала и редокс-соединений [275, 286]. Для того, чтобы определить константы скорости взаимодействия, необходимо зарегистрировать анодный ток в присутствии и отсутствии окисляемого субстрата. В методе ЦВА регулируемой переменной является значение скорости наложения потенциала. Константа скорости переноса электронов определяется по этой скорости развертки и по соответствующему разделению потенциалов анодного и катодного пиков.

В данном случае необходимо учитывать стадию взаимодействия редокс-соединения с биоматериалом. Моделирование Николсона и Шайна основано на допущении, что лимитирующей стадией переноса электронов является диффузия медиатора. Изменение концентрации медиатора в биокаталитическом слое связано не только с ферментативной реакцией, но и с процессами массопереноса, если применить модель двухсубстратной ферментативной реакции «пинг-понг» и уравнение Фика, то математически изменение концентрации медиатора в биокаталитическом слое можно описать следующим образом:

$$\frac{d[M]}{dx} = D \left( \frac{d^2[M]}{dx^2} \right) - \frac{k_{\text{взаим}}[E][M]}{1 + k_{\text{взаим}} \left( \frac{1}{k_2} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 k_2} [S] \right) [M]} \quad (13)$$

где  $x$  – расстояние от электрода;  
 $[M]$  – концентрация медиатора;  
 $[E]$  – полная концентрация фермента;  
 $[S]$  – концентрация субстрата;  
 $k_1, k_{-1}, k_2$  – константы скоростей соответствующих стадий реакции по механизму «пинг-понг».

Первое слагаемое уравнения связано с процессом диффузии медиатора, а второе с потреблением медиатора микроорганизмами. В случае низкой концентрации медиатора и высокой концентрации субстрата уравнение преобразуется к виду:

$$\frac{d[M]}{dx} = D\left(\frac{d^2[M]}{dx^2}\right) - k_{\text{взаим}}[E][M] \quad (14)$$

При избытке субстрата и низкой концентрации редокс-соединения (в описанном случае взаимодействие редокс-соединения с биоматериалом будет иметь псевдопервый порядок) константу скорости взаимодействия медиатора и биоматериала ( $k_{\text{взаим}}$ ) можно рассчитать по уравнению:

$$\frac{I_k}{I_d} = \sqrt{\frac{k_{\text{взаим}}[E]RT}{nFv}}, \quad (15)$$

где  $I_d$  – ток без субстрата;  $I_k$  – ток при введении субстрата;  $[E]$  – концентрация фермента (титр клеток);  $T$  – температура;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $v$  – скорость наложения потенциала;  $n$  – число электронов;  $F$  – число Фарадея.

В рамках данной модели отношения токов на вольтамперограммах с субстратом и без него линейно зависят от  $v^{-1/2}$ , что позволяет по тангенсу угла наклона линейной регрессии рассчитать константу скорости взаимодействия биоматериала с исследуемым медиатором. Ограничение данной модели состоит в том, что массоперенос должен осуществляться только за счет диффузии, тогда конвекцией и миграцией пренебрегают. Также модель не учитывает образования новой фазы на поверхности электрода. Данный

подход часто используется при определении  $k_{\text{взаим}}$  ферментов с разными редокс-соединениями (таблица 29).

Таблица 29. Результаты расчета  $k_{\text{взаим}}$  глюкозооксидазы, полученные с применением метода ЦВА и моделирования Николсона и Шайна.

Редокс-соединение	$k_{\text{взаим}}$ , дМ <sup>3</sup> /(с·моль)	Публикация
Азур А	$9,8 \cdot 10^2$	[275]
Бриллиантовый крезилковый голубой	$4,0 \cdot 10^2$	[287]
Дауномицин	$9,0 \cdot 10^3$	[287]
Дофамин	$1,2 \cdot 10^6$	[287]
Феназин	$2,1 \cdot 10^4$	[275]
Тионин	$1,6 \cdot 10^4$	[287]
$[\text{Co}^{\text{III}}(5\text{-хлоро-}1,10\text{-фенантролин})_3]^{3+}$	$1,75 \cdot 10^3$	[286]
$[\text{Co}^{\text{III}}(1,10\text{-фенантролин})_3]^{3+}$	$1,9 \cdot 10^4$	[286]

Таким образом, ЦВА может быть очень полезным и информативным методом при исследовании механизмов функционирования биосенсоров, в частности для определения кинетических констант отдельных стадий биоэлектрохимических процессов.

### ***3.1.4. Особенности формирования и использования медиаторных биосенсорных систем для определения биохимического потребления кислорода***

Разработки в области создания медиаторных систем для определения БПК можно разделить на два основных направления: использование электроактивных веществ для модификации стандартного метода определения БПК [21, 22, 59] и создание модифицированных медиаторами электродов для применения в биосенсорах [9, 10].



Идея модификации стандартного метода определения БПК впервые описана в работе [24]. Такой подход основан на замене кислорода в системе на медиатор – гексацианоферрат (III) калия, таким образом инкубация образца проводилась анаэробно, а БПК<sub>5</sub> рассчитывалось по полученному в биохимической реакции гексацианоферрату (II). Снижение времени анализа за счет предложенного подхода помогло дальнейшей разработке такого метода. Учет эндогенного дыхания применяемой микробной популяции позволил повысить точность анализа БПК<sub>5</sub> [288]. По аналогии со стандартным методом в описанном подходе требуется инокулят, который готовят во время пробоподготовки. Для решения проблемы хранения и подготовки используемого инокулята предлагалось иммобилизовать микроорганизмы, например, в поливинилацетат [289]. В первых работах по модификации стандартного метода БПК<sub>5</sub> применялись наиболее изученные микроорганизмы, однако в дальнейшем были проведены следования по поиску микроорганизмов с широким спектром окисляемых веществ, в частности, использовали микроорганизмы, выделенные из анализируемых образцов вод, так как они уже адаптированы к содержащимся в них органическим веществам [290].

В первых научных работах по созданию медиаторных систем для определения БПК рекомендовалось проводить определение в анаэробных условиях, чтобы убрать возможную конкуренцию кислорода и внесенного редокс-соединения. В работе [291] было показано, что потребности создавать бескислородные условия нет. На примере микроорганизмов *E. coli* было определено, что степени биохимического разложения органических соединений в кислородной и бескислородной средах достаточно близки. В таких случаях кислород затрачивается преимущественно на внутриклеточные процессы, не изменяя результат определения БПК [292].

Однако существенным недостатком было то, что время инкубации пробы в новом методе не было стандартизовано. Кроме того, во время инкубационного периода из-за биохимических превращений

гексацианоферрата (III) калия возможно выделение в среду цианид-ионов. Для преодоления описанной проблемы в работе [21] предложено останавливать реакцию редокс-соединения с использованием таких веществ, как:  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{HCHO}$ ,  $\text{NaClO}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NaOH}$  и других. Самым лучшим ингибитором медиаторного переноса оказался  $\text{HCHO}$ . Он прекращал восстановление редокс-соединения и не вносил погрешность в результаты измерения БПК до 73 ч инкубирования. Авторы данного исследования тоже отказались от применения бескислородной среды. Развитие данных исследований было направлено на повышение автоматизации медиаторного метода определения БПК [59, 60, 290].

Родоначальниками направления по разработке модифицированных медиаторных электродов являются японские ученые [293]. В пионерской работе по этому направлению были применены микроорганизмы *P. fluorescens* и гексацианоферрат (III) калия. В следующей работе тех же авторов [294] представлен портативный БПК-датчик (рисунок 114А).



Рис. 114. Портативные биосенсорные БПК-анализаторы: А – биосенсор, описанный в работе [294]; Б – биосенсор, описанный в работе [295]; В – модифицированный электрод, описанный в работе [62].

Основная проблема использования гексацианоферрата (III) калия – это его хорошая растворимость в воде, осложняющая проведение многократных измерений. Для формирования безреагентных биосенсоров используют подход совместной иммобилизации медиатора и биоматериала. В работе [61] показана возможность электрохимической иммобилизации бактерий *P.*

*aeruginosa* с гексацианоферратом (III) калия в полипиррольную матрицу. Созданный датчик обладал невысокой стабильностью из-за вымывания редокс-соединения из приэлектродного пространства. В другой работе было предложено использовать поли(нейтральный красный) для создания электропроводящего геля (рисунок 114В). Это дало возможность создать стабильный биораспознающий элемент и повысить экспрессность [62].

В работе [26] описан биосенсор на основе криогеля хитозана и бычьего сывороточного альбумина. В качестве медиатора применялся метиленовый синий, что обусловлено его нетоксичностью и близостью рабочего потенциала к потенциалам коферментов дыхательной цепи микроорганизмов (-0,1...-0,4В при рН = 4–11) [235]. Для получения сенсорного элемента на стеклоуглеродный электрод наносили медиатор, и после его высушивания наносили сверху слой криогеля. Наличие криогеля в матрице оказывает большое влияние на структуру пленки (рис. 115).

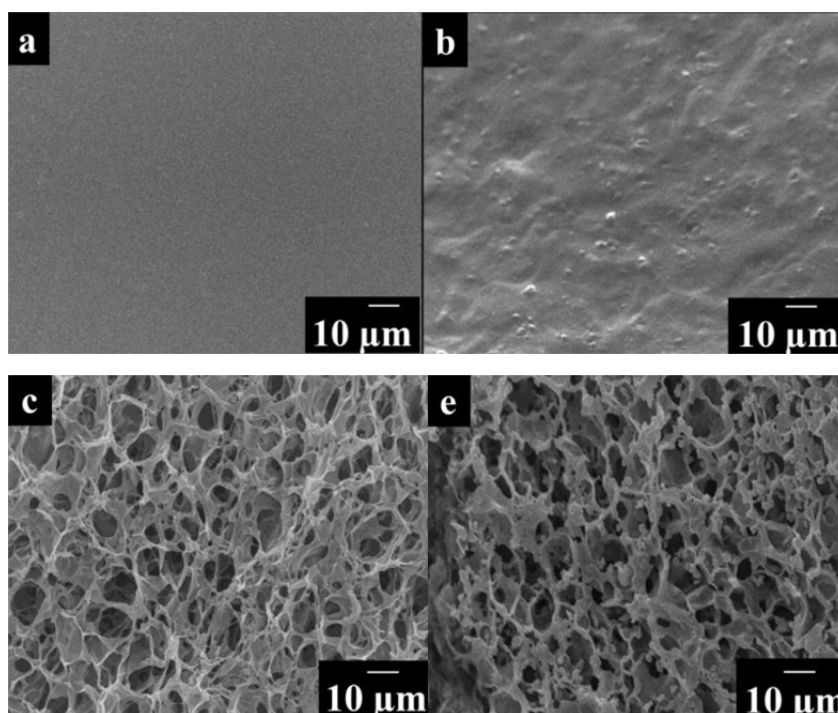


Рис. 115. Полученные электронным микроскопом изображения [26]: (а) – хитозан – БСА внекриогелевой матрицы; (б) – хитозан – БСА – активный или вне криогелевой матрицы; (с) – хитозан – БСА криогелевая матрица; (е) – хитозан – БСА – активный или криогелевая матрица.

На рис. 115 представлены полученные на электронном микроскопе изображения модифицированных поверхностей электродов. У электродов с внекриогелевой матрицей наблюдается плоская поверхность в то время, как электроды на основе криогелевой матрицы показали взаимосвязанную пористую структуру. Данная структура увеличивает площадь поверхности, тем самым улучшая контакт между клетками и субстратами, следовательно, повышается чувствительность изготовленного биодатчика. При оптимальных условиях криогелевая матрица «хитозан – БСА – активный ил» показала хороший уровень стабильности при хранении (65 дней) и широкий линейный БПК<sub>5</sub> диапазон: 1–100 мг/дм<sup>3</sup> O<sub>2</sub> [26].

Для создания работы с микроорганизмами эукариот было предложено использовать двухмедиаторные системы [25]. Созданный биосенсор включал в себя микроорганизмы *Saccharomyces cerevisiae* и двухмедиаторную систему гексацианоферрат (III) калия – 2-метил-1,4-нафтохинон (менадион). 2-Метил-1,4-нафтохинон может проникать внутрь клетки и забирать электроны с НАДН и цепи переноса электронов [296]. Гексацианоферрат (III) калия был применен в качестве второго компонента системы на основе его широкого использования в других исследованиях [297]. Таким образом, созданный двухмедиаторный биосенсор давал возможность проводить определение БПК<sub>5</sub> в диапазоне 6,6–220 мгO<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. В работе [298] изучен механизм работы двухмедиаторной системы на основе микроорганизмов *S. cerevisiae*. Применение менадиона и гексацианоферрата (III) калия позволило увеличить аналитический сигнал сенсора. Авторы также предположили, что липофильный менадион проникает в клетки микроорганизмов, далее передает принятые электроны на гексацианоферрат (III) калия, который быстро окисляется на электроде (рис. 116). В дальнейших исследованиях аналогичная система была применена при создании биосенсора для анализа общей токсичности [299].

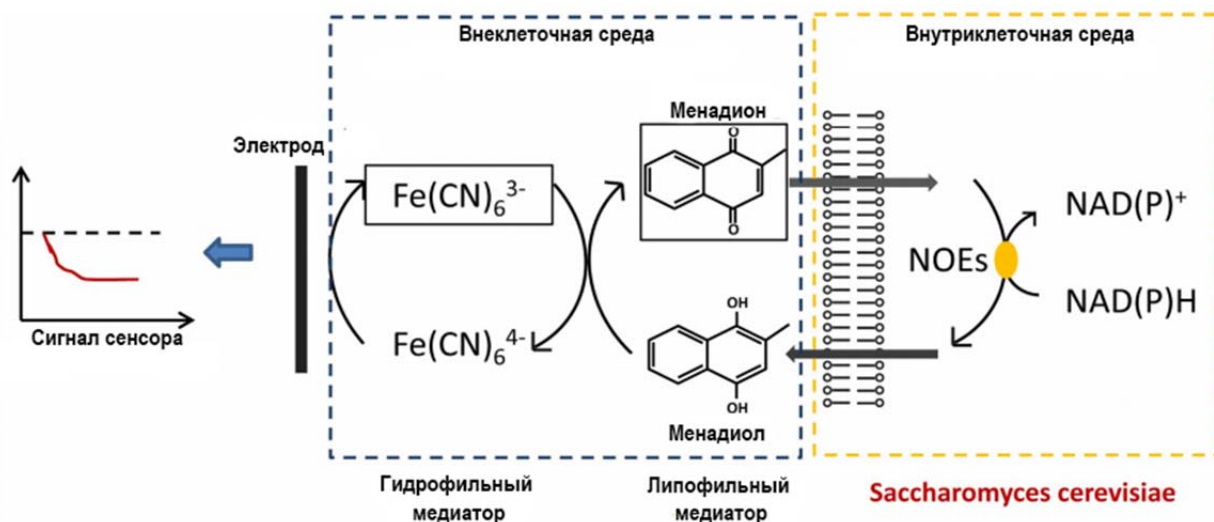


Рис. 116. Механизм работы двухмедиаторной системы гексацианоферрат (III) калия – менадион с клетками *S. cerevisiae* [299].

Гексацианоферрат (III) калия имеет достаточно большой редокс-потенциал и, соответственно, служит хорошим акцептором электронов. При этом, из-за того, что его молекула заряжена, он не может проникать сквозь плазматическую мембрану. Таким образом, гексацианоферрат (III) калия взаимодействует преимущественно с мембранными ферментами микроорганизмов. С другой стороны, проблема липофильных медиаторов, подобных менадиону, в том, что они легко проникают через мембраны клеток, но их потенциал обычно невысок для того чтобы быть сильными акцепторами электронов.

В работе [291] описана возможность использования двухмедиаторной системы в БПК-биосенсоре на основе бактерий *E. coli*. Такие системы разрабатывались на основе гексацианоферрата (III) калия, который применялся совместно с менадионом, п-бензохиноном, нейтральным красным, 2,6-дихлорфенол-индофенолом, N,N'-тетраметил-1,4-фенилендиамином, 2,3,5,6-тетраметил-1,4-фенилендиамином и феназинэтосульфатом. При использовании феназинэтосульфата и 2,3,5,6-тетраметил-1,4-фенилендиамина совместно с гексацианоферратом (III) калия эффективность биодegradации органических субстратов увеличивалась.

Нейтральный красный не влиял на эффективность биодegradации. Другие редокс-соединения уменьшали эффективность биодegradации, что по мнению авторов, связано с их токсичностью для клеток. Необходимо отметить, что такой подход, основанный на создании двухмедиаторных систем, дает возможность увеличить эффективность переноса электронов от клеток на электрод. Однако при создании таких систем должны учитываться как скорость взаимодействия медиатора с электродом, так и скорость взаимодействия медиатора с микроорганизмами.

Более подробно характеристики медиаторных БПК-биосенсоров представлены в таблице 2. Следует отметить, что большинство описанных в литературе моделей медиаторных биосенсоров обладают низкой чувствительностью и не позволяют анализировать пробы воды с низким значением БПК<sub>5</sub>. Таким образом, в настоящее время актуальным представляется создание более чувствительных биосенсорных систем для экспресс-определения БПК.

### **3.2 Анализ возможности использования некоторых соединений как медиаторов для выбранных микроорганизмов**

Генерация сигнала в медиаторных биосенсорах на основе целых клеток микроорганизмов состоит из трех основных фаз: биохимическое окисление субстрата микроорганизмами, взаимодействие медиатора с биоматериалом и перенос 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 электронного транспорта 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.

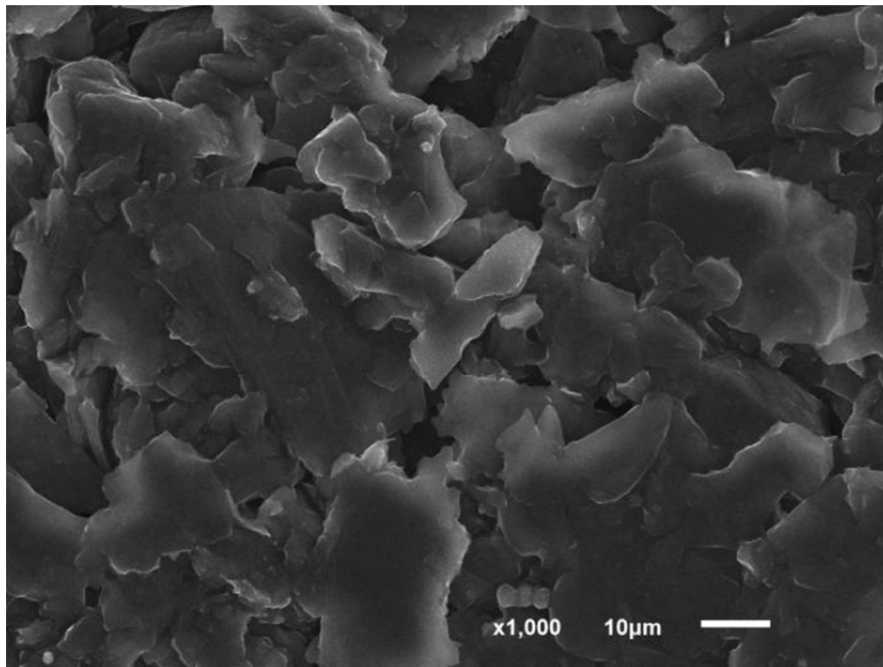


Рис. 117. СЭМ-изображение поверхности применяемого графитопастового РЭ.

В качестве РЭ 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 (рис. 117). Это дает возможность получать более высокий аналитический сигнал и надежнее удерживать микроорганизмы на поверхности РЭ. Еще одним их преимуществом является возможность легкой модификации пасты различными редокс-соединениями. При модификации РЭ производными ферроцена их вносили в пасту, остальные медиаторы применяли в виде водных растворов.

### 3.2.1. Определение константы скорости взаимодействия микроорганизмов с редокс-соединениями

Для расчета константы скорости взаимодействия дрожжей *D. hansenii* и бактерий *P. yeii* с редокс-соединениями был применен метод ЦВА с моделированием по уравнению Николсона и Шайна (15). Исследование проводили в кислородной среде, так как было показано, что наличие в среде кислорода не влияет на значения полученных констант.

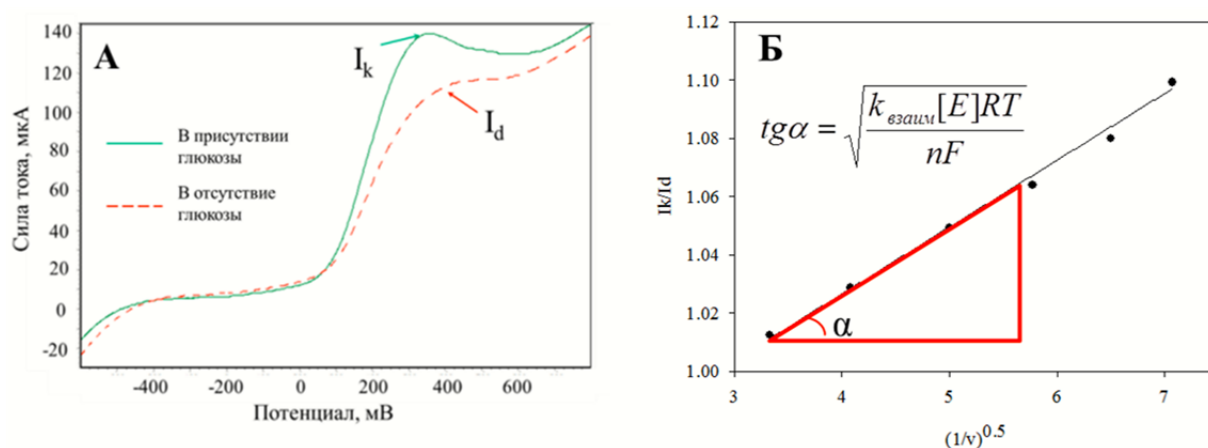


Рис. 118. Расчет  $k_{\text{взаим}}$  в системе с микроорганизмами *P. yeii* и ферроценацетонитрилом методом ЦВА: А – вид регистрируемых вольтамперных зависимостей; Б – график для расчета  $k_{\text{взаим}}$ .

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. 118). По тангенсу угла линейной зависимости были рассчитаны значения констант (таблица 30).



Таблица 30. Константы скорости взаимодействия микроорганизмов с редокс-соединениями.

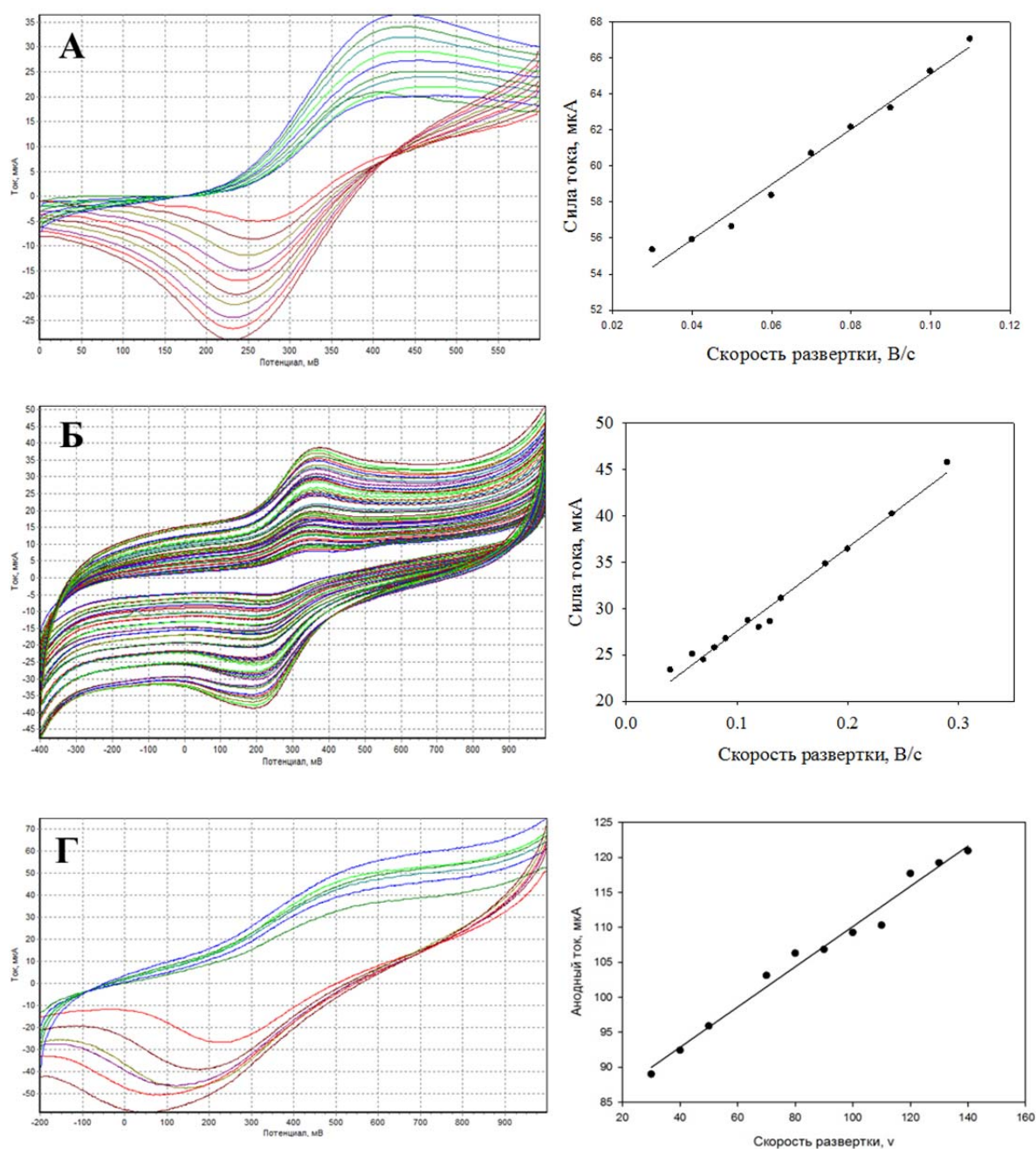
Редокс-соединение	$k_{\text{взаим}}, \text{см}^3/(\text{г}\cdot\text{с})$	
	<i>P. yeai</i>	<i>D. hansenii</i>
Ферроценкарбоксальдегид	7±1	3,7±0,1
Ферроценацетонитрил	1,4±0,1	0,6±0,2
1,1'-Диметилферроцен	3,8±0,9	7,9±0,5
<b>Ферроцен</b>	<b>23±1</b>	<b>13±3</b>
Гексацианоферрат (III) калия	19±3	14±3
2,6-Дихлорфенолиндофенол	13±2	8±2
<b>Метиленовый синий</b>	<b>21±1</b>	6±1
<b>Нейтральный красный</b>	13±3	<b>19±3</b>
Тионин	13±4	15±4

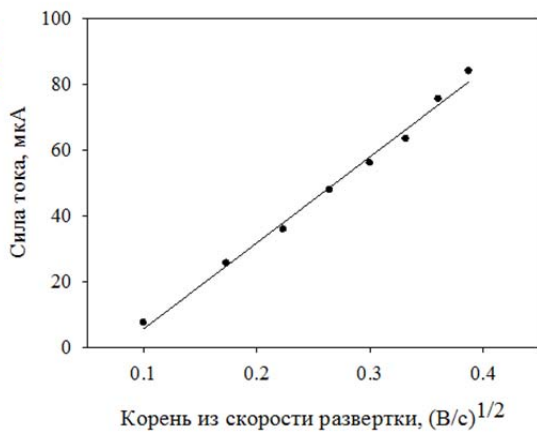
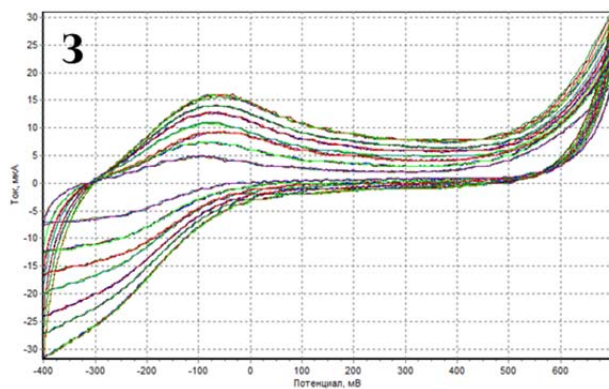
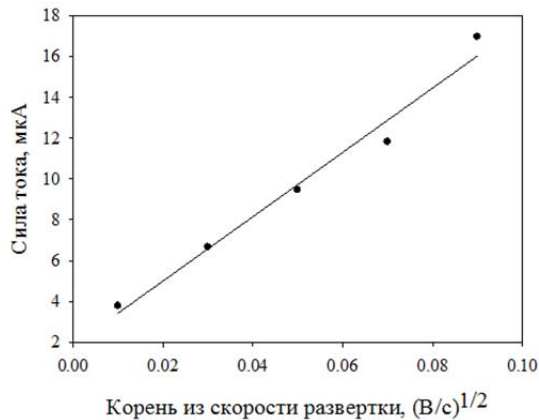
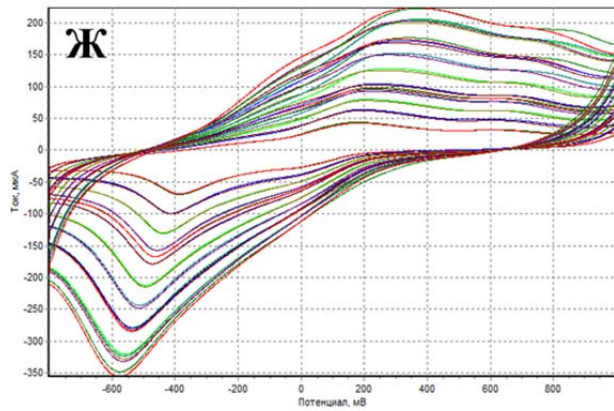
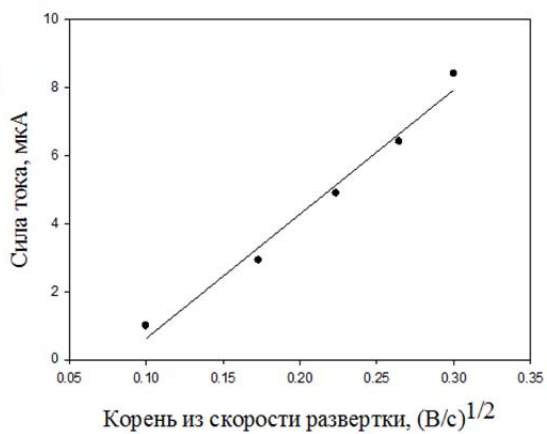
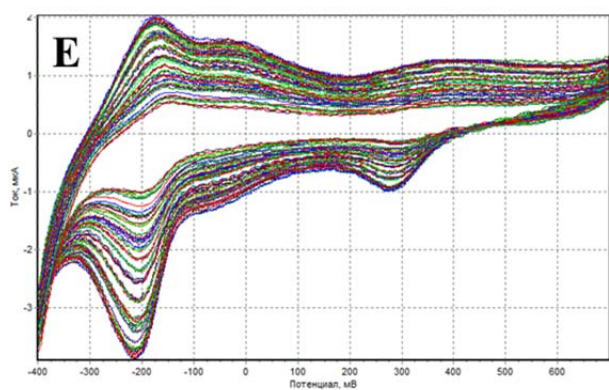
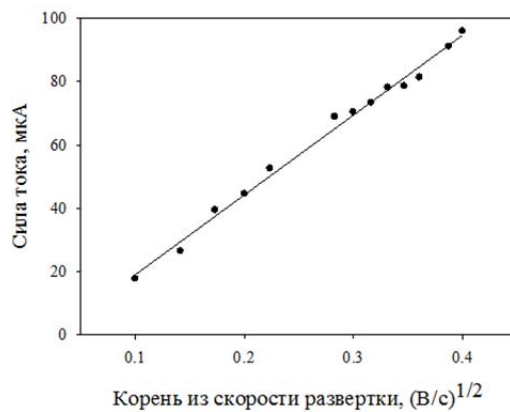
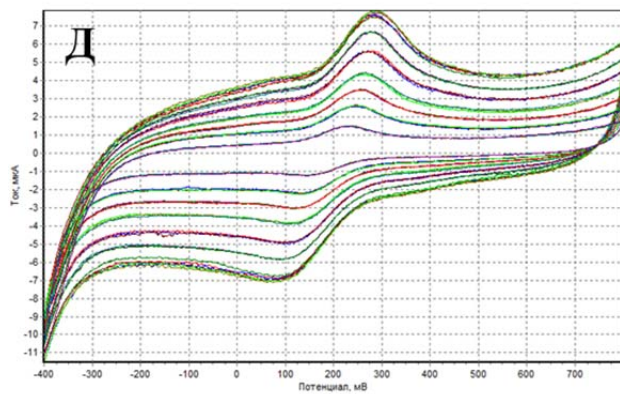
Таким образом, наиболее перспективным растворимым медиатором для микроорганизмов *D. hansenii* является нейтральный красный, а иммобилизованным в графитовой пасте – ферроцен. Для микроорганизмов *P. yeai* наибольшие константы скорости взаимодействия получены в сочетании с метиленовым синим и ферроценом. В целом следует отметить, что растворимые медиаторы взаимодействуют с клетками быстрее, чем производные ферроцена, что закономерно обусловлено диффузионной подвижностью.

### 3.2.2. Определение гетерогенной константы скорости передачи электронов редокс-соединениями на электрод

Процесс переноса электронов на электрод включает в себя несколько этапов, наиболее важными из которых являются: диффузии редокс-соединения к поверхности РЭ и его адсорбция на РЭ с передачей электронов.

Определение скоростьопределяющих стадий медиаторного переноса электронов выполняли по анализу зависимости  $I_p$  от скорости наложения потенциала и корня скорости наложения потенциала в соответствии с моделями Николсона и Лавирона, описанными в разделе 3.1.3 (уравнения 10, 12). Полученные вольтамперограммы и графики для выявления скоростьопределяющей стадии процесса приведены на рис. 119, рассчитанные константы представлены в таблице 2.





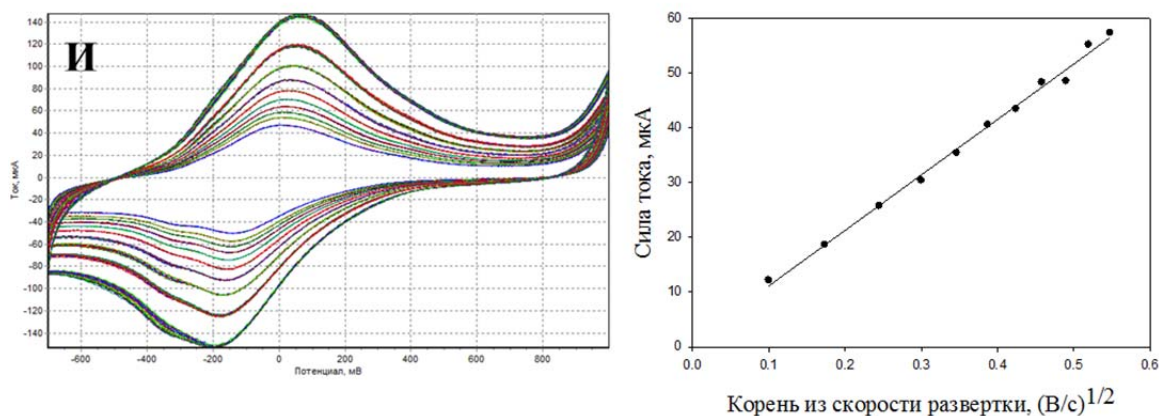


Рис. 119. Данные для расчета  $k_s$  исследуемых редокс-соединений: А – ферроцена; Б – 1,1'-диметилферроцена; В – ферроценкарбоксальдегида; Г – ферроценацетонитрила; Д – гексацианоферрата (III) калия; Е – тионина; Ж – 2,6-дихлорфенолиндофенола; З – нейтрального красного; И – метиленового синего.

Если зависимость в координатах  $I_p$  от  $v$  имела линейный вид, то расчеты  $k_s$  проводили, исходя из моделирования Лавирона (уравнение 12), если линейный вид имела зависимость  $I_p$  от  $v^{1/2}$ , то расчеты  $k_s$  проводили, исходя из моделирования Николсона (уравнение 10). Для расчетов по применяемым моделям рассчитывали коэффициенты переноса  $\alpha$  по уравнениям (16) для модели Николсона и (17) для модели Лавирона:

$$E_p^{cat} = \text{const} + b/2lgv \quad (16),$$

$$E_p^{cat} = \text{const} + blgv \quad (17),$$

где  $v$  – скорость наложения потенциала;  $E_p^{cat}$  – потенциал катодного пика;  $b=2,3RT/(\alpha nF)$ .

Таблица 31. Полученные значения  $k_s$  (скорость наложения потенциала 0,1 В/с).

Редокс-соединение	$k_s$ , (см·с <sup>-1</sup> )	Лимитирующая стадия
Ферроценкарбоксальдегид	0,03±0,01	Адсорбция
Ферроценацетонитрил	0,14±0,05	Адсорбция
1,1'-Диметилферроцен	0,07±0,01	Адсорбция
<b>Ферроцен</b>	<b>0,4±0,1</b>	Адсорбция
Гексацианоферрат (III) калия	0,0067±0,0009	Диффузия
2,6-Дихлорфенолиндофенол	0,069±0,004	Диффузия
Метиленовый синий	0,025±0,009	Диффузия
Нейтральный красный	0,017±0,005	Диффузия
Тионин	0,022±0,005	Диффузия
Ферроцен (пентаннитрил) [300]	0,23±0,05	Диффузия
Ферроценкарбоксальдегид (этаннитрил) [300]	1,1±0,1	Диффузия
1,1'-Диметилферроцен (этаннитрил) [300]	0,97±0,08	Диффузия

Из представленных данных (таблица 31) видно, что у соединений ферроценового ряда  $k_s$  больше, чем у растворимых медиаторов. Скорее всего это связано с нахождением данных соединений в графитовой пасте на поверхности рабочего электрода. Следует также отметить, что  $k_s$  для различных соединений ферроценового ряда в растворенной форме достаточно близки [300]. Так как скоростьопределяющей стадией в органическом растворителе является диффузия, из-за близкого размера молекул подвижность веществ близка. В изучаемой системе необходимо учитывать растворимость производных ферроцена в водном растворе, особенно в виде соответствующих катионов. Так, например, метильные

группы в 1,1'-диметилферроцене усиливают гидрофобность этого вещества, что приводит к снижению растворимости его катиона.

На основе анализа полученных значений  $k_s$  и  $k_{\text{взаим}}$  показано, что наиболее перспективным растворимым медиатором для дрожжей *D. hansenii* является нейтральный красный, а иммобилизованным в графитовой пасте – ферроцен. Для бактерий *P. yeii* можно выделить метиленовый синий и ферроцен как наиболее эффективные медиаторы. 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 графитопастовый 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*».

### 3.3. Разработка медиаторных БПК-биосенсоров

Первым этапом создания амперометрических медиаторных биосенсоров на основе выбранных сочетаний «микроорганизмы – медиатор» является определение рабочего потенциала. Чтобы определить увеличение

силы тока, которое зависит от взаимодействия микроорганизмов и аналита, к электроду необходимо приложить потенциал, соответствующий редокс-потенциалу применяемого медиатора. Рабочий редокс-потенциал находили по полученным циклическим вольтамперограммам как потенциалы анодного пика. Таким образом, были определены следующие значения потенциалов: нейтральный красный – 335 мВ, ферроцен – 250 мВ, метиленовый синий – 40 мВ. Выбранные потенциалы использовали в дальнейшей работе по созданию биосенсоров.

Для разработки медиаторных биоаналитических систем находили такие параметры формирования электродов, которые обеспечат максимальную чувствительность анализа БПК<sub>5</sub>. Выявление оптимального удельного содержания микроорганизмов и концентрации редокс-соединения производили по анализу зависимостей ответов биосенсора на раствор ГГС от значения варьируемого параметра.

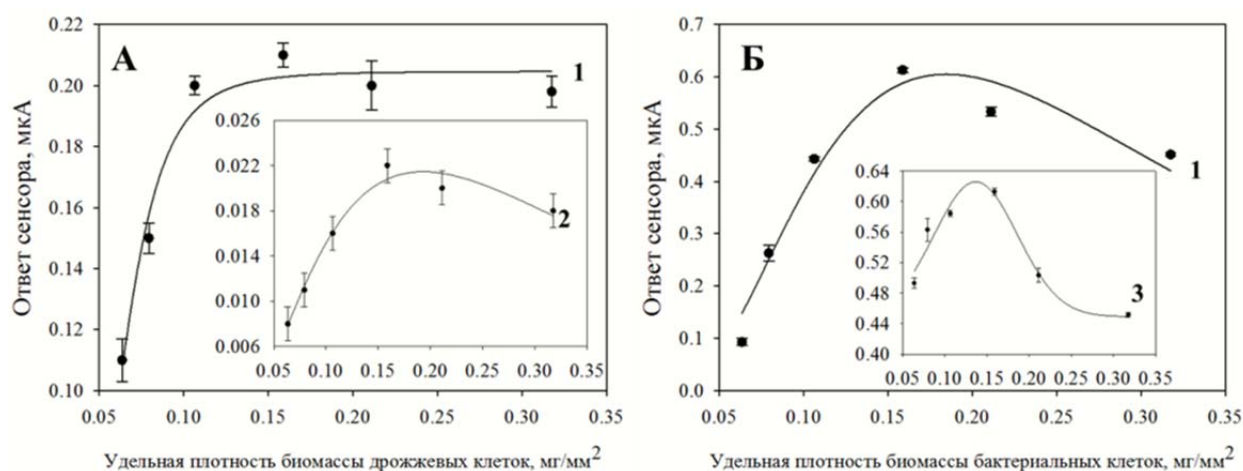


Рис. 120. Зависимость ответа созданных БПК-биосенсоров от удельного содержания биоматериала: А – *Debaromyces hansenii*, Б – *Paracoccus yeii* (1 – ФЦ, 2 – НК, 3 – МС).

Разработанные биосенсоры обладают наибольшей чувствительностью определения БПК при удельном содержании микроорганизмов около 0,15  $\text{mg}/\text{mm}^2$  (рис. 120). Повышение содержания клеток способствует осложнению

диффузии исходных субстратов и продуктов реакции в биокаталитическом слое, что уменьшает аналитический сигнал.

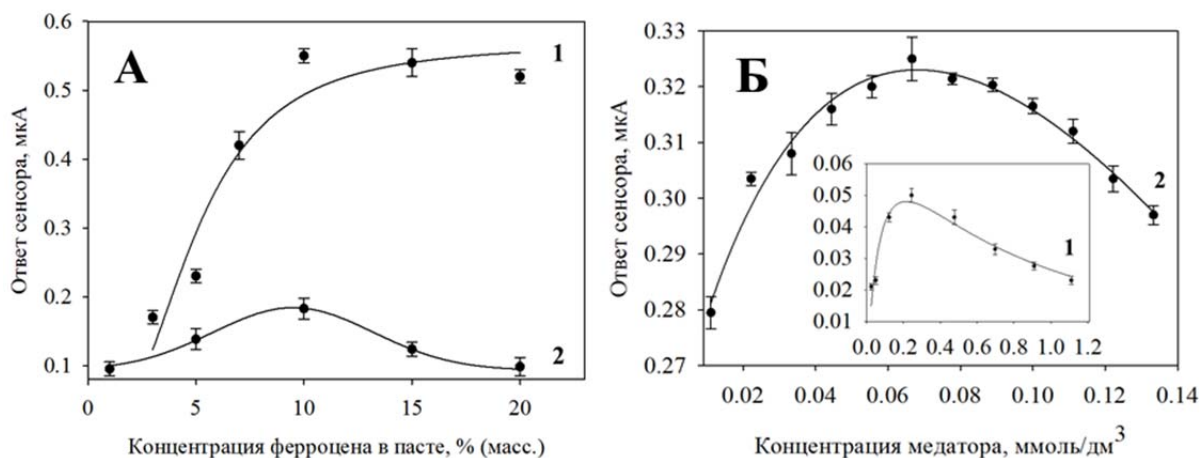


Рис. 121. Зависимость ответа созданных БПК-биосенсоров от концентрации редокс-соединений: А – ферроцена, Б – нейтрального красного и метиленового синего в кювете. Микроорганизмы: 1 – *Debaryomyces hansenii*, 2 – *Paracoccus yei*.

Чаще всего зависимость ответа от концентрации редокс-соединения для медиаторных биоаналитических систем выглядит как гипербола [266]. Такой вид зависимости был получен в случае микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* в сочетании с ФЦ (рис. 121). В случае других биосенсоров при высоких содержаниях медиаторов наблюдается падение аналитического сигнала. Такая зависимость может объясняться возможным токсическим эффектом высоких концентраций медиатора на ферментные системы бактерий и дрожжей. Таким образом, оптимальным является содержание ФЦ – 10% от общей массы пасты независимо от типа микроорганизмов. Концентрация нейтрального красного – 0,2  $\text{mmol/dm}^3$ , а метиленового синего – 0,07  $\text{mmol/dm}^3$ . Дальнейшую работу выполняли с использованием электродов с оптимальными параметрами.

Для созданных медиаторных биосенсоров были построены градуировочные зависимости ответа от БПК<sub>5</sub> (рис. 122, 123).



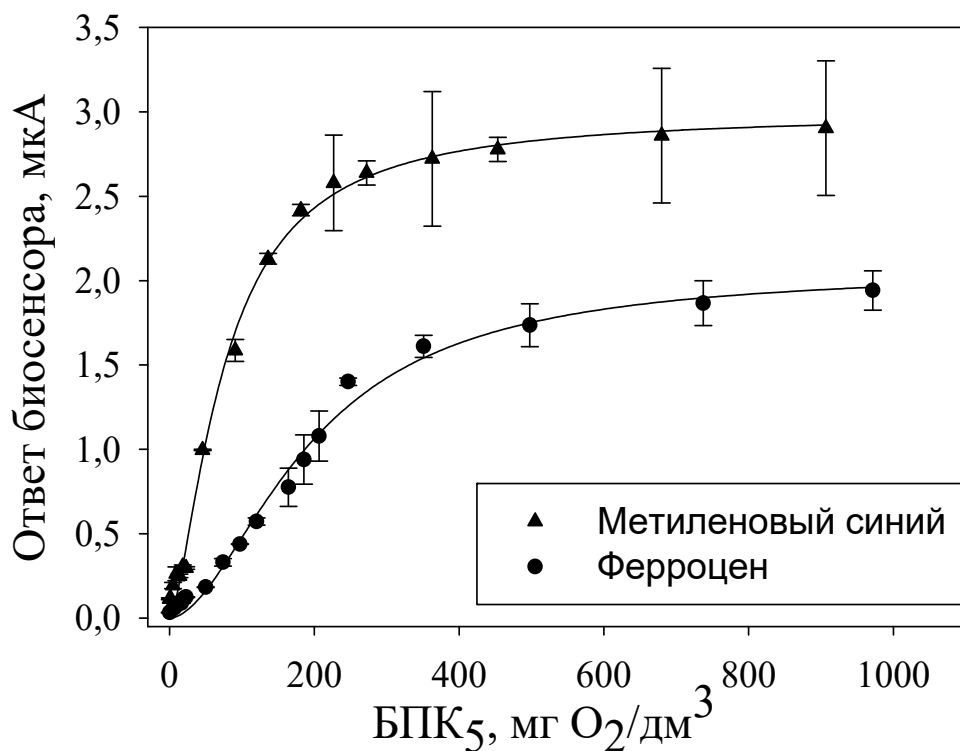


Рис. 122. Градуировочные зависимости для созданных медиаторных биосенсоров на основе микроорганизмов *P. yeai*.

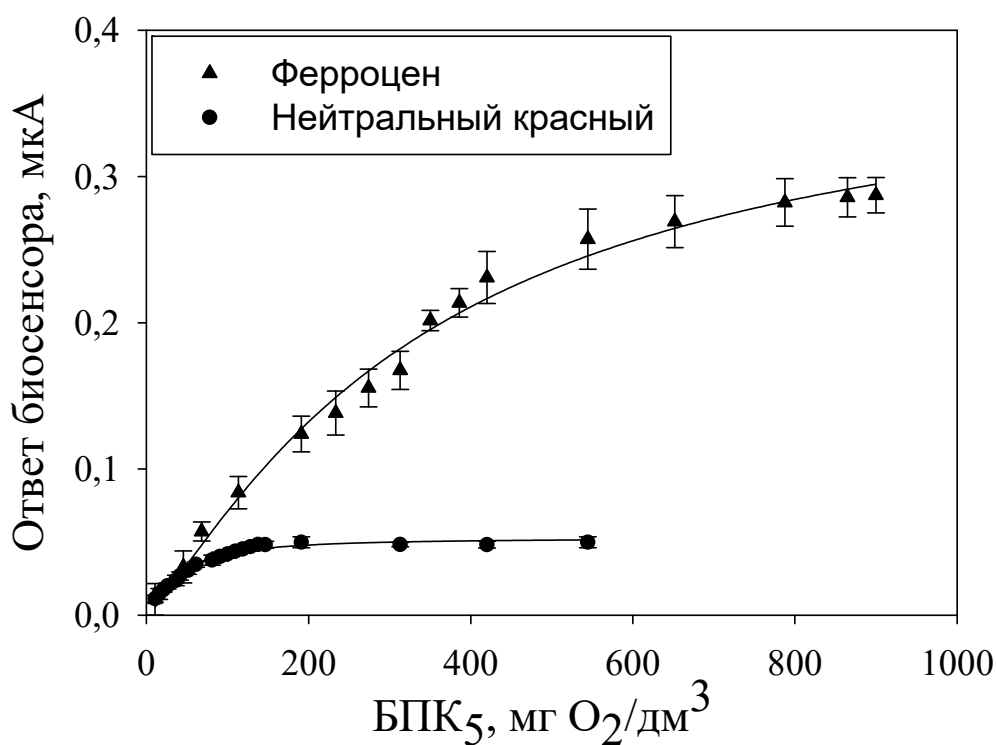


Рис. 123. Градуировочные зависимости для созданных медиаторных биосенсоров на основе микроорганизмов *D. hansenii*.

Так же как и биочувствительные элементы на основе микроорганизмов и электрода Кларка, медиаторные биоэлектроды относятся к каталитическому типу. Поэтому для аппроксимации градуировочных зависимостей применяли уравнение типа Михаэлиса-Ментен (уравнение 3) (таблица 32).

Таблица 32. Параметры аппроксимирующего гиперболического уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	$K'_M$ , мг/дм <sup>3</sup>	$R_{max}$ , мкА	Коэффициент корреляции, R
<i>Paracoccus yeii</i> (Ферроцен)	200±50	2,9±0,2	0,9871
<i>Paracoccus yeii</i> (Метиленовый синий)	90±10	3,4±0,1	0,9912
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Ферроцен)	320±50	0,46±0,02	0,9946
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Нейтральный красный)	53±4	0,058±0,002	0,9816

Для непосредственного проведения анализа БПК используют не гиперболическую зависимость, а ее линейный участок (рис. 124). Параметры уравнений прямых ( $y = a + b \times x$ ), которые аппроксимируют линейные участки градуировочных зависимостей, приведены в таблице 33.

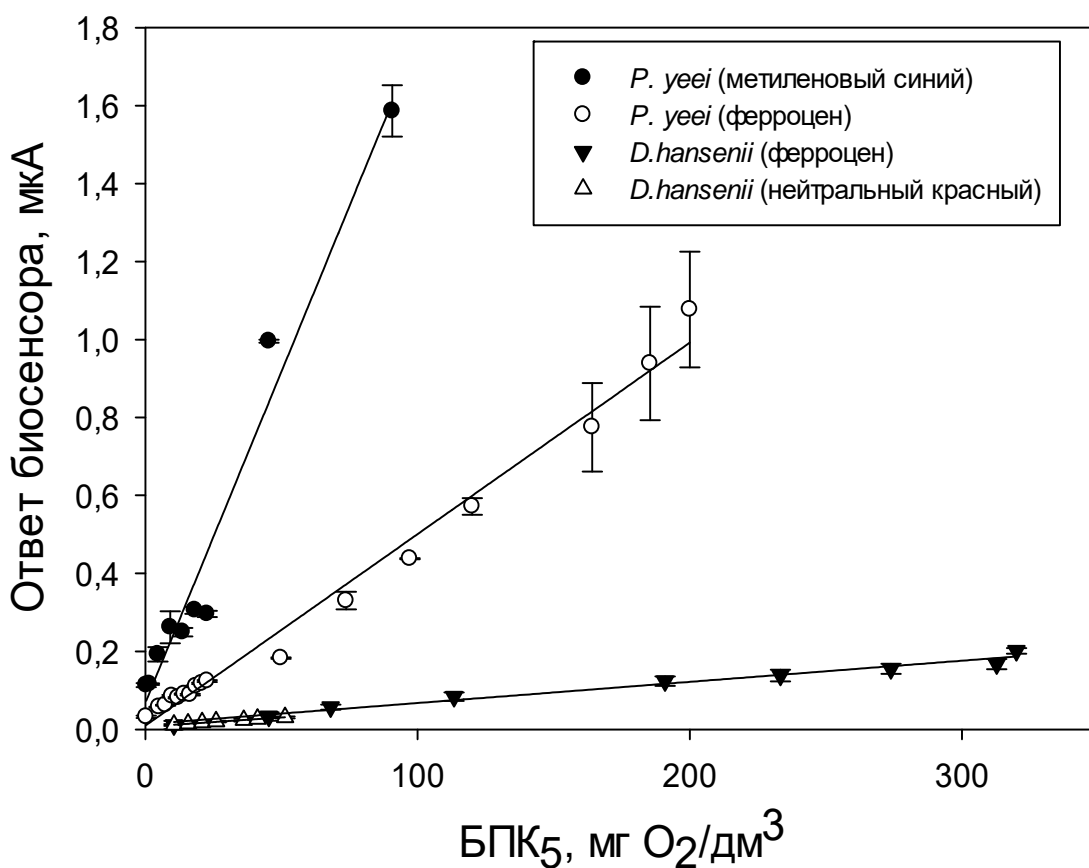


Рис. 124. Линейные участки градуировочных зависимостей для созданных медиаторных биосенсоров.

Таблица 33. Параметры аппроксимирующего линейного уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	b, нА·дм <sup>3</sup> /мг O <sub>2</sub>	a, мкА	Коэффициент корреляции, R
<i>Paracoccus yeii</i> (Ферроцен)	4,8±0,2	0,010±0,002	0,9940
<i>Paracoccus yeii</i> (Метиленовый синий)	17±1	0,07±0,05	0,9840
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Ферроцен)	0,5±0,2	0,013±0,007	0,9886
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Нейтральный красный)	0,4±0,1	0,0071±0,0005	0,9968

Значения коэффициентов корреляции больше 0,95 для всех созданных сенсоров говорят о достоверности выбора линейного участка. Для сравнения возможностей биосенсоров по анализу низких значений БПК использовали коэффициент чувствительности. Таким образом, из таблицы видно, что наибольшей чувствительностью характеризуется биосенсор на основе бактерий *P. yeai* и метиленового синего. Для сравнения созданных биоэлектродов кроме коэффициента чувствительности сопоставляли их пределы обнаружения БПК и нижние границы анализируемых значений БПК (таблица 34).

Таблица 34. Характеристики чувствительности медиаторных биосенсоров.

Сенсорный элемент	Предел обнаружения, мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	Нижняя граница анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>
<i>Paracoccus yeai</i> (Ферроцен)	0,4	1,3
<i>Paracoccus yeai</i> (Метиленовый синий)	0,4	1,4
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Ферроцен)	12,1	25,2
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Нейтральный красный)	1,7	5,1

Наименьшей нижней границей анализа БПК<sub>5</sub> характеризуются биосенсоры на основе бактерий *Paracoccus yeai*. На следующем этапе работы определяли стабильность биосенсоров на основе созданных биоэлектродов. Пример графика зависимости ответа биосенсора от количества измерений

представлен на рис. 125, графики долговременной стабильности приведены на рисунке 126. Полученные результаты представлены в таблице 35.

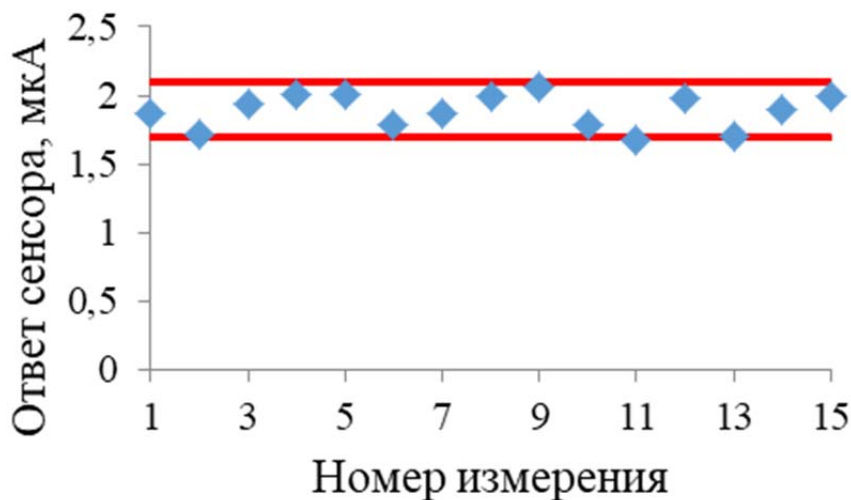


Рис. 125. Операционная стабильность биосенсора на основе бактерий *Paracoccus yevei* и медиатора ферроцена.

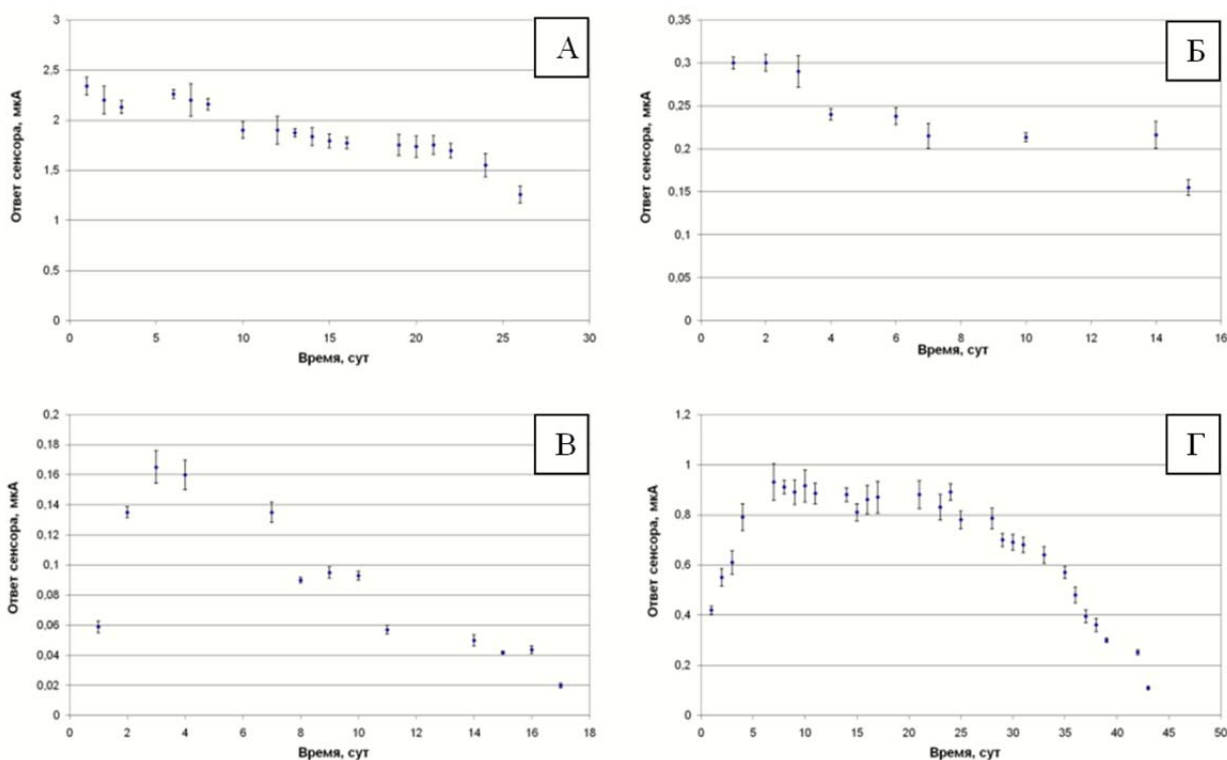


Рис. 126. Долговременная стабильность биосенсоров на основе: А – *P. yevei* и ферроцена; Б – *P. yevei* и метиленового синего; В – *D. hansenii* и ферроцена; Г – *D. hansenii* и нейтрального красного.

У биосенсора на основе микроорганизмов *D.hansenii* так же как при использовании кислородного электрода в первые дни после иммобилизации наблюдается увеличение ответа биосенсора, что вероятно связано с адаптацией дрожжей к изменившимся условиям среды. Бактерии *Paracoccus yevei* легче переносят иммобилизацию на графитовый электрод и проявляют максимальную активность сразу после формирования электрода.

Таблица 35. Стабильность созданных БПК-биосенсоров.

Сенсорный элемент	Стандартное отклонение S, мкА (n=15, P=0,95)	Относительное стандартное отклонение (повторяемость), % (n=15, P=0,95)	Время работы, сут.
<i>Paracoccus yevei</i> (Ферроцен)	0,024	2,9	22
<i>Paracoccus yevei</i> (Метиленовый синий)	0,034	2,4	14
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Ферроцен)	0,003	2,2	39
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Нейтральный красный)	0,01	2	16

Таким образом, ответы биосенсоров на основе созданных биоаналитических систем устойчивы на протяжении 15 измерений (таблица 35). Еще одной важной аналитической характеристикой любого метода анализа является его экспрессность (таблица 36).

Таблица 36. Характеристики экспрессности разработанных биосенсоров.

Сенсорный элемент	Время отклика, мин	Время промывки системы, мин	Время анализа, мин
<i>Paracoccus yeei</i> (Ферроцен)	1–2	3–4	4–6
<i>Paracoccus yeei</i> (Метиленовый синий)	1–2	6–10	7–12
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Ферроцен)	1–4	7–16	8–20
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Нейтральный красный)	1–4	4–6	5–10

Таким образом, лучшими по экспрессности являются биосенсоры на основе бактерий *P. yeei*. При этом лучшие результаты по экспрессности были получены в системе с ферроценом, что связано с иммобилизацией медиатора на электроде. В таблице 37 приведены основные характеристики созданных медиаторных биосенсоров.

Таблица 37. Характеристики разработанных медиаторных биосенсоров.

Характеристики	Бактерии <i>P. yeei</i>		Дрожжи <i>D. hansenii</i>	
	Ферроцен	Метиле- новый синий	Фер- роцен	Нейтраль- ный красный
Диапазон анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг O <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 O <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

Таким образом, 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*. Системы на основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* не подходят для анализа природных поверхностных вод из-за низкой чувствительности.

Оценка спектра анализируемых субстратов для созданных биосенсоров выполнена по соединениям различных классов, которые могут находиться в образцах воды разнообразного происхождения (промышленные и бытовые стоки, поверхностные воды) (рис. 127).

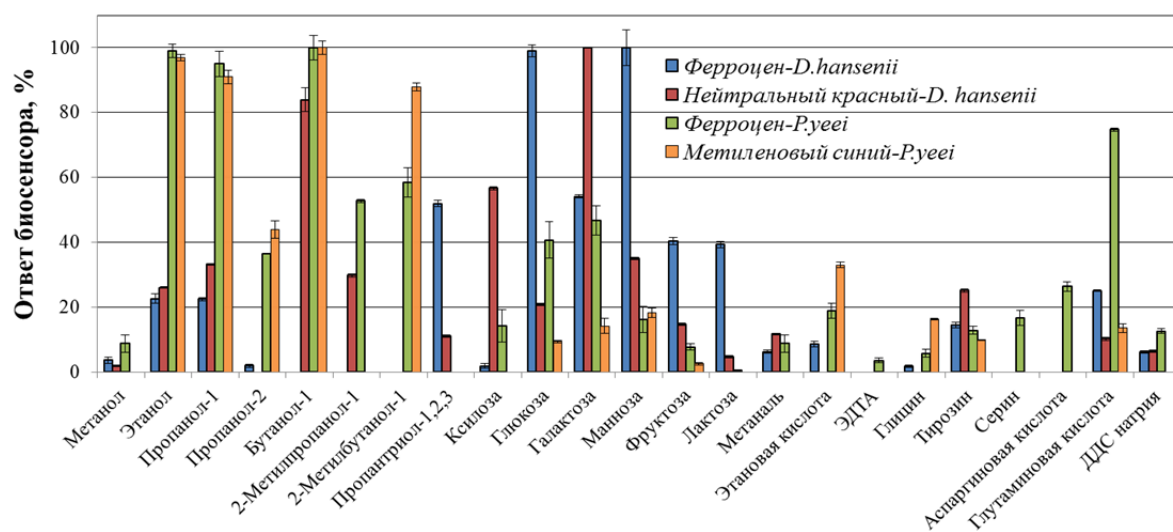


Рис. 127. Профиль детектируемых веществ для биосенсоров с разработанными медиаторными биоэлектрохимическими системами.

Более узкий спектр окисляемых субстратов у микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* при использовании медиаторного биокатализа, по сравнению с использованием в качестве преобразователя кислородного электрода, может объясняться затруднением во взаимодействии ферментных



систем эукариот с редокс-соединениями. Такое предположение также может косвенно подтверждать широкий спектр окисляемых веществ для медиаторного биосенсора на основе прокариотических клеток *Paracoccus yeai*, который достигается благодаря доступности ферментов бактерий для применяемых редокс-соединений.

Исходя из полученных результатов, по совокупности характеристик наиболее перспективным для создания медиаторного БПК-сенсора является электрод, содержащий микроорганизмы *Paracoccus yeai* и ферроцен, что подтверждает эффективность предложенной методологии формирования систем «медиатор – микроорганизм». Применение эукариотических микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* затруднено из-за плохой чувствительности биосенсора на их основе. Для преодоления данного недостатка можно применять двухмедиаторные системы, которые позволяют добиться высоких характеристик медиаторного переноса в системах на основе дрожжевых микроорганизмов, однако малоэффективны в случае использования клеток прокариот [299].

#### **3.4. 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 [25, 299]. По определенным значениям констант скорости взаимодействия медиаторов с электродом (таблица 38) видно, что ферроцен является лучшим редокс-соединением с точки зрения переноса электронов на электрод. С точки зрения взаимодействия с ферментными системами используемых дрожжей *D. hansenii* лучшим медиатором является нейтральный красный.

Кроме нейтрального красного для формирования двухмедиаторных систем было предложено использовать медиаторы – тионин и метиленовый синий. Эти медиаторы похожи по структуре на нейтральный красный и также способны проникать через клеточную мембрану дрожжей и взаимодействовать с их внутриклеточными ферментными системами [252, 259, 301]. Механизм переноса электронов в исследуемых двухмедиаторных системах показан на рисунке 128.

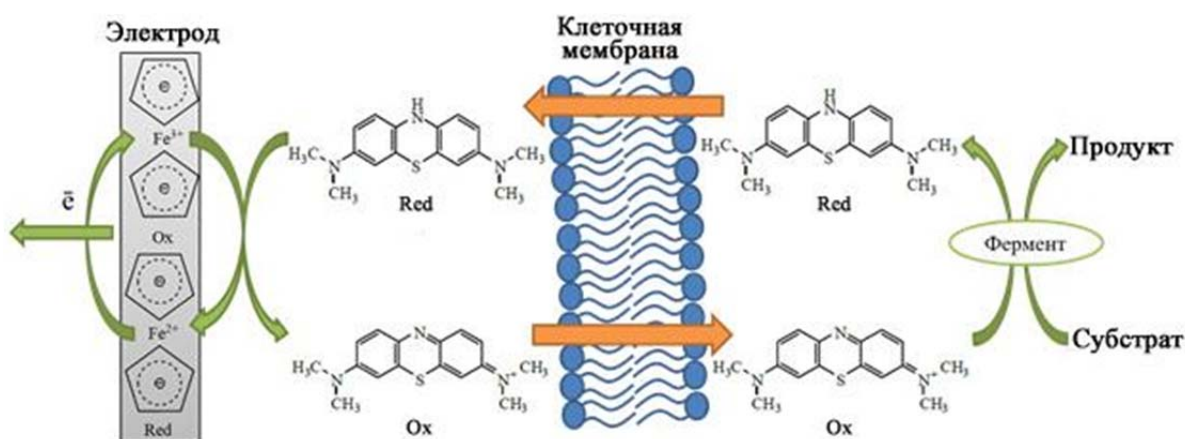


Рис. 128. Механизм переноса электронов в двухмедиаторной системе «ферроцен – метиленовый синий – *D. hansenii*».

На рисунке 129 представлены ответы БПК-биосенсоров с микроорганизмами *D. hansenii*, полученные в присутствии только ферроцена – кривая «а», только метиленового синего – кривая «б» и в совместном их присутствии – кривая «в». Аналогичные зависимости были получены для систем ферроцен-нейтральный красный и ферроцен-тионин.

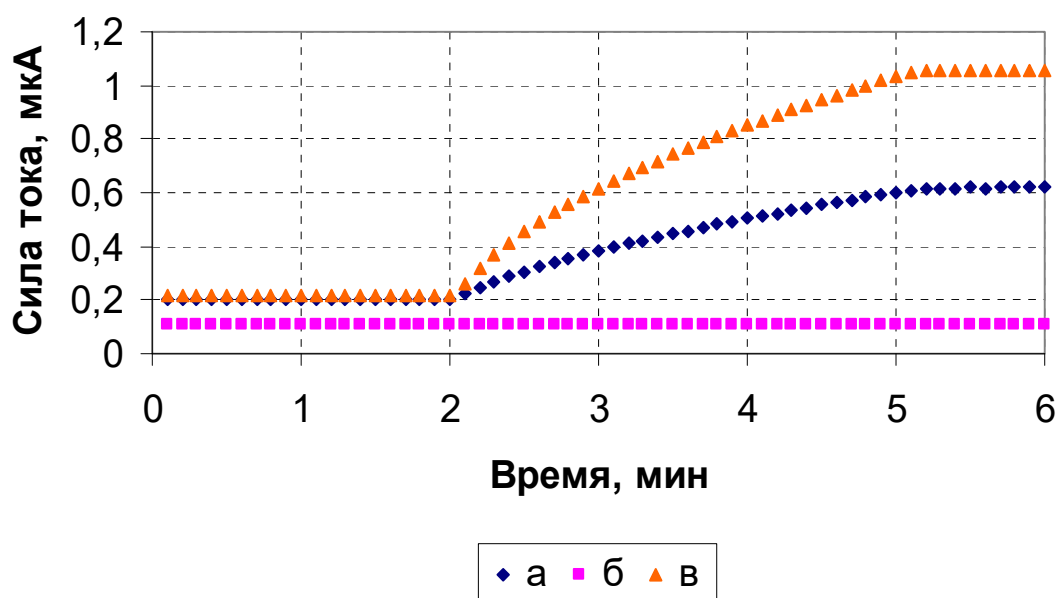
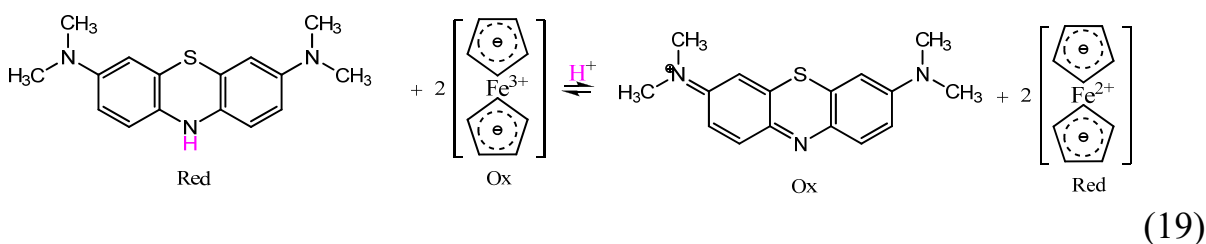
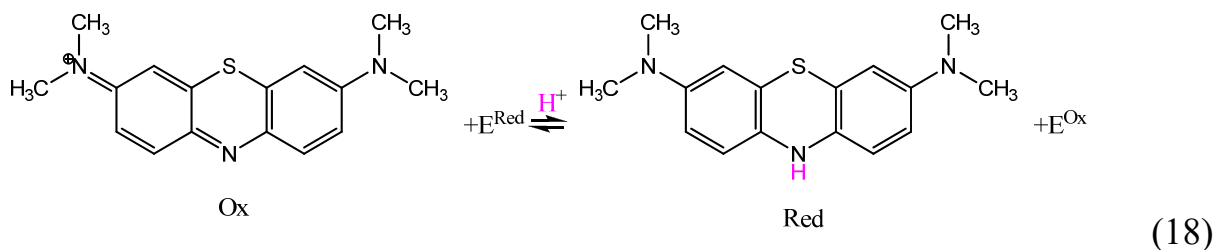
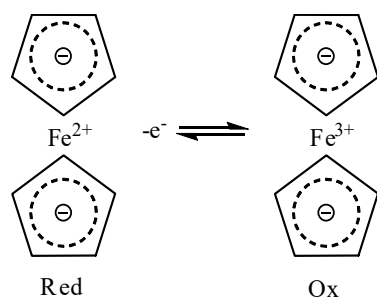


Рис. 129. Отклик сенсора на основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* с редокс-соединениями: ферроценом (а), метиленовым синим (б) и одновременно ферроценом и метиленовым синим (в).

Из рисунка 129 видно, что метиленовый синий не способен переносить электроны без ферроцена, а ответы сенсора увеличиваются при совместном использовании двух медиаторов (ферроцена и метиленового синего). Данные результаты показывают, что метиленовый синий может проникнуть в клетку эукариот и принять электроны от ферментативных систем. Образованная восстановленная форма переносит электроны на ферроцен, последний подвергается окислительно-восстановительной реакции на электроде, согласно схемам 18–20.

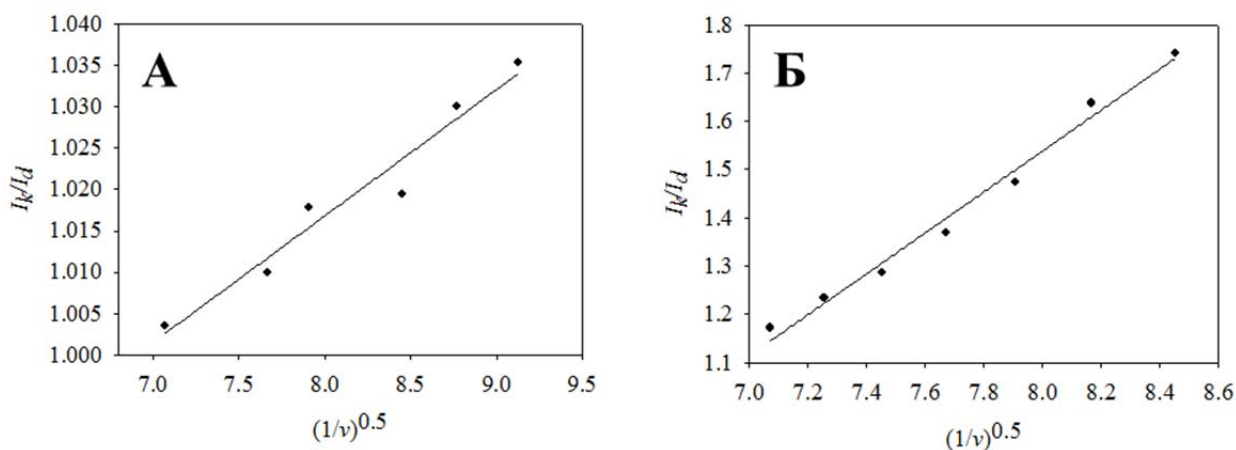




На электроде: (20)

Аналогичные взаимодействия происходят в системах ферроцен – нейтральный красный и ферроцен – тионин.

Таким образом, для дрожжей *D. hansenii* сформированы три двухмедиаторные системы: «ферроцен – метиленовый синий», «ферроцен – нейтральный красный» и «ферроцен – тионин». 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 методом ЦВА по анализу токов в присутствии микроорганизмов ( $I_k$ ) и в их отсутствие ( $I_d$ ), используя уравнение Николсона-Шайна. Полученные для дрожжей *D. hansenii* данные представлены на рис. 130.



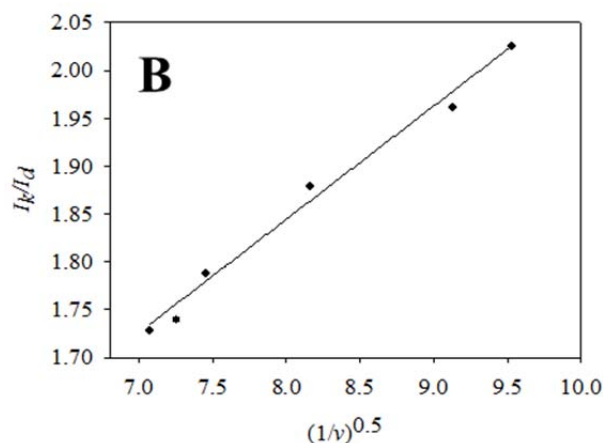
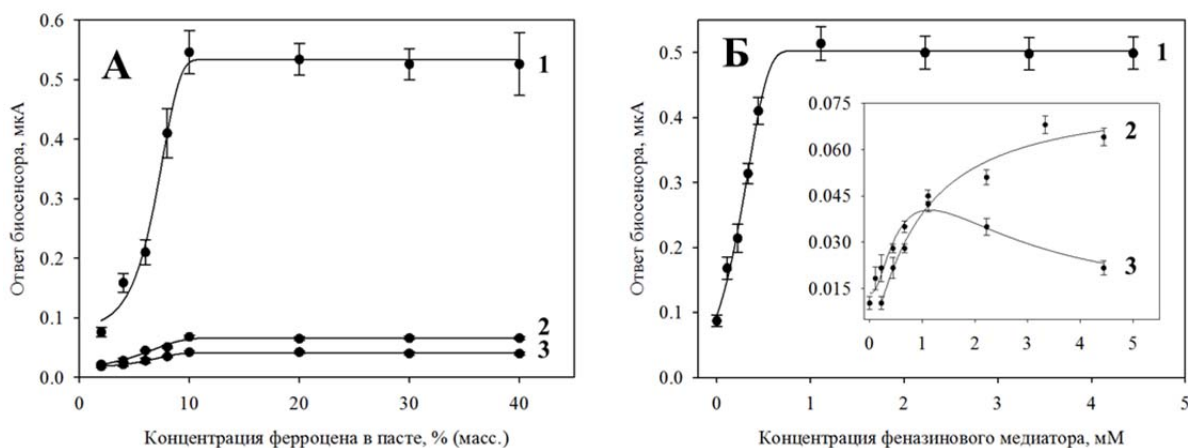


Рис. 130. Полученные расчетные зависимости  $I_k/I_d$  от  $(1/v)^{0,5}$  в системах: А) ферроцен – нейтральный красный; Б) ферроцен – метиленовый синий; В) ферроцен – тионин.

Значения  $k_{M-M}$  ( $\text{дм}^3/(\text{ммоль} \cdot \text{с})$ ) составили:  $0,18 \pm 0,02$  (ФЦ-НК);  $4,8 \pm 0,2$  (ФЦ-ТН);  $56,2 \pm 0,7$  (ФЦ-МС). Из полученных результатов следует, что перенос электронов наиболее эффективен в системе с редокс-соединениями ферроценом и метиленовым синим.

Для созданных двухмедиаторных систем были определены оптимальные рабочие параметры анализа. Для этого определяли ответ биосенсора на основе созданных систем при изменении концентрации медиаторов и содержания микроорганизмов (рис. 131).



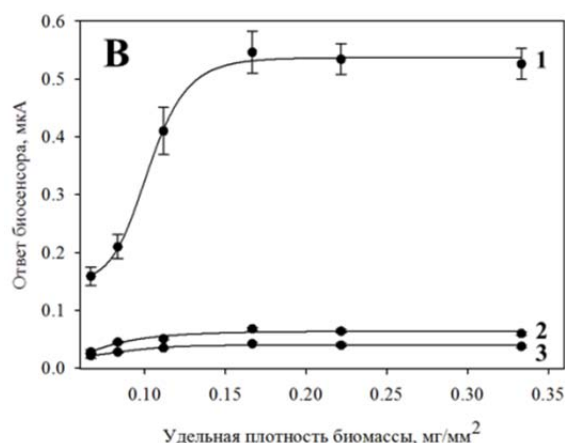


Рис. 131. Определение рабочих параметров анализа для двухмедиаторных систем: 1 – «ферроцен – метиленовый синий»; 2 – «ферроцен – тионин»; 3 – «ферроцен – нейтральный красный». Зависимость аналитического сигнала от: А – содержания ферроцена; Б – концентрации растворимого медиатора; В – удельной плотности микроорганизмов.

В созданных двухмедиаторных системах получены похожие зависимости ответа биосенсора от содержания ферроцена в пасте электрода (рис. 131А). Максимальный ответ биосенсора наблюдался при содержании ферроцена 10%. Дальнейшее увеличение содержания медиатора практически не влияло на ответ биосенсора. Зависимость аналитического сигнала от концентрации нейтрального красного имеет вид пика, что, вероятно, связано с его токсичностью при высоких концентрациях. Максимальное значение ответа биосенсора зарегистрировано при содержании нейтрального красного и метиленового синего – 1,1 ммоль/дм<sup>3</sup>. Для тионина в качестве рабочей использована концентрация 2,2 ммоль/дм<sup>3</sup>. При дальнейшем увеличении концентрации тионина происходит увеличение времени ответа биосенсора при незначительном увеличении аналитического сигнала. Биосенсоры на основе разработанных систем медиаторов обладали идентичной зависимостью ответа от удельной массы биоматериала. Ответ биосенсора увеличивался при увеличении количества клеток до удельной массы 0,16 мг/мм<sup>2</sup>. Дальнейшее увеличение массы дрожжей практически не приводило к

росту ответа биосенсора, так как новые порции микроорганизмов образовывали внешние слои, слабо взаимодействующие с медиатором на поверхности электрода.

Для созданных двухмедиаторных биосенсоров были построены градуировочные зависимости от БПК<sub>5</sub> (рис. 132).

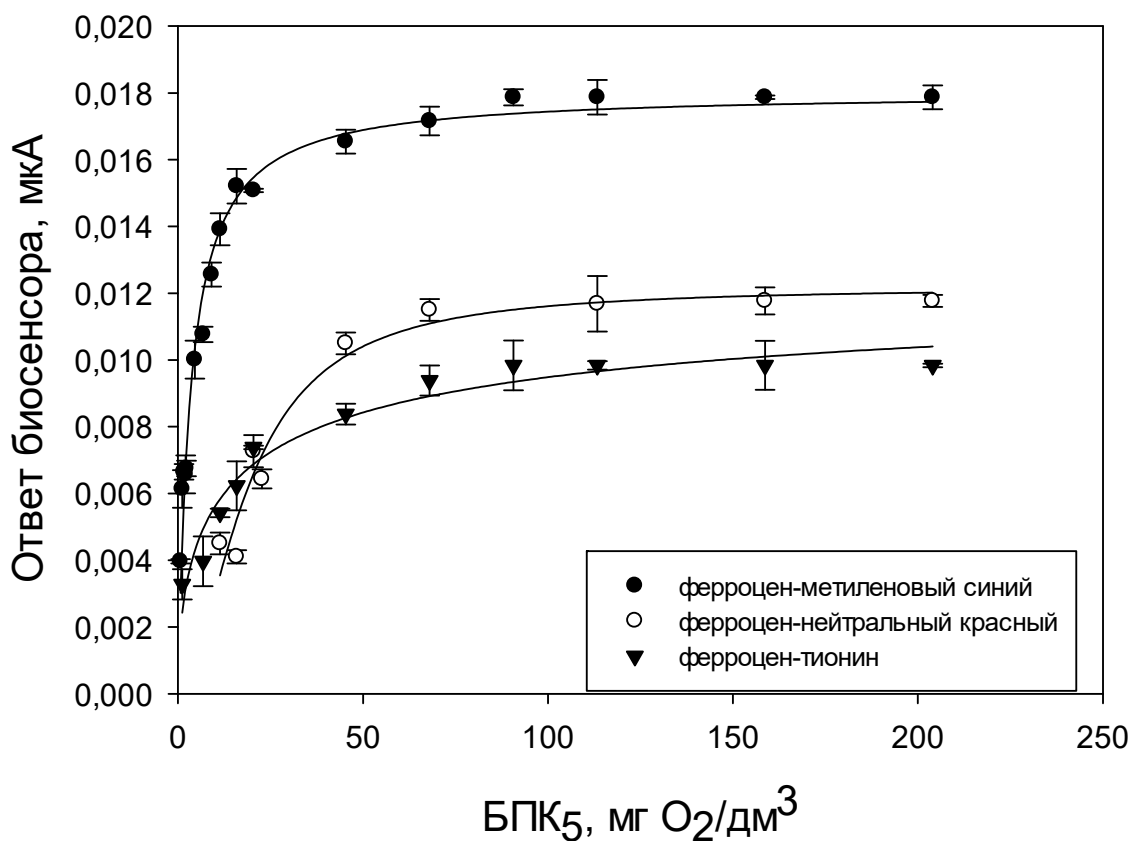


Рис. 132. Градуировочные зависимости для созданных двухмедиаторных биосенсоров на основе микроорганизмов *D. hansenii*.

Для аппроксимации градуировочных зависимостей применяли уравнение типа Михаэлиса–Ментен (уравнение 3) (таблица 38).

Таблица 38. Параметры аппроксимирующего гиперболического уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	$K'_M$ , мг/дм <sup>3</sup>	$R_{max}$ , мкА	Коэффициент корреляции, R
Ферроцен – тионин	16,7±0,3	0,013±0,002	0,9753
Ферроцен – нейтральный красный	19,5±0,1	0,0122±0,0006	0,9789
Ферроцен – метиленовый синий	7,2±0,2	0,018±0,003	0,9906

Параметры уравнений прямых ( $y = a + b \times x$ ), которые аппроксимируют линейные участки градуировочных зависимостей (рис. 133), приведены в таблице 39.

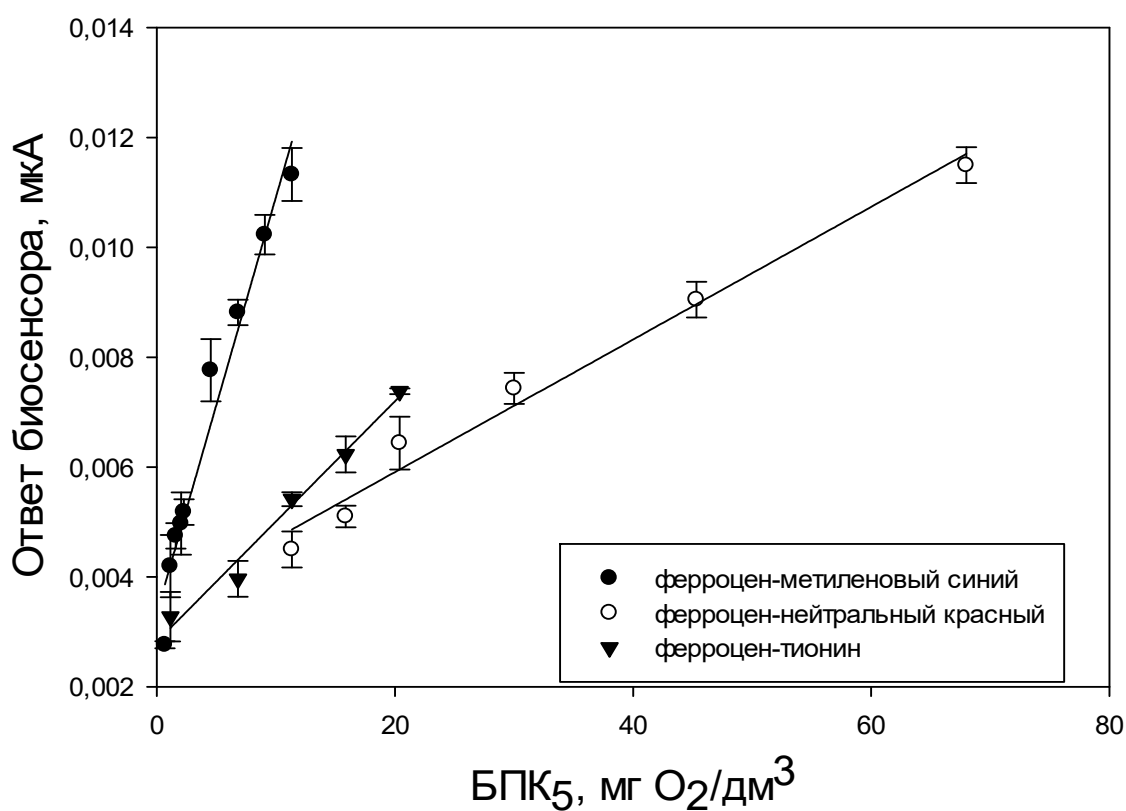


Рис. 133. Линейные участки градуировочных зависимостей для созданных медиаторных биосенсоров.



Таблица 39. Параметры аппроксимирующего линейного уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	$b$ , нА·дм <sup>3</sup> /мг O <sub>2</sub>	$a$ , мкА	Коэффициент корреляции, R
Ферроцен – тионин	0,22±0,01	0,0028±0,0002	0,9915
Ферроцен – нейтральный красный	0,11±0,01	0,0035±0,0003	0,9911
Ферроцен – метиленовый синий	0,81±0,04	0,0034±0,0002	0,9806

Значения коэффициентов корреляции больше 0,95 для всех созданных сенсоров говорят о достоверности выбора линейного участка. Для сравнения возможностей биосенсоров по анализу низких значений БПК использовали коэффициент чувствительности. Таким образом, из таблицы видно, что наибольшей чувствительностью характеризуется биосенсор на основе системы ФЦ-МС. Для сравнения созданных биоэлектродов кроме коэффициента чувствительности сопоставляли их пределы обнаружения БПК и нижние границы анализируемых значений БПК (таблица 40).

Таблица 40. Характеристики чувствительности медиаторных биосенсоров.

Сенсорный элемент	Предел обнаружения, мг $O_2/дм^3$	Нижняя граница анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг $O_2/дм^3$
Ферроцен – тионин	2,5	4,6
Ферроцен – нейтральный красный	3,8	11,3
Ферроцен – метиленовый синий	0,8	2,7

На следующем этапе работы определяли стабильность биосенсоров на основе созданных биоэлектродов. Графики долговременной стабильности приведены на рисунке 134. Полученные результаты представлены в таблице 41.

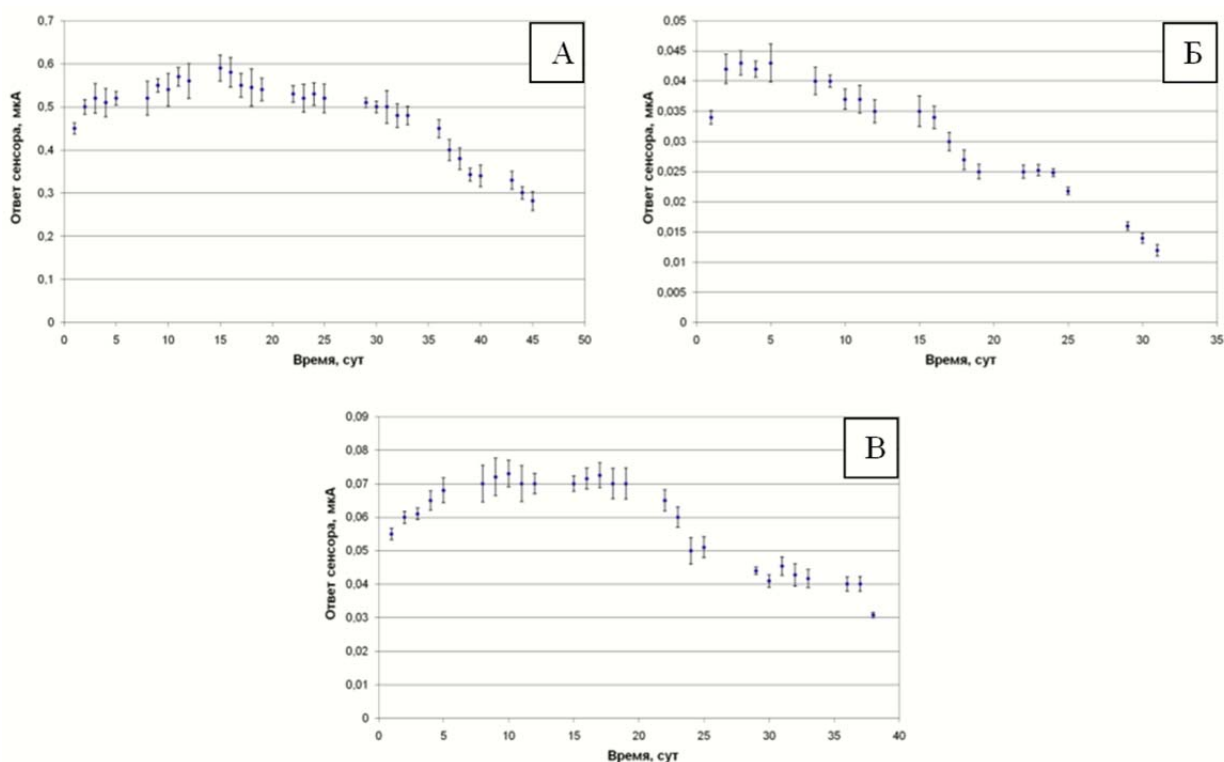


Рис. 134. Долговременная стабильность биосенсора на основе *D.hansenii* и систем: А – «ФЦ-МС»; Б – «ФЦ-НК»; В – «ФЦ-ТН».

У разработанных двухмедиаторных систем с микроорганизмами *D.hansenii* также заметно увеличение сигнала сенсора в первые дни после формирования электрода. Лучшей долговременной стабильностью обладают биосенсоры на основе двухмедиаторных систем «ферроцен – метиленовый синий» и «ферроцен – тионин».

Таблица 41. Стабильность созданных БПК-биосенсоров.

Сенсорный элемент	Стандартное отклонение S, мкА (n=15, P=0,95)	Относительное стандартное отклонение (повторяемость), % (n=15, P=0,95)	Время работы, сут.
Ферроцен – тионин	0,0015	2,2	37
Ферроцен – нейтральный красный	0,0009	2	24
Ферроцен – метиленовый синий	0,0048	1,2	43

Таким образом, ответы биосенсоров на основе созданных биоаналитических систем устойчивы на протяжении 15 измерений (таблица 41). Еще одной важной аналитической характеристикой любого метода анализа является его экспрессность (таблица 42).

Таблица 42. Характеристики экспрессности разработанных биосенсоров.

Сенсорный элемент	Время отклика, мин	Время промывки системы, мин	Время анализа, мин
Ферроцен – тионин	2–3	6–17	8–20
Ферроцен – нейтральный красный	2–3	5–7	7–10
Ферроцен – метиленовый синий	1–2	2,5–4	3,5–6

Таким образом, лучшим по экспрессности является биосенсор на основе системы «ферроцен – метиленовый синий». В таблице 43 приведены основные характеристики двухмедиаторных биосенсоров.

Таблица 43. Характеристики разработанных 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 переноса электронов от дрожжевых клеток на электрод и, как следствие, улучшить характеристики БПК-биосенсора. По долговременной стабильности и чувствительности пара «ферроцен – метиленовый синий» является наиболее пригодной для создания двухмедиаторного БПК-биосенсора. Улучшение характеристик биосенсора в системе «ФЦ-МС» обусловлено высоким значением константы взаимодействия между медиаторами. При увеличении константы скорости взаимодействия медиаторов между собой увеличивается чувствительность биосенсоров.

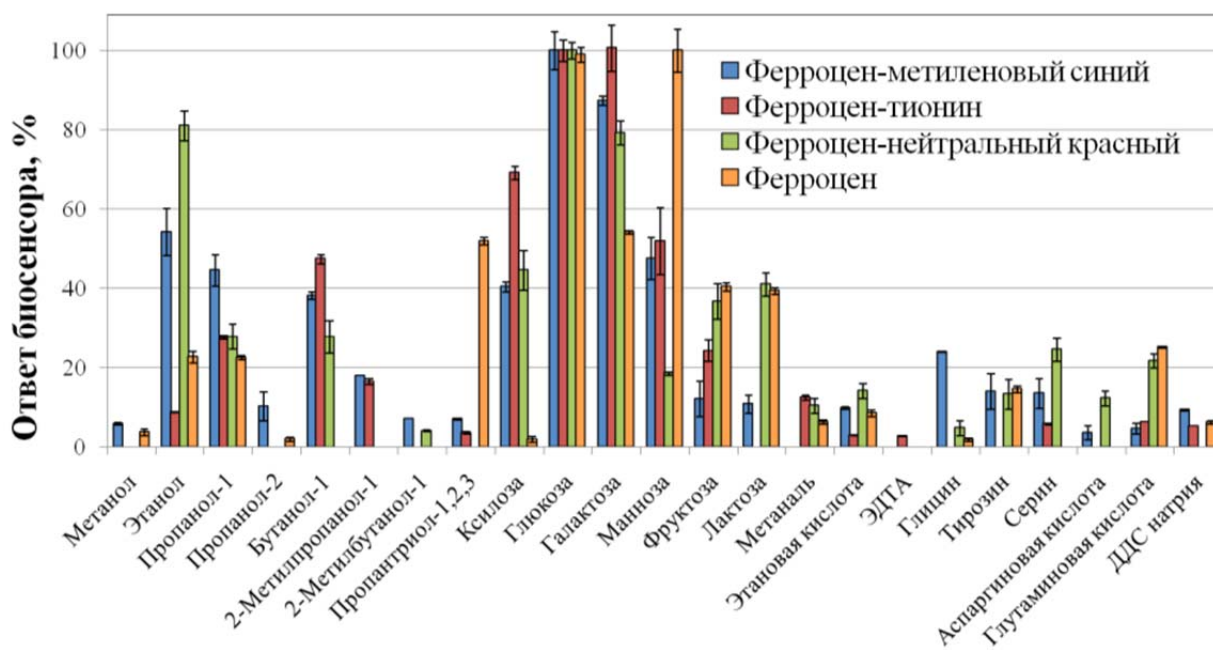


Рис. 135. Профиль детектируемых веществ для биосенсоров с разработанными двухмедиаторными биоэлектрохимическими системами.

По результатам оценки профиля детектируемых веществ для биосенсоров с разработанными двухмедиаторными биоэлектрохимическими системами показано, что при введении в систему второго медиатора – метиленового синего – наблюдается увеличение количества окисляемых соединений (рис. 135). Профили окисления углеводов дрожжами *D. hansenii* в исследуемых двухмедиаторных системах близки. Наибольшие отклики

созданные сенсорные системы показывали в присутствии глюкозы. Не так активно окислялись другие моносахариды. Спирты при использовании созданных двухмедиаторных систем окислялись не так эффективно, как углеводы. В присутствии медиаторных систем «ферроцен – метиленовый синий» и «ферроцен – нейтральный красный» аналитические сигналы на спирты снижались при усложнении структуры радикала. Однако характер окисления спиртов менялся в присутствии медиаторной системы «ферроцен-тионин»: ответ увеличивался с увеличением размера радикала. Следовательно, селективность медиаторных биосенсоров на основе *D. hansenii* можно изменять, используя разные двухмедиаторные биоэлектрохимические системы. *Debaryomyces hansenii* в присутствии системы «ферроцен – метиленовый синий», как и «ферроцен – нейтральный красный», способны метаболизировать все исследуемые аминокислоты: с отрицательно заряженными радикалами (серин, аспаргиновая и глутаминовая кислоты), с ароматическим радикалом (тирозин) и с неполярным радикалом (глицин, глутамин), что благоприятствует определению индекса БПК в образцах, содержащих различные белковые соединения. Однако чувствительность дрожжей к аминокислотам снижается при переходе к медиаторной системе ферроцен – тионин, но в то же время в присутствии только этой системы наблюдалось окисление ЭДТА.

Таким образом, впервые на основе анализа экспериментально определенных констант скорости взаимодействия микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* с редокс-соединениями, гетерогенных констант скорости передачи электронов редокс-соединениями на электрод, констант скорости взаимодействия ферроцена с рядом водорастворимых медиаторов предложен подход к разработке двухмедиаторных биосенсорных систем, который дает возможность увеличить эффективность передачи электронов от микроорганизмов на электрод. Применимость предложенного подхода подтверждается повышением чувствительности биосенсора.

### **3.5. Разработка подходов 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 РЭ и биоматериалом. Так как восстановленный медиатор обычно характеризуется более высокой растворимостью, такое перемещение вызывает снижение содержания электроактивных частиц на поверхности РЭ, что отражается в постоянном снижении ответов сенсора. При миниатюризации датчиков данная проблема усугубляется. Решением данной проблемы является иммобилизация в редокс-активные гели, 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 способен взаимодействовать с биоматериалом.

#### ***3.5.1. Создание редокс-активных гидрогелей для иммобилизации микроорганизмов***

##### **3.5.1.1. Особенности создания и изучения механизмов электронного переноса в редокс-активных гидрогелях**

При использовании биокатализаторов на основе микробных клеток в составе биосенсора главным условием функционирования получаемой аналитической системы является сопряжение ферментных систем микроорганизмов с преобразователем сигнала. В настоящее время наиболее универсальным современным подходом для решения данной задачи является

использование в конструкции датчика электропроводящих или редокс-активных гидрогелей [302]. Полимеры, способные к образованию редокс-активных гидрогелей, представляют собой сложную структуру, состоящую из молекул электроактивных соединений, ковалентно связанных с полимерной основой, которая может обладать или не обладать электропроводностью. Молекулы редокс-активных полимеров характеризуются большой молекулярной массой, а применение их в виде геля для иммобилизации микроорганизмов дает возможность переносить электроны с биоматериала на РЭ без физического передвижения медиатора (рис. 136).

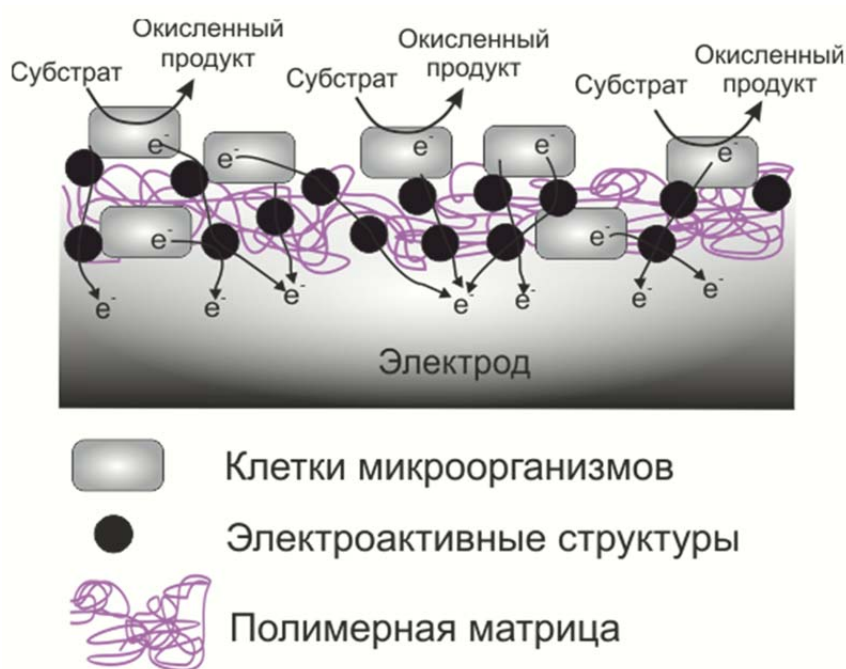


Рис. 136. Одна из возможных схем взаимодействия микроорганизмов с матрицей из редокс-активного полимера.

Интерес к полимерам подобного рода возник в конце 80-х годов. Редокс-активные полимеры синтезировали для использования в составе биокатализаторов для электрохимических биосенсоров [303]. С того момента и по настоящее время одной из главных областей применения редокс-активных гидрогелей является биосенсорный анализ. Основной объем работ, посвященных синтезу и применению редокс-полимеров, описывает системы,



в которых электронный транспорт осуществляется за счет электроактивных структур, ковалентно связанных с полимерной основой. Она сама по себе инертна и является местом крепления электроактивных структур, которые вступают в электрохимическое взаимодействие с активными центрами ферментов и поверхностью электродов. Механизм транспорта электронов через молекулы электропроводящих полимеров до сих пор является предметом фундаментальных исследований. Предполагается, что окислительно-восстановительная активность подобных полимеров обусловлена процессом перескока электронов, в рамках которого транспорт электронов представляется в виде ряда последовательных окислительно-восстановительных взаимодействий между близко расположенными электроактивными структурами [160]. Так как в целом пленка полимера должна быть электронейтральна, движение заряда в полимере должно уравниваться перемещением противоионов. Полная характеристика процесса переноса электронов должна учитывать как электронную, так и ионную проводимость материала. Для редокс-активных полимеров характерно наличие проводимости лишь в узком диапазоне потенциалов, а максимум проводимости наблюдается при равенстве концентраций окисленной и восстановленной форм полимера, то есть при формальном потенциале его окислительно-восстановительных центров.

Существует несколько путей синтеза редокс-активных полимеров. Они могут быть получены путем электрополимеризации мономеров, содержащих электроактивные группы атомов. Как правило, в роли мономеров в данном случае выступают комплексные органические соединения, содержащие атомы переходных металлов (Co, Os, Ru, Ni). Изменяя условия и длительность процесса полимеризации, можно варьировать длину цепи получаемого полимера, и, как следствие, его физические свойства. Среди подобного рода соединений наиболее широко применяются осмиевые полимеры, которые используются для создания биокатализаторов на основе ферментов и бактериальных клеток.

Другим подходом к синтезу редокс-активных полимеров является модификация готовой полимерной матрицы электроактивными молекулами. Для этого молекулы полимера и электроактивного соединения должны обладать необходимыми функциональными группами, по которым будет происходить присоединение. При этом возможно как непосредственное взаимодействие полимера и электроактивного соединения, так и использование бифункциональных реагентов, которые встраиваются между ними. При использовании данного подхода крайне важен выбор исходного полимера для модификации, так как он должен не просто обладать необходимыми функциональными группами, но иметь достаточную их удельную плотность из расчета на единицу массы. Так, молекулы хитозана и бычьего сывороточного альбумина имеют аминогруппы и способны подвергаться модификации карбонилсодержащими электроактивными соединениями, однако в молекуле хитозана одна аминогруппа приходится на 162 Да молекулярной массы, в то время как в молекуле белка – примерно на 1150 Да. Очевидно, что плотность электроактивных структур при использовании хитозана в качестве исходного соединения для синтеза электроактивного полимера может быть выше. Однако при синтезе необходимо принимать во внимание возможное появление стерических затруднений, возникающих при экранировании функциональных групп полимерным скелетом из-за особенностей трехмерной конформации полимерной молекулы, что характерно для белков, обладающих устойчивой вторичной и третичной структурой.

Выбор электроактивного соединения является еще одним важным аспектом при синтезе полимера, способного вступать в окислительно-восстановительные взаимодействия. Требования к таким соединениям в основном те же, что и к медиаторам электронного транспорта, традиционно используемым в биосенсорах второго поколения, однако помимо этого электроактивные соединения, подходящие для синтеза, должны иметь функциональные группы, по которым возможно протекание реакции с

полимерной молекулой с образованием прочной ковалентной связи. Кроме того, такая реакция должна протекать в относительно мягких условиях, в которых не произойдет ни разрушения исходного полимера, ни потери окислительно-восстановительных свойств молекулой электроактивного соединения. С учетом вышеперечисленных особенностей синтеза в исследовательской практике хорошо себя зарекомендовали производные ферроцена. Круг соединений, пригодных для синтеза электроактивных полимеров, не ограничивается металлсодержащими комплексами. Органические красители также могут проявлять медиаторные свойства, будучи ковалентно связаны с полимерной матрицей. К таким красителям относятся производные феназина и фенотиазина. Те из них, что имеют в качестве заместителей ароматического кольца amino-, карбонильные или карбоксильные группы, могут быть использованы для модификации полимеров, например, нейтральный красный и тионин. Данный подход к иммобилизации электроактивного соединения в биокатализаторе имеет преимущества перед более традиционной электрополимеризацией, которая часто используется для закрепления водорастворимого нейтрального красного на поверхности электрода. В случае образования электроактивного гидрогеля нейтральный красный фиксируется во всем объеме биокатализатора и располагается в непосредственной близости от биоматериала, в то время как в случае электрополимеризации нейтральный красный оседает на поверхности электрода, и его доступность для клеток микроорганизмов не одинакова и зависит от их расположения в объеме биокатализатора.

### **3.5.1.2. Редокс-активные полимеры на основе БСА**

Бычий сывороточный альбумин — белок, имеющий одну субъединицу с молекулярной массой 69 000 Да. БСА обладает такими биологическими свойствами, как биосовместимость и нетоксичность. По этой причине белок

находит широкое применение при иммобилизации биоматериала в процессе разработки биосенсоров для различных целей, иммуносенсоров. Наиболее распространена модификация БСА производными ферроцена, например, ферроценкарбальдегидом и ферроценкарбоновой кислотой. Это возможно благодаря наличию первичных реакционноспособных аминогрупп в структуре белка.

В работе [304] был описан биосенсор для определения глюкозы на основе конъюгата БСА-ферроценкарбоновая кислота/мУНТ/полисилоксан. В качестве биоматериала использовали фермент глюкозооксидазу. При синтезе конъюгата предварительно проводили модификацию БСА ферроценкарбоновой кислотой, используя при этом N-гидроксисукцинимид (NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC). Схема синтеза приведена на рисунке 137.

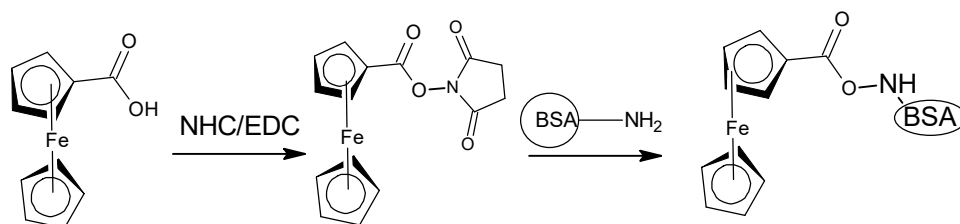


Рис. 137. Схема карбодиимидного синтеза конъюгата БСА-ферроценкарбоновая кислота [304].

Методом циклической вольтамперометрии были изучены электрохимические свойства матрицы (рис. 138).

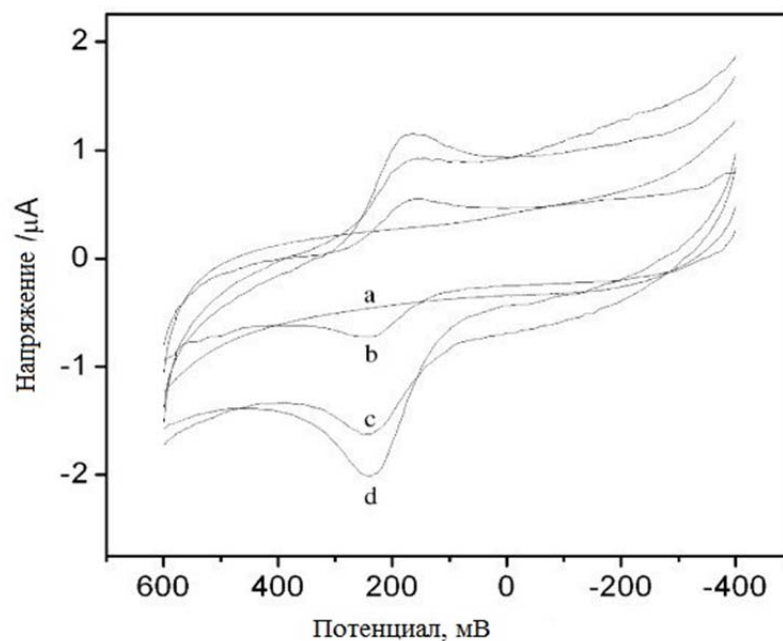


Рис. 138. Циклические вольтамперограммы: (а) – золь-гель пленка; (b) – конъюгат ферроценкарбоновая кислота – БСА/золь-гель; (с) – УНТ покрытые конъюгатом ферроценкарбоновая кислота – БСА/золь-гель; (d) – конъюгат ферроценкарбоновая кислота – БСА/золь-гель/УНТ [304].

Лимитирующей стадией является процесс диффузии. При включении УНТ в полимер наблюдалось увеличение тока пика, т. е. проводимость матрицы улучшилась из-за близости наноматериалов и медиатора. Полученный композит способствовал прочному закреплению как медиатора, так и биоматериала на поверхности электрода. Линейный диапазон определения глюкозы разработанного биосенсора составил 0,05–20,0 мМ.

В работе [305] подобным образом синтезировали конъюгат ферроцен-БСА, но при этом добавляли дигоксин. Редокс-активный полимер использовали при разработке иммуносенсора для гомогенного электрохимического анализа биоактивных веществ. Принцип работы анализатора заключается в следующем: дигоксин выступает в качестве мультивалентного антигена, способного образовывать сетчатый комплекс с антителом. Этот иммунокомплекс сосуществует вместе со свободным антигеном, от концентрации которого зависит аналитический сигнал сенсора.

### 3.5.1.3. Редокс-активные полимеры на основе хитозана

Хитозан находит широкое применение при разработке редокс-активных полимеров для иммобилизации биоматериала, например, ферментов. Высокое содержание реакционноспособных аминогрупп позволяет модифицировать полимер электроактивным веществом и посредством сшивающих реагентов, таких как глутаровый альдегид, сформировать гель с пористой структурой. Ковалентное связывание хитозана с ферроценом используется в ряде работ [160, 306–309].

В работах [160, 308, 309] проводили модификацию хитозана ферроценкарбальдегидом: ферроценкарбальдегид взаимодействовал с первичными аминогруппами хитозана с образованием основания Шиффа, кратную связь которого восстанавливали посредством цианоборгидрида натрия. Затем проводили ковалентное связывание редокс-активного полимера с глутаровым альдегидом для образования геля с сетчатой структурой, что позволило проводить иммобилизацию биоматериала на поверхности рабочего электрода.

В работе [160] вышеописанный редокс-активный полимер применяли для иммобилизации биоматериала (фермент глюкозооксидаза и микроорганизмы *Gluconobacter oxydans*) при создании биосенсоров на глюкозу. Было доказано, что данная матрица обеспечивает прочную иммобилизацию биоматериала и является биосовместимой системой как для ферментов, так и для бактериальных клеток. Изучен механизм переноса электронов, в обоих случаях лимитирует процесс диффузии. В редокс-активном полимере диффузия невозможна, поэтому заряд распространяется в результате скачков электронов между редокс-сайтами ферроцена.

В работе [309] при создании иммуносенсора редокс-активный полимер на основе хитозана и ферроцена применяли для иммобилизации антигена гепатита В на стеклоуглеродном электроде. На протяжении исследования

электрохимическая активность медиатора, сшитого с полимером, не снизилась, что свидетельствует о его прочном закреплении на поверхности электрода. Изучено влияние многослойных углеродных нанотрубок на проводимость системы. При использовании наноматериалов скорость переноса электронов на электрод увеличилась за счет того, что УНТ выполняли роль мостика между ковалентно связанными с полимером молекулами медиатора. Процесс на электроде контролировался поверхностной реакцией. Разработанный иммуносенсор обладал хорошей стабильностью в течение 30 дней. Вероятно, это обусловлено прочным удерживанием медиатора и биоматериала на поверхности электрода. Активность иммобилизованных в геле антигенов не изменилась.

В работе [310] проводили синтез аналогично вышеописанному, но вместо цианоборгидрида применяли боргидрид натрия. Редокс-активный полимер использовали при формировании биосенсора на основе пероксидазы хрена для определения пероксида водорода. Диапазон определяемых концентраций составил  $2,0 \cdot 10^{-6}$ – $1,33 \cdot 10^{-3}$  М, долговременная стабильность сенсора – 14 дней.

Был разработан биосенсор для определения глюкозы на основе нанокompозита полисилоксан/хитозан, модифицированного ферроценальдегидом [311]. Синтез электрохимически активного нанокompозита проводили в несколько стадий. На первом этапе проводили конденсацию 3-аминопропилтриметоксисилана с ферроценкарбальдегидом в смеси ТГФ/изопропанол (2:1) с последующим восстановлением основания Шиффа боргидридом натрия, затем проводили полимеризацию образовавшегося продукта в кислой среде. На третьем этапе модифицированный ферроценкарбальдегидом полисилоксан сшивали с хитозаном, используя в качестве сшивающего реагента глутаровый альдегид. Продукт взаимодействия представлен на рисунке 139.

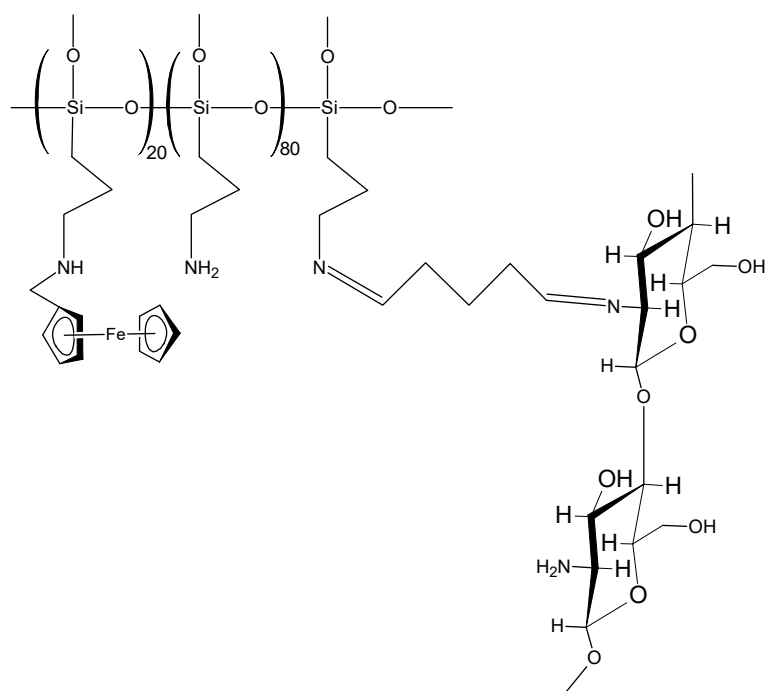


Рис. 139. Структура модифицированного ферроценкарбальдегидом нанокompозита полисилоксан/хитозан [311].

При изучении электрохимических свойств редокс-активного полимера сравнивали проводимость вышеописанного нанокompозита и модифицированного ферроценкарбальдегидом полисилоксана. В последнем скорость окислительно-восстановительного процесса оказалась ниже, несмотря на более высокое содержание медиатора. Автор связал это с гидрофильностью хитозана. Растворитель полностью окружал молекулы медиатора, что способствовало свободному распространению модифицированной ферроценом цепи и тем самым ускорило процесс переноса электронов. Чувствительность разработанного биосенсора ( $0,86 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ) оказалась ниже, чем в работе [308] ( $8,1 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ). Автор связывает это с низкой концентрацией медиатора в полимере.

При разработке редокс-активных полимеров применяют и другие медиаторы, например, тионин. Так, в работе [265] при формировании иммуносенсора для определения бактерий рода *Salmonella* ковалентно связывали хитозан и медиатор тионин с помощью сшивающего реагента, в



качестве которого использовали глутаровый альдегид. Схема синтеза представлена на рисунке 140.

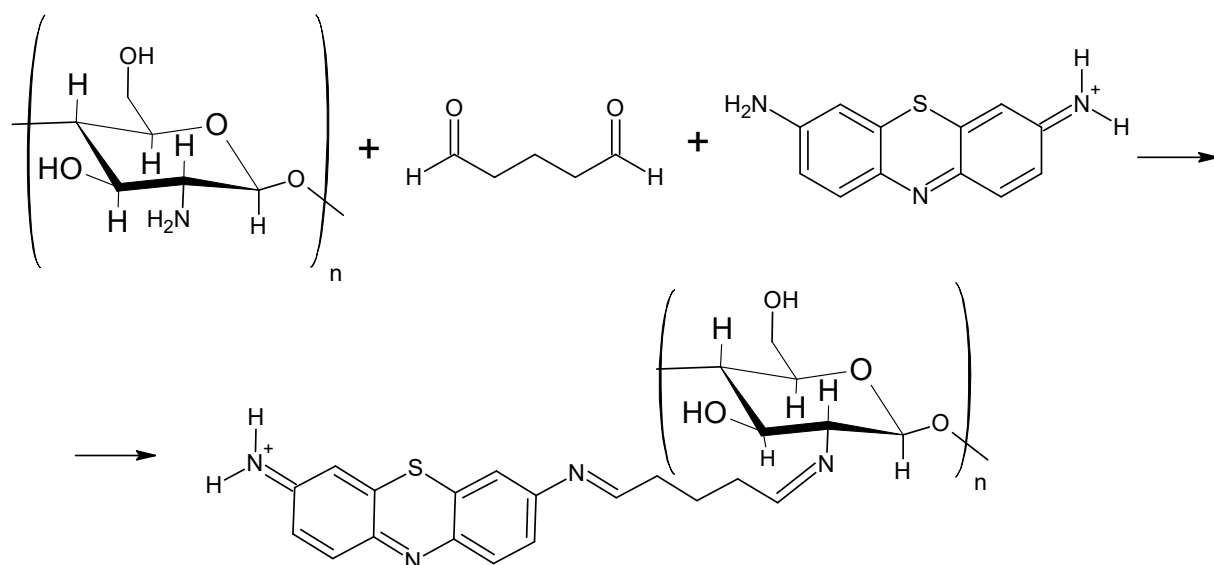


Рис. 140. Схема синтеза редокс-активного полимера на основе хитозана и медиатора тионина.

Иммуносенсор обладает высокой чувствительностью, селективностью и хорошей воспроизводимостью. Это позволяет проводить эффективное определение сальмонелл.

#### **3.5.1.4. Использование углеродных нанотрубок в редокс-активных и проводящих гелях**

Углеродные нанотрубки – аллотропные модификации углерода, представленные протяженными цилиндрическими структурами диаметром 1–100 нанометров и длиной до нескольких микрометров. Структура может состоять из одного или нескольких гексагональных слоев, которые свернуты в трубку. По количеству слоев нанотрубки подразделяют на однослойные и многослойные. В однослойных УНТ (рис. 141А) при сворачивании не образуются швы; строение концов УНТ подобно молекуле фуллерена: полусферические вершины содержат правильные шестиугольники и шесть правильных пятиугольников. Многослойные УНТ состоят из нескольких

слоев, расстояние между которыми всегда около 0,34 нм, как между слоями в кристаллическом графите. Форма УНТ может изменяться в продольном и поперечном направлении в зависимости от количества слоев. «Русская матрешка» является разновидностью поперечных структур УНТ, представляет совокупность коаксиально вложенных друг в друга однослойных цилиндрических нанотрубок (рис. 141Б) [312].

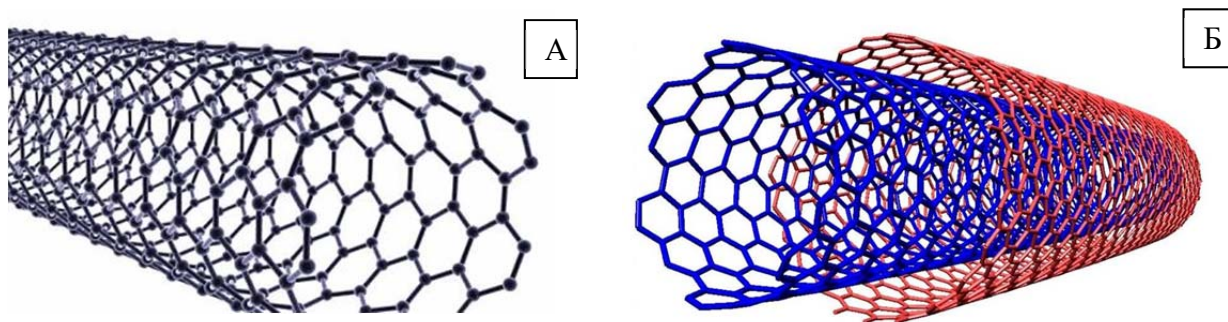


Рис. 141. Схематичное изображение углеродных нанотрубок: А – однослойные УНТ; Б – многослойные УНТ, поперечная структура «русская матрешка».

Для улучшения характеристик амперометрических биосенсоров многие исследователи при создании рецепторных элементов в последнее время начали использовать различные наноматериалы. В работе [313] создан биосенсор для определения мочевины. Иммунизацию фермента проводили при помощи композита на основе полианилина и многослойных УНТ, полученного методом электрополимеризации. Предел обнаружения разработанного биосенсора составил 0,04 мМ.

В работах [314–316] созданы биосенсоры с применением УНТ совместно с медиатором. Разработан амперометрический биосенсор для определения глюкозы [314], основанный на ковалентной иммобилизации фермента глюкозооксидазы на многослойных УНТ с использованием феррицианида калия в качестве медиатора электронного транспорта. Присутствие нанотрубок облегчает перенос электронов от фермента к медиатору. В работе исследован механизм переноса электронов. Преобладает

поверхностная реакция. Автор объясняет это тем, что многослойные УНТ имеют очень плотную упаковку, и по этой причине диффузионные слои пучков нанотрубок сильно перекрываются.

Биосенсор для определения эндокринного разрушителя – матаирезинола – был разработан путем иммобилизации тирозиназы посредством композитной пленки политионин/нафион/многослойные УНТ [315]. Электродный процесс носил диффузионно-контролируемый характер. Разработанный анализатор обладал высокой чувствительностью, стабильностью. Диапазон определяемых концентраций составлял 180 нМ–4,33 мМ. В работе [316] создан биосенсор для определения свежести рыбы по содержанию в ней ксантина. Фермент ксантиноксидаза был иммобилизован с помощью матрицы на основе сополимера полиглицидилметакрилат-винилферроцен с включенными в него многослойными УНТ. Электрохимическое поведение матрицы изучали как с использованием УНТ, так и без наноматериала. Применение нанотрубок обеспечивает проводящий путь для переноса электронов, что дает возможность проводить измерения при более низком потенциале. Протекающий на электроде процесс контролируется диффузией. Биосенсор обладает высокой чувствительностью и малым временем отклика (около 4 секунд).

Схожим способом иммобилизации медиатора является ионная ассоциация медиатора с матрицей [12, 317]. В исследовании [317] описана ионная ассоциация тионина и микроорганизмов *E. coli* за счет сил электростатического взаимодействия. Для создания сенсора ионную ассоциацию смешивали с нанотрубками и помещали на электроде. Нанотрубки применяли для увеличения эффективности передачи электронов от бактерий *E. coli* к электроду (рис. 142). Такой биосенсор был применен для определения тяжелых металлов в сточных водах и показал себя крайне эффективно.

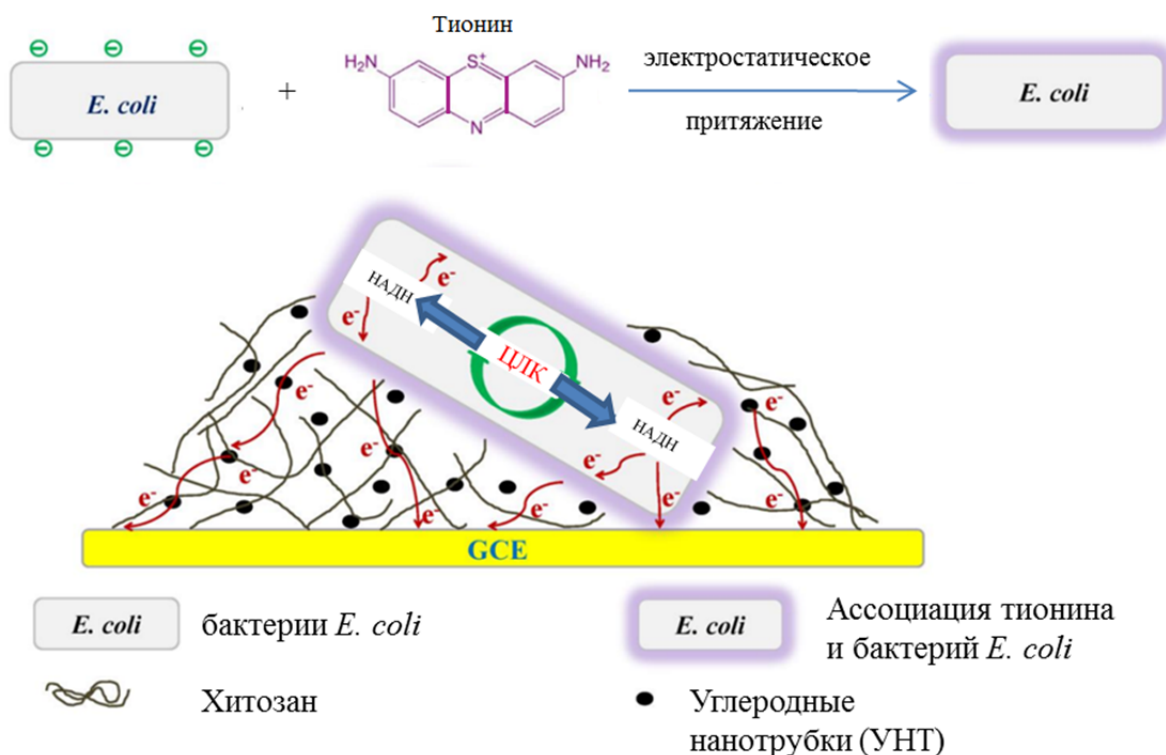


Рис. 142. Разработка биосенсора на основе ионной ассоциации тхионина и *E.coli* [317].

При создании медиаторного амперометрического БПК-биосенсора [12] рабочий электрод модифицировали медиатором гексацианоферратом (III) калия за счет ионной ассоциации 3-(аммонийпропил)триметоксисилоксан хлоридом, а для того, чтобы медиатор не вымывался наносили защитный слой золя оксида титана (IV) (толщина слоя 30 мкм – рис. 143В). Использование наноматериалов позволило успешно иммобилизовать медиатор. Из вольтамперограммы следует, что спустя 100 циклов сканирования электрода медиатор не вымывался из матрицы благодаря защитному покрытию из наноматериалов. Нижняя граница анализируемых концентраций биосенсора составила  $1,2 \text{ мкгО}_2/\text{дм}^3$ , что является приемлемым для анализа в пределах ПДК.

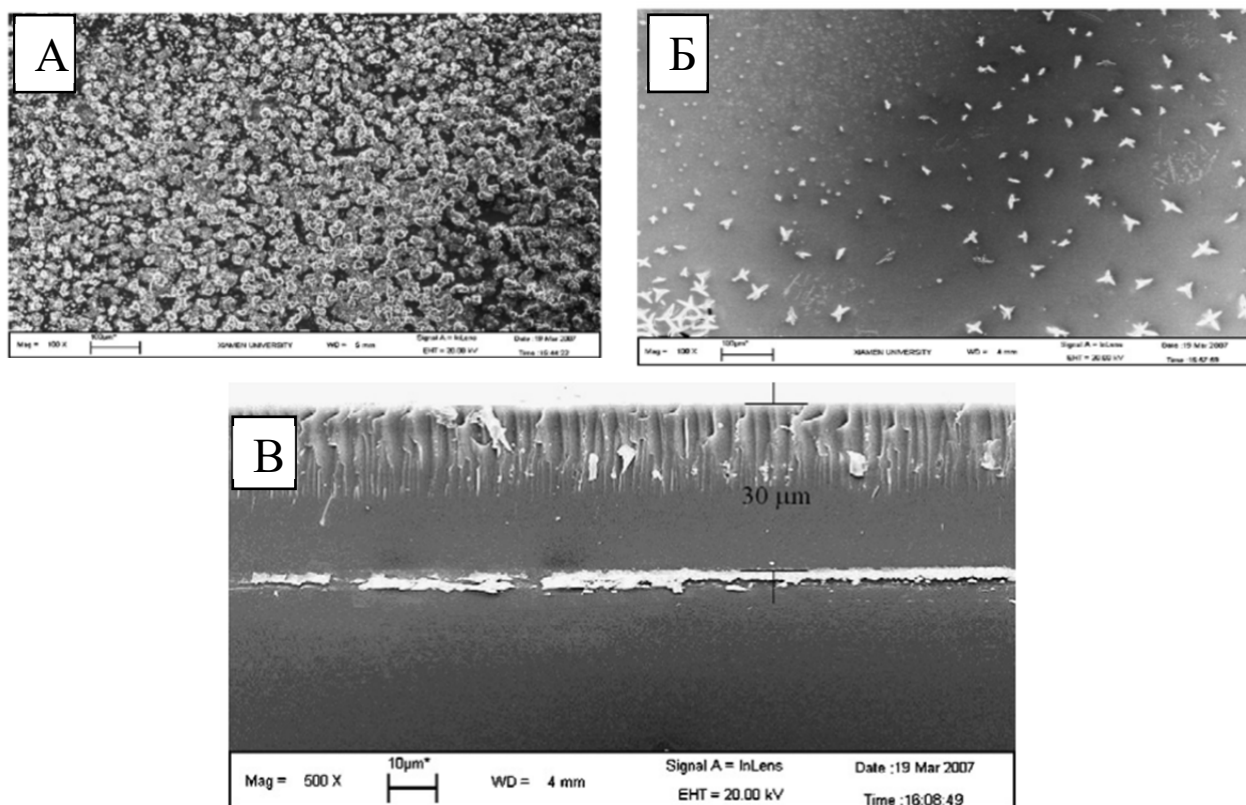


Рис. 143. Результаты сканирующей электронной микроскопии: А – изображение поверхности стеклоуглеродного электрода, модифицированного медиатором ферицианидом калия за счет ионной ассоциации; Б – изображение того же электрода после покрытия наноматериалом; В – толщина слоя нанопокрyтия [12].

Таким образом, в настоящее время редокс-активные полимеры в биосенсорах наиболее часто используют для иммобилизации ферментов и аффинных компонентов. Сложность использования таких систем для иммобилизации микроорганизмов связана с необходимостью проникновения ковалентно связанного медиатора в клетку через ее мембрану для сопряжения биохимических реакций с электрохимическим преобразователем. Несмотря на множество преимуществ синтезированных гидрогелей, они имеют несколько серьезных недостатков. Главными из них являются низкая чувствительность из-за сложности сопряжения биоматериала с электродом, большая длительность измерений из-за плохой проницаемости матриц и невысокая долговременная стабильность,

обусловленная плохой биосовместимостью используемых проводящих систем. Поэтому в данной работе проведено исследование возможности создания биоэлектродов на основе бактерий *P. yeii* и редокс-активных полимеров на основе БСА и хитозана, модифицированных медиаторами электронного транспорта и углеродными нанотрубками для создания высокочувствительного БПК-биосенсора.

### **3.5.2. Получение биосовместимых редокс-активных гидрогелей на основе полимеров, ковалентно связанных с медиаторами**

В качестве медиатора для получения редокс-активных систем за счет наличия необходимых функциональных групп и медиаторных свойств использовали ферроценкарбоксальдегид. Выбор бычьего сывороточного альбумина и хитозана в качестве исходных матриц сделан на основе их высокой биосовместимости и нетоксичности. Эти свойства важны для применения созданных редокс-активных полимеров для иммобилизации бактерий. Наличие функциональных групп (аминогрупп) позволяет провести сшивку ферроцена с обоими биополимерами. Как было показано ранее, бактерии *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 обладают способностью метаболизировать широкий круг веществ; в этой связи они были использованы в данном исследовании как основа биорецепторного элемента. Для обеспечения облегченного переноса электронов между медиатором и электродом в систему вводили одностенные углеродные нанотрубки. Процесс синтеза полимерных матриц протекал по механизму нуклеофильного присоединения с последующим восстановлением боргидридом натрия. На завершающем этапе глутаровый альдегид был использован в роли сшивающего реагента для получения нерастворимой матрицы для иммобилизации микроорганизмов (рис. 144, 145).

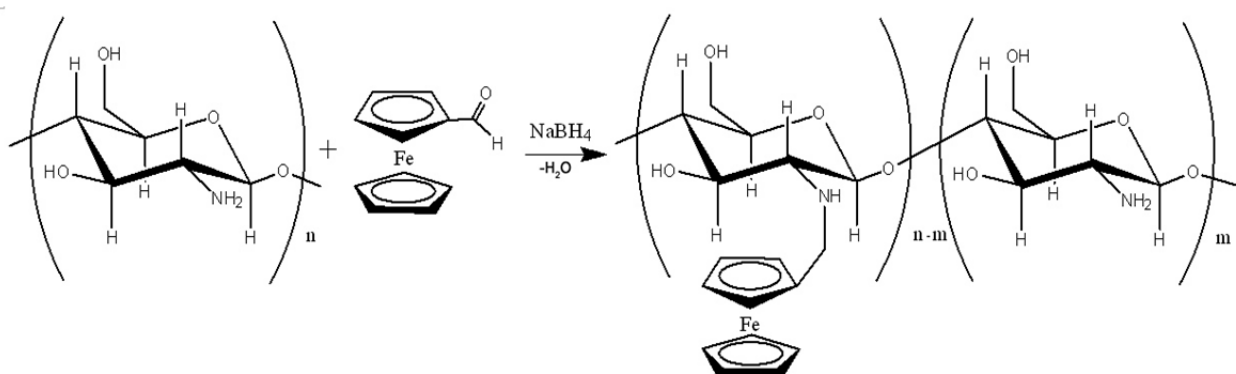


Рис. 144. Модификация хитозана ферроценальдегидом. Нуклеофильное присоединение свободных аминогрупп хитозана к альдегидной группе ферроценальдегида с последующим восстановлением боргидридом натрия.

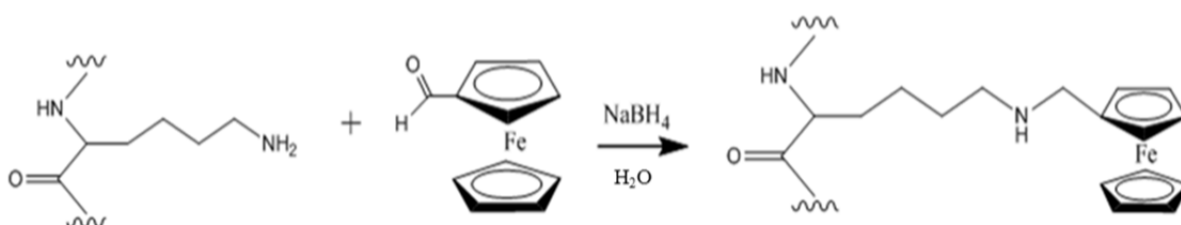


Рис. 145. Модификация бычьего сывороточного альбумина ферроценальдегидом. Нуклеофильное присоединение свободных аминогрупп лизина к альдегидной группе ферроценальдегида с последующим восстановлением боргидридом натрия.

Структуры полученных матриц, модифицированных медиатором, изучали с помощью метода ИК-спектроскопии (рис. 146, 147).

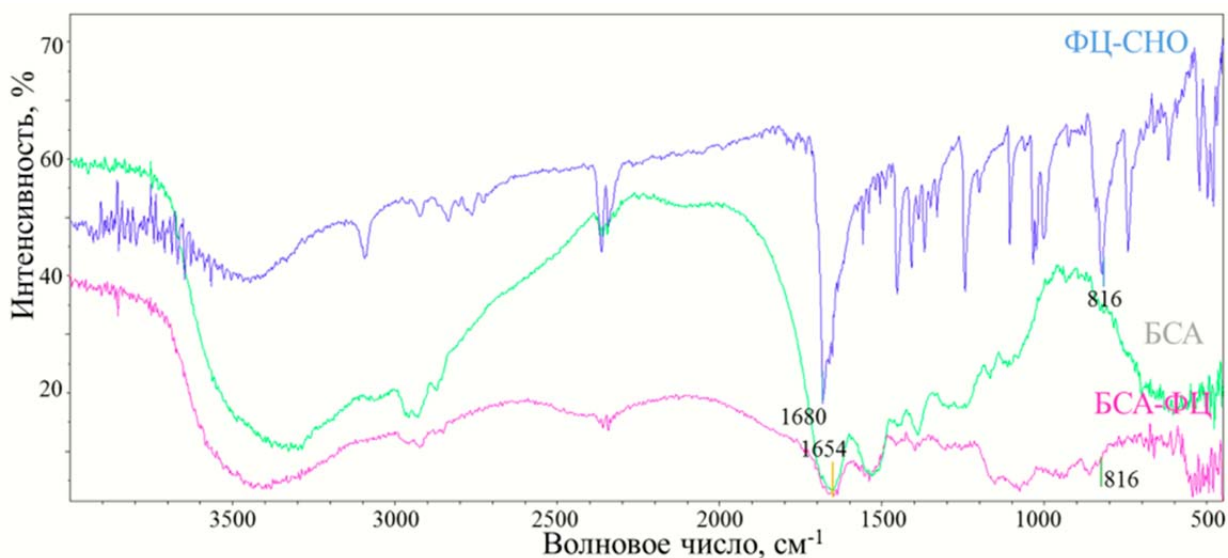


Рис. 146. ИК-спектр редокс-активной матрицы БСА, модифицированного ферроценальдегидом – БСА-ФЦ, исходных БСА и ферроценальдегида – ФЦ-СНО.

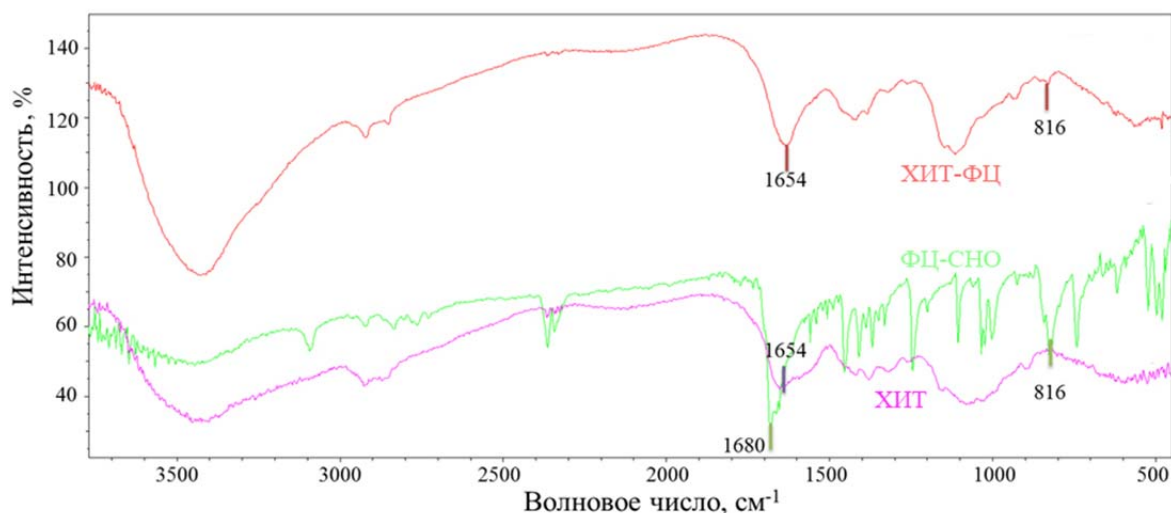


Рис. 147. ИК-спектр редокс-активной матрицы хитозана, модифицированного ферроценальдегидом – ХИТ-ФЦ, исходных хитозана - ХИТ и ферроценальдегида – ФЦ-СНО.

На ИК-спектре хитозана, модифицированного ферроценом, отчетливо видна полоса поглощения при волновом числе, равном  $1654\text{ см}^{-1}$ , являющаяся характерной для амидной полосы хитозана. Полоса поглощения валентных колебаний группы  $\text{C}=\text{O}$  (ВЧ  $1680\text{ см}^{-1}$ ) ферроценальдегида в модифицированной матрице исчезает. Присутствие ферроценилов в



полученной пленке определяли по наличию полосы поглощения деформационных колебаний C-N при ВЧ  $820\text{ см}^{-1}$ . В полученной пленке данная полоса поглощения смещена и появляется при ВЧ  $850\text{ см}^{-1}$ , полученные результаты согласуются с работой, в которой исследован ИК-спектр редокс-активного полимера хитозана, модифицированного ферроценом [160]. Аналогичные данные получены для матрицы на основе БСА и ферроцена.

Результаты определения содержания железа в синтезированных матрицах на основе ферроцена, полученные методом атомно-абсорбционной спектроскопии, показали, что массовая доля ферроцена в матрице БСА-ФЦ составила 14,1%, а в матрице ХИТ-ФЦ – 6,2%. Таким образом, несмотря на меньшее содержание свободных аминогрупп в белке, БСА более эффективно подвергается модификации, чем хитозан. Скорее всего это связано с тем, что сшивка БСА с ферроценом протекает в щелочной среде, что существенно облегчает реакцию нуклеофильного присоединения. Более низкую реакционную способность хитозана можно объяснить тем, что при растворении хитозана в уксусной кислоте происходит образование аммонийной соли по схеме, представленной на рисунке 148.

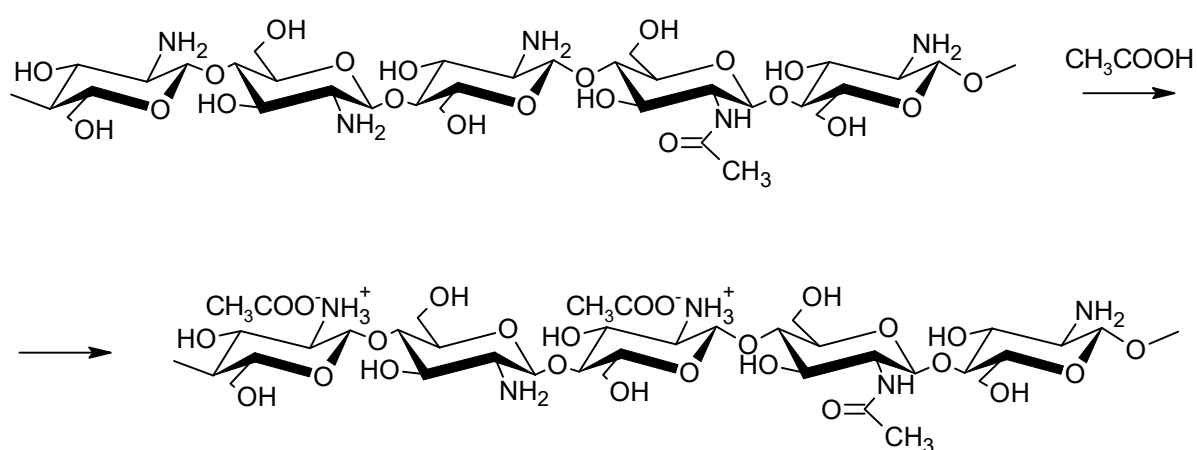


Рис. 148. Схема образования аммонийной соли при растворении хитозана в уксусной кислоте.

В результате образования аммонийной соли количество первичных аминогрупп в хитозане, по которым протекает реакция нуклеофильного присоединения, уменьшается. Следовательно, снижается и количество пришитого медиатора. По этой причине матрица на основе хитозана является менее перспективной. Сшивка хитозана в щелочной среде трудноосуществима из-за его малой растворимости.

Структура исследуемых проводящих гидрогелей была изучена методом сканирующей электронной микроскопии. Полученные изображения представлены на рисунках 149–152.

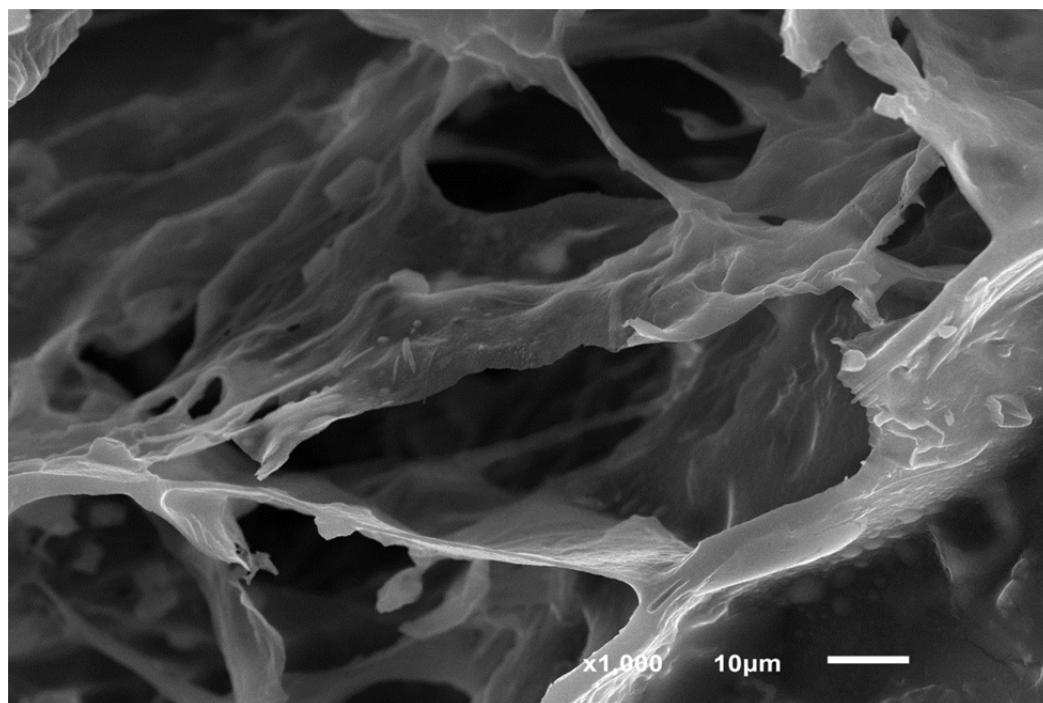


Рис. 149. Изображения сканирующей электронной микроскопии для редокс-активного полимера на основе БСА, модифицированного ферроценом.

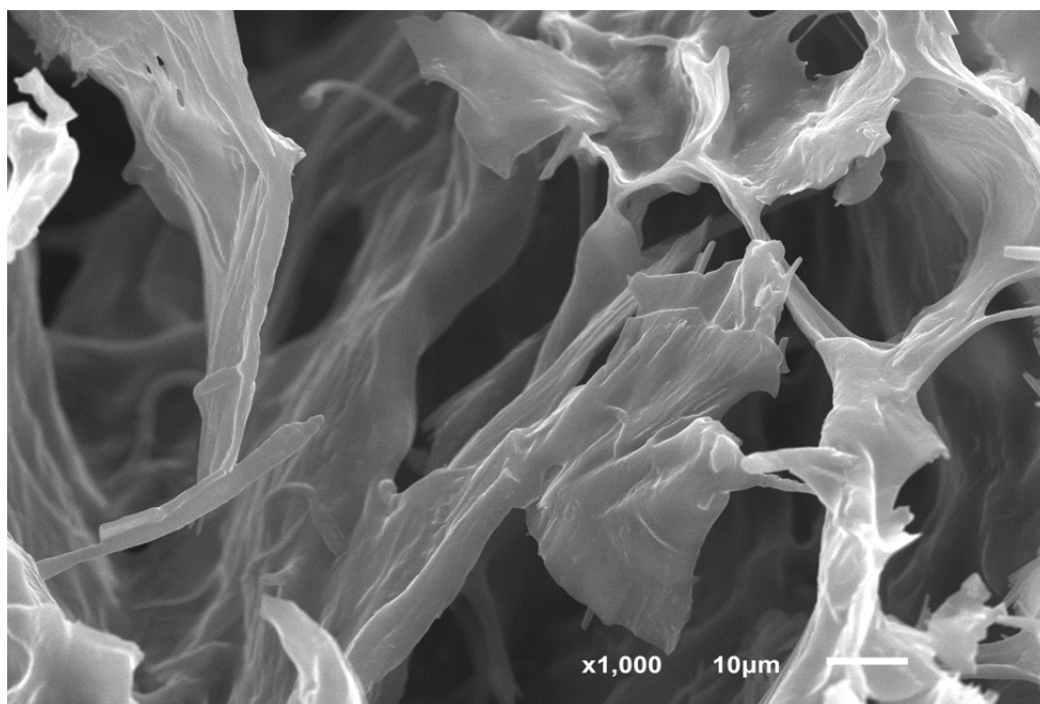


Рис. 150. Изображения сканирующей электронной микроскопии для редокс-активного полимера на основе хитозана, модифицированного ферроценом.

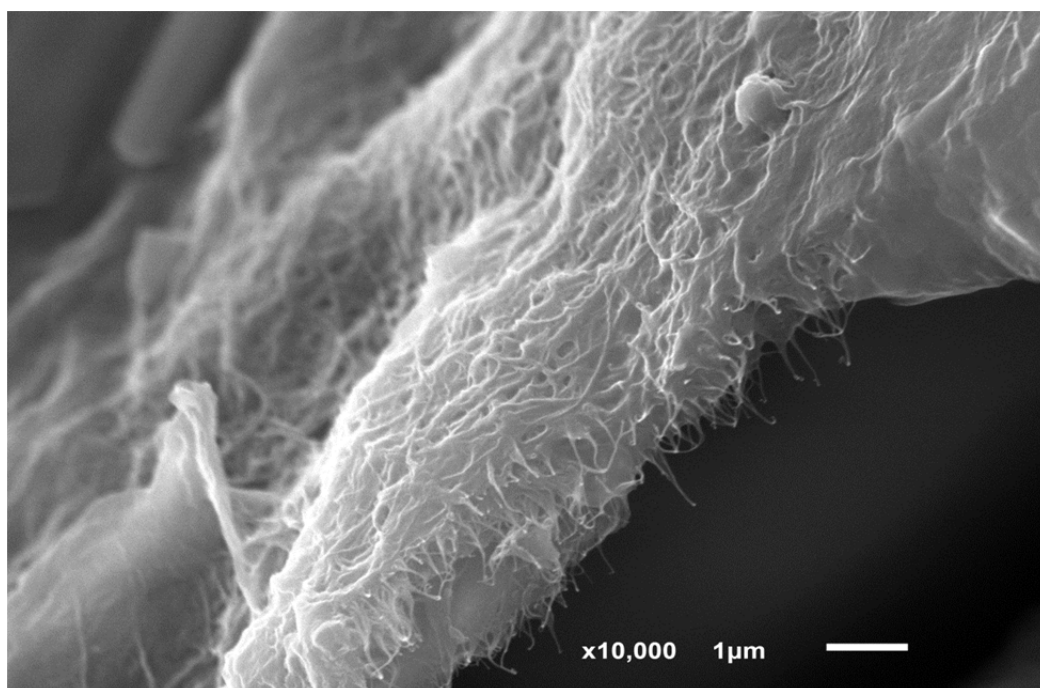


Рис. 151. Изображения сканирующей электронной микроскопии для редокс-активного полимера на основе БСА, модифицированного ферроценом с включенными углеродными нанотрубками.

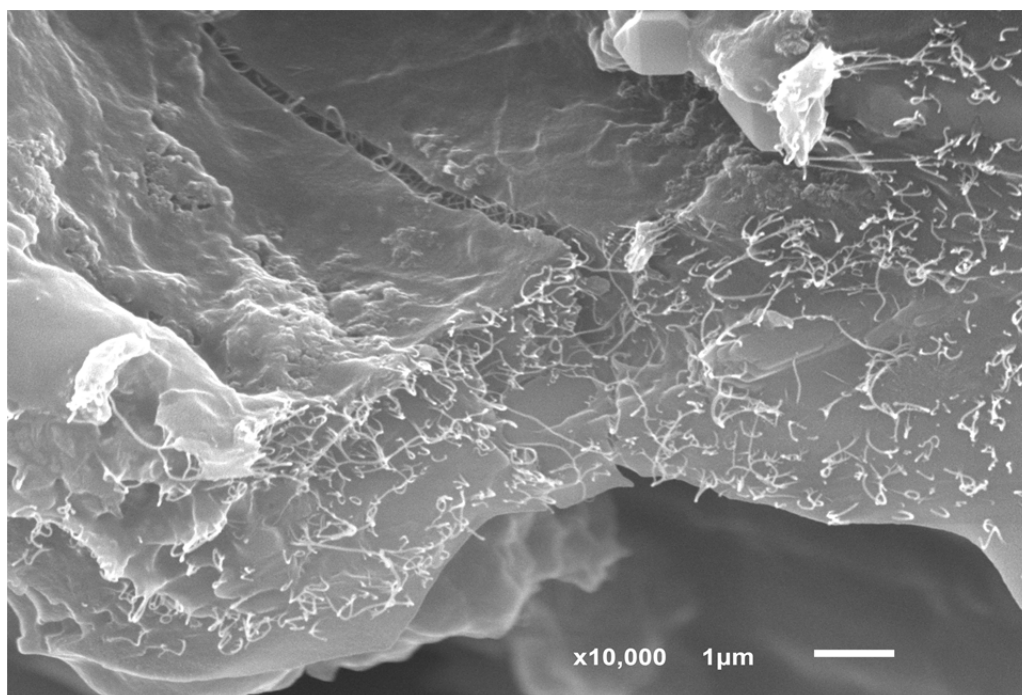


Рис. 152. Изображения сканирующей электронной микроскопии для редокс-активного полимера на основе хитозана, модифицированного ферроценом с включенными углеродными нанотрубками.

На рисунках 149 и 150 можно видеть пористую структуру редокс-активных полимеров. Полученные гидрогели имеют размер пор около 10 мкм. Таким образом, при нанесении полученного геля на электрод существенно увеличивается площадь рабочей поверхности, пористая структура позволяет бактериям *P. uvei* встраиваться в данный полимер. При использовании углеродных нанотрубок (рис. 151, 152) происходит их равномерное распределение в структуре синтезированных матриц.

Проведено определение электрохимических свойств полученных редокс-активных полимеров. В исследуемой электрохимической системе в отсутствие углеродных нанотрубок можно выделить две стадии: прыжковый механизм (ПМ) – процесс переноса электронов между ковалентно связанными молекулами медиатора и поверхностную реакцию (ПР) – перенос электронов от медиатора на электрод (рис. 153А).

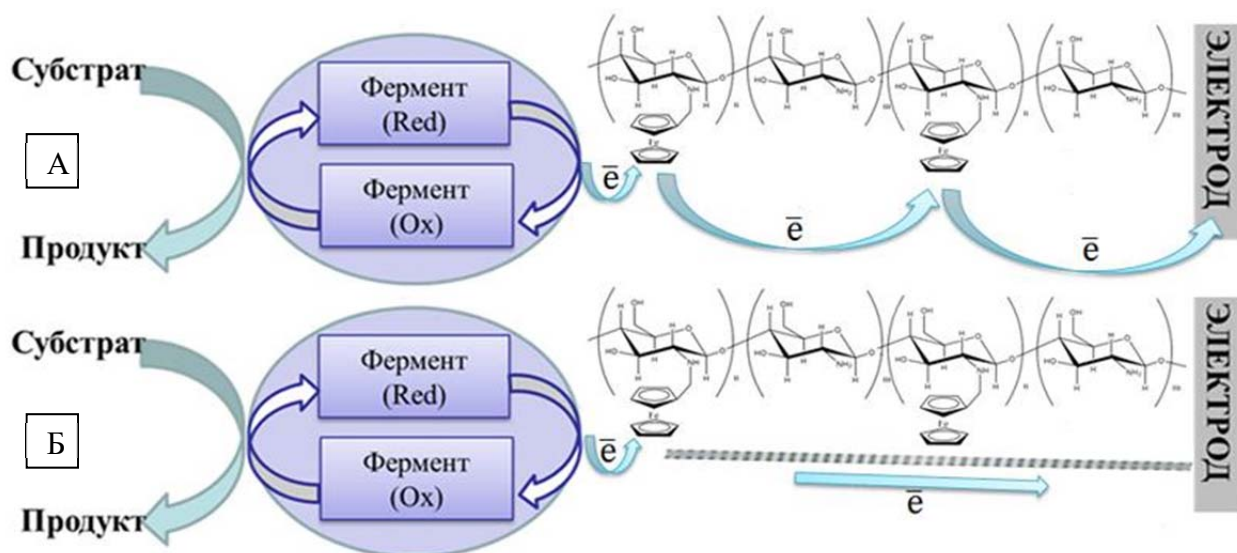


Рис. 153. Перенос электронов на электрод в редокс-активном полимере на основе хитозана: А – в отсутствии УНТ; Б – в присутствии УНТ.

В случае, если расстояние между ковалентно связанными медиаторами большое, то скорость прыжковой составляющей переноса электронов может снижаться. За счет внедрения углеродных нанотрубок в структуру полимера эффективное расстояние между молекулами медиаторов уменьшается (рис. 155 Б); УНТ играют роль мостиков, по которым электроны переносятся по редокс-активному полимеру на электрод. При низком выходе при модификации исходных полимеров редокс-активными соединениями, когда электроактивных частиц недостаточно для быстрой передачи электронов на электрод, введение наноматериалов в систему снимает вызванное кинетическое затруднение. Кроме того, введение нанотрубок увеличивает площадь контакта проводящей матрицы с поверхностью электрода. Введение наночастиц в состав редокс-активного полимера позволяет «подключить» больше редокс-активных центров полимера, а следовательно, увеличить регистрируемый аналитический сигнал и, таким образом, повысить чувствительность измерений.

Электрохимические свойства полученных проводящих гелей исследовали методом циклической вольтамперометрии. Метод циклической вольтамперометрии удобен для нахождения лимитирующих стадий

электрохимических процессов, так как в случае «прыжкового механизма» предельный анодный ток прямопропорционален квадратному корню из скорости развертки. Блаух и Савант разработали модель для описания движения электронов в полимерных пленках на основе концепции перколяции. Когда физическое движение сегментов либо отсутствует, либо очень медленное, перенос заряда происходит в основном за счет перколяции через взаимосвязанные кластеры окислительно-восстановительных частиц [318]. В случае, если прыжковый механизм осуществляется достаточно быстро и процесс лимитируется поверхностной реакцией на электроде – ток пропорционален скорости наложения потенциала [276]. Типичный вид вольтамперограмм приведен на рис. 154.

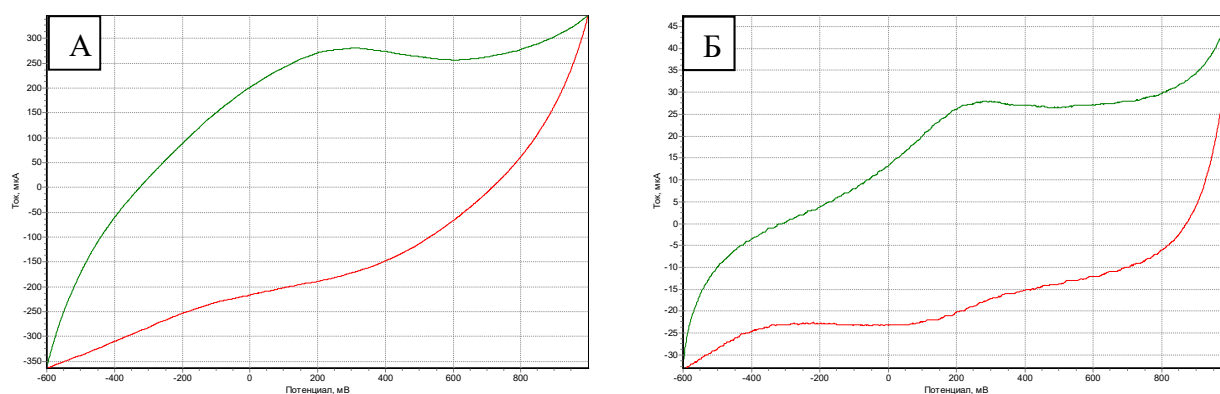


Рис. 154. А – вольтамперограмма для редокс-активного полимера БСА–ФЦ; Б – вольтамперограмма для редокс-активного полимера БСА–ФЦ с включенными УНТ (скорость наложения потенциала 30 мВ/с).

Наблюдаемый в случае использования обоих редокс-полимеров анодный пик соответствует потенциалу ферроцена (250 мВ). Введение УНТ в систему не влияет на потенциалы анодного и катодного пиков, однако делает пики более выраженными за счет повышения проводимости системы. Определенные лимитирующие стадии электрохимического процесса для полученных матриц представлены в таблице 1. Выявление лимитирующей стадии позволило применить модель Николсона (уравнение 10) [276] и

модель Лавирона [281] (уравнение 12) для нахождения гетерогенной константы переноса электронов (рис. 155).

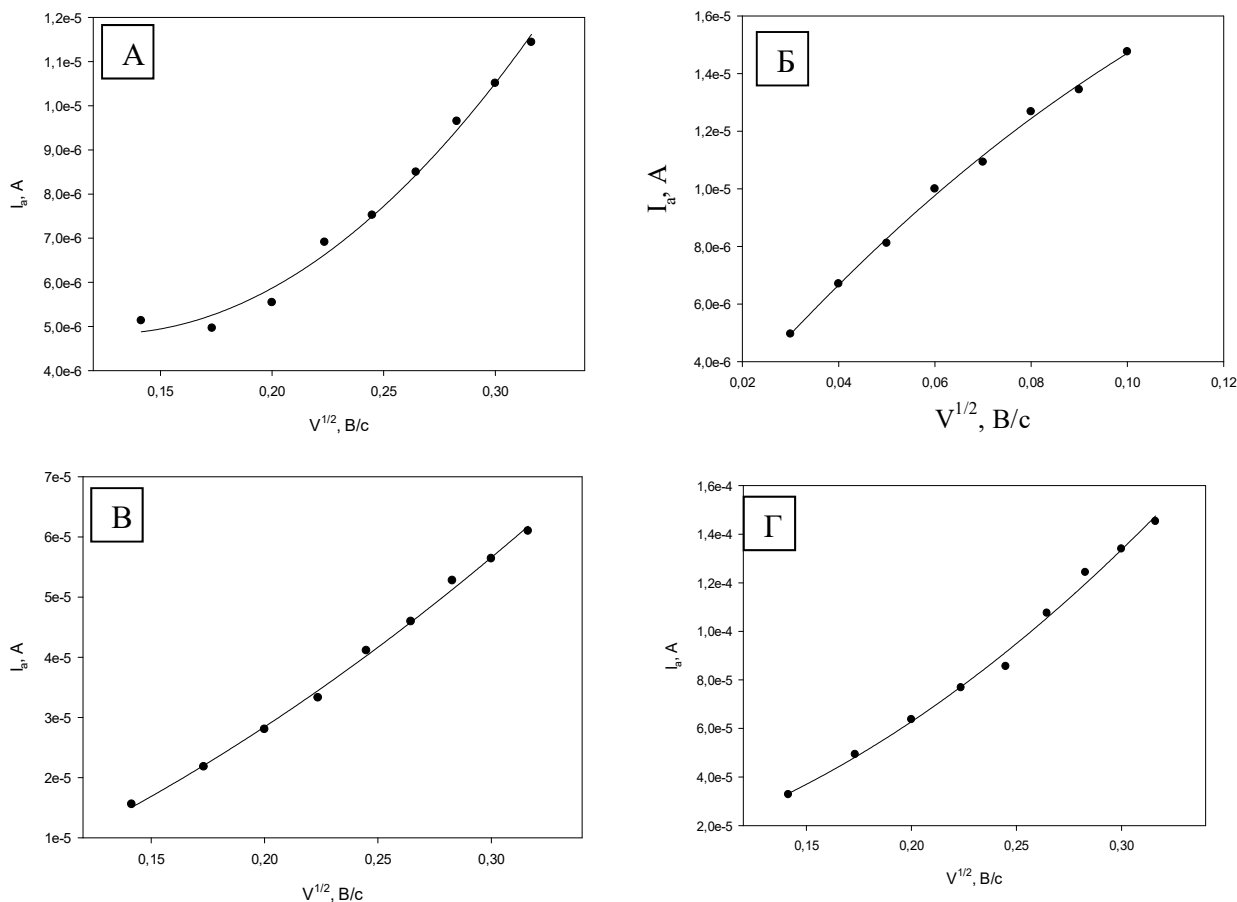


Рис. 155. Графики зависимости силы тока от квадратного корня скорости развертки для систем: А – БСА–ферроцен; Б – хитозан–ферроцен; В – БСА–ферроцен–УНТ; Г – хитозан–ферроцен–УНТ.

Для исследования возможности применения редокс-активных полимеров для иммобилизации микроорганизмов были найдены константы скорости взаимодействия микроорганизмов с ковалентно связанными медиаторами электронного транспорта с использованием описанного выше моделирования Николсона – Шайна [285]. Значения рассчитанных констант представлены в таблице 44.

Таблица 44.  $k_s$  (скорость наложения потенциала 0,1 В/с) и  $k_{\text{взаим}}$  для созданных проводящих систем.

Проводящая матрица	Лимитирующая стадия	$k_s$ , см/с	$k_{\text{взаим}}$ , (см <sup>3</sup> /(Г·с))
БСА–ФЦ	Поверхностная реакция (адсорбция)	0,45±0,01	51±4
БСА–ФЦ–УНТ	Поверхностная реакция (адсорбция)	0,55±0,01	55±1
ХИТ–ФЦ	Поверхностная реакция (адсорбция)	0,44±0,02	52±3
ХИТ–ФЦ–УНТ	Поверхностная реакция (адсорбция)	0,55±0,03	57±2

Наибольшая скорость электродного обмена достигается при использовании матриц на основе БСА, модифицированного ферроценом. Следует отметить, что при модификации матриц наноматериалами предполагается увеличение скорости переноса электрона на электрод, а следовательно, увеличение гетерогенной константы скорости переноса электронов, что подтверждается полученными результатами. Предположительно это происходит за счет увеличения общей проводимости геля, в частности увеличивается эффективность прыжковой составляющей переноса электронов. Константы скорости взаимодействия клеток бактерий с ковалентно связанным медиатором при добавлении углеродных нанотрубок увеличиваются в пределах доверительного интервала. В целом константы скорости взаимодействия ковалентно связанных медиаторов с бактериями  $P. \text{уе}i$  выше, чем при использовании немодифицированных медиаторов.



Особенности электрохимических свойств редокс-активных полимеров на основе ферроцена были исследованы методом импедансной спектроскопии. При измерении импедансных характеристик систем получали частотные зависимости реальной и мнимой составляющих импеданса, представленные в виде диаграмм Найквиста (рис. 156).

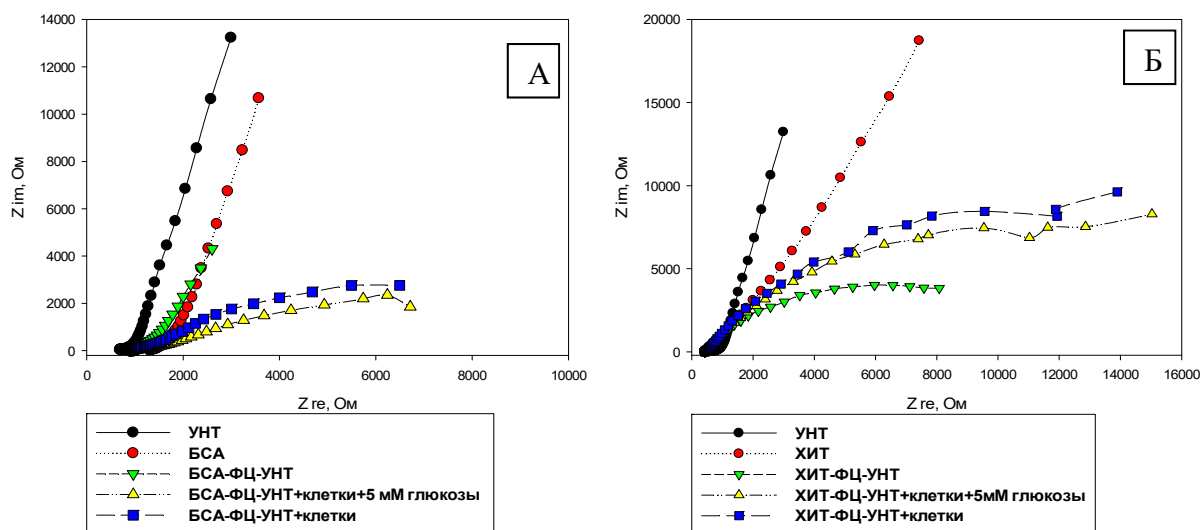


Рис. 156. Импедансная спектроскопия исследуемых матриц: А – диаграммы, соответствующие электроду, модифицированному матрицей БСА; Б – диаграммы, соответствующие электроду, модифицированному матрицей хитозана.

Следует отметить, что модификация графито-пастового электрода матрицей ХИТ–ФЦ–УНТ значительно снижает сопротивление переноса заряда, в то время как при модификации электрода композитом сопротивление переноса заряда электрода уменьшается незначительно. Это может быть связано с тем, что матрица с хитозаном более эффективно взаимодействует с электродом и углеродными нанотрубками, создавая большую площадь контакта и обеспечивая более легкое протекание электрического тока по проводящим каналам. В то же время стоит отметить, что при модификации электрода с матрицей ХИТ–ФЦ–УНТ бактериальными клетками наблюдается заметное увеличение общего сопротивления электрода. Для электродов с матрицей БСА–ФЦ–УНТ виден

противоположный эффект. Можно предположить, что матрица БСА–ФЦ–УНТ лучше взаимодействует с бактериальными клетками и обеспечивает более надежный электронный перенос от клеток к поверхности электрода за счет наличия большего количества сшитых ферроценовых групп (в соответствии с результатами атомно-абсорбционной спектроскопии определения содержания железа в модифицированном БСА его почти в два раза больше, чем в модифицированном хитозане). Стоит отметить, что после добавления субстрата в ячейку наблюдалось снижение общего сопротивления электродов на основе обоих типов матриц (с 7520 Ом до 6950 Ом в случае использования БСА–ФЦ–УНТ и с 14825 Ом до 13923 Ом в случае использования редокс-активного полимера ХИТ–ФЦ–УНТ). Также при использовании модифицированного полимера ХИТ–ФЦ–УНТ на диаграммах Найквиста в области высоких частот наблюдается изгиб, который можно связать с наличием элемента Варбурга. Это говорит о наличии в системе незначительных диффузионных ограничений, которые практически полностью отсутствуют при использовании матрицы на основе БСА–ФЦ–УНТ.

Таким образом, по результатам изучения полученных полимеров методами циклической вольтамперометрии и импедансной спектроскопии можно заключить, что лучшая проводимость достигается при использовании систем ХИТ–ФЦ–УНТ и БСА–ФЦ–УНТ, поэтому эти матрицы наиболее перспективны для создания БПК-биосенсоров.

### ***3.5.3. Сравнительный анализ характеристик БПК-биосенсоров на основе созданных редокс-активных полимеров***

Для разработки биоаналитических систем на основе редокс-полимеров находили такие параметры формирования электродов, которые обеспечат максимальную чувствительность анализа БПК<sub>5</sub>. Выявление оптимального удельного содержания микроорганизмов, УНТ и количества матрицы

производили по анализу зависимостей ответов биосенсора на раствор ГГС от значения варьируемого параметра (рис. 157–159).

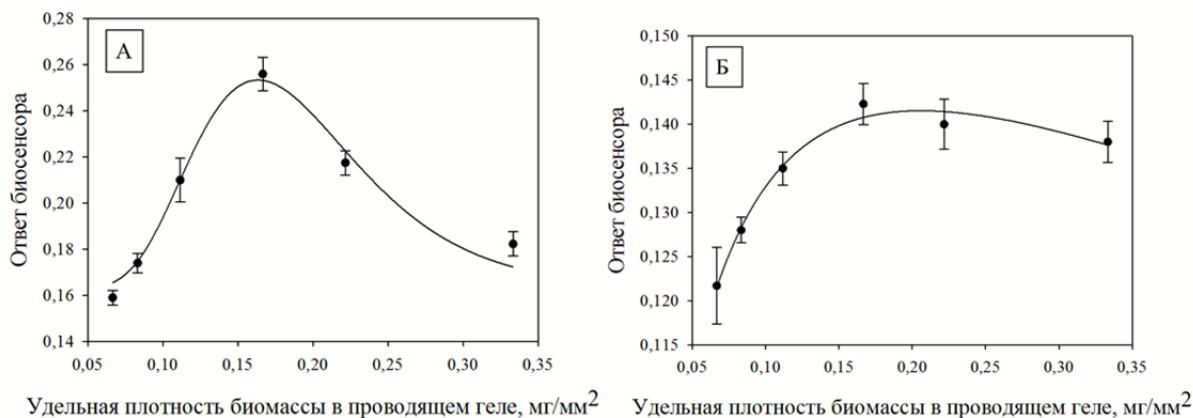


Рис. 157. Зависимость ответа созданных БПК-биосенсоров от удельного содержания биоматериала: А – гель БСА–ФЦ–УНТ; Б – гель ХИТ–ФЦ–УНТ.

Разработанные биосенсоры обладают наибольшей чувствительностью определения БПК при удельном содержании микроорганизмов около 0,16 мг/мм<sup>2</sup>. Повышение содержания клеток способствует осложнению диффузии исходных субстратов и продуктов реакции в биокаталитическом слое, что уменьшает аналитический сигнал.

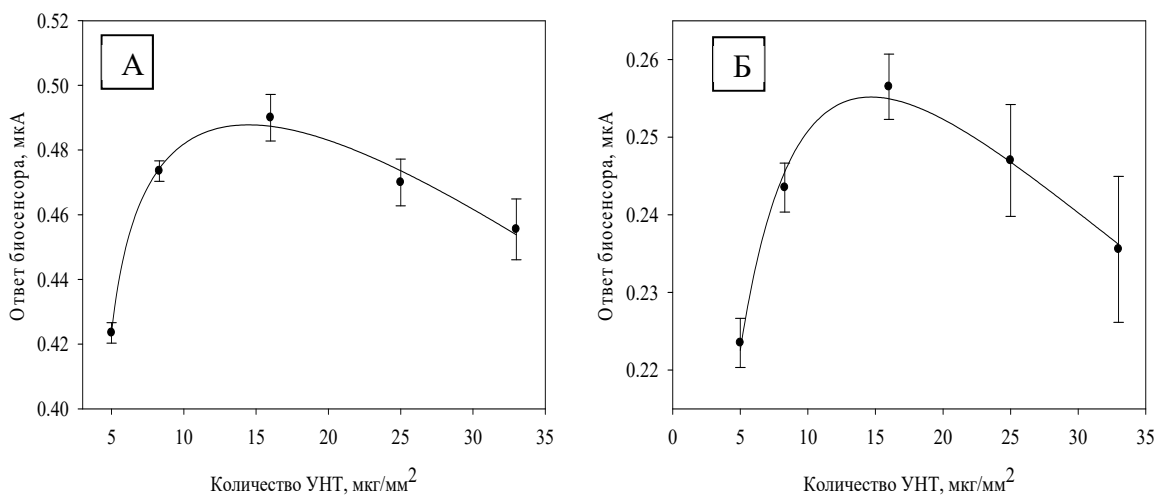


Рис. 158. Влияние количества УНТ на величину генерируемого ответа биосенсора. Использование проводящей системы на основе: А – БСА–ФЦ–УНТ; Б – ХИТ–ФЦ–УНТ.

Высокая концентрация УНТ увеличивает генерируемые токи (рис. 158), а следовательно, и аналитический сигнал, однако при высоких содержаниях УНТ могут разрушаться клеточные мембраны [319]. Таким образом, созданные сенсоры характеризуются наибольшей чувствительностью при содержании УНТ 16 мкг/мм<sup>2</sup>.

Для формирования рецепторной системы выбирали массовую концентрацию редокс-активного полимера на основе ковалентно связанного медиатора: чем выше исходная концентрация модифицированной матрицы, тем выше концентрация медиатора в системе. Для выявления оптимальной концентрации матрицы брали 1–20% (масс.) исходных редокс-активных полимеров на основе медиатора на одно и то же содержание glutaraldehyde (рис. 159).

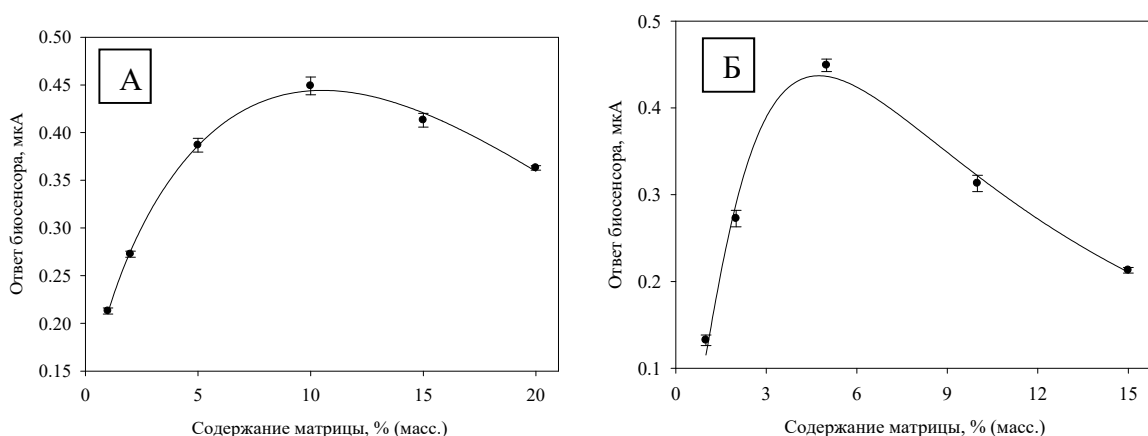


Рис. 159. Влияние содержания матрицы на величину генерируемого ответа биосенсора. Проводящая система на основе: А – БСА–ФЦ–УНТ; Б – ХИТ–ФЦ–УНТ.

Из данных, приведенных на рисунке 161, видно, что с увеличением содержания матрицы выше определенных значений ответ сенсора снижался. На основе этих данных были выбраны следующие оптимальные концентрации матриц: БСА–ФЦ–УНТ – 10%, ХИТ–ФЦ–УНТ – 5%. Дальнейшую работу выполняли с использованием электродов с оптимальными параметрами.

Для созданных биосенсоров на основе редокс-активных полимеров были построены градуировочные зависимости от БПК<sub>5</sub> (рис. 160).

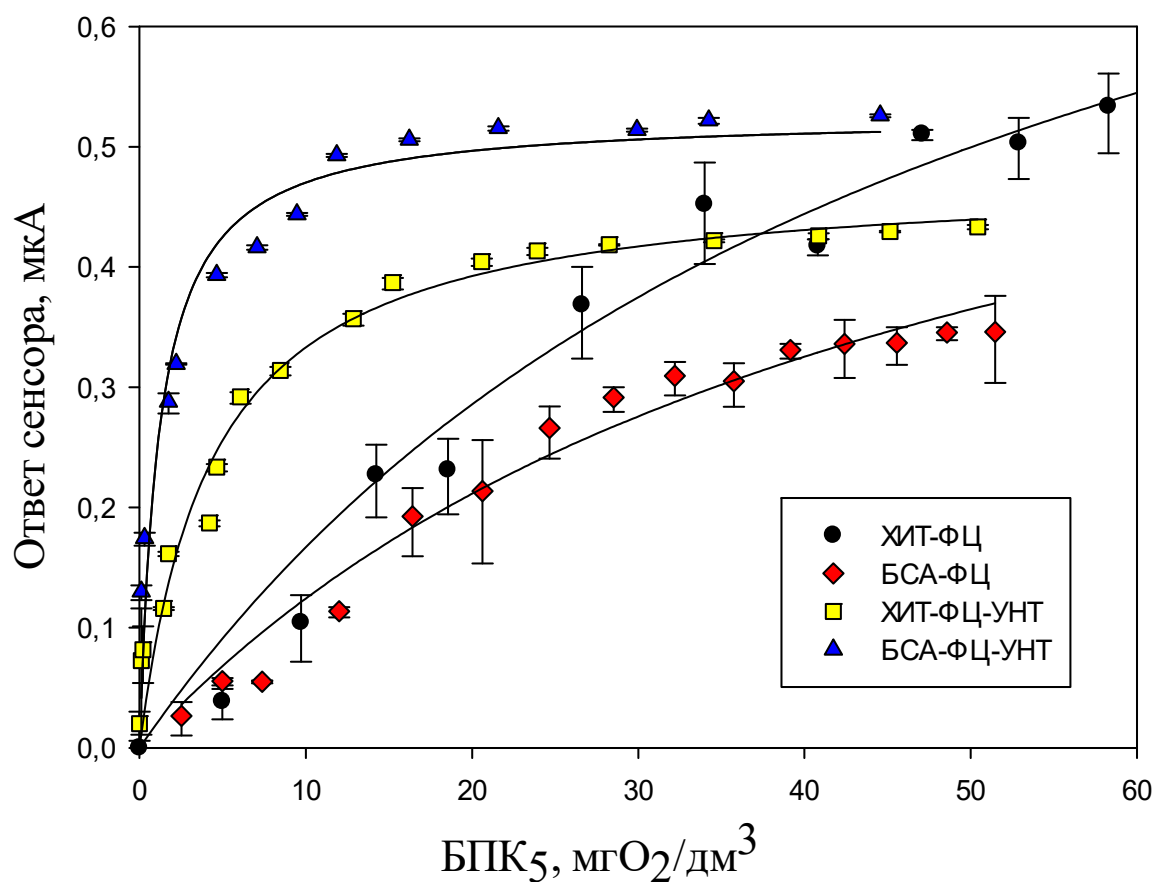


Рис. 160. Градуировочные зависимости ответа микробных медиаторных биосенсоров на основе *P. yeii* и редокс-активных гидрогелей от БПК<sub>5</sub> в анализируемой пробе.

Для аппроксимации градуировочных зависимостей применяли уравнение типа Михаэлиса – Ментен (уравнение 3) (таблица 45).

Таблица 45. Параметры аппроксимирующего гиперболического уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	$K'_M$ , мг/дм <sup>3</sup>	$R_{max}$ , мкА	Коэффициент корреляции, R
БСА-ФЦ	47,0±0,4	0,7±0,1	0,9627
БСА-ФЦ-УНТ	2,0±0,2	0,53±0,01	0,9981
Хит-ФЦ	18,9±0,3	1,2±0,2	0,9653
Хит-ФЦ-УНТ	4,5±0,2	0,47±0,01	0,9943

Параметры уравнений прямых ( $y = a + b \times x$ ), которые аппроксимируют линейные участки градуировочных зависимостей (рис. 161) приведены в таблице 46.

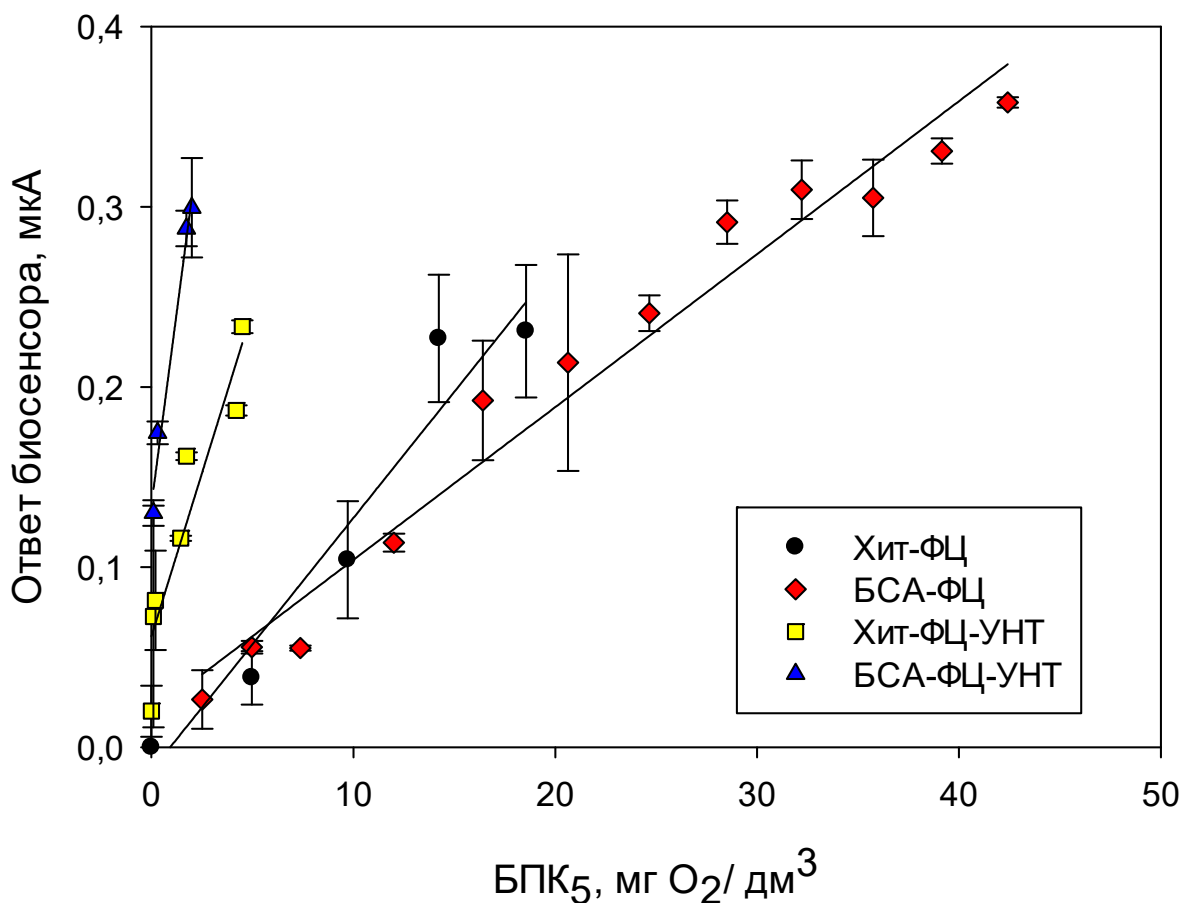


Рис. 161. Линейные участки градуировочных зависимостей для созданных биосенсоров с редокс-полимерами.

Таблица 46. Параметры аппроксимирующего линейного уравнения для созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	$b$ , нА·дм <sup>3</sup> /мг O <sub>2</sub>	$a$ , мкА	Коэффициент корреляции, R
БСА–ФЦ	8,2±0,5	0,01±0,03	0,9739
БСА–ФЦ–УНТ	112±2	0,1±0,1	0,9786
Хит–ФЦ	11,7±0,4	-0,013±0,003	0,9708
Хит–ФЦ–УНТ	110±2	0,06±0,02	0,9540

Значения коэффициентов корреляции больше 0,95 для всех созданных сенсоров говорят о достоверности выбора линейного участка. Для сравнения возможностей биосенсоров по анализу низких значений БПК использовали коэффициент чувствительности. Таким образом, из таблицы видно, что наибольшей чувствительностью характеризуется биосенсор на основе бактерий *P. uvei* и матриц с УНТ. Для сравнения созданных биоэлектродов кроме коэффициента чувствительности сопоставляли их пределы обнаружения БПК и нижние границы анализируемых значений БПК (таблица 47).

Таблица 47. Характеристики чувствительности созданных биосенсоров.

Сенсорный элемент	Предел обнаружения, мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	Нижняя граница анализируемых значений БПК <sub>5</sub> , мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>
БСА–ФЦ	1,1	2,5
БСА–ФЦ–УНТ	0,04	0,1
Хит–ФЦ	1,3	2,5
Хит–ФЦ–УНТ	0,04	0,1

Наименьшей нижней границей анализа БПК<sub>5</sub> характеризуются биосенсоры на основе матриц с УНТ. На следующем этапе работы определяли стабильность биосенсоров на основе созданных биоэлектродов. Графики долговременной стабильности приведены на рисунке 162. Полученные результаты представлены в таблице 48.

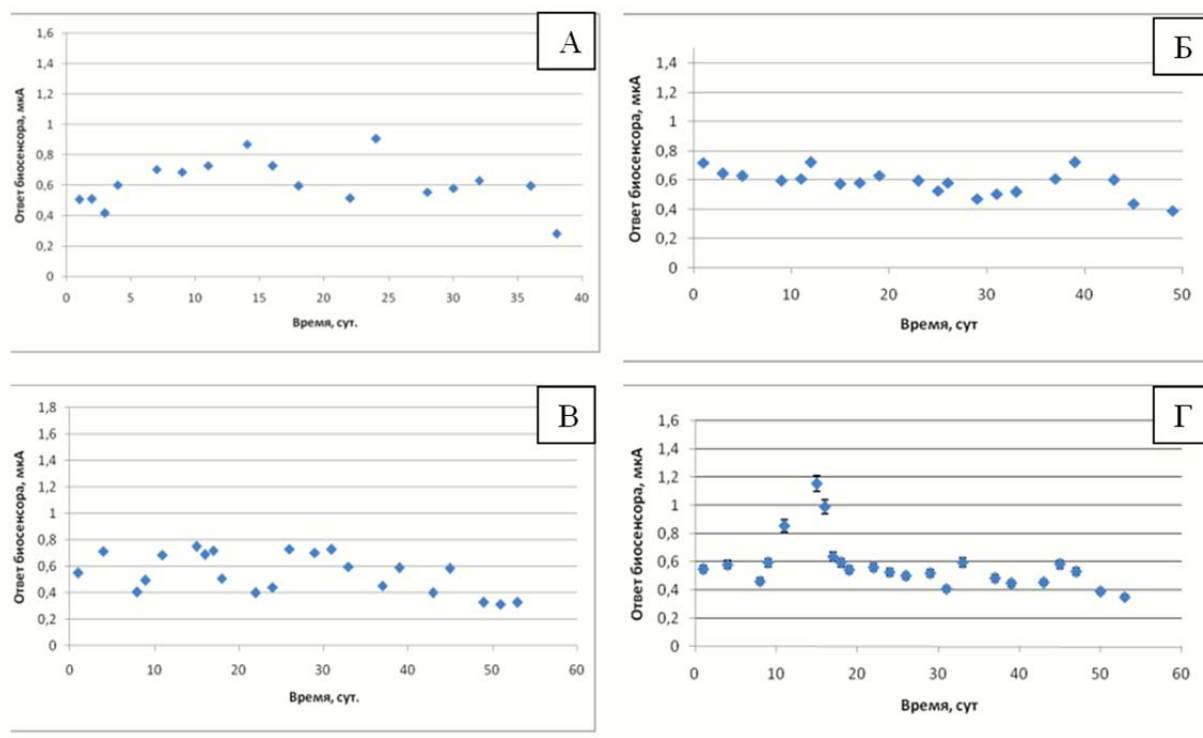


Рис. 162. Долговременная стабильность биосенсора на основе редокс-активного гидрогеля: А – БСА–ФЦ; Б – БСА–ФЦ–УНТ; В – Хит–ФЦ; Г – Хит–ФЦ–УНТ.

Таким образом, использование редокс-активного гидрогеля позволяет существенно повысить долговременную стабильность за счет предотвращения десорбции медиатора с поверхности электрода. Лучшей долговременной стабильностью обладают биосенсоры на основе гелей хитозана, ковалентно связанного с ферроценом.



Таблица 48. Стабильность созданных БПК-биосенсоров.

Сенсорный элемент	Стандартное отклонение S, мкА (n=15, P=0,95)	Относительное стандартное отклонение, % (n=15, P=0,95)	Время стабильной работы, сут.
БСА-ФЦ	0,0285	5,7	38
БСА-ФЦ-УНТ	0,0354	5,9	45
Хит-ФЦ	0,0264	6,6	49
Хит-ФЦ-УНТ	0,049	5,0	50

Таким образом, ответы биосенсоров на основе созданных биоаналитических систем устойчивы на протяжении 15 измерений.

Таблица 49. Характеристики экспрессности разработанных биосенсоров.

Сенсорный элемент	Время отклика, мин	Время промывки системы, мин	Время анализа, мин
БСА-ФЦ	1-2	3-8	4-10
БСА-ФЦ-УНТ	1-2	3-8	4-10
Хит-ФЦ	1-2	3-8	4-10
Хит-ФЦ-УНТ	1-2	3-8	4-10

Таким образом, созданные биосенсоры характеризуются одинаковой экспрессностью (таблица 49). В таблице 50 приведены основные характеристики созданных биосенсоров с редокс-активными полимерами.

Таблица 50. Характеристики разработанных медиаторных биосенсоров.

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 стабильной работы, сутки	38	49	45	50
Относительное стандартное отклонение, % (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 при использовании проводящего гидрогеля оказалась выше по сравнению с биосенсором на основе сорбированного медиатора (таблица 37). Это, по-видимому, обусловлено снижением доступности ковалентно связанного медиатора для бактерий. При использовании УНТ чувствительность анализа значительно возрастает, что обусловлено увеличением проводящей способности геля. Использование проводящего гидрогеля также позволяет существенно повысить долговременную стабильность по сравнению с биосенсором на основе медиаторного графито-пастового электрода 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.

Для проведения анализа БПК<sub>5</sub> важно, чтобы биосенсор мог регистрировать окисление широкого спектра органических субстратов, поэтому был исследован спектр детектируемых веществ биосенсоров на основе созданных проводящих систем. На рисунке 163 представлены полученные результаты.

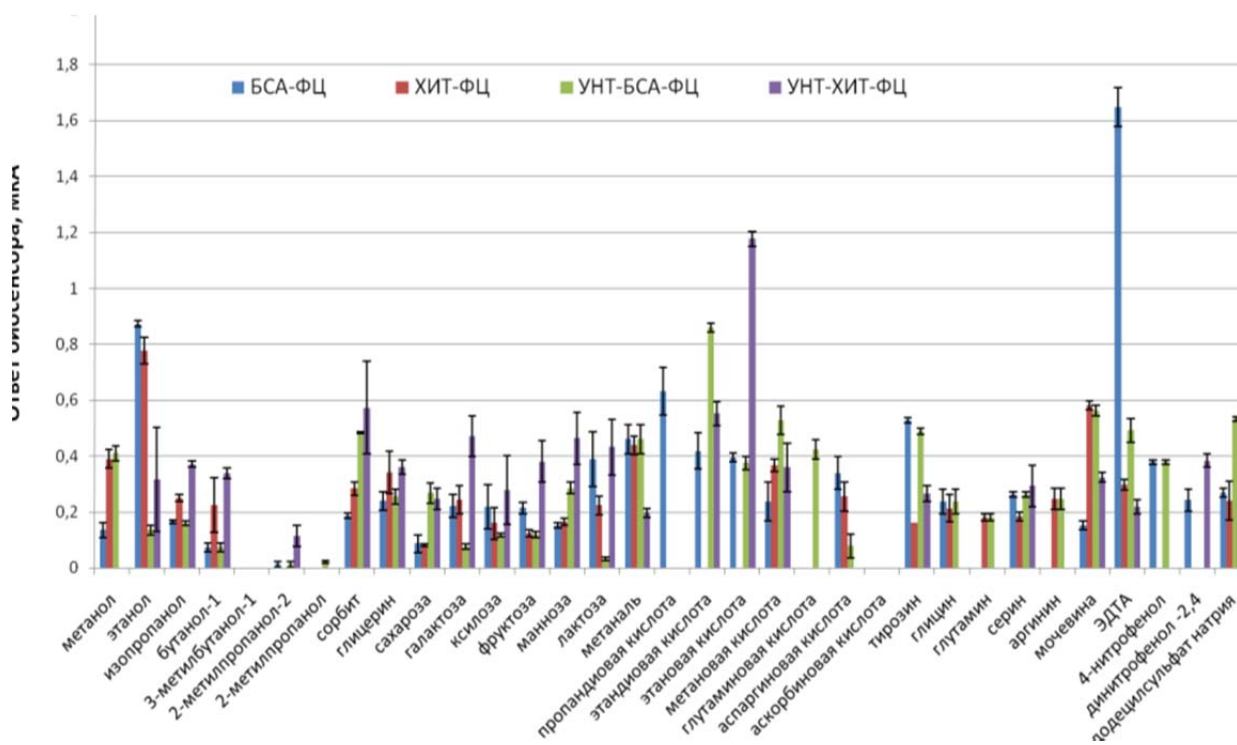


Рис. 163. Профиль детектируемых веществ для биосенсоров с редокс-активными полимерами.

Характер биоразложения органических веществ незначительно изменяется в зависимости от применяемого редокс-полимера. В целом все разработанные биосенсоры позволяют зарегистрировать окисление бактериями *P. yeii* достаточно широкого спектра органических соединений, что обеспечивает правильность результатов анализа БПК<sub>5</sub>.

Таким образом, установлена возможность сопряжения метаболизма бактерий *P. yeii* 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 воды. Пробоотбор и анализ биохимического потребления кислорода методом разбавления выполняли по ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 в аккредитованной лаборатории Центра экспертизы, аттестации и сертификации (ЦЭАС) ТулГУ (г. Тула, Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21АЛ36) [4]. Полученные данные представлены в таблице 51. Корреляция между значениями БПК<sub>5</sub>, полученными методом разбавления и с использованием созданных биосенсоров, представлена на рисунках 164–168.

Таблица 51. Результаты анализа образцов воды.

Анализируемые образцы	Основа биосенсора					БПК <sub>5</sub> станд.
	<i>D. hansenii</i> / кислородный электрод	<i>P. yeii</i> / кислородный электрод	Ассоциация дрожжей (послойно) / кислородный электрод	<i>D. hansenii</i> / ферроцен - метиленовый синий	<i>P. yeii</i> / редокс-активный гель на основе ФЦ и УНТ	
Речная вода, образец №1	0,64±0,06	0,7±0,1	-	-	0,82±0,08	0,8±0,1
Речная вода, образец №2	1,4±0,2	1,6±0,2	1,9±0,1	-	1,4±0,2	1,8±0,3
Вода из пруда, образец №1	1,8±0,1	1,9±0,2	1,9±0,2	-	2,3±0,1	1,9±0,3
Вода из пруда, образец №2	2,9±0,2	2,8±0,3	3,0±0,2	-	2,8±0,5	2,9±0,4
Вода из пруда, образец №3	4,2±0,3	4,8±0,7	4,6±0,4	4,4±0,4	4,7±0,4	4,5±0,6
Болотная вода, образец №1	19±1	15±2	15±2	18±1	16±2	18±3
Болотная вода, образец №2	18±1	22±2	19±3	20±1	23±1	22±3
Стоки после очистных сооружений	3,9±0,3	3,7±0,6	4±1	3,3±0,3	3,1±0,4	3,4±0,6
Талые воды	11,1±0,1	11,2±0,4	12±1	10,5±0,6	11,4±0,8	11±2
Сточные воды, образец №1	53±4	58±9	60±10	66±3	55±4	60±8
Сточные воды, образец №2	170±30	180±20	170±20	190±20	145±25	190±30
Сточные воды, образец №3	260±30	260±30	240±20	210±20	230±60	250±30

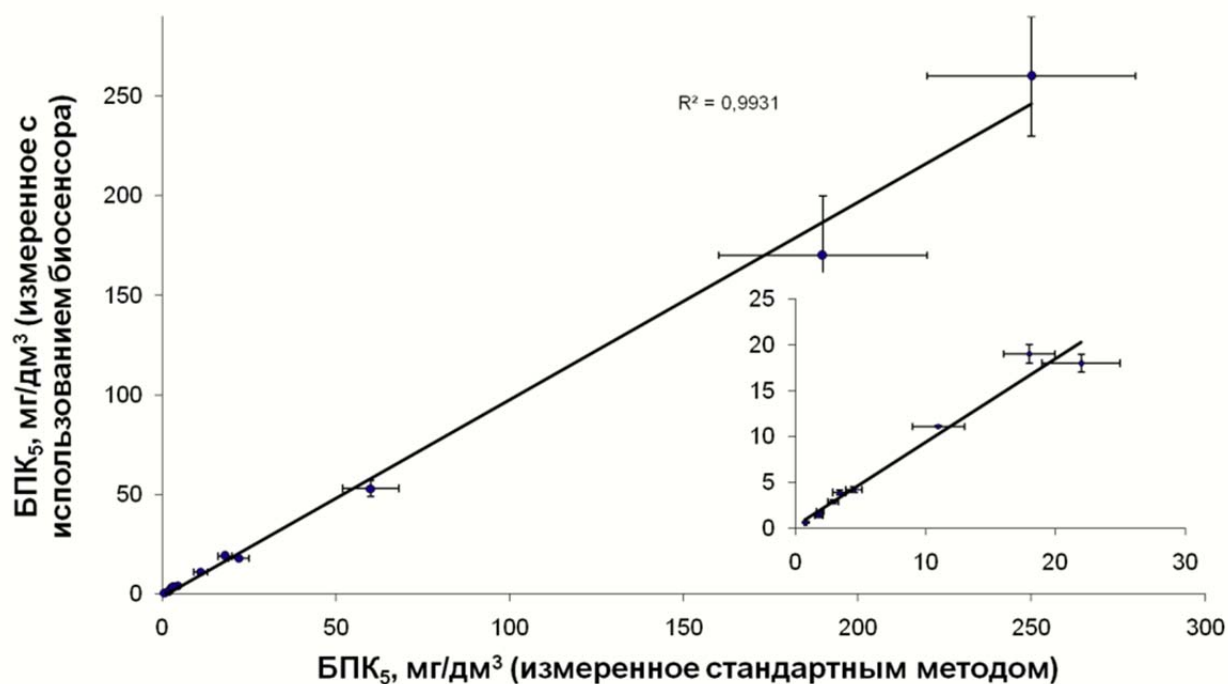


Рис. 164. Корреляция результатов анализа биохимического потребления кислорода для биосенсора на основе *D. hansenii* и кислородного электрода.

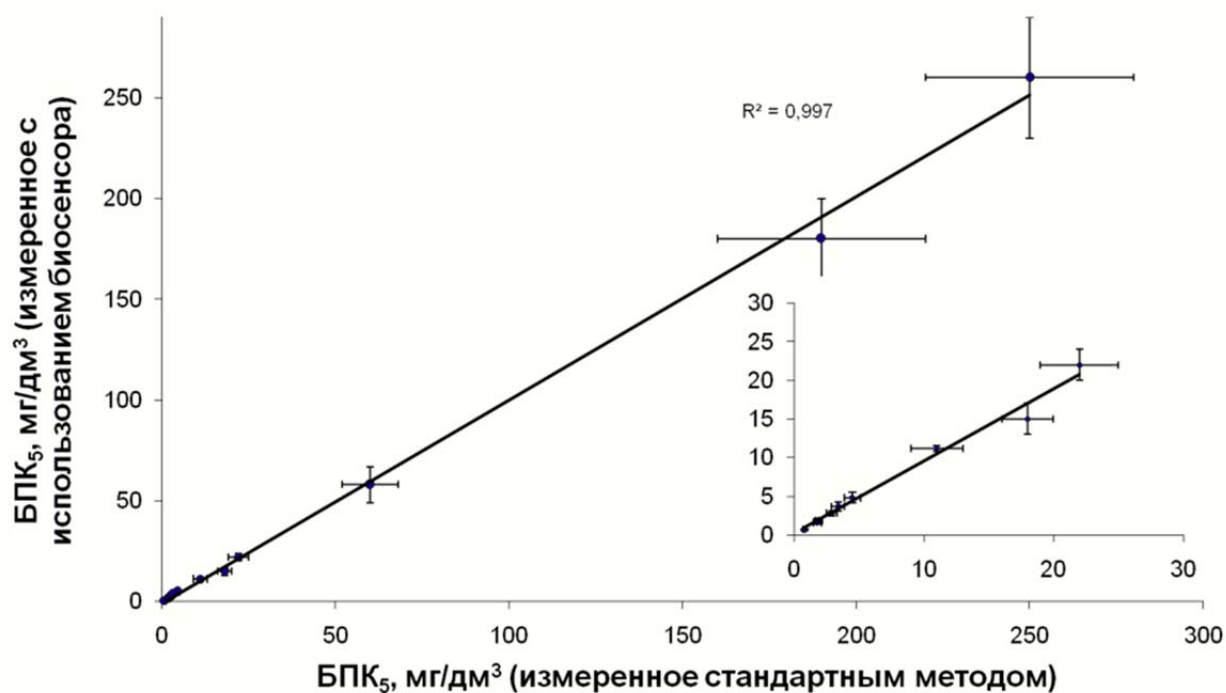


Рис. 165. Корреляция результатов анализа биохимического потребления кислорода для биосенсора на основе *P. yeii* и кислородного электрода.

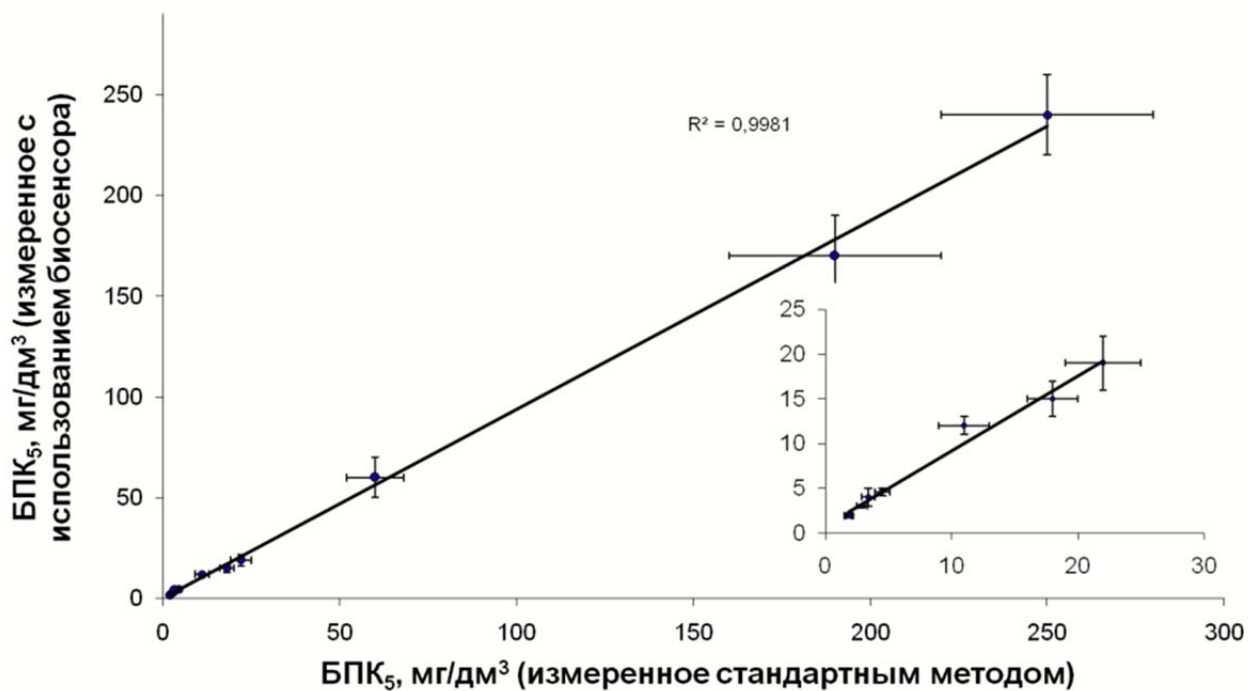


Рис. 166. Корреляция результатов анализа биохимического потребления кислорода для биосенсора на основе ассоциации послойно иммобилизованных дрожжей и кислородного электрода.

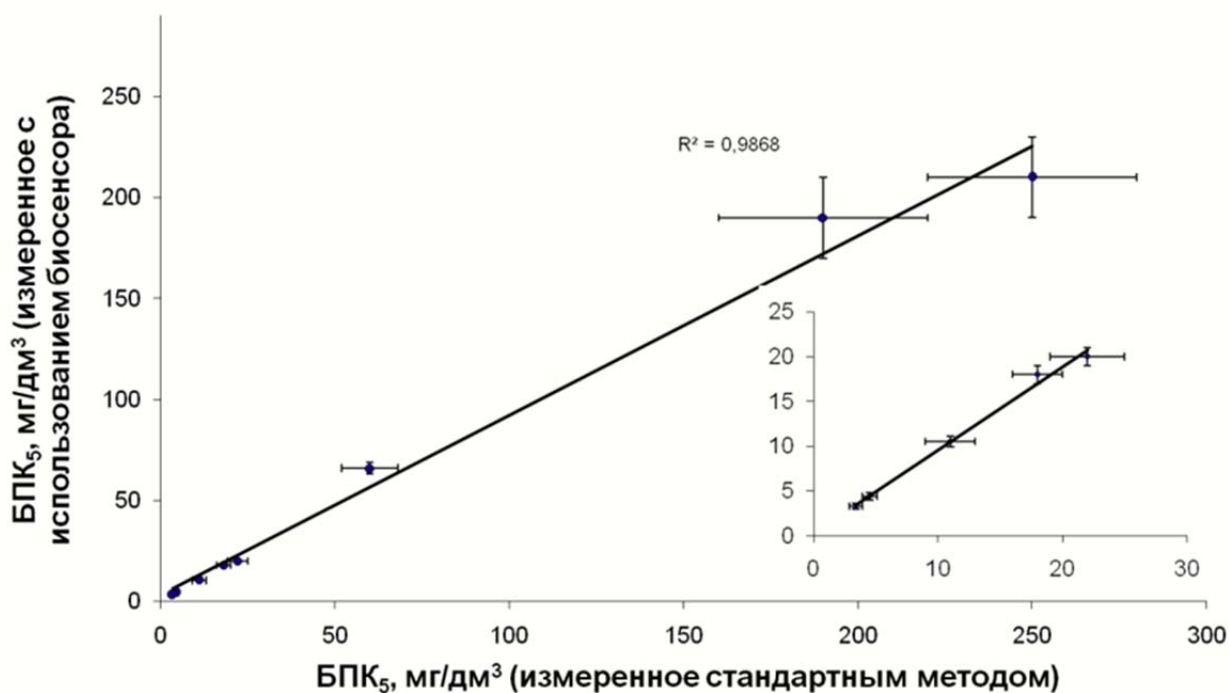


Рис. 167. Корреляция результатов анализа биохимического потребления кислорода для биосенсора на основе *D. hansenii* и двухмедиаторной системы ферроцен – метиленовый синий.



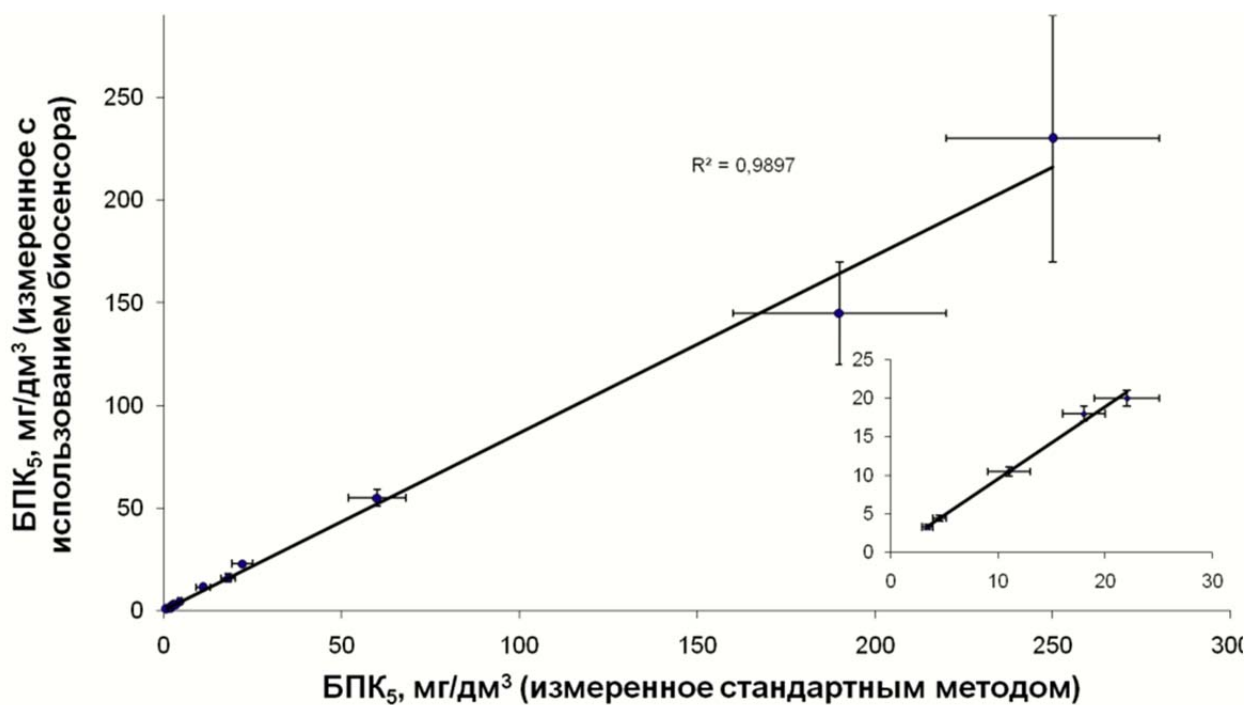


Рис. 168. Корреляция результатов анализа биохимического потребления кислорода для биосенсора на основе *P. yeii* и редокс-активного полимера ферроцен – хитозан – УНТ.

Для анализа полученных данных выполнена их статистическая проверка с использованием стандартных тестов (рис. 169).

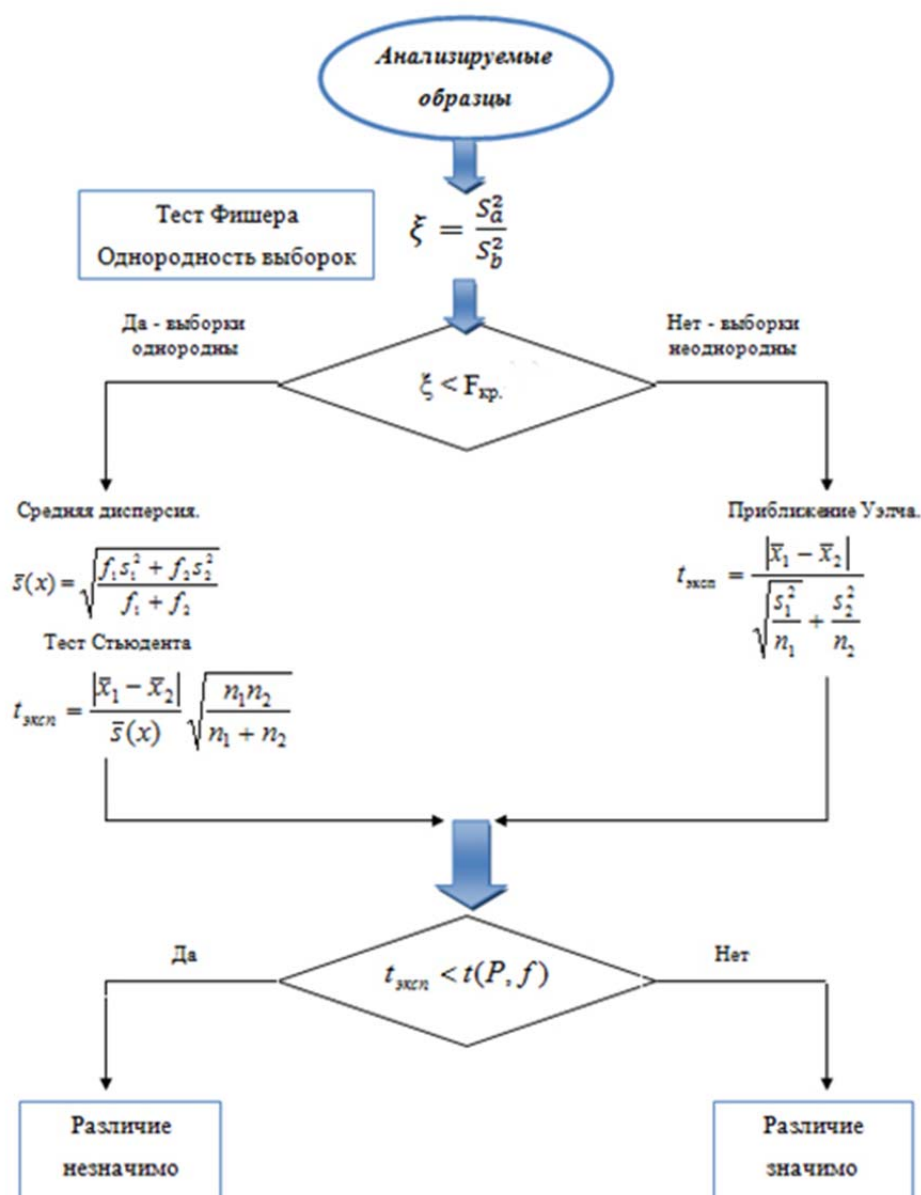


Рис. 169. Алгоритм статистической обработки результатов определения БПК с использованием модифицированного теста Стьюдента.

Полученные результаты БПК для метода разбавления и разработанных биосенсоров различаются незначительно. Таким образом, в результатах экспресс-метода определения БПК отсутствует систематическая погрешность. Сравнение характеристик лучших из разработанных биосенсоров с описанными аналогами представлено в таблице 52.

Таблица 52. Основные параметры созданных БПК-сенсоров и описанных аналогов.

Биоматериал/ иммобилизация	Преобразователь	Диапазон анализиру- емых значений БПК <sub>5</sub> , мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	R <sup>2</sup>	Работа
<i>D. hansenii</i> / включение в полимер ПВХ – N-ВП	Кислородный электрод	0,16–30	0,9931	Данная работа
<i>P. yeai</i> / включение в полимер ПВХ – N-ВП	Кислородный электрод	0,05–5,0	0,9970	Данная работа
Ассоциация дрожжей / послойное включение в полимер ПВХ – N-ВП	Кислородный электрод	0,7–21	0,9981	Данная работа
<i>P. yeai</i> / включение в редокс-активный гидрогель хитозана с УНТ	Медиаторный электрод	0,1–4,5	0,9897	Данная работа
<i>D. hansenii</i> / инкапсуляция диализной мембраной	Медиаторный электрод (ферроцен, метиленовый синий)	2,7–7,2	0,9868	Данная работа
<i>B. subtilis</i> / включение в полипиррольную матрицу с пористым графеном	Медиаторный электрод (гексацианоферрат (III) калия)	4–60	-	[20], 2017
Биопленка на основе сообщества	Микробный биотопливный	20–500	0,9999	[73], 2021

микроорганизмов	элемент			
<i>P. aeruginosa</i> / включение клеток в полипиррол-альгинатную матрицу	Медиаторный электрод (поли(нейтральный красный))	3–100	0,998	[62], 2016
Активный ил / включение в криогель хитозан – бычий сывороточный альбумин	Медиаторный электрод (метиленовый синий+графен)	1–100	-	[26], 2017
<i>S. cerevisiae</i> / включение в гель ПВС – стирилпиридин	Оптический датчик кислорода	1–20	0,99	[35], 2015
<i>E. coli</i> / Коллагеновое волокно с Zr (IV)	Кислородный электрод	до 225	-	[42], 2017
Биопленка/ гидрогель на основе восстановленного оксида графена	Медиаторный электрод (нейтральный красный)	2–64	0,9624	[13], 2015
Биопленка	Микробный биотопливный элемент	до 300	0,9901	[33], 2020

Лучшими из разработанных являются биосенсоры, содержащие иммобилизованные на кислородном датчике дрожжи *D. hansenii* или бактерии *P. yeai*. Основным их преимуществом является возможность определения низких значений БПК. Важно отметить, что созданные анализаторы по своим параметрам, в частности чувствительности, превосходят многие зарубежные аналоги [3, 9, 10]. Область анализируемых созданными сенсорами концентраций соответствует уровню БПК<sub>5</sub> в природных водах, это дает возможность работать с образцами воды без

разбавления и снижает ошибку анализа. Высокие значения  $R^2$  для созданных биологических сенсоров достигаются за счет применения выбранных микроорганизмов, способных к биоразложению большого количества веществ.

Таким образом, эффективность предложенного в работе научно-методологического подхода к формированию биораспознающих элементов БПК-сенсоров подтверждается полученными результатами. Проведенный сравнительный анализ основных параметров микробных амперометрических БПК-биосенсоров на основе индивидуальных культур и ассоциаций микроорганизмов, разных способов иммобилизации и генерации сигнала позволил создать научную базу для разработки коммерческого анализатора БПК.

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

На основе обобщения полученных в работе результатов подготовлено техническое задание на разработку амперометрического биосенсорного анализатора БПК (согласно ГОСТ 15.016–2016). Реализация подготовленного технического задания произведена одним из крупнейших российских производителей лабораторного оборудования ООО «Эконикс-Эксперт».

Результаты работы, положенные в основу создания коммерческого биосенсорного анализатора БПК «Эксперт-009»:

1. Выбранный способ генерации сигнала амперометрического БПК-биосенсора. Для создания коммерческого биосенсорного анализатора биохимического потребления кислорода в качестве преобразователя было решено использовать кислородный электрод Кларка. Такой способ генерации сигнала позволяет анализировать более низкие значения  $BPK_5$  (от  $0,05 \text{ мгО}_2/\text{дм}^3$ ) и позволяет добиться более высокой

корреляции между значениями БПК<sub>5</sub>, полученными методом разбавления и с использованием биосенсора. Еще одним важным преимуществом такого подхода является более низкая стоимость аппаратного оформления такого метода по сравнению с использованием медиаторного биоэлектродного катализа, что позволит снизить стоимость конечного продукта и повысить его конкурентоспособность.

2. Выбранный биологический материал для разработки сенсорного элемента БПК-биосенсора. Для создания коммерческого биосенсорного анализатора биохимического потребления кислорода в качестве микроорганизмов было решено использовать осмо- и галотолерантные дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 и выделенные из активного ила бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302. Выбор основан на предложенном научно-методологическом подходе к созданию высокочувствительных и стабильных электрохимических микробных биосенсоров, основанном на сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров. Дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 и бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 характеризуются наиболее широкой субстратной специфичностью, высокой долговременной стабильностью в иммобилизованном виде и высокой чувствительностью к субстратам. При этом в качестве основного биокатализатора в создаваемом анализаторе использованы дрожжи *D. hansenii*, что обусловлено их более высокой устойчивостью к составу исследуемых проб (раздел работы 1.5). Однако в создаваемом анализаторе предусмотрена возможность использования

бактерий *P. yeel* для анализа природных поверхностных вод с низкими значениями БПК<sub>5</sub>.

3. Выбранный способ иммобилизации биологического материала для формирования сенсорного элемента БПК-биосенсора. Для создания коммерческого биосенсорного анализатора БПК было решено использовать включение микробов в гидрогель полученного в работе полимера поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. Разработанная полимерная матрица обеспечивает высокий уровень диффузии субстратов и продуктов реакции, обладает механической прочностью и нерастворима в воде за счет наличия сетчатой структуры. Эти свойства обуславливают широкие перспективы применения гидрогелей на основе синтезированного полимера для иммобилизации дрожжевых и бактериальных микроорганизмов в биотехнологии.

#### ***4.2.1. Основное содержание ТЗ на разработку амперометрического биосенсорного анализатора БПК***

##### **1. Цель выполнения ОКР**

Разработка направлена на создание амперометрического биосенсорного экспресс-анализатора биохимического потребления кислорода. Разработанная технология должна обеспечить возможность серийного выпуска биосенсорных анализаторов БПК с заявленными в ТЗ характеристиками. Внедрение созданных анализаторов даст возможность уменьшить загрязнение водных объектов за счет обеспечения быстрого мониторинга выбросов органических веществ. Созданный анализатор позволит обеспечить возможность внедрения в химические, экологические и биоаналитические лаборатории РФ быстрого, недорого и простого метода оценки БПК.

## **2. Технические требования к изделию**

### **2.1. Состав изделия**

- Конструктивно разрабатываемый амперметрический биосенсорный анализатор биохимического потребления кислорода должен состоять из кислородного датчика с иммобилизованными микроорганизмами и измерительного преобразователя.
- Амперметрический биосенсорный анализатор БПК должен соответствовать требованиям ГОСТ 22729–84 и требованиям настоящего ТЗ.

### **2.2. Требования назначения**

#### **Требования к основным параметрам и характеристикам:**

- Нижний предел измеряемых значений БПК<sub>5</sub>: не более 0,5 мг/дм<sup>3</sup>.
- Верхний предел измеряемых значений БПК<sub>5</sub> с учетом разбавления пробы: не менее 1000 мг/дм<sup>3</sup>.
- Погрешность измерения БПК<sub>5</sub>: не более 15%.
- Время единичного измерения: не более 20 мин.
- Повторяемость анализа БПК<sub>5</sub>: не более 10%.
- Время работы датчика до падения ответов на 25% от исходного значения: не менее 20 суток.
- Коэффициент корреляции ( $R^2$ ) результатов измерения БПК методом с использованием биосенсора и стандартным методом разбавления: не менее 0,98.

### **2.3. Конструктивные требования**

- Разрабатываемый анализатор должен иметь возможность работы в лабораторных и полевых условиях.



- Анализатор должен иметь возможность питания от встроенного аккумулятора. Конструкцией анализатора должна быть предусмотрена индикация заряда аккумулятора.
- Измерительный преобразователь должен иметь жидкокристаллический дисплей для отображения результатов измерения и клавиатуру для управления.
- Дискретность представления результатов измерения БПК<sub>5</sub> на дисплее измерительного преобразователя должна быть не более 0,01.
- Измерительный преобразователь должен иметь интерфейс для подключения к персональному компьютеру.
- В качестве основы датчика анализатора должен быть использован кислородный электрод типа Кларка (платиновый рабочий электрод и хлоридсеребряный электрод сравнения).
- Датчик должен быть укомплектован соединительными кабелями длиной не менее 30 см, заканчивающимися разъемами, согласующимися с соответствующими разъемами на измерительном преобразователе.
- В качестве рецептора в датчике анализатора должны быть использованы микроорганизмы *D. hansenii* ВКМ У-2482 или *P. yeai* ВКМ В-3302, включенные в ПВС, сшитый N-винилпирролидоном с содержанием микроорганизмов 200±10 мг сырой массы клеток на мл исходного полимера.
- Для формирования рецепторного элемента должен быть использован полимер поливинилового спирта (марка 16/1), модифицированного N-винилпирролидоном с мольным соотношением ПВС : N-ВП : инициатор (нитрат аммония церия (IV)) — 160:7:1.
- Для получения рецепторных элементов с максимальной чувствительностью определения БПК синтез используемого

полимера поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном, необходимо проводить при температуре 40°C в атмосфере аргона или азота в течение 3 часов.

- Толщина рецепторного элемента должна быть  $0,20 \pm 0,05$  мм.
- Разрабатываемый датчик анализатора должен иметь возможность фиксации рецепторного элемента на электроде с помощью наворачиваемого на него наконечника.
- Диаметр рецепторного элемента должен соответствовать диаметру используемого кислородного датчика. Закрепление биорецепторного элемента на датчике должно быть плотным и не приводить к механическим повреждениям рецепторного элемента.
- Датчик анализатора должен быть снабжен термометром, позволяющим проводить измерения температуры в интервале от 0 до 50°C.
- Разрабатываемый анализатор должен иметь возможность проведения измерений с использованием системы термостатирования датчика с рецепторным элементом.
- Габаритные размеры анализатора в сборе не более (длина×ширина×высота): 500×500×200 мм.
- Масса анализатора в сборе не более 10 кг.

#### **2.4. Требования живучести и стойкости к внешним воздействиям**

##### **Условия работы анализатора:**

- Внешняя температура: от 5 до 40°C.
- Температура жидкости в измерительной кювете – от 15°C до 25°C при использовании дрожжей *D. hansenii* и от 20°C до 30°C при использовании бактерий *P. yeii*.
- Температура измеряемых проб – от 15 до 30°C.

## **2.5. Требования надежности**

- Анализатор должен быть восстанавливаемым изделием многократного циклического применения. Средняя продолжительность работы – 3000 часов в год, режим эксплуатации – сменный.
- Средний срок службы должен составлять – не менее 10 лет.
- Средняя наработка на отказ должна составлять – не менее 5000 часов.
- Вероятность безотказной работы за время непрерывной работы 8 часов (при доверительной вероятности 0,9) должна составлять не менее 0,96.
- Среднее время восстановления работоспособного состояния должно составлять не более 1 часа.

## **2.6. Требования к эксплуатации, хранению, удобству технического обслуживания и ремонта**

- Разработанный анализатор должен храниться в упаковке без потери работоспособности при температуре от 1°C до 40°C и влажности воздуха при 25°C от 0 до 90%.
- Рецепторные элементы разрабатываемого анализатора должны храниться в отдельной таре из нетоксичного пластика или стекла при температуре от –20°C до 10°C.

## **2.7. Транспортирование**

- Разрабатываемый анализатор должен иметь возможность транспортирования в упаковке без потери работоспособности при температуре от 1°C до 40°C и влажности воздуха при 25°C от 0 до 90%.

- Рецепторные элементы разрабатываемого анализатора должны транспортироваться в отдельной таре из нетоксичного пластика или стекла при температуре от минус 20°С до 10°С.

## **2.8. Требования безопасности**

- Процесс производства разрабатываемого амперометрического биосенсорного анализатора БПК по общим требованиям безопасности должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.3.002–2014.
- Процесс производства разрабатываемого амперометрического биосенсорного анализатора БПК должен соответствовать ГОСТ Р ИСО 14031–2016, ГОСТ 17.1.3.06–82, СП 2.2.2.1327–03 в части соблюдения экологических нормативов.
- В конструкции анализатора не должны использоваться материалы и комплектующие изделия, которые содержат вредные или опасные для окружающей среды компоненты.
- При эксплуатации анализатор не должен быть источником выделений вредных веществ и опасных излучений, загрязняющих окружающую среду.

## **3. Требования к видам обеспечения**

### **3.1 Требования к метрологическому обеспечению**

- Разрабатываемый амперометрический биосенсорный анализатор БПК должен иметь аттестованную методику экспресс-определения БПК в воде.

### **3.2. Требования к математическому, программному и информационно-лингвистическому обеспечению**

- Программное обеспечение разрабатываемого амперометрического биосенсорного анализатора БПК должно иметь следующий минимальный набор функций:
  - фиксация зависимости содержания кислорода от времени и ее графическое отображение;
  - расчет скорости потребления кислорода на определенном временном отрезке;
  - построение в памяти анализатора градуировочной зависимости зафиксированных значений скорости потребления кислорода от БПК;
  - возможность простой корректировки построенной градуировочной зависимости, в том числе изменение углового коэффициента по одной градуировочной точке;
  - расчет БПК по построенной градуировочной зависимости.

### **3.3. Требования к сырью, материалам и КИМП**

- Использование дорогостоящих и труднодоступных материалов, в том числе зарубежного производства, для изготовления создаваемого экспресс-анализатора БПК должно быть минимальным.

## **4. Требования к консервации, упаковке и маркировке**

- Упаковка амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс-определения БПК должна соответствовать ГОСТ 23170–78 и производиться в полиэтиленовом чехле, который помещается в картонную коробку.
- Маркировка амперометрического биосенсорного анализатора

БПК должна находиться в соответствии с ГОСТ 26828–86.

- На амперометрическом биосенсорном анализаторе БПК должен быть нанесен заводской номер прибора, месяц и год выпуска.
- На органы управления анализатора должны быть нанесены надписи, указывающие их назначение.
- Транспортная маркировка наносится согласно ГОСТ 14192–96.

## **5. Специальные требования**

- Исследовательские испытания разрабатываемого анализатора должны проводиться с учетом требований ГОСТ 24026–80.

## **6. Требования к документации**

- Техническая (конструкторская, технологическая, программная, эксплуатационная) документация на разрабатываемый анализатор должна соответствовать требованиям действующих стандартов: единая система программной документации (ЕСПД), единая система конструкторской документации (ЕСКД), единая система технологической документации (ЕСТД).

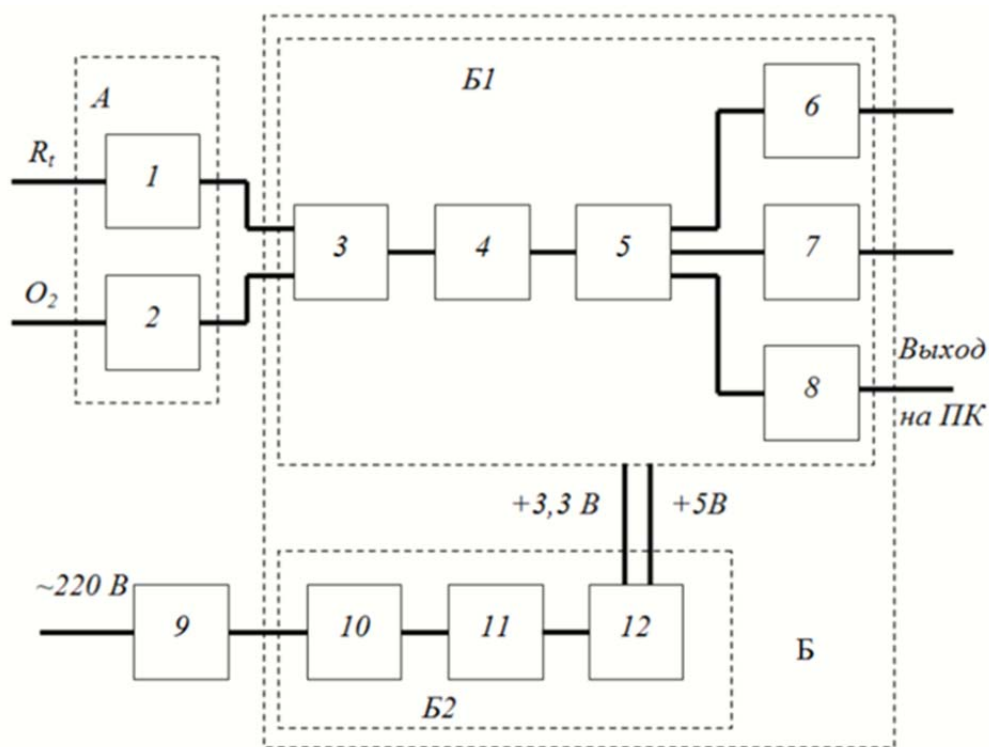
### ***4.2.2. Создание коммерческого биосенсорного анализатора БПК «Эксперт-009»***

Работы по созданию амперометрического биосенсорного анализатора БПК «Эксперт-009» реализованы при выполнении ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение №14.574.21.0062). ФГБОУ ВО ТулГУ выступал в качестве основного исполнителя проекта, а ООО «Эконикс-Эксперт» являлся индустриальным партнером. Предприятием ООО «Эконикс-Эксперт», в соответствии с

требованиями подготовленного ТЗ, разработана структурная схема анализатора, сконструирован датчик с фиксатором рецептора, создана переработанная конструкция измерительного преобразователя, подготовлено ПО анализатора, дающее возможность строить градуировку по растворам ГГС и рассчитывать биохимическое потребление кислорода, создана измерительная кювета с возможностью термостатирования.

Основной задачей при определении биохимического потребления кислорода является измерение падения содержания кислорода, затрачивающегося в ходе ферментативной реакции с иммобилизованными в рецепторном элементе микроорганизмами. Конструктивно биосенсорный анализатор биохимического потребления кислорода состоит из датчика (первичного преобразователя) и измерительного преобразователя. Измерительный преобразователь представляет собой микропроцессорное устройство, которое реализует пользовательские меню различного уровня, определенные сценарии работы и дает возможность отображать результаты измерения на ЖК-дисплее. Созданный анализатор реализует все свои функции без подключения к ПК. Однако для удобства хранения и систематизации результатов большого количества анализов прибор имеет возможность подключения к ПК и снабжен ПО для работы в среде Windows.

Созданный прибор имеет встроенный аккумулятор, что дает возможность избежать потери результатов измерений при внезапном отключении электричества и позволяет выполнять анализы непосредственно на месте отбора проб. Такая особенность анализатора является очень важной, учитывая экспрессность метода определения БПК с использованием биосенсора. Исходя из описанных выше параметров анализатора и требований ТЗ, была подготовлена структурная схема прибора, представленная на рисунке 170.



*А – датчики (первичные преобразователи); Б – измерительный преобразователь : Б1 – схема измерения, Б2 – схема электропитания. 1 – схема измерения температуры; 2 – схема первичного измерителя содержания кислорода; 3 – коммутатор переключения режимов; 4 – аналого-цифровой преобразователь; 5 – микропроцессорная схема; 6 – контроллер дисплея; 7 – блок управления; 8 – схема формирования выходных сигналов; 9 – сетевой адаптер; 10 – схема зарядки аккумулятора; 11 – аккумулятор; 12 – стабилизатор.*

Рис. 170. Структурная схема разработанного экспресс-анализатора БПК.

Датчик измерения кислорода является составным устройством, которое содержит в одном корпусе кислородный электрод и температурный датчик. В качестве температурного датчика использован термометр сопротивления марки Pt1000. Программное обеспечение анализатора производит расчет термокомпенсации при определении показаний кислородного датчика. Специфика БПК-датчика заключается в необходимости размещения на кислородном электроде рецептора с используемыми клетками.

Для поиска наилучшего способа крепления биорецептора к кислородному электроду (байонетное, клипсовое или резьбовое) были созданы различные варианты 3D-моделей модифицированного датчика. По полученным моделям были определены возможные слабые места



конструкций и выявлено, что наиболее надежным вариантом соединения электрода с фиксатором биорецептора будет резьбовое соединение (рис. 171).

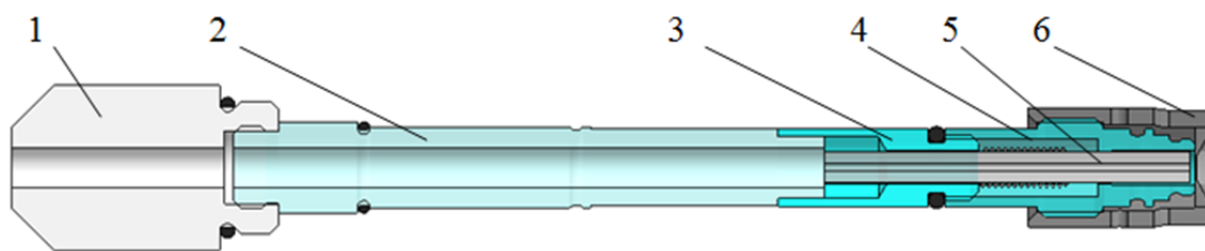


Рис. 171. Созданный модифицированный электрод ДКТП-02.06: 1 – соединение кабеля электрода; 2 – кожух электрода; 3 – вставка для крепления электрохимической системы; 4 – резьба на кожухе электрода; 5 – анод и катод кислородного датчика; 6 – разработанный наконечник для закрепления рецептора.

В качестве катода кислородного датчика использована платиновая проволока, запаянная в стекло. Площадь катода составляет около  $0,2 \text{ мм}^2$ . В качестве анода использован стандартный хлоридсеребряный электрод. Для достижения необходимой точности и чувствительности измерений площадь хлоридсеребряного электрода в тысячу раз больше площади платинового электрода. Анод и катод датчика находятся в растворе электролита и отделены от внешнего пространства полупроницаемой мембраной.

Поскольку рецепторный элемент биосенсора представляет собой тонкую пленку полимера с иммобилизованными микроорганизмами, важно, чтобы он располагался максимально близко к газопроницаемой мембране электрода и при этом контактировал с анализируемым раствором. Как правило, электрод опускается в анализируемый раствор вертикально, то есть рецепторный элемент находится в самом низу. При фиксации рецепторного элемента в таком положении возможен захват пузыря воздуха в момент опускания датчика в раствор, что может привести к значительному искажению результатов анализа. Для снижения вероятности захвата

воздушного пузыря фиксатором рецепторного элемента его внутренние края выполнены скошенными с минимальной толщиной стенки, которая обеспечивает необходимую прочность конструкции. Кроме того, на боковых частях фиксатора выполнены прорезы, соединяющие приэлектродное пространство с анализируемым раствором и дающие возможность воздуху выходить при погружении датчика в анализируемый раствор (рис. 172А).

В целом предложенная конструкция фиксатора рецепторного элемента с резьбовым креплением к электроду является удобной и надежной. Однако жесткая торцевая часть может приводить к механическому повреждению рецепторного элемента и нарушению работы биосенсора. Для более плотной и мягкой фиксации рецепторного элемента на электроде без его возможных повреждений разработан второй вариант фиксатора (рис. 172Б). Использование тонкой ткани из нейлона, зафиксированной на наконечнике электрода с применением резинового кольца, дает возможность фиксировать рецептор без механических повреждений.

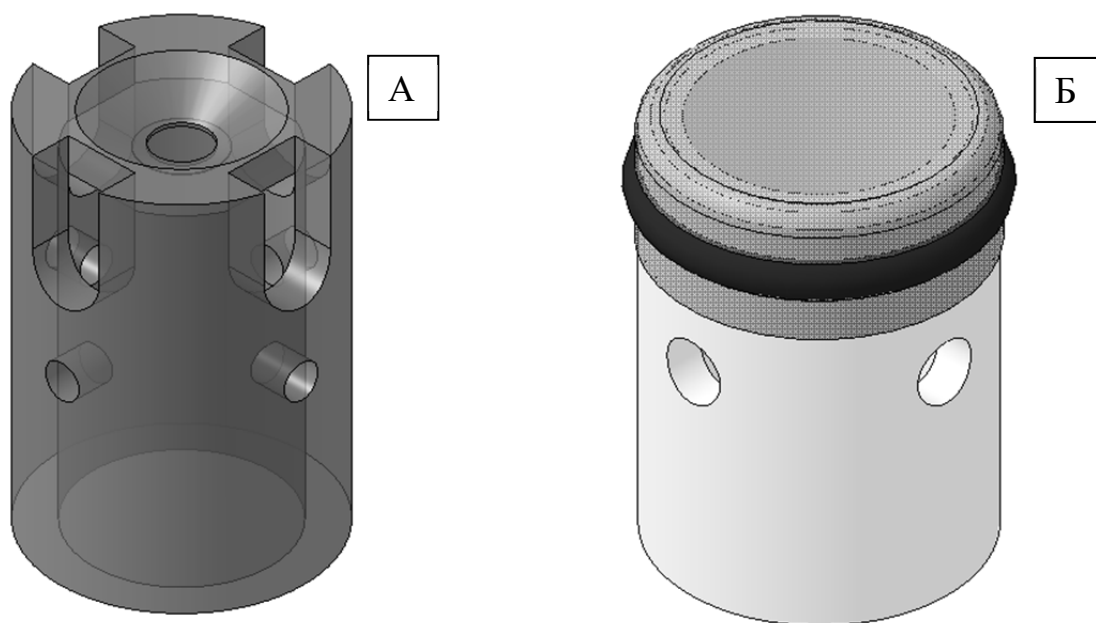


Рис. 172. Наконечник электрода для фиксации рецептора: А – полностью выполненный из пластика; Б – с использованием фиксирующей сетки.

Отличием созданного прибора от стандартных термооксиметров является возможность записи изменения содержания  $O_2$  во времени. При этом в качестве ответа биосенсорной системы используется скорость изменения (первая производная) содержания  $O_2$  от времени. Для выполнения всех измерений используется внутренний процессор анализатора. При проведении анализа на дисплее прибора визуализируется графическая информация о содержании  $O_2$  во времени. Момент ввода пробы (точка начала расчета ответа биосенсора) указывается на полученной графической зависимости автоматически, однако возможна и его корректировка в ручном режиме. Вычисление полученного значения биохимического потребления кислорода происходит после определения момента ввода пробы.

Общая блок-схема работы созданного анализатора в режиме экспресс-анализа БПК представлена на рисунке 173. После выбора режима измерения «Экспресс-БПК» в основном меню созданного прибора производится проверка подключения амперометрического датчика к анализатору. В случае отсутствия датчика отображается сообщение об ошибке, измерение не запускается, и программа возвращается к основному меню.

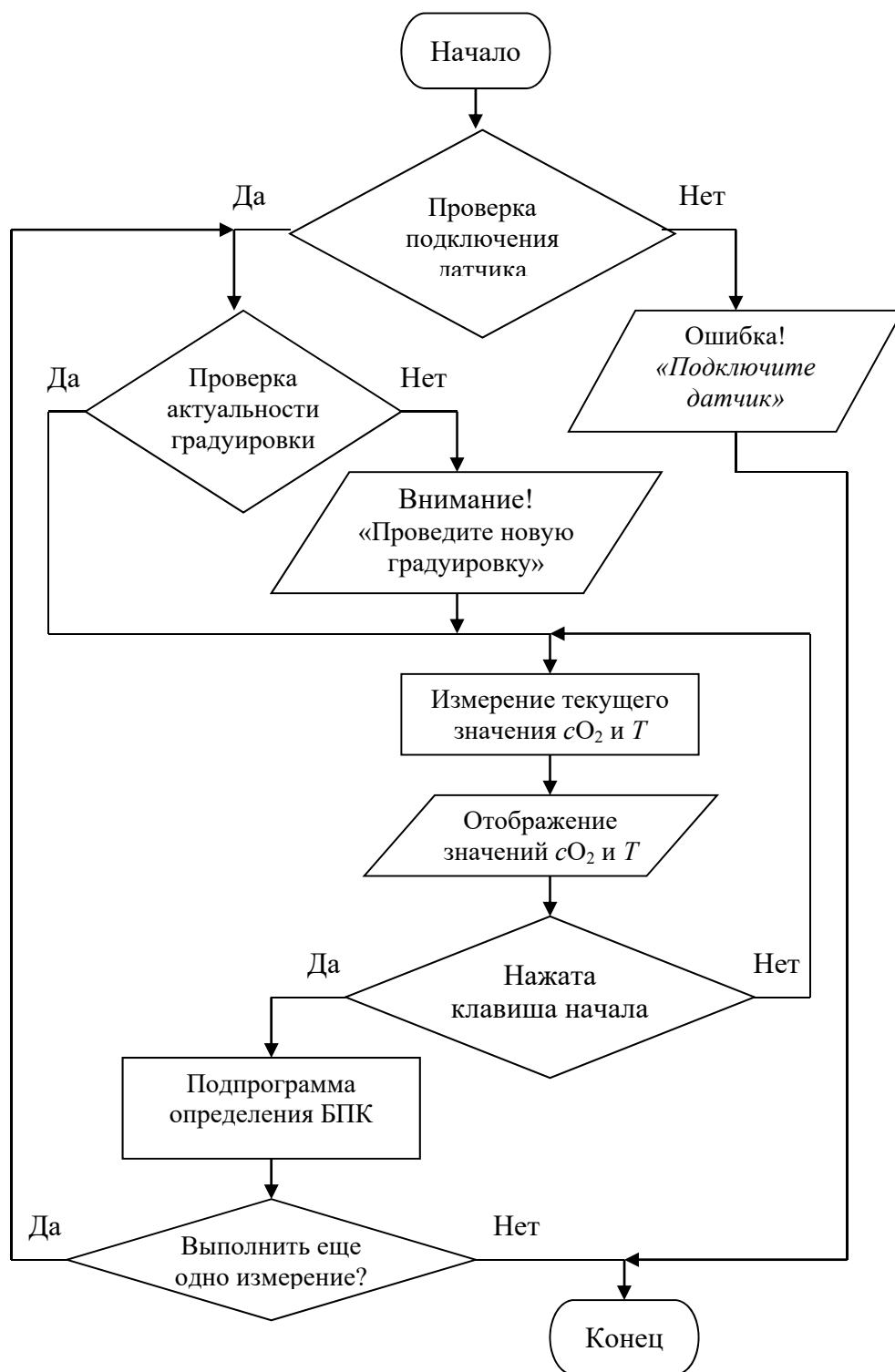


Рис. 173. Блок-схема работы созданного анализатора в режиме измерения «Экспресс-БПК».

При положительном результате проверки подключения датчика производится проверка актуальности сохраненной в анализаторе градуировки. В случае превышения допустимого интервала между

градуировками на дисплее отображается сообщение о необходимости выполнить новую градуировку. Такая функция добавлена по результатам определения долговременной стабильности созданных рецепторных элементов (раздел работы 2.5). Данное сообщение не является препятствием для начала измерения. Однако в этом случае не гарантируется сохранение заявленной погрешности измерения БПК.

При включении режима градуировки на дисплее прибора появляется меню, которое позволяет выполнить новую градуировку или просмотреть существующую. Выполненная градуировка отображается в виде таблицы со значениями БПК и соответствующими им значениями ответа сенсора. Список градуировочных точек можно изменять на усмотрение пользователя. Поскольку свойства биосенсорного элемента изменяются со временем, что является естественным, перед новой серией измерений (например, в начале рабочего дня) необходимо сделать градуировку. Так как зависимость аналитического сигнала от показателя БПК является линейной в известном диапазоне, для коррекции градуировочной зависимости (определения текущего углового коэффициента) достаточно выполнить измерение одного раствора стандарта. Это значительно ускоряет проведение анализа в целом. При этом рекомендуется, чтобы точка коррекции градуировки лежала в интервале от не менее  $\frac{1}{2}$  полной шкалы методики до  $\frac{3}{4}$  этой шкалы, либо в интервале определения БПК однотипных образцов (повышается точность). Поправку градуировочной зависимости можно выполнять и между измерениями, если возникает такая необходимость.

После окончания градуировки пользователь анализатора попадает в цикл подготовки к измерению БПК. Анализатор последовательно измеряет температуру окружающего раствора и содержание в нем кислорода, полученные значения отображаются на дисплее. Далее программа прибора проверяет нажатие клавиши начала измерения БПК. Если данная клавиша не нажата, то процесс измерения температуры и содержания кислорода повторяется. Данный цикл подготовки необходим для выхода

амперометрического биосенсорного датчика на стационарный режим, который будет в дальнейшем являться точкой отсчета при определении ответа биосенсора и вычислении БПК. После нажатия клавиши начала измерения БПК запускается регистрация изменения содержания кислорода во времени и подпрограмма расчета БПК по градуировочной зависимости. После завершения подпрограммы пользователь может выйти из режима измерения БПК, либо выполнить еще одно измерение (рис. 174). В любой момент анализа есть возможность покинуть меню ожидания и расчета БПК. В таком случае на дисплее отображается сообщение о потере данных из-за прерывания измерения. Если пользователь отвечает согласием, программа возвращается в основное меню выбора режима измерения.



Рис. 174. Внешний вид дисплея анализатора при выполнении анализа: А – меню экспресс-определения БПК; Б – вид отклика биосенсорной системы на добавление пробы в измерительную кювету; В – вид дисплея в режиме калибровки БПК; Г – результаты измерения БПК.

В качестве базы для создания амперметрического экспресс-анализатора БПК был использован серийный термооксиметр «Эксперт-001», применяемый в работе на этапе научных исследований. Для выполнения требований подготовленного технического задания потребовалась значительная модификация прибора. В измерительном преобразователе расширен объем памяти, предназначенной для хранения полученных результатов. Для проведения расчетов скорости изменения содержания кислорода в приэлектродном пространстве установлен более производительный процессор. Новый прибор получил коммерческое название «Эксперт-009» (рис. 175).



Рис. 175. Разработанный анализатор «Эксперт-009».

Электрическая схема прибора создана в виде печатной платы, изготавливаемой промышленным способом и помещающейся в стандартный корпус анализаторов жидкости ООО «Эконикс-Эксперт». Используемый жидкокристаллический экран имеет подсветку для работы в любое время суток. Прибор имеет разъемы для подсоединения биосенсорного электрода и подключения к компьютеру. Анализатор снабжен шестнадцатикнопочной клавиатурой, которая успешно используется в других приборах ООО «Эконикс-Эксперт».

При проведении работ по изучению влияния факторов окружающей среды на используемые микроорганизмы (раздел работы 1.5) было выявлено существенное влияние температуры окружающей среды на ответ биосенсора. Для снижения воздействия температуры на метаболическую активность используемых дрожжей и бактерий разработана термостатируемая измерительная кювета (рис. 176).

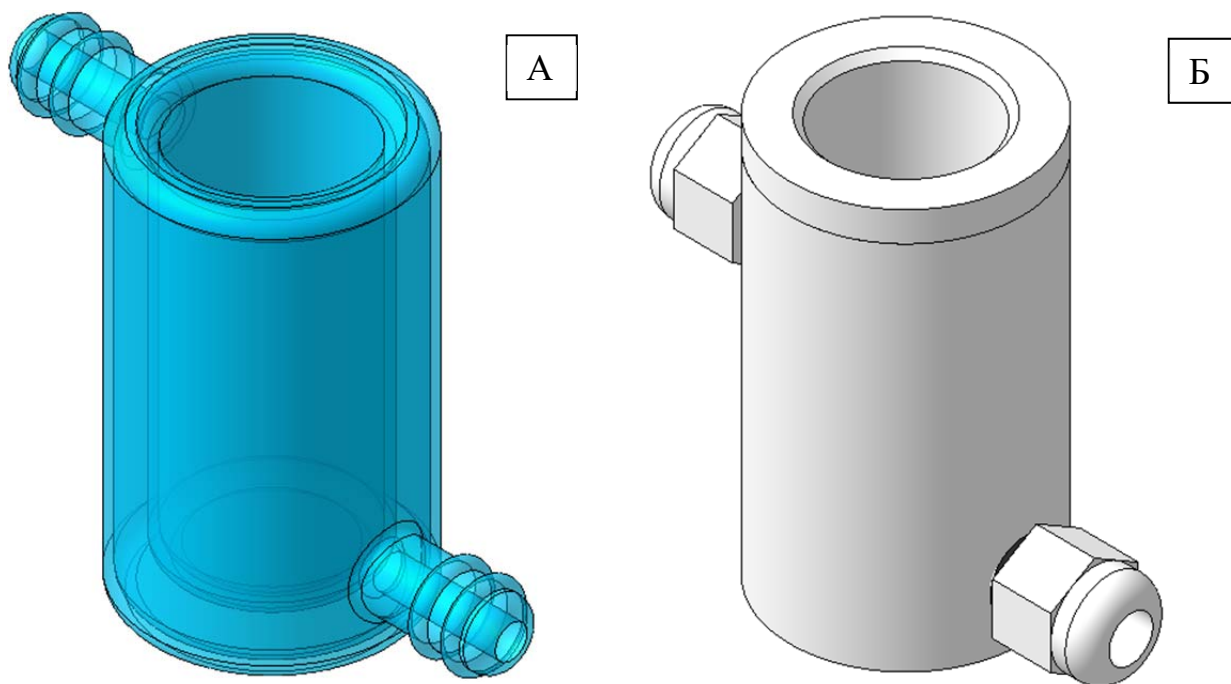


Рис. 176. Термостатируемая измерительная кювета для анализатора «Эксперт-009»: А – выполненная из стекла; Б – выполненная из пластмассы.

Для создания термостатируемой измерительной кюветы использовано стекло. В верхней и нижней частях термостатируемой кюветы находятся



патрубки для подсоединения к термостату. Изделия из стекла обладают хорошей теплопередачей и химической инертностью, однако, имеется и серьезный недостаток – хрупкость. При выполнении измерений в аналитической лаборатории данный недостаток не является серьезным, однако при выполнении полевых измерений целесообразно использовать ячейку с аналогичными габаритами из пластмассы. Наиболее доступным вариантом является оргстекло, однако возможно использование и других материалов, обладающих инертностью к компонентам анализируемой пробы.

В качестве основы биокатализатора в анализаторе используются дрожжи *D. hansenii*, иммобилизованные в химически модифицированный ПВС, что обуславливается их высокой устойчивостью к условиям окружающей среды. Предусмотрена возможность использования других микроорганизмов, в частности, бактерий *P. yeai* в зависимости от типа анализируемых вод. Для получения воспроизводимых рецепторных элементов суспензию микроорганизмов в поливиниловом спирте, модифицированном N-винилпирролидоном, помещали в планшет с плоскими лунками 5 мм диаметром и высушивали при комнатной температуре. Фотография созданных таким образом рецепторов представлена на рисунке 177.



Рис. 177. Фотография рецепторов на основе дрожжей *D. hansenii*, включенных в химически модифицированный ПВС.

Для подготовки выпуска разработанного биосенсорного анализатора БПК и внесения его в реестр средств измерений разработана основная техническая документация на него:

1. Технические условия (ТУ) на прибор;
2. Описание типа средства измерений;
3. Руководство по эксплуатации;
4. Методика поверки прибора.

Для разработанного БПК-термооксиметра «Эксперт-009» утвержден тип средства измерения. Испытания проведены в федеральном бюджетном учреждении «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Московской области» в период с 1 сентября по 11 декабря 2015 года (№ 63403-16 в Госреестре СИ РФ, свидетельство об утверждении СИ RU.C.31.083.A № 61711. Приложение 2). В процессе консультаций со специалистами ФБУ «ЦСМ Московской области» было принято решение утвердить для прибора тип «анализатор растворенного кислорода Эксперт-009» и выполнять поверку анализатора как анализатора растворенного кислорода, а метод измерения экспресс-БПК аттестовать в

качестве методики МВИ. Поверка анализаторов растворенного кислорода проще и намного понятнее для центров стандартизации и метрологии, чем поверка узкоспециализированного анализатора экспресс-БПК. Процесс утверждения типа СИ занимает продолжительное время, что в условиях рыночной экономики может критически сказаться на окупаемости анализатора. Аттестация методики происходит гораздо быстрее, чем утверждение типа СИ, что позволит максимально быстро вывести продукт на рынок. Кроме того, для потребителей удобнее иметь один прибор, способный выполнять несколько функций: экспресс-анализ БПК и определение содержания кислорода.

На основе полученных результатов работы подготовлена «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» (МУ 09–16/001). Данная методика аттестована ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ ГЦГ и ЭФМБА России). Свидетельство об аттестации методики измерений: № 09–16/001.311955.2016 от 30.11.2016 г. Таким образом, сформирована вся нормативная база для использования созданного анализатора в аккредитованных лабораториях РФ.

Согласно аттестованной методике диапазон определения БПК<sub>5</sub> составляет 0,5–1000 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. Для анализа проб с БПК<sub>5</sub> выше 500 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> проводят дополнительные разбавления. Прописанные характеристики показателей точности определения БПК представлены в Приложении 4. Характеристики для анализатора растворенного кислорода «Эксперт-009» приведены в Приложении 3. В приложении 5 представлено полученное свидетельство об аттестации методики измерений МУ 09–16/001.

Кроме существенного сокращения времени анализа еще одним важным преимуществом разработанной методики является значительное упрощение пробоподготовки. В п. 7.8 стандартной методики (ПНД Ф 14.1:2:3.4.123) указан ряд вмещающих факторов, например: наличие осадков примесей, наличие нитритов, рН за пределами значений 7,0–9,0, наличие активного хлора, наличие планктона и водорослей. В разработанном методе в отличие от стандартного время контакта пробы с биоматериалом очень мало (ответ сенсора занимает 30–60 секунд), а используемые дрожжи *D. hansenii* устойчивы к внешним воздействиям. Кроме того, проба при анализе многократно разбавляется буферным раствором, что нивелирует влияние рН образца воды и еще больше снижает возможное негативное влияние примесей.

Таким образом, разработанный анализатор для экспресс-определения БПК полностью соответствует требованиям подготовленного по результатам работы ТЗ. По своим функциональным характеристикам и потребительским свойствам он является конкурентноспособными по сравнению с существующими на рынке зарубежными аналогами. Сравнение полученных результатов с современным научно-техническим уровнем представлено в таблице 53.

Таблица 53. Параметры экспресс-анализаторов БПК, выпускаемых промышленностью.

Марка	Компания производитель, государство	Используемый конструктивный подход	Анализируемые значения БПК, мг/дм <sup>3</sup>	Экспрессность, мин	Ошибка анализа	Масса, кг	Ориентировочная стоимость, \$ США
«QuickBOD α1000»	Central Kagaku Corp., Япония	Биосенсорный тип	5–50	60	5%	16	35 600
Ra-BOD	AppliTek, Бельгия	Биореакторный тип	20–100000	30	<5%	50	55 000
MB-DBO	Biosensores, Испания	Биореакторный тип	10–1000	30	<3%	–	–
HABS-2000	KORBI, Корея	Микробный топливный элемент	0–200	10	5%	120	9 000
Biox-1010	Endress and Hauser, Швейцария	Биореакторный тип	5–100000	3–15	3%	70	25 000
DKK BOD sensor 7842	DKK Corporation, Япония	Биосенсорный тип	0–60	5	10%	–	–
BioMonitor	LAR, США	Биореакторный тип	1–200000	3–4	<5%	70	–
BOD-3000	Central Kagaku Corp., Япония	Биореакторный тип	0–1000	30–60	–	6	–
Эксперт-009	ТулГУ, ООО «Эконикс- Эксперт», Россия	Биосенсорный тип	0,5–1000	5–10	<15%	1,1 (5)	около 700

Как можно видеть из таблицы, в целом характеристики созданного биосенсора близки к характеристикам выпускаемых в мире экспресс-анализаторов БПК. По ряду параметров созданный анализатор превосходит аналоги. Например, используемый конструктивный подход, основанный на создании биосенсора кюветного типа, дает возможность обеспечить портативность и небольшой вес разработанного прибора (1,1 кг – масса прибора с датчиком без штатива и подъемного столика). Это позволяет в перспективе успешно применять созданный экспресс-анализатор БПК для полевых исследований. Вместе с тем необходимо отметить, что многие разработчики коммерческих экспресс-анализаторов не предоставляют в открытом доступе данных по влиянию негативных факторов среды на работу используемых микроорганизмов, а также не указывают уровень корреляции с классическим методом БПК<sub>5</sub>.

На конец 2021 года стоимость продажи созданного анализатора «Эксперт-009» в электрохимическом исполнении составляет около 51 000 руб, что значительно меньше, чем у аналогов. В стоимость не включены необходимые для работы: магнитная мешалка, автоматические дозаторы и термостат, которые, как правило, есть во всех химических лабораториях. При этом, стоимость термооксиметра для анализа БПК по классическому методу «Эксперт-001-БПК» того же изготовителя составляет 54 000 руб и еще дополнительно увеличивается за счет необходимости приобретения набора колб для инкубации проб (около 10 000 руб). В обоих методах предполагается регулярная закупка материалов: реактивов для пробоподготовки в 5-ти суточном методе и биорецепторных элементов в экспресс-методе. Таким образом, себестоимость единичного анализа БПК с использованием разработанного анализатора и аттестованной методики сопоставима с себестоимостью единичного анализа в классическом методе по ПНД Ф 14.1:2:3.4.123-97 с использованием термооксиметра (500 – 700 руб за 1 анализ) при экономии времени анализа в 400 – 500 раз и снижении трудозатрат персонала.

По проведенной совместно соискателем и ООО «Эконикс-Эксперт» оценке объем рынка Российской Федерации составляет величину порядка 12000 – 15000 анализаторов БПК (612 – 765 млн. руб. в ценовом эквиваленте) и включает в себя производственные структуры, использующие воду в технических целях (химические, пищевые, биотехнологические предприятия), водоочистные сооружения и службы занимающиеся экологическим мониторингом. Экономический эффект от внедрения созданных экспресс-анализаторов БПК с аттестованной методикой будет заключаться в повышении эффективности работы и экономической отдачи аналитических лабораторий в Российской Федерации. Общее время анализа образцов проб природных, поверхностных и сточных вод по комплексу химических показателей снизиться с 5 суток (только за счет замены устаревшего метода анализа БПК) до нескольких часов, что позволит повысить число анализируемых проб за единицу времени. Использование простого и надежного экспресс-метода контроля содержания загрязняющих органических веществ в воде позволит быстро выявлять экологически-опасные ситуации реагировать на них, что даст возможность снизить экономические потери при авариях и выбросах неочищенных сточных вод. Долгосрочный социально-экономический эффект от применения разработанных экспресс-анализаторов БПК будет заключаться в улучшении экологической ситуации в стране.

Таким образом, решение всех поставленных в работе задач позволило достигнуть главной цели диссертационного исследования – разработать комплексный научно-методологический подход к формированию амперометрических микробных биосенсоров для экспресс-определения биохимического потребления кислорода и создать на этой базе серийный анализатор БПК.

## 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 5.1. Используемые штаммы микроорганизмов

Индивидуальные культуры микроорганизмов: бактерии: *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280; дрожжи: *Candida boidinii* ВКМ Y-2356, *Candida maltosa* ВКМ Y-2359 и *Candida blankii* ВКМ Y-2675, *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2677, *Saccharomyces bayanus* ВКМ Y-349, *Saccharomyces pastorianus* ВКМ Y-507, *Ogataea angusta* ВКМ Y-1397, *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Ogataea parapolyomorpha* ВКМ Y-2518, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, Y-1585, Y-111, Y-1050 предоставлены ВКМ Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН.

### 5.2. Выделение и идентификация микроорганизмов активного ила

Выделение микроорганизмов проводили на твердой среде Луриа – Бертани. Выделение отдельных колоний проводили по методу Р. Коха. Исследования проводились на базе ВКМ Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН. Выделение и очистку ДНК проводили по методу Уилсона [320] с модификациями. Амплификацию фрагментов генов 16S рРНК проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). С помощью секвенатора 3730 DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США) определяли нуклеотидные последовательности в соответствии с методикой фирмы-производителя. Уровни сходства генов 16S рРНК устанавливали на основе базы данных EzBioCloud. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонировали в международные базы данных (DDBJ/ENA/GenBank).



### 5.3. Культивирование микроорганизмов

Дрожжи: *D. hansenii* ВКМ Y-2482, Y-1585, Y-111, Y-1050, *B. adenivorans* ВКМ Y-2677, *C. boidinii* ВКМ Y-2356, *C. maltosa* ВКМ Y-2359, *C. blankii* ВКМ Y-2675, *S. bayanus* ВКМ Y-349 и *S. pastorianus* ВКМ Y-507 культивировали на богатой минеральной среде состава: глюкоза – 10 г/дм<sup>3</sup>, пептон – 5 г/дм<sup>3</sup>, дрожжевой экстракт – 0,5 г/дм<sup>3</sup> (все ООО «Диаэм», Россия). Время культивирования составляло 18–24 часов, температура 28°C. Дрожжи *Og. angusta* ВКМ Y-1397, *Og. polymorpha* ВКМ Y-2559, *Og. parapolyomorpha* ВКМ Y-2518 культивировали в среде состава: глицерин – 1%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,39%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,25%; микроэлементы – 0,1%; дрожжевой экстракт – 0,05%; MgSO<sub>4</sub> – 0,04%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,09%; лейцин – 0,017% (все ООО «Диаэм», Россия). Время культивирования составляло 36 ч, температура 28°C. Активный ил и выделенные из него микроорганизмы культивировали в среде Луриа – Бергани. Время культивирования составляло 18–20 ч, температура 28°C. Для выращивания бактерий *G. oxydans* использовали среду следующего состава: сорбит – 20%, дрожжевой экстракт – 2% (все ООО «Диаэм», Россия). Время культивирования составляло 16–18 часов, температура 28°C. Для культивирования всех микроорганизмов использовали шейкер–инкубатор ES-20/60 («BioSan», Латвия). Осаждение биомассы всех микроорганизмов проводили центрифугированием при 9000g 15 минут (центрифуга «TG16WS», Поликом LTD, Россия). Для промывки применяли фосфатный буферный раствор (30 мМ, рН 6,8). Биомассу хранили в микропробирках при температуре –10°C.

### 5.4. Определение параметров роста микроорганизмов

Кривые роста микроорганизмов получали, используя среды, описанные в разделе 5.3. Пробы отбирали каждые 2 часа. Оптическую плотность суспензии

определяли с использованием фотометра «Эксперт-003» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия) при длине волны 590 нм (раствор сравнения - дистиллированная вода). Для оценки окислительной активности микроорганизмов на разных фазах роста отбирали пробу культуральной жидкости, биомассу отделяли центрифугированием. Центрифугат промывали фосфатным буфером (30 мМ, рН 6,8). Биомассу иммобилизовали с использованием диализной мембраны.

## **5.5. Иммобилизация биоматериала и формирование биосенсора на основе кислородного электрода**

### ***5.5.1. Иммобилизация микроорганизмов с использованием диализной мембраны***

Биомассу микроорганизмов разбавляли фосфатным буферным раствором (20 мМ, рН 6,8) концентрации 200 мг/мл. Полученную суспензию объемом 5 мкл наносили на диализную мембрану («Roth», Германия) с пределом пропускания 14 кДа и фиксировали на электроде с помощью резинового кольца.

### ***5.5.2. Иммобилизация микроорганизмов адсорбцией на стекловолоконном фильтре***

Биомассу микроорганизмов разбавляли фосфатным буферным раствором (20 мМ, рН 6,8) концентрации 200 мг/мл. Полученную суспензию наносили на стекловолоконный фильтр (Whatman GF/A, Sigma, США) в объеме 5 мкл. Рецепторный элемент размером 3×3 мм подсушивали на воздухе в течение 15 минут при 20<sup>0</sup>С и фиксировали на электроде.

### ***5.5.3. Иммуобилизация микроорганизмов включением в золь-гель ТЭОС***

К 20 мкл 5% раствора ПВС («Ferak Berlin», Германия) прибавляли суспензию микроорганизмов в фосфатном буферном растворе (20 мМ, рН 6,8) и перемешивали в течение 5 минут, добавляли тетраэтоксисилан («Sigma», США) и вновь перемешивали в течение 5 минут. Затем добавляли 5 мкл 0,2 моль/дм<sup>3</sup> раствора NaF, перемешивали 15 минут. Полученную смесь наносили на поверхность диализной мембраны («Roth», Германия), оставляли на сутки для высыхания. Подготовленный рецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода.

### ***5.5.4. Иммуобилизация микроорганизмов включением в гель хитозана***

Растворяли 1,0 г хитозана (SIGMA-ALDRICH, США, M<sub>r</sub> = 200–800 кДа) в 100 мл 1,0%-ной уксусной кислоты и перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре до полного растворения. Для формирования рецепторного элемента к микроорганизмам добавляли 100 мкл раствора хитозана. Полученную суспензию наносили в планшет с плоскими лунками диаметром 5 мм и оставляли до полного высыхания. Подготовленный рецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода.

### ***5.5.5. Иммуобилизация микроорганизмов включением в гель ПВС, сшитого янтарной кислотой***

К 5% раствору поливинилового спирта при температуре 60°C добавляли навеску янтарной кислоты из расчета 0,04 моль ПВС на  $7,5 \cdot 10^{-4}$  моль кислоты [321]. Для получения рецепторного элемента к 100 мкл полученного геля добавляли клетки микроорганизмов и встряхивали в течение 5 минут. Полученную суспензию наносили в планшет с плоскими лунками диаметром 5

мм и оставляли до полного высыхания. Подготовленный рецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода.

#### ***5.5.6. Иммобилизация микроорганизмов включением в поперечно-сшитый бычий сывороточный альбумин***

В химическом стакане растворяли 150 мг БСА (Sigma, США) в 1 мл фосфатного буфера (рН=6,8, 20 мМ). К полученному раствору добавляли микроорганизмы, перемешивали и добавляли 30 мкл 25%-ного глутарового альдегида (Sigma, США). Полученную массу перемешивали еще раз, быстро переносили в чашку Петри и высушивали в течение часа. Из образовавшегося геля вырезали рецепторные элементы диаметром 5 мм. Подготовленный рецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода.

#### ***5.5.7. Иммобилизация микроорганизмов включением в агаровый гель***

Микроорганизмы разбавляли фосфатным буферным раствором (20 мМ, рН=6,8), полученную суспензию смешивали в соотношении 1:7 с 2% агаровым гелем (агар-агар бактериологический, ООО «Диаэм», Россия), нагретым до 50°C. Смесь быстро переносили в чашку Петри, высушивали в течение часа и вырезали фрагмент диаметром 5 мм и толщиной 1 мм. Подготовленный рецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода.

#### ***5.5.8. Иммобилизация микроорганизмов в гидрогель поливинилового спирта, сшитого N-винилпирролидоном***

Модификацию 5% водного раствора ПВС (марка №16/1, Россия) проводили N-винилпирролидоном (99%, ACROSORGANICS, США) в присутствии водного раствора аммоний-церий (IV) нитрата (ТУ 6-09-4762-84, Россия) при температуре 40°C в атмосфере аргона в течение 1–5 часов. Для

получения биорецептора к 100 мкл модифицированного ПВС добавляли 5–60 мг клеток (смешанных в соотношении 1:1:1 для ассоциаций состоящих из 3-х микроорганизмов, и 1:1 для ассоциаций, состоящих из 2-х микроорганизмов). Полученную суспензию наносили в планшет с плоскими лунками диаметром 5 мм и оставляли до полного высыхания. Подготовленный рецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода.

#### ***5.5.9. Послойная иммобилизация микроорганизмов в гидрогель поливинилового спирта, сшитого N-винилпирролидоном***

Для получения послойного биокатализатора к 100 мкл гидрогеля добавляли необходимую массу клеток. Полученную суспензию наносили в планшет с плоскими лунками диаметром 5 мм и оставляли на 2 часа. Далее аналогично готовили гидрогель с другими микроорганизмами и наносили полученную суспензию вторым слоем. После нанесения трех слоев геля с клетками рецепторный элемент оставляли на воздухе до полного высыхания. Подготовленный рецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода.

#### **5.6. Проведение биосенсорных измерений с использованием кислородного электрода**

В качестве преобразователя использовали анализатор Эксперт-001–4.0.1 («Эконикс-Эксперт», г. Москва) в режиме «термооксиметр», что позволило производить непрерывную регистрацию сигнала (рис. 178). Управление прибором и обработка результатов проводились с помощью программы «EXP2PR» (ООО «Эконикс-Эксперт», г. Москва).

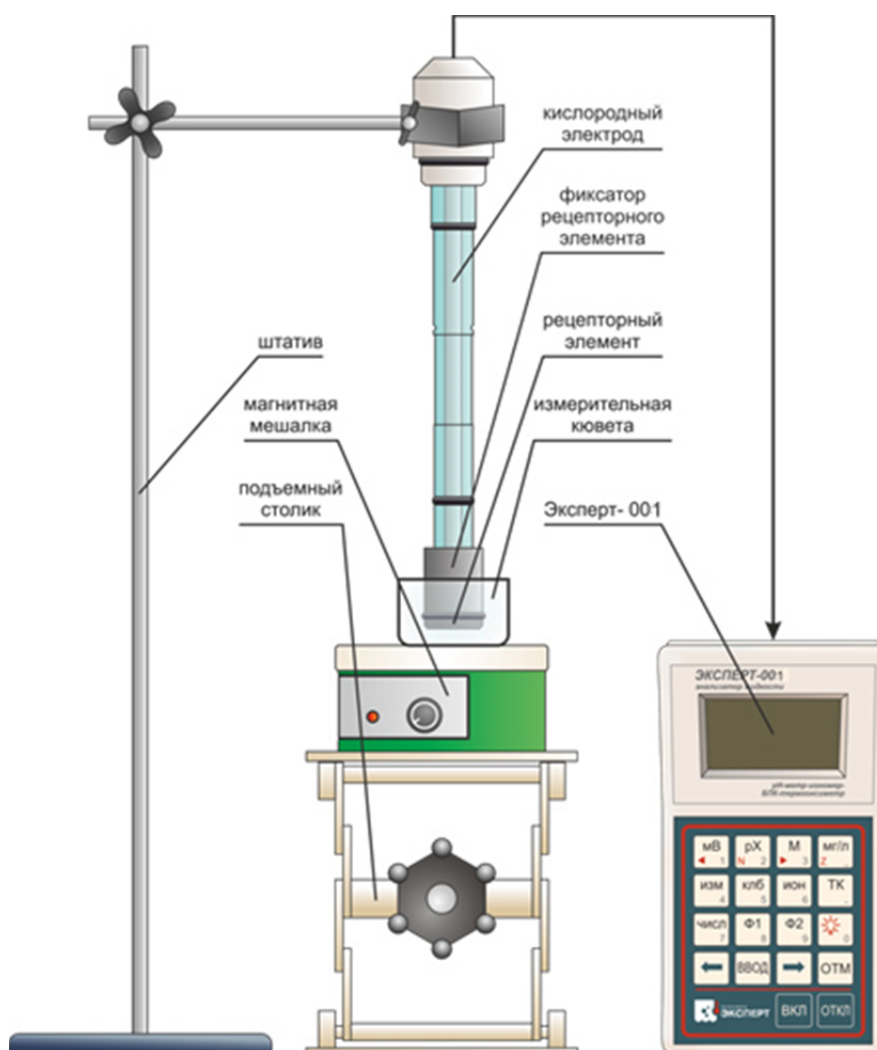


Рис. 178. Схема биосенсора на основе кислородного электрода.

Перед измерением кювету промывали фосфатным буфером (30 мМ, рН = 6,8), после установления стационарного уровня кислорода в кювету добавляли определенный объем пробы с помощью микропипеток. После окончания измерения кювету снова промывали буферным раствором до восстановления начальной концентрации кислорода. Обработка полученных результатов производилась с помощью программы Microsoft Excel. В качестве ответа биосенсора использовали максимальную скорость падения содержания кислорода при добавлении аналита.

## 5.7. Проведение биосенсорных измерений с использованием медиаторного электрода

Графито-пастовые электроды (рис. 179) сделаны путем заполнения пластиковой трубки площадью сечения  $6,3 \text{ мм}^2$  пастой на основе мелкодисперсного графита («Fluka», Германия) и минерального масла («Fluka», Германия) в соотношении 100 мг пудры : 40 мкл масла. Использовались медиаторы ферроценового ряда: ферроцен, ферроценацетонитрил, ферроценкарбоксальдегид, 1,1'-диметилферроцен («Sigma-Aldrich», Германия) и растворимые медиаторы: гексацианоферрат (III) калия, 2,6-дихлорфенолиндофенол, метиленовый синий, нейтральный красный, тионин (ООО «Диаэм», Россия). Электроды на основе ферроцена и его производных формировали введением в состав пасты раствора медиатора в ацетоне. Суспензию микроорганизмов помещали на поверхность электрода, высушивали и закрывали диализной мембраной, как показано на рисунке 179.

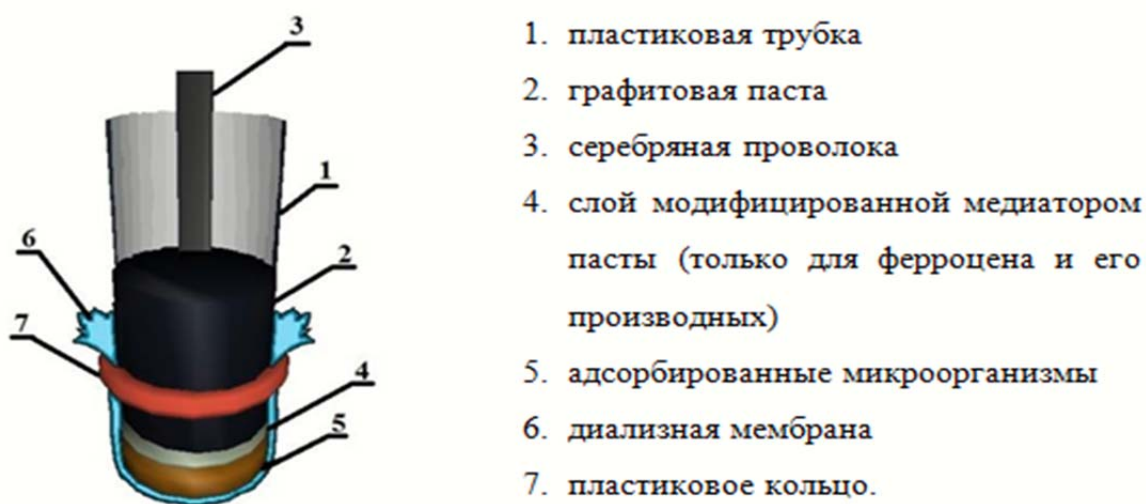


Рис. 179. Устройство используемого медиаторного электрода.

Амперометрические измерения проводили с использованием гальванопотенциостата IPC-micro (Вольта, Россия). Все измерения осуществляли при постоянном потенциале относительно электрода сравнения –

насыщенного Ag/AgCl. За ответ биосенсора принимали изменения силы тока при добавлении в кювету аналита.

## **5.8. Формирование рабочих электродов на основе редокс-активных полимеров**

### ***5.8.1. Синтез редокс-активного полимера на основе БСА и медиатора ферроценкарбоксальдегида и формирование рабочего электрода (БСА-ФЦ)***

Для формирования редокс-активной матрицы 0,5 г БСА растворяли в 5 мл фосфатного буферного раствора. Затем 0,05 г ферроценальдегида растворяли в 5 мл ацетона, смесь приливали к раствору БСА. Полученный раствор доводили до pH=9,3 путем добавления 5% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Реакция продолжалась в течение часа при температуре 30<sup>0</sup>C. После чего добавляли 0,01 г NaBH<sub>4</sub> к смеси. Полученную смесь перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение 10 минут и выдерживали при комнатной температуре в течение 6 часов. pH полученной смеси доводили до значения 6,5 для разложения оставшегося NaBH<sub>4</sub>. Затем pH смеси доводили до pH=8,5 путем добавления 0,1 М раствора NaOH порциями по 20 мкл. Далее смесь центрифугировали (4000 об/мин, 20 мин). Полученный супернатант диализовали фосфатным буферным раствором в течение двух суток при температуре 4<sup>0</sup>C для отделения непрореагировавшего ферроценкарбоксальдегида. Полученный редокс-активный полимер сушили до постоянной массы при температуре 60<sup>0</sup>C.

Для формирования электрода редокс-активный полимер массой 3,5 мг растворяли в 50 мкл фосфатного буфера (pH=6,8), затем добавляли 7,5 мкл глутарового альдегида. На графито-пастовый электрод наносили 10 мкл полученной смеси и оставляли до полного высыхания.



### ***5.8.2. Синтез редокс-активного полимера на основе хитозана и медиатора ферроценкарбоксальдегида и формирование рабочего электрода (ХИТ-ФЦ)***

Для формирования редокс-активной матрицы 0,1 г хитозана растворяли в 10 мл 3% уксусной кислоты, смешивали с раствором 0,01 г ферроценальдегида в 7 мл ацетона. Далее смесь перемешивали в течение суток. Затем при перемешивании добавляли 53,0 мг  $\text{NaBH}_4$ . Реакционную смесь перемешивали в течение суток. Модифицированный полимер осаждали раствором 5,0 мМ  $\text{NaOH}$  до значения  $\text{pH} = 10,0$ . Осажденный полимер центрифугировали и диализовали, после чего сушили в сушильном шкафу в течение 2-х часов.

Для формирования электрода 2,5 мг полученного полимера растворяли в 250 мкл 1% уксусной кислоты. К 50 мкл полученного раствора добавляли 7,5 мкл глутарового альдегида, на поверхность угольно-пастового электрода наносили 10 мкл полученного полимера и оставляли до полного высыхания.

### ***5.8.3. Модификация редокс-активных полимеров углеродными нанотрубками***

Для модификации редокс-активных полимеров 0,5 мг суспензии (0,5% масс.) одностенных углеродных нанотрубок (ООО «Углерод Чг», Россия) добавляли 100 мкл деионизованной воды и оставляли в ультразвуковой бане на 15 минут. Полученную суспензию в количестве 10 мкл добавляли к редокс-активному полимеру при приготовлении рабочих электродов. Таким образом, были сформированы следующие электроды: БСА – ФЦ – УНТ, ХИТ – ФЦ – УНТ.

#### **5.8.4. Имобилизация микроорганизмов в созданные редокс-активные матрицы и формирование биосенсоров**

Для создания биоэлектрода 20 мкл суспензии с содержанием 200 мг сырого веса/мл бактерий *P. uvei* наносили на модифицированный редокс-активным полимером электрод и оставляли до полного высыхания. Далее наносили еще один слой проводящего редокс-активного полимера. После высыхания электрод закрывали диализной мембраной.

#### **5.9. Циклическая вольтамперометрия**

Вольтамперограммы регистрировали в трехэлектродной системе с использованием анализатора Экотест-ВА (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия). В качестве рабочего электрода использовали графито-пастовый электрод, в качестве вспомогательного – платиновый, в качестве электрода сравнения – насыщенный хлоридсеребряный электрод. Циклические вольтамперограммы регистрировали при скорости развертки 20–100 мВ/с в фосфатном буфере (20 мМ, рН=6,8).

#### **5.10. Импедансная спектроскопия**

Измерения импедансных характеристик выполняли на гальванопотенциостате VersaSTAT 4 (Ametek Inc., США). Для получения спектров использовали трехэлектродную схему измерения, где рабочим являлся графито-пастовый электрод, вспомогательным электродом служила платиновая пластина площадью 30 мм<sup>2</sup>. В качестве электрода сравнения использовался хлоридсеребряный электрод. Измерения выполняли в 25 мМ калий-фосфатном буферном растворе (рН 6,8), содержащем 10 мМ хлорида натрия при потенциале +350 мВ в диапазоне частот от 40 кГц до 0,02 Гц и амплитуде модуляции напряжения в 10 мВ.

### **5.11. Определение содержания железа в редокс-активных полимерах методом атомно-абсорбционной спектроскопии**

Полученные образцы матриц высушивали, навеску сухого вещества массой 1,2 мг растворяли в 10 мл деионизованной воды с добавлением 3 мл концентрированной азотной кислоты и 2,5 мл пероксида водорода. Полученный раствор упаривали в течение 2-х часов до объема ~ 2–3 мл, после чего разбавляли 50 мл деионизованной воды. Для проведения анализа раствор разбавляли в 1000 раз, в измерительную кювету вносили 30 мкл разбавленного раствора. Для регистрации атомно-абсорбционных спектров использовали спектрофотометр МГА-915М (Люмекс, Россия).

### **5.12. Регистрация ИК-спектров**

Инфракрасные спектры получали с использованием ИК-Фурье-спектрометра ФМС 1201 (ООО «Мониторинг», Россия). Для получения спектров твердых веществ использовали таблетки бромида калия. Для этого 1–3 мг образца тщательно смешивали в ступке с 300 мг спектроскопически чистого KBr. Полученный порошок прессовали при давлении  $2 \times 10^7$  Па 3 мин. Спектр снимали относительно воздуха. Жидкие пробы измеряли, используя приставку МНПВО горизонтального типа с призмой из селенида цинка.

### **5.13. Регистрация ЯМР-спектров**

Регистрация ЯМР-спектров выполнялась в Центре магнитной спектроскопии Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН на спектрометре Bruker Avance III 500 с рабочими частотами 500.2 МГц и 125.8 МГц по протону и углероду соответственно. Регистрировались спектры водного раствора реакционной смеси при комнатной температуре с добавлением 10% D<sub>2</sub>O и с подавлением сигнала воды. Химические сдвиги <sup>1</sup>H и

$^{13}\text{C}$  калибровали относительно сигнала тетраметилсилана. Все двумерные эксперименты проводились по стандартным методикам фирмы Bruker.

#### **5.14. Определение доли сшитого N-винилпирролидоном ПВС методом экстракции**

Образцы полимерных пленок взвешивали, заливали водой и перемешивали в течение 4–6 часов при температуре 50–60°C, затем воду сливали, а набухшую пленку сушили в сушильном шкафу при  $t=50\text{--}60^\circ\text{C}$  до постоянной массы. Опыт повторяли несколько раз, пока масса образца после высушивания не переставала изменяться.

#### **5.15. Определение физико-механических свойств полимерных пленок на основе поливинилового спирта**

Определение физико-механических свойств полимеров на основе ПВС проводили на универсально-разрывной машине «INSTRON» (INSTRON, США). Подготовка образцов и расчет физико-механических характеристик проводились согласно методикам фирмы-изготовителя и ГОСТ 14236–81 [322].

#### **5.16. Определение количества жизнеспособных клеток микроорганизмов в ассоциациях методом Коха**

Готовили ряд последовательных разведений суспензий клеток микроорганизмов (степень разведения –  $10^{-6}$ ). Высев суспензий микроорганизмов проводили поверхностным способом на твердую питательную среду из трех последних разведений (4 параллельных посева). Подсчет колоний проводили через 7 суток инкубации.

### **5.17. Оптическая микроскопия**

Для проведения оптической микроскопии был использован микроскоп Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония), оборудованный камерой ProgRes SpeedXT core5 (Jenoptik, Германия).

### **5.18. Сканирующая электронная микроскопия**

Анализ образцов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510 LV («JEOL», Япония) в режиме высокого вакуума при регистрации вторичных электронов. На образцы напыляли тонкий слой платиново-углеродной смеси в вакуумно-напылительной установке JEE-4X (JEOL, Япония).

### **5.19. Определение БПК<sub>5</sub> стандартным методом разбавления**

Анализ проводили в соответствии с методикой, указанной в [1]. Определение содержания растворенного кислорода проводили с использованием БПК-термооксиметра ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия).

## 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 yeei* 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 скорость взаимодействия редокс-соединений как 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 yeai* 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 ПВС, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 27065-86. Качество вод. Термины и определения. – М.: 1987.
2. Муравьев А.Г. Руководство по определению показателей качества воды полевыми методами. 3-е издание, дополненное и переработанное – СПб.: «Крисмас+», 2004. – 248 с.
3. Jouanneau S. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review / S. Jouanneau, L. Recoules, M. J. Durand et al. // Water research. – 2014. – 49. – P. 62–82.
4. ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПК<sub>полн</sub>) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. – М.: 1997.
5. СанПиН 2.1.5.980-00. Гигиенические требования к охране поверхностных вод.
6. МВИ 224.01.17.133.2009. Методика выполнения измерений биохимического потребления кислорода в природных и сточных водах по изменению давления газовой фазы (манометрический метод). – М.: 2009.
7. Karube I. Microbial electrode BOD sensors / I. Karube, S. Mitsuda, T. Matsunaga, S. Susuki // Biotechnology and Bioengineering. – 1977. – 19. – I. 10. – P. 1535–1547.
8. Hikuma M. Amperometric estimation of BOD [biochemical oxygen demand] by using living immobilized yeasts. Microbiology of sewage and industrial wastes / M. Hikuma, H. Suzuki, T. Yasuda, I. Karube, S. Suzuki // European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. – 1979. – 8. – P. 289–297.
9. Gupta N. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives / N. Gupta, V. Renugopalakrishnan, D. Liepmann et al. // Biosensors and Bioelectronics. – 2019. – 141. – № 111435.

10. Ejeian F. Biosensors for wastewater monitoring: A review / F. Ejeian, P. Etedali, H.-A. Mansouri-Tehrani et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – 118. – № 30. – P. 66–79.
11. Raud M. Comparative study of semi-specific *Aeromonas hydrophila* and universal *Pseudomonas fluorescens* biosensors for BOD measurements in meat industry wastewaters / M. Raud, T. Tenno, E. Jogi, T. Kikas // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2012. – 50. – I. 4–5. – P. 221–226.
12. Chen H. A novel approach based on ferricyanide-mediator immobilized in an ion-exchangeable biosensing film for the determination of biochemical oxygen demand / H. Chen, T. Ye, B. Qiu, G. Chen, X. Chen // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – 612. – I. 1. – P. 75–82.
13. Liu L. One-pot synthesis of 3-dimensional reduced graphene oxide-based hydrogel as support for microbe immobilization and BOD biosensor preparation / L. Liu, J. Zhai, C. Zhu et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – 63. – P. 483–489.
14. Raud M. Bioelectronic tongue and multivariate analysis: A next step in BOD measurements / M. Raud, T. Kikas // *Water Research*. – 2013. – 47. – I. 7. – P. 2555–2562.
15. Guo F. Impact of heterotrophic denitrification on BOD detection of the nitrate-containing wastewater using microbial fuel cell-based biosensors / F. Guo, H. Liu // *Chemical Engineering Journal*. – 2020. – 394. – №125042.
16. Khor B.H. A redox mediated UME biosensor using immobilized *Chromobacterium violaceum* strain R1 for rapid biochemical oxygen demand measurement / B.H. Khor, A.K. Ismail, R. Ahamad, R.S. Shahir // *Electrochimica Acta*. – 2015. – 176. – P. 777–783.
17. Liu C. Demonstration study of biofilm reactor based rapid biochemical oxygen demand determination of surface water / C. Liu, Z. Li, D. Jiang et al. // *Sensing and Bio-Sensing Research*. – 2016. – 8. – P. 8–13.
18. Hussain F. Real-time biomonitoring of oxygen uptake rate and biochemical oxygen demand using a novel optical biogas respirometric system / F. Hussain,

- H.-W. Yu, K. Chon et al. // *Journal of Environmental Management*. – 2021. – 277. – № 111467.
19. Liu L. A co-immobilized mediator and microorganism mediated method combined pretreatment by TiO<sub>2</sub> nanotubes used for BOD measurement / L. Liu, S. Zhang, L. Xing, H. Zhao, S. Dong // *Talanta*. – 2012. – 93. – P. 314–319.
20. Hu J. A Mediated BOD Biosensor Based on Immobilized *B. Subtilis* on Three-Dimensional Porous Graphene-Polypyrrole Composite / J. Hu, Y. Li, G. Gao, S. Xia // *Sensors*. – 2017. – 17. – № 11. – P. 2594.
21. Bonetto M.C. Assessing the effect of oxygen and microbial inhibitors to optimize ferricyanide-mediated BOD assay / M.C. Bonetto, N.J. Sacco, A.H. Ohlsson, E. Cortón // *Talanta*. – 2011. – 85. – № 1. – P. 455–462.
22. Jordan M. A. A sensitive ferricyanide-mediated biochemical oxygen demand assay for analysis of wastewater treatment plant influents and treated effluents / M.A. Jordan, D.T. Welsh, R. John et al. // *Water research*. – 2013. – 47. – № 2. – P. 841–849.
23. Jordan M. A. Ubiquity of activated sludge ferricyanide-mediated BOD methods: A comparison of sludge seeds across wastewater treatment plants / M.A. Jordan, D.T. Welsh, P.R. Teasdale // *Talanta*. – 2014. – 125. – P. 293–300.
24. Pasco N. Biochemical mediator demand – a novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand / N. Pasco, K. Baronian, C. Jeffries, J. Hay // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2000. – 53. – №. 5. – P. 613–618.
25. Nakamura H. A new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. / H. Nakamura, K. Suzuki, H. Ishikuro et al. // *Talanta*. – 2007. – 72. – I.1. – P. 210–216.
26. Niyomdecha S. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and

- methylene blue / S. Niyomdecha, W. Limbut, A. Numnuam et al. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – 241. – P. 473–481.
27. Dhall P. Quick and reliable estimation of BOD load of beverage industrial wastewater by developing BOD biosensor / P. Dhall, A. Kumar, A. Joshi et al. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2008. – 133. – I. 2. – P. 478–483.
28. Kaur A. Microbial fuel cell type biosensor for specific volatile fatty acids using acclimated bacterial communities / A. Kaur, J.R. Kim, I. Michie et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – 47. – P. 50–55.
29. Tee P.F. Performance evaluation of a hybrid system for efficient palm oil mill effluent treatment via an air-cathode, tubular upflow microbial fuel cell coupled with a granular activated carbon adsorption / P.F. Tee, M.O. Abdullah, I.A.W. Tan et al. // *Bioresource technology*. – 2016. – 216. – P. 478–485.
30. Moon H. Improving the dynamic response of a mediator-less microbial fuel cell as a biochemical demand (BOD) sensor / H. Moon, I.S. Chang, K.H. Kang et al. // *Biotechnology Letters*. – 2004. – 26. – № 22. – P. 1717–1738.
31. Sun J.Z. Microbial fuel cell-based biosensors for environmental monitoring: a review / J.Z. Sun, G.P. Kingori, R.W. Si et al. // *Water Science and Technology*. – 2015. – 71. – №. 6. – P. 801–809.
32. Do M.H. Microbial fuel cell-based biosensor for online monitoring wastewater quality: A critical review / M.H. Do, H.H. Ngo, W. Guo et al. // *Science of The Total Environment*. – 2020. – 712. – № 135612.
33. Do M.H. Performance of mediator-less double chamber microbial fuel cell-based biosensor for measuring biological chemical oxygen / M.H. Do, H.H. Ngo, W. Guo et al. // *Journal of Environmental Management*. – 2020. – 276. – № 111279.
34. Sakaguchi T. Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells-immobilized chip / T. Sakaguchi, Y. Morioka, M. Yamasaki et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2007. – 22. – I.7. – P. 1345–1350.

35. Kashem M.A. An optical biochemical oxygen demand biosensor chip for environmental monitoring / M.A. Kashem, M. Suzuki, K. Kimoto, Y. Iribe // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2015. – 221. – P. 1594–1600.
36. Pang H.L. High-throughput determination of biochemical oxygen demand (BOD) by a microplate-based biosensor / H.L. Pang, N.Y. Kwok, P.H. Chan et al. // *Environmental Science & Technology*. – 2007. – 4. – № 11. – P. 4038–4082.
37. Vaiopoulou E. On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor / E. Vaiopoulou, P. Melidis, E. Kampragou, A. Aivasidis // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2005. – 21. – I. 2. – P. 365–371.
38. Tønning E. Chemometric exploration of an amperometric biosensor array for fast determination of wastewater quality / E. Tønning, S. Sapelnikova, J. Christensen et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2005. – 21. – I. 4. – P. 608–617.
39. Wang J. Ultramicroelectrode array modified with magnetically labeled *Bacillus subtilis*, palladium nanoparticles and reduced carboxy graphene for amperometric determination of biochemical oxygen demand / J. Wang, Y. Li, C. Bian et al. // *Microchimica Acta*. – 2017. – 184. – P. 763–771.
40. Mattiasson B. The microbe thermistor / B. Mattiasson, P.O. Larsson, K. Mosbach // *Nature*. – 1977. – 268. – P. 519–520
41. Lin L. Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix / L. Lin, L.L. Xiao, S. Huang et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2006. – 21. – №. 9. – P. 1703–1709.
42. Zhao L. Microbial BOD sensors based on Zr (IV)-loaded collagen fiber / L. Zhao, L. He, S. Chen et al. // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2017. – 98. – P. 52–57.
43. Yi Y. Dual detection of biochemical oxygen demand and nitrate in water based on bidirectional *Shewanella loihica* electron transfer / Y. Yi, T. Zhao, B. Xie et al. // *Bioresource Technology*. – 2020. – 309. – № 123402.

44. Qi X. An electroactive biofilm-based biosensor for water safety: Pollutants detection and early-warning / X. Qi, S. Wang, T. Li et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2021. – 173. – № 112822.
45. Commault A.S. Geobacter-dominated biofilms used as amperometric BOD sensors / A.S. Commault, G. Lear, S. Bouvier et al. // *Biochemical Engineering Journal*. – 2016. – 109. – P. 88–95.
46. Ahmad H.A. Gel immobilization: A strategy to improve the performance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria for nitrogen-rich wastewater treatment / H.A. Ahmad, S.-Q. Ni, S. Ahmad et al. // *Bioresource Technology*. – 2020. – 313. – № 123642.
47. Liu C. Immobilized multi-species based biosensor for rapid biochemical oxygen demand measurement / C. Liu, C. Ma, D. Yu et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – 26. – I.5. – P. 2074–2079.
48. Chan C. Designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor / C. Chan, M. Lehmann, K. Chan et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2000. – 15. – № 7. – P. 343–353.
49. Testing Methods for Industrial Waste Water, JIS K3602, Japanese Industrial Standard Committee, Tokyo, 1990.
50. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: Amer. Publ. Health Association. 1992. – P. 5.1–5.6.
51. Melidis P. Development and implementation of microbial sensors for efficient process control in wastewater treatment plants / P. Melidis, E. Vaiopoulou, A. Aivasidis // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2008. – 31. – P. 277–282.
52. Organization for Economic Corporation and Development (OECD), OECD Guidel. Testing Chem. 1991. – 209, 1.
53. Yang Z. Fabrication of oxygen electrode arrays and their incorporation into sensors for measuring biochemical oxygen demand / Z. Yang, S. Sasaki, I. Karube, H. Suzuki // *Analytica Chimica Acta*. – 1997. – 357. – № 1-2. – P. 41–50.

54. Tan T.C. Thermally killed cells of complex microbial culture for biosensor measurement of BOD of wastewater / T.C. Tan, E.W.C. Lim // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2005. – 107. – I. 2. – P. 546–551.
55. Raudkivi K. *Pseudomonas putida* P67.2 and *Pseudomonas fluorescens* P75 based microbial sensors for biochemical oxygen demand (BOD) measurements in phenolic wastewaters of oil shale industry / K. Raudkivi, M. Tutt, E. Talpsep, T. Kikas // *Oil Shale*. – 2008. – 25. – №. 3. – P. 376–387.
56. Seo K.S. A flow injection analysis system with encapsulated high-density *Saccharomyces cerevisiae* cells for rapid determination of biochemical oxygen demand / K.S. Seo, K.H. Choo, H.N. Chang, J.K. Park // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2009. – 83. – №. 2. – P. 217–223.
57. Liu C. A biofilm reactor-based approach for rapid on-line determination of biodegradable organic pollutants / C. Liu, H. Zhao, L. Zhong et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – 34. – I. 1. – P. 77–82.
58. Chee G.-J. Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers / G.-J. Chee // *Talanta*. – 2013. – 117. – P. 366–370.
59. Oota S. Development of mediated BOD biosensor system of flow injection mode for shochu distillery wastewater / S. Oota, Y. Hatae, K. Amada et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – 26. – I. 1. – P. 262–266.
60. Liu L. Biochemical oxygen demand measurement by mediator method in flow system / L. Liu, L. Bai, D. Yu et al. // *Talanta*. – 2015. – 138. – P. 36–39.
61. Hu J. Development of a mediator-type bioelectrochemical sensor based on polypyrrole immobilized ferricyanide and microorganisms for biochemical oxygen demand fast detection / J. Hu, G. Gao, S. Xia // *International journal of electrochemical science*. – 2015. – 10. – P. 9695–9705.
62. Hu J. A Mediated BOD Microsensor Based on Poly (Neutral Red) and Bacteria Modified Interdigitated Ultramicroelectrode Array / J. Hu, G. Gao, S. Xia // *International journal of electrochemical science*. – 2016. – 11. – №. 7. – P. 6387–6402.

63. Li Y. A single-layer structured microbial sensor for fast detection of biochemical oxygen demand / Y. Li, J. Sun, J. Wang et al. // *Biochemical Engineering Journal*. – 2016. – 112. – P. 219–225.
64. Kwok N.-Y. An optical biosensor for multi-sample determination of biochemical oxygen demand (BOD) / N.-Y. Kwok, S. Dong, W. Lo, K.-Y. Wong // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2005. – 110. – I. 2. – P. 289–298.
65. Chang I.S. Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors / I.S. Chang, H. Moon, J.K. Jang, B.H. Kim // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2005. – 20. – I. 9. – P. 1856–1859.
66. Di Lorenzo M. A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters / M. Di Lorenzo, T.P. Curtis, I.M. Head, K. Scott // *Water Research*. – 2009. – 43. – I. 13. – P. 3145–3154.
67. Peixoto L. In situ microbial fuel cell-based biosensor for organic carbon / L. Peixoto, B. Min, G. Martins et al. // *Bioelectrochemistry*. – 2011. – 81. – I. 2. – P. 99–103.
68. Modin O. A novel bioelectrochemical BOD sensor operating with voltage input / O. Modin, B.-M. Wilén // *Water Research*. – 2012. – 46. – I. 18. – P. 6113–6120.
69. Hsieh M.-C. Measurement of biochemical oxygen demand from different wastewater samples using a mediator-less microbial fuel cell biosensor / M.-C. Hsieh, Y.-C. Chung // *Environmental Technology*. – 2014. – 39. – I. 24. – P. 3228–3237.
70. Yi Y. Comparative analysis of microbial fuel cell based biosensors developed with a mixed culture and *Shewanella loihica* PV-4 and underlying biological mechanism / Y. Yi, B. Xie, T. Zhao, H. Liu // *Bioresource Technology*. – 2018. – 265. – P. 415–421.
71. Wang S. Enhancement of biological oxygen demand detection with a microbial fuel cell using potassium permanganate as cathodic electron acceptor / S.



- Wang, S. Tian, P. Zhang et al. // Journal of Environmental Management. – 2019. – 252. – №109682.
72. Xiao N. Development of a xurographically fabricated miniaturized low-cost, high-performance microbial fuel cell and its application for sensing biological oxygen demand / N. Xiao, R. Wu, J.J. Huang, P.R. Selvaganapathy // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2020. – 304. – №127432.
73. Guo F. Hibernations of electroactive bacteria provide insights into the flexible and robust BOD detection using microbial fuel cell-based biosensors / F. Guo, Y. Liu, H. Liu // Science of The Total Environment. – 2021. – 753. – № 142244.
74. Nakamura H. A spectrophotometric biochemical oxygen demand determination method using 2,6-dichlorophenolindophenol as the redox color indicator and the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* / H. Nakamura, S. Kobayashi, Y. Hirata et al. // Analytical Biochemistry. – 2007. – 369. – I. 2. – P. 168–174.
75. Costa S.P.F. Microfluidic chemiluminescence system with yeast *Saccharomyces cerevisiae* for rapid biochemical oxygen demand measurement / S.P.F. Costa, E. Cunha, A.M.O. Azevedo et al. // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2018. – 6. – I. 5. – P. 6094–6101.
76. Ашин В.В. Образование и распределение модифицированного FAD между изоформами алкогольоксидазы метилотрофных дрожжей *Pichia methanolica* / В.В. Ашин, Ю.А. Троценко // Биохимия. – 1998. – №12. – С. 1654–1661.
77. Kurtzman C.P. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness / C.P. Kurtzman // Antonie van Leeuwenhoek – 1984. – 50. – P. 209–217.
78. Kurtzman C.P. Systematics of methanol assimilating yeasts and neighboring taxa from multigene sequence analysis and the proposal of *Peterozyma* gen. nov., a new member of the Saccharomycetales / C.P. Kurtzman, C.J. Robnett // FEMS Yeast Research. – 2010. – 10. – P. 353–361.

79. Suh S.O. Methylotrophic yeasts near *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. / S.O. Suh, J.J. Zhou // FEMS Yeast Research. – 2010. – 10. – P. 631–638.
80. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) / C.A. Batt, P. Patel // Academic Press. – 2014. – P. 3248.
81. Manfrão-Netto JHC. Advances in using *Hansenula polymorpha* as chassis for recombinant protein production / JHC. Manfrão-Netto, AMV. Gomes, NS. Parachin // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2019. – 7. – № 94.
82. Gonchar M.V. Microbial O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements / M.V. Gonchar, M.M. Maidan, M.O. Moroz et al. // Biosensors and Bioelectronics. – 1998. – 13. – P. 945–952.
83. Voronova E.A. Development, investigation of parameters and estimation of possibility of adaptation of *Pichia angusta* based microbial sensor for ethanol detection / E.A. Voronova, P.V. Iliasov, A.N. Reshetilov // Analytical Letters. – 2008. – 41. – № 3. – P. 377–391.
84. Malak A. *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*: a promising alternative yeast for biotechnology and basic research / A. Malak, K. Baronian, G. Kunze // Yeast. – 2016. – 33. – I. 10. – P 535–547.
85. Middelhoven W.J. *Trichosporon adenivorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy / W.J. Middelhoven, M.V. Hoogkamer-Te Niet, N.J.W. Kreger-Van Rij // Antonie van Leeuwenhoek. – 1984. – 50. – P. 369–378.
86. Gienow U. The yeast genus *Trichosporon spec.* LS3: molecular characterization of genomic complexity / U. Gienow, G. Kunze, F. Schauer, R. Bode, J. Hofemeister // Zbl. Mikrobiol. – 1990. – 145. – P. 3–12.

87. Middelhoven W.J. *Arxula adenivorans* a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds / W.J. Middelhoven, I.M. de Jonge, M. de Winter // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1991. – 59. – P. 129–137.
88. Kunze G. The complete genome of *Blastobotrys (Arxula) adenivorans* LS3 - a yeast of biotechnological interest. / G. Kunze, C. Gaillardin, M. Czernicka et al. // *Biotechnology for Biofuels*. – 2014. – 7. – № 66.
89. Wartmann T. Temperature-dependent dimorphism of the yeast *Arxula adenivorans* LS3 / T. Wartmann, A. Krüger, K. Adler et al. // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1995. – 68. – P. 215–223.
90. Wartmann T. Morphology-related effects on gene expression and protein accumulation of the yeast *Arxula adenivorans* LS3 / T. Wartmann, J. Erdmann, I. Kunze, G. Kunze // *Archives of Microbiology*. – 2000. – 173. – P. 253–261.
91. Yang X. Halotolerance of the yeast *Arxula adenivorans* LS3 / X. Yang, T. Wartmann, R. Stoltenburg, G. Kunze // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2000. – 77. – P. 303–311.
92. Tag K. *Arxula adenivorans* LS3 as suitable biosensor for measurements of biodegradable substances in salt water / K. Tag, M. Lehmann, C. Chan et al. // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 1998. – 73. – P. 385–388.
93. Chan C. Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl)sulfonate (PCS). Part II: Application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions / C. Chan, M. Lehmann, K. Tag et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1999. – 14. – №3. – P. 295–302.
94. Hahn T. A novel estrogen sensor based on recombinant *Arxula adenivorans* cells / T. Hahn, K. Tag, K. Riedel et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2006. – 21. – P. 2078–2085.
95. Pham Thi M.H. Application of modified *Arxula adenivorans* yeast cells in an online biosensor for the detection of estrogenic compounds in wastewater

- samples / M.H. Pham Thi, K. Kunath, L. Gehrman et al. // *Sensors and Actuators B.* – 2013. – 185. – P. 628–637.
96. Pham Thi M.H. The determination of pharmaceuticals in wastewater using a recombinant *Arxula adenivorans* whole cell biosensor / M.H. Pham Thi, M. Giersberg, L. Gehrman et al. // *Sensors and Actuators B.* – 2015. – 211. – P. 439–448.
97. Chamas A. Development of a recombinant *Arxula adenivorans* cell bioassay for the detection of molecules with progesterone activity in wastewater / A. Chamas, A. Nieter, M.H. Pham Thi et al. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* – 2015. – 407. – P. 8109–8120.
98. Prista C. The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts / C. Prista, C. Michan, I.M. Miranda, J. Ramos // *Yeast.* – 2016. – 33. – №. 10. – P. 523–533.
99. Breuer U. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential / U. Breuer, H. Harms // *Yeast.* – 2006. – 23. – P. 415–437.
100. Barnett J.A. In *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn, Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (eds). / J.A. Barnett, R.W. Payne, D. Yarrow // Cambridge University Press: Cambridge. – 2000.
101. Petersen K.M. Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface-ripened cheeses / K.M. Petersen, L. Jespersen // *Journal of Applied Microbiology.* – 2004. – 97. – P. 205–213.
102. Kurtzman C.P. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences / C.P. Kurtzman, C.J. Robnett // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1998. – 73. – P. 331–371.
103. Nakase T. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-Van Rij and related species. II. Practical discrimination and

- nomenclature / T. Nakase, M. Suzuki // The Journal of General and Applied Microbiology. – 1985. – 31. – P. 71–86.
104. The Yeasts (Fifth Edition), Editor(s): Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell, Teun Boekhout. Elsevier. – 2011. – P. 2354.
105. Nakase T. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. In The Yeasts — A Taxonomic Study, Kurtzman CP, Fell JW (eds). / T. Nakase, M. Suzuki, H.J. Phaff, C.P. Kurtzman // Elsevier: Amsterdam. – 1998. – P. 157–173.
106. Forrest S.I. Nuclear behaviour accompanying ascus formation in *Debaryomyces polymorphus* / S.I. Forrest, C.F. Robinow, M.A. Lachance // Canadian Journal of Microbiology. – 1987. – 33. – P. 967–970.
107. Butinar L. Yeast diversity in hypersaline habitats / L. Butinar, S. Santos, I. Spencer-Martins et al. // FEMS Microbiology Letters. – 2005. – 244. – P. 229–234.
108. Yadav J.S. Multiple P450alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* / J.S. Yadav, J.C. Loper // Gene. – 1999. – 226. – P. 139–146.
109. Turk M. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity / M. Turk, V. Montiel, D. Zigon et al. // Microbiology. – 2007. – № 153. – P. 3586–3592.
110. Martínez J.L. Proteomic changes in response to potassium starvation in the extremophilic yeast *Debaryomyces hansenii* / J.L. Martínez., C. Luna, J. Ramos // FEMS yeast research. – 2012. – 12. – №. 6. – P. 651–661.
111. Chao H.F. Characterization of a salt-induced DhAHP, a gene coding for alkyl hydroperoxide reductase, from the extremely halophilic yeast *Debaryomyces hansenii* / H.F. Chao, Y.F. Yen, M.S. Ku // BMC Microbiology. – 2009. – 9. – P. 182–185.
112. Martinez J.L. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii* / J.L. Martinez, H.

- Sychrova, J. Ramos // *Fungal Genetics and Biology*. – 2011. – 48. – P. 177–184.
113. Minhas A. Conserved Ser/Arg-rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance / A. Minhas, A. Sharma, H. Kaur et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – № 287. – P. 7301–7313.
114. Cabrera-Orefice A. The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: components and supramolecular organization / A. Cabrera-Orefice, N. Chiquete-Félix, J. Espinasa-Jaramillo et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2014. – 1837. – № 1. – P. 73–84.
115. Gunge N. Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* / N. Gunge, K. Fukuda, S. Morikawa et al. // *Current Genetics*. – 1993. – 23. – P. 443–449.
116. Dura M.A. Effects of curing agents and the stability of a glutaminase from *Debaryomyces* spp. / M.A. Dura, M. Flores, F. Toldra // *Food Chemistry*. – 2004. – 86. – P. 385–389.
117. Prakash G. Microbial production of xylitol from d-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* / G. Prakash, A.J. Varma, A. Prabhune et al. // *Bioresource technology*. – 2011. – 102. – № 3. – P. 3304–3308.
118. Camiolo S. Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments / S. Camiolo, C. Porru, A. Benítez-Cabello et al. // *Standards in Genomic Sciences*. – 2017. – 12. – № 70.
119. Lin Y.H. Molecular and chemical taxonomic differentiation of *Candida Boidinii* Ramirez strains / Y.H. Lin, F.L. Lee, W.H. Hsu // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1996. – 46. – P. 352–355.
120. Grembecka M. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review / M. Grembecka // *European Food Research and Technology*. – 2015. – 241. – P. 1–14.
121. Oda S. Molecular characterization of hap complex components responsible for methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast

- Candida boidinii* / S. Oda, H. Yurimoto, N. Nitta // Eukaryotic Cell. – 2015. – 14. – P. 278–285.
122. Rodríguez-Gómez F. Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing / F. Rodríguez-Gómez, F.N. Arroyo-López, A. López-López et al. // Food Microbiology. – 2010. – 27. – P. 604–612.
123. Domínguez-Manzano J. Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation / J. Domínguez-Manzano, Á. León-Romero, C. Olmo-Ruiz et al. // International Journal of Food Microbiology. – 2012. – 157. – P. 230–238.
124. Leon-Romero A. Formation of in vitro mixed-species biofilms by lactobacillus pentosus and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations / A. Leon-Romero, J. Dominguez-Manzano, A. Garrido-Fernandez et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – 82. – P. 689–695.
125. Vogl T. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production / T. Vogl, A. Glieder // New Biotechnology. – 2013. – 30. – I. 4. – P. 385–404.
126. Lin-Cereghino J. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* / J. Lin-Cereghino, J.M. Cregg // FEMS Microbiology Review. – 2000. – 24. – P. 45–66.
127. Comprehensive Biotechnology. 3rd Edition. Editor in Chief: M. Moo-Young. – 2019. – P. 4870.
128. Патент РФ № 2384616 от 12.03.2008. Консорциум штаммов микроорганизмов для очистки окружающей среды от углеводов. / Р.О. Самсонов, Г.С. Аكوпова, С.И. Козлов и др.
129. Hofmann K.H. Utilization of phenol by hydrocarbon assimilating yeasts / K.H. Hofmann, F. Schauer // Antonie van Leeuwenhoek. – 1988. – 54. – P. 179–188.

130. Polnisch E. Cyclic AMP, fructose-2,6-bisphosphate and catabolite inactivation of enzymes in the hydrocarbon-assimilating yeast *Candida maltosa* / E. Polnisch, K. Hofmann // Archives of Microbiology. – 1989. – 152. – P. 269–272.
131. Beier A. Metabolism of alkenes and ketones by *Candida maltosa* and related yeasts / A. Beier, V. Hahn, U.T. Bornscheuer, F. Schauer // AMB Express. – 2014. – 4. – №. 75.
132. Mauersberger S. The induction of cytochrome P-450 in the alkane-utilizing yeast *Lodderomyces elongisporus*: Alterations in the microsomal membrane fraction / S. Mauersberger, W.-H. Schunck, H.-G. Moller // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1984. – 19. – P. 29–35.
133. Nakanishi K. Determination of cyanide using a microbial sensor / K. Nakanishi, K. Ikebukuro, I. Karube // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 1996. – 60. – №2. – P. 97–106.
134. Hristozova T. Effect of furfural on nitrogen assimilating enzymes of lactose utilizing yeasts *Candida blankii* 35 and *Candida pseudotropicalis* / T. Hristozova, V. Gotcheva, B. Tzvetkova et al. // Enzyme and Microbial Technology. – 2008. – 43. – P. 284–288.
135. Meyer P.S. Evaluation of *Candida blankii* hybrids for biomass production / P.S. Meyer, J.C. du Preez, B.D. Wingfield, S.G. Kilian // Journal of Biotechnology. – 1993. – 29 (3). – P. 267–275.
136. Le Jeune C. Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* / C. Le Jeune, M. Lollier, C. Demuyter et al. // FEMS Yeast Research. – 2007. – 7. – I. 4. – P. 540–549.
137. Bertolini L. Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains / L. Bertolini, C. Zambonelli, P. Giudici, L. Castellari // American Journal of Enology and Viticulture. – 1996. – 47. – P. 343–345.
138. Masneuf I. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains / I. Masneuf, J. Hansen,



- C. Groth et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – 64. – P. 3887–3892.
139. Nguyen H.V. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae* including the *S. bayanus* type strain CBS 380 / H.V. Nguyen, A. Lepingle, C. Gaillardin // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2000. – 23. – P. 71–85.
140. Naumov G.I. Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: auto- and allotetraploidy / G.I. Naumov, E.S. Naumova, I. Masneuf et al. // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2000. – 23. – P. 442–449.
141. Fernandez-Espinar T.M. Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex / T.M. Fernandez-Espinar, E. Barrio, A. Querol // *Yeast*. – 2003. – 20. – P. 1213–1226.
142. Патент РФ № 2065495 от 27.07.1994. Гибридный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae Saccharomyces bayanus*, используемый в винодельческой промышленности / Н.Г. Саришвили, Ф.И. Шакарова, Н.К. Кардаш и др.
143. Gupta A. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications / A. Gupta, V.K. Singh, G.N. Qazi, A. Kumar // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – 3(3). – P. 445–456.
144. Dwivedi M. Chapter 25 - *Gluconobacter*, Editor(s): N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar, A. Sankaranarayanan, *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press. – 2020. – P. 521–544.
145. Matsushita K. A tightly bound quinone functions in the ubiquinone reaction sites of quinoprotein alcohol dehydrogenase of an acetic acid bacterium, *Gluconobacter suboxydans* / K. Matsushita, Y. Kobayashi, M. Mizuguchi et al. // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2008. – 72. – №. 10. – P. 2723–2731.

146. Richhardt J. Evidence for a key role of cytochrome bo<sub>3</sub> oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans* / J. Richhardt, B. Luchterhand, S. Bringer et al. // Journal of Bacteriology. – 2013. – 195. – P. 4210–4220.
147. Sakurai K. Role of the glyoxylate pathway in acetic acid production by *Acetobacter aceti* / K. Sakurai, S. Yamazaki, M. Ishii, Y. Igarashi, H. Arai // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2013. – 115. – P. 32–36.
148. Richhardt J. Mutational analysis of the pentose phosphate and Entner–Doudoroff pathways in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of a *edd* *eda* mutant on mannitol / J. Richhardt, S. Bringer, M. Bott // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – 78. – P. 6975–6986.
149. Moonmangmee D. Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein cyclic alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* CHM 9 / D. Moonmangmee, Y. Fujii, H. Toyama et al. // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2001. – 65. – P. 2763–2772.
150. Matsushita K. 5-ketogluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species / K. Matsushita, Y. Fujii, Y. Ano et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – 69. – P. 1959–1966.
151. Saichana N. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications / N. Saichana, K. Matsushita, O. Adachi et al. // Biotechnology Advances. – 2015. – 33. – I.6. – P. 1260–1271.
152. Shinagawa E. Solubilization, purification, and properties of membrane-bound D-glucono- $\delta$ -lactone hydrolase from *Gluconobacter oxydans* / E. Shinagawa, Y. Ano, T. Yakushi // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2009. – 73. – P. 241–244.
153. Toyama H. Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from “*Gluconobacter dioxyaceticus*” IFO 3271: molecular properties and gene disruption / H. Toyama, N. Furuya, I. Saichana // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – 73. – P. 6551–6556.

154. Adachi O. Biooxidation with PQQ- and FAD-dependent dehydrogenases. / O. Adachi, Y. Ano, H. Toyama, K. Matsushita. Modern biooxidation: enzymes, reactions and applications, R.D. Schmid, V.B. Urlacher (Eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. – 2007. – P. 1–41.
155. Pasteur L. Etudes sur le vinaigre. // Compt. Rend. Sean. Acad. Sci. – 1862. – 54. – P. 265–270.
156. Ohrem H.L. Inhibitory effects of dihydroxyacetone on *Gluconobacter* cultures / H.L. Ohrem, H. Voss // Biotechnology Letters. – 1995. – 17. – № 9. – P. 981–984.
157. Schenkmyerova A. Whole-cell *Gluconobacter oxydans* biosensor for 2-phenylethanol biooxidation monitoring / A. Schenkmyerova, A. Bertokova, J. Sefcovicova et al. // Analytica Chimica Acta. – 2015. – 854. – P. 140–144.
158. Valach M. Ethanol *Gluconobacter* biosensor designed for flow injection analysis: Application in ethanol fermentation off-line monitoring / M. Valach, J. Katrlík, E. Sturdik, P. Gemeiner // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2009. – 138. – I. 2. – P. 581–586.
159. Reshetilov A.N. Characteristics of *Gluconobacter oxydans* B-1280 and *Pichia methanolica* MN4 cell based biosensors for detection of ethanol / A.N. Reshetilov, J.A. Trotsenko, N.O. Morozova et al. // Process Biochemistry. – 2001. – 36. – I. 10. – P. 1015–1020.
160. Yılmaz Ö. Chitosan–ferrocene film as a platform for flow injection analysis applications of glucose oxidase and *Gluconobacter oxydans* biosensors / Ö. Yılmaz, D.O. Demirkol, S. Gülcemal et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2012. – 100. – P. 62–68.
161. ISO 5815-1:2003. Water Quality – Determination of Biochemical Oxygen Demand after N Days ( $BOD_n$ ), Part 1: Dilution and Seeding Method with Allylthiourea Addition. – 2003.
162. Кобзев Е. Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе. / Е. Н. Кобзев,

- С. Б. Петрикевич, А. Н. Шкидченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – 37. – №4. – С. 413–417.
163. Ефременко Е.Н. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов / Е.Н. Ефременко, Н.Ю. Татарина // Микробиология. – 2007. – Т.76 (3). – С.383–389.
164. Ткач J. Determination of total sugars in lignocellulose hydrolysate by a mediated *Gluconobacter oxydans* biosensor / J. Ткач, P. Gemeiner, J. Svitel, T. Benikovsky et al. // Analytica Chimica Acta. – 2000. – 420. – I. 1. – P. 1–7.
165. Chan C. Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly (carbamoyl) sulfonate (PCS): Part II: application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions / C. Chan, M. Lehmann, K. Tag et al. // Biosensors and Bioelectronics. – 1999. – 14. – № 3. – P.295–302.
166. Банникова Д.А. Формирование доминирующих микробных сообществ активного ила / Д.А. Банникова // Ветеринария. – 1998. – № 5. – С. 45–47.
167. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. – М.: АКВАРОС, 2003. – С. 512.
168. Sun L.-N. *Paracoccus huijuniae* sp. nov., an amide pesticide-degrading bacterium isolated from activated sludge of a wastewater biotreatment system / L.-N. Sun, J. Zhang, S.-W. Kwon et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013. – 63. – №. 3. – P. 1132–1137.
169. Ferbiyanto A. Characterization and Identification of Cellulolytic Bacteria from gut of Worker *Macrotermes gilvus* / A. Ferbiyanto, I. Rusmana, R. Raffiudin // HAYATI Journal of Biosciences. – 2015. – 22. – №. 4. – P. 197–200.

170. Коршунова Т.Ю. Новый представитель рода *Paracoccus*, выделенный из техногенно загрязненной почвы / Т.Ю. Коршунова, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2012. – №3. – С. 19–26.
171. Montes C. A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential / C. Montes, F. Altimira, H. Canchignia et al. // Standards in Genomic Sciences. – 2016. – 11. – №. 76.
172. Elomari M. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov / M. Elomari, L. Coroler, B. Hoste et al. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1996. – 46. – №. 4. – P. 1138–1144.
173. Morales M. The genome of the toluene-degrading *Pseudomonas veronii* strain 1YdBTEX2 and its differential gene expression in contaminated sand / M. Morales, V. Sentschilo, C. Bertelli et al. // PloS one. – 2016. – 11. – №. e0165850.
174. Rengipat S. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth / S. Rengipat, W. Phianphak, S. Piyatirativorakul, P. Menasveta // Aquaculture. – 1998. – 167. – P. 310–313.
175. Bhaskar N. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities / N. Bhaskar, E.S. Sudeepa, H.N. Rashmi, A. Tamil Selvi // Bioresource Technology. – 2007. – 98. – I. 14. – P. 2758–2764.
176. Gori K. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese surface model / K. Gori, L.M. Sørensen, M.A. Petersen et al. // Microbiology Open. – 2012. – 1. – №. 2. – P. 161–168.
177. Cano-García L. Molecular characterization and aromatic potential of *Debaryomyces hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages / L. Cano-García, M. Flores, C. Belloch // Food Research International. – 2013. – 52. – №. 1. – P. 42–49.

178. Padilla B. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes and goats cheeses / B. Padilla, P. Manzanares, C. Belloch // *Food microbiology*. – 2014. – 38. – P. 160–166.
179. Laponi M.J. Cell immobilization strategies for biotransformations / M.J. Laponi, M.B. Méndez, J.A. Trelles, C.W. Rivero // *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. – 2021. – № 100565.
180. Immobilization of enzyme and cells. / Edited by Jose M. Guisan. – 2nd ed. New Jersey: Humana Pres inc. 2006. – 449 p.
181. Efremenko E.N. Application of gel systems with various biocatalysts detoxifying neurotoxic agents for pollution control, water purification, and self-defense. / E.N. Efremenko, I.V. Lyagin, O.V. Senko et al. // In book: «Sol-gel methods for materials processing» Ser. NATO Science for Peace and Security. Eds: Innocenzi P., Zub Y.L, Kessler V.G. – 2008.
182. Mehrotra P. Biosensors and their applications – A review / P. Mehrotra // *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. – 2016. – 6. – № 2. – P. 153–159.
183. Berbegal C. Immobilisation of yeasts on oak chips or cellulose powder for use in bottle-fermented sparkling wine / C. Berbegal, L. Polo, M.J. García-Esparza // *Food Microbiol.* – 2019. – 78. – P. 25–37.
184. Katrlík J. A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring / J. Katrlík, I. Vostiar, F. Sevcov // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – 388. – № 1. – P. 287–295.
185. Shetye S.P. Hydrogels: introduction, preparation, characterization and applications / S.P. Shetye, A. Godbole, S. Bhilegaokar, P. Gajare // *Int. J. Res. Methodol.* – 2015. – 1 (1). – P. 47–71.
186. Fu J. Hydrogel properties and applications / J. Fu, M. Panhuis // *Journal of Materials Chemistry B* – 2019. – 7. – P. 1523–1525.

187. Saini K. Preparation method, properties and crosslinking of hydrogel : a review // *PharmaTutor*. – 2017. – 5 (1). – P. 27–36.
188. Mahinroosta M. Hydrogels as intelligent materials : a brief review of synthesis, properties and applications / M. Mahinroosta, Z. Jomeh, A. Allahverdi, Z. Shakoori // *Materials Today Chemistry*. – 2018. – 8. – P. 42–55.
189. Shibata H. Injectable hydrogel microbeads for fluorescence-based in vivo continuous glucose monitoring / H. Shibata, Y. Jung, T. Okitsu et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2010. – 107 (42). – P. 4–6.
190. Tsuchiya M. Eye-recognizable and repeatable biochemical flexible sensors using low angle-dependent photonic colloidal crystal hydrogel microbeads / M. Tsuchiya, Y. Kurashina, H. Onoe // *Scientific Reports*. – 2019. – 9.
191. Echalier C. Chemical cross-linking methods for cell encapsulation in hydrogels. / C. Echalier, L. Valot, J. Martinez et al. // *Materials Today Communications*. – 2019. – 20. – № 100536.
192. Pinelli F. Progress in hydrogels for sensing applications: a review / F. Pinelli, L. Magagnin, F. Rossi // *Materials Today Chemistry*. – 2020. – 17. – № 100317.
193. Partovinia A. Phenanthrene biodegradation by immobilized microbial consortium in polyvinyl alcohol cryogel beads / A. Partovinia, F. Naeimpoor // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – 85. – P. 337–344.
194. Wang Y. Crosslinking of polyvinyl alcohol (PVA) fibrous membranes with glutaraldehyde and PEG diacylchloride / Y. Wang, Y. L. Hsieh // *Journal of applied polymer science*. – 2010. – 116(6). – P. 3249–3255.
195. Semenova M.V. Kinetic features of the reaction of polyvinyl alcohol with epichlorohydrin in an alkaline medium // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2017. – 87(5). – P. 1047–1052.
196. Ye Y.S. Water soluble polymer sasprotonex change membranes for fuel cells / Y.S. Ye, J. Rick, B.J. Hwang // *Polymers*. – 2012. – 4 (2). – P. 913–963.

197. Hai T.A.P. Synthesis and characterization of poly(3-hexylthiophene)-grafted polyvinyl alcohol / T.A.P. Hai, R. Sugimoto // *Synthetic Metals*. – 2018. – 434. – P. 37–43.
198. Shinde P. Immobilization and stabilization of alcohol dehydrogenase on polyvinyl alcohol fibre / P. Shinde, M. Musameh, Y. Gao et al. // *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*. – 2018. – 19. – № 100260.
199. Dong Y. Immobilization of ammonia-oxidizing bacteria by polyvinyl alcohol and sodium alginate / Y. Dong, Y. Zhang, B. Tu // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2017. – 48 (3). – P. 515–521.
200. Migneault I. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking / I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron // *Biotechniques*. – 2004. – 37(5). – P.790–802.
201. Guebitz G.M. Enzymes as green catalysts and interactive biomolecules in wound dressing hydrogels / G.M. Guebitz, G.S. Nyanhongo // *Trends in Biotechnology*. – 2018. – 36 (10). – P. 1040–1053.
202. Karamikamkar S. Advances in precursor system for silica-based aerogel production toward improved mechanical properties, customized morphology, and multifunctionality: A review / S. Karamikamkar, H.E. Naguib, C.B. Park // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2020. – 276. – № 102101.
203. Owens G.J. Sol–gel based materials for biomedical applications / G.J. Owens, R.K. Singh, F. Foroutan et al. // *Progress in Materials Science*. – 2016. – 77. – P. 1–79.
204. Milea C.A. The influence of parameters in silica sol-gel process / C.A. Milea, C. Bogatu // *Bulletin of the Transilvania University of Brasov*. – 2011. – 4(1). – P. 59–66.
205. Brinker C. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing / C. Brinker, G. Scherer // *Advanced materials*. – 1990. – 3 (10). – P. 912.



206. Gill I. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals / I. Gill, A. Ballesteros // Trends in Biotechnology. – 2000. – 18 (7). – P. 282–296.
207. Tsai H. Preparation and characterization of urease-encapsulated biosensors in poly(vinyl alcohol)-modified silica sol-gel materials / H. Tsai, R. Doong // Biosensors and Bioelectronics. – 2007. – 23 (1). – P. 66–73.
208. Lee E.-J. Nanostructured poly( $\epsilon$ -caprolactone)–silica xerogel fibrous membrane for guided bone regeneration / E.-J. Lee, S.-H. Teng, T.-S. Jang et al. // Acta Biomaterialia. – 2010. – 6 (9). – P. 3557–3565.
209. Song J.-H. Bioactive and degradable hybridized nanofibers of gelatin–siloxane for bone regeneration / J.-H. Song, B.-H. Yoon, H.-E. Kim, H.-W. Kim // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2008. – 84A (4). – P. 875–884.
210. Lee E.-J. Membrane of hybrid chitosan–silica xerogel for guided bone regeneration / E.-J. Lee, D.-S. Shin, H.-E. Kim et al. // Biomaterials. – 2009. – 30 (5). – P. 743–750.
211. Catauro M. Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO<sub>2</sub>/PEG hybrid materials synthesized by sol–gel technique / M. Catauro, F. Bollino, F. Papale // Materials Science and Engineering: C. – 2015. – 48. – P. 548–555.
212. Srivastava N. Recent advances in composite hydrogels prepared solely from polysaccharides / N. Srivastava, Richa, A.R. Choudhury // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2021. – 205. – № 111891.
213. Dai M. Preparation of thermoresponsive alginate/starch ether composite hydrogel and its application to the removal of Cu(II) from aqueous solution / M. Dai, Y. Liu, B. Ju, Y. Tian // Bioresource Technology. – 2019. – 294. – № 122192.
214. Ahmed E.M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review // Journal of Advanced Research. – 2015. – 6. – P. 105–121.

215. Lyons J.G. Development and characterisation of an agar–polyvinyl alcohol blend hydrogel / J.G. Lyons, L.M. Geever, M.J.D. Nugent et al. // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2009. – 2 (5). – P. 485–493.
216. Dash M. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications / M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini // *Progress in Polymer Science*. – 2011. – 36 (8). – P. 981–1014.
217. Ahmadi F. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications / F. Ahmadi, Z. Oveisi, S.M. Samani, Z. Amoozgar // *Research in pharmaceutical sciences*. – 2015. – 10(1). – P. 1–16.
218. Mi F.L. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads / F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu et al. // *Polymer*. – 2003. – 44. – P. 6521–6530.
219. Qun G. Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution / G. Qun, W. Ajun // *Carbohydrate Polymers*. – 2006. – 64. – P. 29–36.
220. Del Valle L.J. Hydrogels for biomedical applications: cellulose, chitosan, and protein/peptide derivatives / L.J. Del Valle, A. Diaz, J. Puiggali // *Gels*. – 2017. – 3(3). – 27.
221. Nilsen-Nygaard J. Chitosan: gels and interfacial properties / J. Nilsen-Nygaard, S.P. Strand, K.M. Varum et al. // *Polymers*. – 2015. – 7(3). – P. 552–579.
222. Aleshina E.Y. Production and properties of polyvinyl alcohol spinning solutions containing protease C and polyhexamethylene guanidine / E.Y. Aleshina, T.N. Yudanova, I.F. Skokova // *Fibre Chemistry*. – 2001. – 33 (6) – P. 421–423.
223. Накамото К. ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений: Пер с англ. // М.: Мир. – 1991. – 536 с.
224. Kamanina O.A. Synthesis of organosilicon sol-gel matrices and preparation of heterogeneous biocatalysts based on them / O.A. Kamanina,

- D.G. Fedoseeva, T.V. Rogova et al. // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2014. – 87 (6). – P. 761–766.
225. Weiser D. Immobilization engineering – how to design advanced sol–gel systems for biocatalysis? / D. Weiser, F. Nagy, G. Banoczi // *Green Chemistry*. – 2017. – 19. – P. 3927–3937.
226. Pereira A.P.V. Novel multicomponent silicate–poly(vinyl alcohol) hybrids with controlled reactivity / A.P.V. Pereira, W.L. Vasconcelos, R.L. Orefice // *Journal of Non-Crystalline Solids*. – 2000. – 273 (1). – P. 180–185.
227. Гармаш А.В. Метрологические основы аналитической химии / А.В. Гармаш, Н.М. Сорокина // М.: Московский государственный университет. – 2005. – 34 с.
228. Ферапонтов Н.Б. Влияние свойств полимеров на условия их набухания в воде и в водных растворах / Н.Б. Ферапонтов, М.Г. Токмачев, А.Н. Гагарин и др. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2014. – 14 (5). – С. 703–720.
229. Liu D-M. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications / D-M. Liu, C. Dong // *Process Biochemistry*. – 2020. – 92. – P. 464–475.
230. Карякин А.А. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики / А.А. Карякин, Е.А. Уласова, М.Ю. Вагин // *Сенсор*. – 2002. – 1. – С. 16–24.
231. Sakai K. Interconversion between formate and hydrogen carbonate by tungsten-containing formate dehydrogenase-catalyzed mediated bioelectrocatalysis / K. Sakai, B. Hsieh, A. Maruyama et al. // *Sensing and bio-sensing research*. – 2015. – 5. – P. 90–96.
232. Muthuramalingam R. Theoretical analysis of the enzyme reaction processes within the multiscale porous biocatalytic electrodes / R. Muthuramalingam, R. Lakshmanan // *Russian Journal of Electrochemistry*. – 2016. – 52 (2). – P. 143–153.

233. Варфоломеев С.Д. Биокинетика: Практический курс. / С.Д. Варфоломеев., К.Г. Гуревич // М.: Фаир-Пресс. – 1999. – 720 с.
234. Cass A.E.G. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose / A.E.G. Cass, G. Davis, G. D. Francis et al. // Analytical chemistry. – 1984. – 56 (4). – P. 667–671.
235. Lundblad R.L. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology / R.L. Lundblad, F.M. MacDonald // Boca Raton: CRC Press. – 2010. –1086 p.
236. Turner A.P.F. Biosensors: Fundamentals and applications / A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson // New York: Oxford University Press. – 1987. –770 p.
237. Beitollahi H. Recent advances in applications of voltammetric sensors modified with ferrocene and its derivatives / H. Beitollahi, M.A. Khalilzadeh, S. Tajik et al. // ACS omega. – 2020. – 5 (5). – P. 2049–2059.
238. Nigar A. Ferrocene derivatives: Potential anticancer material / A. Nigar, N. Kausar janjua, A. Gul et al. // Journal of the Chemical Society of Pakistan. – 2018. – 40 (6). – P. 1046–1053.
239. Yan Q. A highly sensitive uric acid electrochemical biosensor based on a nano-cube cuprous oxide/ferrocene/uricase modified glassy carbon electrode / Q. Yan, N. Zhi, L. Yang et al. // Scientific reports. – 2020. – 10 (1). – № 10607.
240. Bond A.M. Electrochemical, thermodynamic, and mechanistic data derived from voltammetric studies on insoluble metallocenes, mercury halide and sulfide compounds, mixed silver halide crystals, and other metal complexes following their mechanical transfer to a graphite electrode / A.M. Bond, F. Scholz // Langmuir. – 1991. – 7 (12). – P. 3197–3204.
241. Ryabov A.D. Enzymatic chemistry of ferrocenes: micellar tuning of the glucose oxidase reactivity toward solubilized electrochemically generated n-alkylferricenium cations / A.D. Ryabov, E.S. Ryabova, M.D. Reshetova // Journal of Organometallic Chemistry. – 2001. – 637. – P. 469–475.

242. Jiang Z. Ferrocene-modified polyelectrolyte film-coated electrode and its application in glucose detection / Z. Jiang, Y. Shangguan, Q. Zheng // *Polymers*. – 2019. – 11 (3). – № 551.
243. Понаморева О.Н. Эффективность биоэлектродокаталитического окисления этанола целыми клетками и мембранной фракцией бактерий *Gluconobacter oxydans* в присутствии медиаторов ферроценового ряда / О.Н. Понаморева, Е.Ю. Инджгия, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // *Электрохимия*. – 2010. – 46 (12). – С. 1503–1508.
244. Florou A.B. Electrocatalytic oxidation of NADH in flow analysis by graphite electrode modified with 2, 6-dichlorophenolindophenol salts / A.B. Florou, M.I. Prodromidis, M.I. Karayannis, S.M. Tzouwara–Karayanni // *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. – 1998. – 10 (18). – P. 1261–1268.
245. Khater D.Z. Exploring the bioelectrochemical characteristics of activated sludge using cyclic voltammetry / D.Z. Khater, K.M. El-Khatib, R.Y.A. Hassan // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2018. – 184 (1). – P. 92–101.
246. Zhao J. The different behaviors of three oxidative mediators in probing the redox activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / J. Zhao, M. Wang, Z. Yang et al. // *Analytica chimica acta*. – 2007. – 597 (1). – P. 67–74.
247. Hassan R.Y.A. Mediated bioelectrochemical system for biosensing the cell viability of *Staphylococcus aureus* / R.Y.A. Hassan, U. Wollenberger // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2016. – 408 (2). – P. 579–587.
248. Rawson D.M. Whole-cell biosensors for environmental monitoring / D.M. Rawson, A.J. Willmer, A.P.F. Turner // *Biosensor*. – 1989. – 4. – P. 299–311.
249. Pauliukaite R. Phenazines and polyphenazines in electrochemical sensors and biosensors / R. Pauliukaite, M. E. Ghica, M. M. Barsan, C. M. A. Brett // *Analytical Letters*. – 2010. – 43 (10–11). – P. 1588–1608.

250. Choi J.P. Electrogenated chemiluminescence 73: acid–base properties, electrochemistry, and electrogenerated chemiluminescence of neutral red in acetonitrile / J.P. Choi, A.J. Bard // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2004. – 573 (2). – P. 215–225.
251. Naik T.S.S.K. Modification of carbon paste electrode by electrochemical polymerization of neutral red and its catalytic capability towards the simultaneous determination of catechol and hydroquinone: a voltammetric study / T.S.S.K. Naik., B.E.K. Swamy // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2017. – 804. – P. 78–86.
252. Park D.H. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore / D.H. Park, J.G. Zeikus // *Applied and environmental microbiology*. – 2000. – 66 (4). – P. 1292–1297.
253. Кузьмичева Е.В. Кинетика процесса окисления глюкозы с помощью микроорганизма *Escherichia coli* в присутствии экзогенных медиаторов: дис. канд. хим. наук: 02.00.05 / Кузьмичева Елена Валерьевна. – Саратов, 2009. – 109 с.
254. Hodson E. A textbook of modern toxicology // New York: John Wiley & Sons. – 2011. – 672 p.
255. Jeykumari D.R.S. A novel nanobiocomposite based glucose biosensor using neutral red functionalized carbon nanotubes / D.R.S. Jeykumari, S.S. Narayanan // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2008. – 23 (9). – P. 1404–1411.
256. Sales F.C. An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes / F.C. Sales, R.M. Iost, M.V. Martins et al. // *Lab on a Chip*. – 2013. – 3 (3). – P. 468–474.
257. Mazar F.M. Development of novel glucose oxidase immobilization on graphene/gold nanoparticles/poly neutral red modified electrode / F.M. Mazar, M. Alijanianzadeh, A. Molaeirad, P. Heydari // *Process Biochemistry*. – 2017. – 56. – P. 71–80.
258. Bollella P. Minimally-invasive microneedle-based biosensor array for simultaneous lactate and glucose monitoring in artificial interstitial fluid / P.

- Bollella, S. Sharma, A.E.G. Cass // *Electroanalysis*. – 2019. – 31 (2). – P. 374–382.
259. Oz M. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system / M. Oz, D.E. Lorke, M. Hasan, G. A. Petroianu // *Medicinal research reviews*. – 2011. – 31 (1). – P. 93–117.
260. Sami M. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination / M. Sami, M. Ikeda, S. Yabuuchi // *Journal of fermentation and bioengineering*. – 1994. – 78 (3). – P. 212–216.
261. Степанова В.Б. Электрохимические ДНК-сенсоры на основе полиэлектролитных комплексов и наноразмерных медиаторов электронного переноса: автореф. дис. канд. хим. наук: 02.00.02 / Степанова Вероника Борисовна. – Казань, 2013. – 23 с.
262. Stoikov D.I. Electrochemical DNA sensors on the basis of electropolymerized thionine and Azure B with addition of pillar arene as an electron transfer mediator / D.I. Stoikov, A. V. Porfir'eva, D. N. Shurpik et al. // *Russian Chemical Bulletin*. – 2019. – 68 (2). – P. 431–437.
263. Martinez-Garcia G. An electrochemical enzyme biosensor for 3-hydroxybutyrate detection using screen-printed electrodes modified by reduced graphene oxide and thionine / G. Martinez-Garcia, E. Pérez-Julián, L. Agüí // *Biosensors*. – 2017. – 7 (4). – P. 50.
264. Li J. The benzoquinone-mediated electrochemical microbial biosensor for water biotoxicity assay / J. Li, Y. Yu, Y. Wang et al. // *Electrochimica Acta*. – 2013. – 97. – P. 52–57.
265. Lu D. A new phosphothreonine lyase electrochemical immunosensor for detecting Salmonella based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan / D. Lu, G. Pang, J. Xie. // *Biomedical microdevices*. – 2017. – 19 (1). – P. 12.
266. Ikeda T. Measurements of oxidoreductase-like activity of intact bacterial cells by an amperometric method using a membrane-coated electrode / T. Ikeda, T. Kurosaki, K. Takayama, K. Kano // *Analytical Chemistry*. – 1996. – 68 (1). – P. 192–198.

267. Бабкина Е.Е. Кинетические закономерности функционирования медиаторных биосенсоров на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*: дис. канд. хим. наук: 02.00.04, 03.00.23 / Бабкина Елена Евгеньевна. – Тула, 2006. – 129 с.
268. Понаморева О.Н. Закономерности функционирования ферментных систем микроорганизмов как биокатализаторов в амперометрических биосенсорах: автореф. дис. док. хим. наук: 03.01.06 / Понаморева Ольга Николаевна. – М., 2013. – 47 с.
269. Инджгия Е.Ю. Электрокаталитическое окисление этанола ферментными системами бактерий *Gluconobacter oxydans* в присутствии медиаторов ферроценового ряда: дис. канд. хим. наук: 03.01.06 / Инджгия Екатерина Юрьевна. – М., 2010. – 131 с.
270. Bard A.J. Electrochemical methods: fundamentals and applications / A.J. Bard, L.R. Faulkner // New York: John Wiley & Sons. – 1980. – 850 p.
271. Sekretaryova A.N. Cholesterol self-powered biosensor / A.N. Sekretaryova, V. Beni, M. Eriksson et al. // Analytical chemistry. – 2014. – 86 (19). – P. 9540–9547.
272. Sekretaryova A.N. Total phenol analysis of weakly supported water using a laccase-based microband biosensor / A.N. Sekretaryova, A.V. Volkov, I.V. Zozoulenko et al. // Analytica chimica acta. – 2016. – 907. – P. 45–53.
273. Christwardana M. Effects of methylene blue and methyl red mediators on performance of yeast based microbial fuel cells adopting polyethylenimine coated carbon felt as anode / M. Christwardana, D. Frattini, G. Accardo et al. // Journal of Power Sources. – 2018. – 396. – P. 1–11.
274. Sekretaryova A.N. Reagentless biosensor based on glucose oxidase wired by the mediator freely diffusing in enzyme containing membrane / A.N. Sekretaryova, D.V. Vokhmyanina, T.O. Chulanova et al. // Analytical chemistry. – 2012. – 84 (3). – P. 1220–1223.



275. Sekretaryova A.N. Unsubstituted phenothiazine as a superior water-insoluble mediator for oxidases / A.N. Sekretaryova, M.Yu. Vagin, V. Beni et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – 53. – P. 275–282.
276. Nicholson R.S. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics // *Analytical Chemistry*. – 1965. – 37 (11). – P. 1351–1355.
277. Siraj N. Cyclic voltammetric study of heterogeneous electron transfer rate constants of various organic compounds in ionic liquids: measurements at room Temperature / N. Siraj, G. Grampp, S. Landgraf, K. Punyain // *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. – 2013. – 227 (1). – P. 105–120.
278. Ribau I. A simple procedure to fabricate paper biosensor and its applicability —NADH/NAD<sup>+</sup> redox system / I. Ribau, E. Fortunato // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2018. – 6. – P. 175–187.
279. Vanegas D.C. Laser scribed graphene biosensor for detection of biogenic amines in food samples using locally sourced materials / D.C. Vanegas, L. Patino, C. Mendez et al. // *Biosensors*. – 2018. – 8 (2). – № 42.
280. Randviir E.P. A cross examination of electron transfer rate constants for carbon screen-printed electrodes using electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry // *Electrochimica Acta*. – 2018. – 286. – P. 179–186.
281. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1979. – 101 (1). – P. 19–28.
282. Zhao Y.D. The interface behavior of hemoglobin at carbon nanotube and the detection for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Y.D. Zhao, Y.H. Bi, W.D. Zhang, Q.M. Luo. // *Talanta*. – 2005. – 65 (2). – P. 489–494.
283. Bravo I. One-step reduced/quinone functionalized graphene oxide as reagentless lactate biosensing platform / I. Bravo, M. Revenga-Parraabc, K.

- Weberd et al. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – 267. – P. 533–541.
284. Raouf J.B. Carbon paste electrode incorporating multi-walled carbon nanotube/ferrocene as a sensor for the electroanalytical determination of N-acetyl-L-cysteine in the presence of tryptophan / J.B. Raouf, F. Chekin, R. Ojani, S. Barari // *Journal of Chemical Sciences*. – 2013. – 125 (2). – P. 283–289.
285. Nicholson R.S. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems / R.S. Nicholson, I. Shain. // *Analytical Chemistry*. – 1964. – 36 (4). – P. 706–723.
286. Ramirez-Delgado V. The role of the  $\pi$  acceptor character of polypyridine ligands on the electrochemical response of Co (II) complexes and its effect on the homogenous electron transfer rate constant with the enzyme glucose oxidase / V. Ramirez-Delgado, M. Cruz-Ramirez, L. F. Hernández-Ayala et al. // *Journal of the Mexican Chemical Society*. – 2015. – 59 (4). – P. 282–293.
287. Heller A. Electrochemical glucose sensors and their application in diabetes management / A. Heller, B. Feldman // *Applications of Electrochemistry in Medicine: MAOE book series*. – New York: Springer, 2013. – P. 121–187.
288. Catterall K. Development of a rapid ferricyanide-mediated assay for biochemical oxygen demand using a mixed microbial consortium / K. Catterall, H. Zhao, N Pasco., R. John. // *Analytical chemistry*. – 2003. – 75 (11). – P. 2584–2590.
289. Pasco N. MICREDOX®—development of a ferricyanide-mediated rapid biochemical oxygen demand method using an immobilised *Proteus vulgaris* biocomponent / N. Pasco, K. Baronian, C. Jeffries et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2004. – 20 (3). – P. 524–532.

290. Liu L. Native biofilm cultured under controllable condition and used in mediated method for BOD measurement / L. Liu, L. Deng, D. Yong, S. Dong. // *Talanta*. – 2011. – 84 (3). – P. 895–899.
291. Pasco N. Redox coupling to microbial respiration: an evaluation of secondary mediators as binary mixtures with ferricyanide / N. Pasco, J. Hay, A. Scott, J. Webber. // *Australian journal of chemistry*. – 2005. – 58 (4). – P. 288–293.
292. Liu L. A new mediator method for BOD measurement under non-deaerated condition / L. Liu, L. Shang, C. Liu et al. // *Talanta*. – 2010. – 81. – P. 1170–1175.
293. Yoshida N. A mediator-type biosensor as a new approach to biochemical oxygen demand estimation / N. Yoshida, K. Yano, T. Morita et al. // *Analyst*. – 2000. – 125 (12). – P. 2280–2284.
294. Yoshida N. Improvement of a mediator-type biochemical oxygen demand sensor for on-site measurement / N. Yoshida, K. Yano, J. Hoashi et al. // *Journal of biotechnology*. – 2001. – 88 (3). – P. 269–275.
295. Nakamura H. Recent organic pollution and its biosensing methods // *Analytical Methods*. – 2010. – 2 (5). – P. 430–444.
296. Rabinowitz J.D. Potentiometric measurement of intracellular redox activity / J.D. Rabinowitz, J.F. Vacchino, C. Beeson, H.M. McConnell. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1998. – 120 (10). – P. 2464–2473.
297. Trosok S. Mediated microbial biosensor using a novel yeast strain for wastewater BOD measurement / S. Trosok, B. Driscoll, J. Luong // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2001. – 56 (3–4). – P. 550–554.
298. Heiskanen A. Amperometric monitoring of redox activity in living yeast cells: comparison of menadione and menadione sodium bisulfite as electron transfer mediators / A. Heiskanen, J. Yakovleva, C. Spegel // *Electrochemistry Communications*. – 2004. – 6. – P.219–224.

299. Gao G. A double-mediator based whole cell electrochemical biosensor for acute biotoxicity assessment of wastewater / G. Gao, D. Fang, Y. Yu et al. // *Talanta*. – 2017. – 167. – P. 208–216.
300. Clegg A.D. Marcus theory of outer-sphere heterogeneous electron transfer reactions: High precision steady-state measurements of the standard electrochemical rate constant for ferrocene derivatives in alkyl cyanide solvents / A.D. Clegg, N.V. Rees, O.V. Klymenko et al. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2005. – 580 (1). – P. 78–86.
301. Jain A.K. Models and methods for in vitro toxicity / A.K. Jain, D. Singh, K. Dubey et al. // *In Vitro Toxicology: book chapter*. - New York: Academic Press. – 2018. – P. 45–65.
302. Taghizadeh A. Conductive polymers in water treatment: A review. / A. Taghizadeh, M. Taghizadeh, M. Jouyandeh et al. // *Journal of Molecular Liquids*. – 2020. – 312. – № 113447.
303. Zaman F.G. Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors / F.G. Zaman, H. Moulahoum, M. Ak et al. // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – 118. – P. 264–276.
304. Kandimalla V.B. A conductive ormosil encapsulated with ferrocene conjugate and multiwall carbon nanotubes for biosensing application / V.B. Kandimalla, V.S. Tripathi, H. Ju. // *Biomaterials*. – 2006. – 27. – P. 1167–1174.
305. Suzawa T. Synthesis of electroactive protein hybrid, Fec-BSA-Dig, and its application to a novel homogeneous electrochemical immunoassay / T. Suzawa, Y. Ikariyama, M. Aizawa // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1995. – 68. – P. 165–171.
306. Wei Z. Synergistic contributions of fullerene, ferrocene, chitosan and ionic liquid towards improved performance for a glucose sensor. / Z. Wei, Z. Li, X. Sun et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – 25 (6). – P. 1434–1438.

307. Qiu J.D. A nanocomposite chitosan based on ferrocene-modified silica nanoparticles and carbon nanotubes for biosensor application / J. D. Qiu, J. Guo, R. P. Liang, M. Xiong. // *Electroanalysis*. – 2007. – 19 (22). – P. 2335–2341.
308. Yang W. Synthesis of ferrocene-branched chitosan derivatives: redox polysaccharides and their application to reagentless enzyme-based biosensors / W. Yang, H. Zhou, C. Sun. // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2007. – 28. – P. 265–270.
309. Liang R. A Label-free amperometric immunosensor based on redox-active ferrocene-branched chitosan/multiwalled carbon nanotubes conductive composite and gold nanoparticles / R. Liang, L. Fan, D. Huang, J. Qiu. // *Electroanalysis*. – 2011. – 23 (3). – P. 719–727.
310. Garcia A. Ferrocene branched chitosan for the construction of a reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor / A. Garcia, C. Peniche-Covas, B. Chico et al. // *Macromolecular bioscience*. – 2007. – 7. – P. 435–439.
311. Nagarale R.K. Electrochemical properties of ferrocene modified polysiloxane/chitosan nanocomposite and its application to glucose sensor / R.K. Nagarale, J.M. Lee, W. Shin // *Electrochimica Acta*. – 2009. – 54. – P. 6508–6514.
312. Елецкий А. В. Углеродные нанотрубки и их эмиссионные свойства // *Успехи физических наук*. – 2002. – 172 (4). – С. 401–438.
313. Meibodi A.S.E. Amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrochemically polymerized film of polyaniline containing MWCNTs / A.S.E. Meibodi, S. Haghjoo. // *Synthetic Metals*. – 2014. – 194. – P. 1–6.
314. Chen Y.S. Glucose biosensor based on multiwalled carbon nanotubes grown directly on Si / Y.S. Chen, J.H. Huang, C.C. Chuang. // *Carbon*. – 2009. – 47. – P. 3106–3112.

315. Rather J.A. A biosensor fabricated by incorporation of a redox mediator into a carbon nanotube/nafion composite for tyrosinase immobilization: detection of matairesinol, an endocrine disruptor / J.A. Rather, S. Pilehvar, K. De Wael. // *Analyst*. – 2013. – 138. – P. 204–210.
316. Dervisevic M. Construction of novel xanthine biosensor by using polymeric mediator/MWCNT nanocomposite layer for fish freshness detection / M. Dervisevic, E. Custiuc, E. Çevik, M. Senel. // *Food Chemistry*. – 2015. – 181. – P. 277–283.
317. Fang D. A reagentless electrochemical biosensor based on thionine wrapped *E. coli* and chitosan-entrapped carbon nanodots film modified glassy carbon electrode for wastewater toxicity assessment / D. Fang, G.Gao, J. Shen // *Electrochimica Acta*. – 2016. – 222. – P. 303–311.
318. Blauch D.N. Dynamics of electron hopping in assemblies of redox centers./ D.N. Blauch, J.M. Saveant. // *Percolation and diffusion, Journal of the American Chemical Society*. – 1992. – 114 (9). – P. 3323–3332.
319. Гусев А.А. Острое токсическое и цитогенетическое действие углеродных нанотрубок на гидробионтов и бактерии // *Российские нанотехнологии*. – 2012. – 7. (9–10). – С. 71–77.
320. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *In Current Protocols in Molecular Biology: book chapter*. – New York: John Wiley & Sons. – 1997. – P. 2.4.1–2.4.5.
321. Степин С.Г. Набухание поливинилового спирта сшитого предельными дикарбоновыми кислотами. / С.Г. Степин, Е.А. Дикусар. // *Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации*. – 2015. – С. 174–175.
322. ГОСТ 14236-81. Пленки полимерные методы испытания на растяжение. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 1989.

Приложение 1. Сертификат о депонировании в ВКМ микроорганизмов  
*Paracoccus yeei*, выделенных из активного ила

G.K.SKRYABIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF MICROORGANISMS  
RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

ALL-RUSSIAN COLLECTION OF MICROORGANISMS



BKM  
All-Russian Collection of Microorganisms  
VKM

✉ 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia  
☎ +7(4967) 730924;  
FAX: +7(495)956-33-70  
📧 Internet E-mail: VKM@ibpm.pushchino.ru

CERTIFICATION OF STRAIN DEPOSIT AND AVAILABILITY

This is to certify that strain *Paracoccus yeei* SPBI has been deposited in the All-Russian collection of microorganisms (VKM) under the number **VKM B-3302**. This strain will be available without any restriction after publication by Arlyapov V.A. and Kharkova A.S. of the scientific paper concerned with the strain description.

Dr. Lyudmila Evtushenko

Head, All-Russian  
Collection of Microorganisms (VKM).

05.02.2019 r

Приложение 2. Свидетельство об утверждении типа средств измерений для  
анализатора «Эксперт-009»



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

# СВИДЕТЕЛЬСТВО

об утверждении типа средств измерений

RU.C.31.083.A № 61711

Срок действия до 11 марта 2021 г.

НАИМЕНОВАНИЕ ТИПА СРЕДСТВ ИЗМЕРЕНИЙ  
Анализаторы растворенного кислорода ЭКСПЕРТ-009

ИЗГОТОВИТЕЛЬ  
Общество с ограниченной ответственностью "ЭКОНИКС-ЭКСПЕРТ"  
(ООО "ЭКОНИКС-ЭКСПЕРТ"), г. Москва

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № 63403-16

ДОКУМЕНТ НА ПОВЕРКУ  
КТЖГ.414318.009 РЭ, раздел 8

ИНТЕРВАЛ МЕЖДУ ПОВЕРКАМИ 1 год

Тип средств измерений утвержден приказом Федерального агентства по  
техническому регулированию и метрологии от 11 марта 2016 г. № 259

Описание типа средств измерений является обязательным приложением  
к настоящему свидетельству.

Заместитель Руководителя  
Федерального агентства

С.С.Голубев

18" 03 ..... 2016 г.

Серия СИ

№ 023588



**Приложение 3. Метрологические характеристики анализатора  
растворенного кислорода «Эксперт-009» (согласно описания типа средства  
измерения)**

Наименование характеристики	Значение
Диапазон измерений массовой концентрации растворенного кислорода ( $c_{O_2}$ ), мг/дм <sup>3</sup>	от 0,2 до 20
Пределы допускаемой относительной погрешности анализаторов при измерении массовой концентрации растворенного кислорода при температуре анализируемой среды $(25\pm 1)^\circ\text{C}$	$\pm 2,5\%$
Пределы допускаемой относительной погрешности анализаторов при измерении массовой концентрации кислорода при температуре анализируемой среды от $5^\circ\text{C}$ до $50^\circ\text{C}$ , кроме температуры $(25\pm 1)^\circ\text{C}$	$\pm 10\%$
Диапазон измерений температуры анализируемого раствора, $^\circ\text{C}$	от 0 до 50
Диапазон температурной компенсации измерительной системы, $^\circ\text{C}$	от 5 до 50
Пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений температуры анализируемого раствора, $^\circ\text{C}$	$\pm 0,5$
Время установления рабочего режима после включения, с, не более	60
Продолжительность непрерывной работы, ч, не менее	8
Номинальное напряжение питания, В (встроенный аккумулятор, с индикацией разрядки)	12

Наименование характеристики	Значение
Потребляемая мощность, Вт, не более	6
Габаритные размеры измерительного преобразователя, мм, (длина×ширина×высота), не более - переносное исполнение - стационарное исполнение	200 × 110 × 70 250 × 340 × 100
Масса, кг, не более - переносное исполнение - стационарное исполнение	0,95 1,10
Условия эксплуатации: - температура окружающей среды, °С - относительная влажность при 25°С, %, не более - атмосферное давление, кПа мм рт.ст. - температура анализируемых растворов, °С	от 5 до 40 90 от 84 до 106,7 от 630 до 800 от 0 до 50
Показатели надежности: - средний срок службы, лет, не менее - средняя наработка на отказ, ч, не менее	10 5000

#### Приложение 4. Результаты аттестации методики МУ 09-16/001

Таблица 1. Диапазоны измерений, относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и точности при P=0,95.

Диапазон измерений, мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	Показатель повторяемости (относительное Среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r$ , %	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), $\sigma_R$ , %	Показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности P=0,95), $\pm\delta$ , <sup>1)</sup> %
От 0,5 до 200 включ.	8	10	15
Свыше 200	6	8	12
<sup>1)</sup> Соответствует относительному значению расширенной неопределенности с коэффициентом охвата k=2			

Таблица 2. Значения предела повторяемости и критического диапазона при доверительной вероятности  $P=0,95$ .

Диапазон измерений, мг $O_2/дм^3$	Предел повторяемости (относительное значение, которое с доверительной вероятностью $P=0,95$ не превышает абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях повторяемости), $r$ , %	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между наибольшим и наименьшим трех результатов измерений, полученных в одной лаборатории в условиях повторяемости), $CR_{0,95}(3)$ , %
От 0,5 до 200 включ.	22	26
Свыше 200	17	20

Таблица 3. Относительные значения пределов внутрилабораторной прецизионности при доверительной вероятности  $P=0,95$

Диапазон измерений, мг $O_2/дм^3$	Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), $R_L$ , %
От 0,5 до 200 включ.	28
Свыше 200	22

**Приложение 5. Свидетельство об аттестации методики измерений  
МУ 09-16/001**



ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО

Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения  
ГОЛОВНОЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ  
И ЭПИДЕМИОЛОГИИ  
(ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России)

*(регистрационный номер записи в реестре аккредитованных лиц в области обеспечения единства измерений № RA.RU.311955 от 22.11.2016 г.)*

**СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ (МЕТОДА) ИЗМЕРЕНИЙ**

№09-16/001.311955.2016

***«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»***

Методика выполнения измерений разработана ООО «Эконикс-Экперт» совместно с Тульским государственным университетом и предназначена для применения в лабораториях выполняющих контроль качества поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных вод и регламентирована в МУ 09-16/001 «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» (2016 г., 25с.)

Методика аттестована в соответствии с Федеральным законом «Об обеспечении единства измерений» № 102-ФЗ и ГОСТ Р 8.563-2009.

Аттестация осуществлена по результатам теоретического и экспериментального исследования методики измерений.

В результате аттестации методики измерений установлено, что методика измерений соответствует требованиям, предъявляемым ГОСТ Р 8.563-2009.

Основные метрологические характеристики измерений приведены в приложении на 1 л.

Главный врач

\_\_\_\_\_  
С.А. Богдан

Дата выдачи

30.11.2016г.

Россия, 123182, Москва, 1-й Пехотный пер., д. 6

Тел. (499) 190-4861 Факс (499) 196-6277 E-mail: [fmba-gcge@mail.ru](mailto:fmba-gcge@mail.ru)



## Приложение 6. Акт внедрения результатов диссертационного исследования



Научно-производственное предприятие

ООО «Эконикс-Эксперт», ИНН/КПП 7728209000/772801001,  
Юридический адрес: 117513, Москва, ул. Акад. Бакулева, 6, корп. 1  
Фактический адрес: г. Москва, п. Московский,  
Киевское шоссе, 22-й км, домовал.4, строен.2 этаж 6 (офис 603Г),  
блок Г (Бизнес Парк "Румянцево")  
Для переписки: 117513, г. Москва, а/я 55  
Телефон многоканальный: +7(499) 600-23-45, +7(495)974-23-45/46  
e-mail: [jonomer@joomer.ru](mailto:jonomer@joomer.ru)

Исх. 586 от 12,10,21

### Акт о внедрении результатов диссертационного исследования к.х.н., доцента ТулГУ Арляпова В.А. на тему «Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода»

ООО «Эконикс-Эксперт» является крупнейшим Российским производителем аналитического оборудования. Фирма выпускает современные электрохимические и оптические приборы для аналитического и лабораторного контроля, сертификации продукции, научно-исследовательской работы и студенческих практикумов.

При разработке серийно выпускаемого ООО «Эконикс-Эксперт» анализатора растворённого кислорода «Эксперт-009» использованы научные результаты диссертационного исследования Арляпова В.А. на тему «Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода». В качестве датчика анализатора «Эксперт-009» в комплекте для экспресс-анализа БПК использован кислородный электрод типа Кларка, модифицированный рецепторным элементом на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482, иммобилизованных в поливиниловый спирт, спитый N-винилпирролидоном. Разработка данного анализатора проводилась в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение №14.574.21.0062) с участием ООО «Эконикс-Эксперт» в качестве индустриального партнера Тульского государственного университета. В.А. Арляпов являлся ключевым исполнителем данного проекта со стороны ТулГУ.

Кроме того, Арляпов В.А. является разработчиком аттестованной для данного прибора методики «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» (МУ 09-16/001)».

Разработанный прибор совместно с аттестованной методикой анализа позволяет проводить определения БПК<sub>5</sub> в диапазоне 0,5 - 1000 мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> с относительной погрешностью не более 15% за время порядка 5-20 минут. Таким образом, внедрение такого анализатора в аналитических и заводских лабораториях может успешно заменить собой использование морально устаревшего 5-суточного метода оценки БПК по ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97. Использование простого и надежного экспресс-метода контроля содержания загрязняющих органических веществ в воде позволит быстро выявлять экологически-опасные ситуации и оперативно реагировать на них.

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты по изучению медиаторного переноса электронов и создания электродов, модифицированных редокс-активными полимерами, позволяют в перспективе создать более совершенный и миниатюрный прибор, отличающийся отсутствием необходимости в аэрации исследуемых образцов и более высокой чувствительностью методики, достигающийся за счет снижения рабочего потенциала и уменьшения влияния электроактивных примесей в анализируемых образцах.

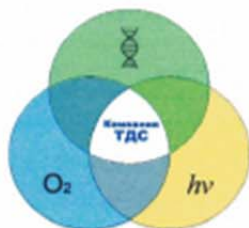
Генеральный директор  
ООО «Эконик-Эксперт»

д.х.н., профессор

Н.К. Зайцев



## Приложение 7. Акт о практическом использовании опытных образцов микробных биосенсоров



ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ

**"ТДС"**

ИНН/КПП 7726596241/773101001, ОГРН 1087746654093  
Юр. адрес: 121596, г. Москва, ул. Говорова, дом 16, стр 6, офис 13,  
тел.: +7(495) 825-01-85, доб.119,  
[www.tds-technology.ru](http://www.tds-technology.ru), e-mail: [tdsmoscow2015@gmail.com](mailto:tdsmoscow2015@gmail.com)

### АКТ

о практическом использовании и испытаниях опытных образцов микробных биосенсоров для экспресс-определения биохимического потребления кислорода, разработанных к.х.н., доцентом Тульского государственного университета Арляповым В.А.

В период с 1 марта по 17 сентября 2021 г. нами была испытана методика определения биохимического потребления кислорода (БПК) на образцах сточных и природных вод с использованием серийно выпускаемого анализатора растворенного кислорода «Эксперт-009» с амперометрическим датчиком – кислородным электродом типа Кларка (ООО «Эконикс-Эксперт») и рецепторного элемента на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482, иммобилизованных в поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном. Испытания проведены в соответствии с методикой МУ 09-16/001, разработанной к.х.н., доцентом Тульского государственного университета Арляповым В.А.

Цель испытаний – определение эффективности разработанной методики определения показателя БПК с использованием биосенсора с позиции оценки достоверности, воспроизводимости, надежности и сокращения времени анализа.

Измерения проводились в диапазоне БПК от 1 до 500 мг О<sub>2</sub>/л в соответствии с разработанной методикой МУ 09-16/001. Результаты по определению БПК, полученные с помощью биосенсора, сопоставимы с результатами анализа по стандартной пятисуточной методике (ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97) и подтвердили возможность резкого сокращения времени измерения БПК с 5 суток до 5-30 мин. Испытания показали пригодность разработанных биосенсоров для определения БПК применительно к загрязнениям хозяйственно-бытовых стоков городских и поселковых очистных сооружений, а также для определения фонового совокупного содержания органических загрязнений в природных водоемах.

Учитывая важность показателя БПК для совокупной комплексной оценки эффективности работы сооружений очистки сточных вод, качества сбрасываемой в водоемы сточной воды, определения трофности и уровня загрязненности природных водоемов, внедрение анализатора с биорецепторным элементом в аналитических и заводских лабораториях может успешно заменить собой использование классического 5-суточного метода оценки БПК по ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 и обеспечить простую и надежную экспресс-оценку совокупного содержания загрязняющих органических веществ в воде. Дальнейшее развитие и совершенствование метода определения БПК на основе



биосенсоров имеет важное практическое значение для организаций, занимающихся вопросами экологического мониторинга состояния природных водоемов, водоочистки и водоотведения.

В частности, наша Компания планирует в дальнейшем использовать разработанные БПК-биосенсоры для оснащения мобильных экологических лабораторий контроля качества очистки сточных вод и проведения мониторинговых исследований качества воды, сбрасываемой в природные водоемы, и их фоновой загрязненности в Московской области и в регионах Поволжья.

Генеральный директор,  
помощник министра ЖКХ Московской области

А.В. Мелиоранский



## Приложение 8. Письмо о внедрении результатов диссертационного исследования

*Центр экспертизы, аттестации и сертификации ТулГУ*  
*Место осуществления деятельности:*  
*Тульская область, г.Тула, Советский район, проспект Ленина, д.92*  
*Тульская область, г.Тула, Советский район, проспект Ленина, д.90*  
*Тел./факс: 8(4872)73-44-94/73-44-35, e-mail: ceastulgu@mail.ru*  
*Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21АЛ36*

### **Письмо о внедрении результатов диссертационного исследования к.х.н., доцента ТулГУ Арляпова В.А. на тему «Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода»**

Центр экспертизы, аттестации и сертификации (ЦЭАС) – структурное подразделение федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет» (ТулГУ), созданное 17 мая 2012 года в составе Инновационно-технологического центра ТулГУ на основании приказа № 711 от 16.05.2012 г. Одной из основных задач ЦЭАС является: экологический контроль за соблюдением природопользователями установленных экологических нормативов. Для оценки степени чистоты воды в настоящее время часто применяется параметр, определенный как индекс биохимического потребления кислорода (БПК). Существующий метод определения БПК основан на тестах, продолжительность которых составляет минимум 5 суток. В силу значительной продолжительности процедуры метод не является адекватным в современных условиях жизни, поскольку представляет результаты анализа со значительной задержкой. Высокая длительность классической методики оценки является существенной проблемой для всех аналитических лабораторий, занимающихся экологическим мониторингом.

Научные результаты диссертационного исследования Арляпова В.А. на тему «Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода» использованы для разработки коммерческого экспресс-анализатора БПК «Эксперт-009» и аттестации методики экспресс-анализа БПК для данного прибора. В 2018 году подготовленная диссертантом

«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» (МУ 09-16/001) внесена в область аккредитации ЦЭАС ТулГУ (представлена в приложении). За время использования методика в сочетании с анализатором «Эксперт-009» показали себя с лучшей стороны. Результаты анализа БПК<sub>5</sub> по внесенной экспресс-методике МУ 09-16/001 совпадают с результатами анализа по используемой ранее классической пятисуточной методике по ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97. Значительное сокращение времени анализа позволило увеличить количество исследуемых проб воды повысить экономическую отдачу возглавляемой мной лаборатории.



Директор ЦЭАС ТулГУ, к.т.н.

Павпертов Г. В.

Руководитель (заместитель руководителя)  
 м.п. Федеральной службы по аккредитации  
**КАЛАГОВ К.Э.**  
 подпись инициалы, фамилия  
 Приложение  
 к аттестату аккредитации  
 от " " 20\_\_ г.  
**24 ОКТ 2018**

на 5 листах, лист 1

**Область аккредитации**  
**Центр экспертизы, аттестации и сертификации (ЦЭАС)**  
**Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования**  
**«Тульский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ТулГУ»)**  
 наименование испытательной лаборатории (центра)

г. Тула, Советский район, проспект Ленина, д.92; г. Тула, Советский район, проспект Ленина, д.90  
 адрес места осуществления деятельности

№ п/п	Документы, устанавливающие правила и методы исследований (испытаний), измерений	Наименование объекта	Код ОКПД2	Код ТН ВЭД ЕАЭС	Определяемая характеристика (показатель)	Диапазон определения
1	2	3	4	5	6	7
г. Тула, Советский район, проспект Ленина, д.92						
1.	РЭ Анализатор жидкости «Эксперт-001-4-01»	Питьевые, природные и сточные воды	-	-	Растворенный кислород	0 – 20 мг/дм <sup>3</sup>
2.	ГОСТ 31858-2012	Питьевые воды			Альфа-ГХЦГ	0,1 – 6,0 мкг/дм <sup>3</sup>
					Бета-ГХЦГ	0,1 – 6,0 мкг/дм <sup>3</sup>
					Альдрин	0,1 – 6,0 мкг/дм <sup>3</sup>
					ДДЭ	0,1 – 6,0 мкг/дм <sup>3</sup>
					ДДД	0,1 – 6,0 мкг/дм <sup>3</sup>
					Гептахлор	0,02 – 1,2 мкг/дм <sup>3</sup>

1	2	3	4	5	6	7
3.	МУ 09-16/001	Поверхностные пресные, подземные, питьевые, сточные и очищенные сточные воды			БПК <sub>5</sub>	0,5 – 1000 мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>
4.	ПНДФ 14.1:2:4.113-97	Питьевые, поверхностные и сточные воды			Хлор активный	0,05 – 5,0 мг/дм <sup>3</sup>
5.	ФР 1.31.2001.00384	Промышленные выбросы			Сажа	1,0 – 50000 мг/м <sup>3</sup>
		Воздух рабочей зоны				2,0 – 50 мг/м <sup>3</sup>
6.	М-16	Промышленные выбросы			Формальдегид	0,05 – 50 мг/м <sup>3</sup>
7.	МВИ 2-05	Промышленные выбросы,			Бутан	0,1-1,0 мг/м <sup>3</sup>
8.	ГОСТ 12.1.014-84	Воздух рабочей зоны			Хлороформ	10 – 200 мг/м <sup>3</sup>
					Оксид азота	1 – 10 5 - 50 мг/м <sup>3</sup>
9.	РД 52.04.791-2014	Атмосферный воздух			Трихлорэтилен	2 – 150 мг/м <sup>3</sup>
10.	РД 52.04.793-2014				Аммиак	0,02 - 5,0 мг/м <sup>3</sup>
11.	РД 52.04.794-2014				Гидрохлорид (хлорид водорода)	0,04-2,0 мг/м <sup>3</sup>
12.	РД 52.04.798-2014				Серы диоксид	0,03-5,0 мг/м <sup>3</sup>
13.	РД 52.04.824-2015				Хлор	0,05-0,72 мг/м <sup>3</sup>
14.	МУК.4.1.598-06				Формальдегид	0,01-0,6 мг/м <sup>3</sup>
					Хлороформ	0,001-0,005 мг/м <sup>3</sup>
				Четыреххлористый углерод		
				Трихлорэтилен		
				Тетрахлорэтилен		
				Бромформ		
				1,1-дихлорэтилен		
				Дихлорметан		
15.	РЭ г/анализатор "Optima7"	Промышленные выбросы			Азота диоксид	0 - 500 ppm
16.	РЭ г/анализатора "Элан"	Воздух рабочей зоны, атмосферный воздух			Углерода оксид	0,6 - 50,0 мг/м <sup>3</sup>

1	2	3	4	5	6	7
г. Тула, Советский район, проспект Ленина, д.90						
21.	ГОСТ Р 53583-2009	Отопительные приборы системы водяного отопления зданий различного назначения	25.21.11.110	7322190000	Номинальный тепловой поток, Вт	-
22.	ГОСТ 31311-2005		25.21.11.120		7322110000	Прочность, МПа
			25.21.11.130	7616991009	Герметичность, МПа	-
			25.21.11.140		Статическая прочность, МПа	-
			25.21.11.150		Масса секции, кг	-
			25.21.11.160			

Проректор по инновациям и управлению имуществом



В.А. Осташев

М. П.