

РАЗРАБОТКА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

В.А. Алферов¹, В.А. Арлянов¹, А.Н. Решетилов^{1,2}

¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Биохимическое потребление кислорода (БПК) – один из наиболее широко используемых критериев для оценки качества воды. Это мера того органического загрязнения, которое может разлагаться биологически. Для этого теста был выбран традиционный пятидневный период еще в 1908 году, потому что это, предположительно, наибольшее время, которое требуется речной воде, чтобы пройти от источника до устья в Великобритании. Этот параметр определяется как количество кислорода в литре системы, поглощаемое за счет дыхательной активности микроорганизмов, использующих для своей жизнедеятельности присутствующие в образце органические соединения во время инкубации при определенной температуре (обычно 20 °С) в течение фиксированного периода. Традиционный метод определения БПК основан на инкубировании насыщенной кислородом пробы в течение 5 суток (БПК₅) и определении содержания кислорода до и после инкубации, что снижает оперативность анализа. Кроме того, результаты могут варьироваться в зависимости от лаборатории (20 %), в первую очередь из-за колебаний микробного разнообразия используемого посевного материала.

Показатель БПК₅ имеет три основных применения: во-первых, это показатель сброса сточных вод; во-вторых, на очистных сооружениях соотношение между БПК₅ и ХПК (химическое потребление кислорода) указывает на биоразлагаемую фракцию сточных вод; в-третьих, соотношение ХПК / БПК₅ является показателем размера проектируемой станции очистки сточных вод, которая необходима для конкретного объекта загрязнения. Таким образом, БПК является важнейшим критерием мониторинга и очистки сточных вод. Исследования в течение двух последних десятилетий привели к созданию нескольких технологий, которые требуют меньше времени и более надежны. Наряду с модификациями стандартного метода для упрощения аналитических измерений, принципиально новыми подходами стали аналитические биотехнологии с применением: биосенсоров на основе иммобилизованных микроорганизмов с использованием кислородного электрода; биосенсоров на основе редокс-медиаторов; биореакторов; биотопливных элементов (БТЭ), прежде всего, микробных топливных элементов (МТЭ) [1]. В научном коллективе НОЦ «Экобиотехнология» (Тульский государственный университет и Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН) более десяти лет проводятся исследования по разработке микробных биосенсоров и БТЭ для определения этого важнейшего для экологического мониторинга показателя загрязнения водных объектов [2, 3].

К преимуществам микробных БПК-биосенсоров на основе иммобилизованных микроорганизмов можно отнести: короткое время ответа, портативность, удобство в работе, а также отсутствие специальных требований к приготовлению исследуемого образца. Биосенсор на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованных в поливиниловый спирт-N-винилпирролидон, продемонстрировал высокую чувствительность, стабильность и высокую степень корреляцию со стандартным методом [4]. Тульским государственным университетом совместно с ООО «Эконикс–Эксперт» разработан и изготовлен экспериментальный образец амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс – определения БПК на основе микроорганизмов иммобилизованных в гидрогель химически модифицированного поливинилового спирта (БПК-термооксиметр «Эксперт-009») (рис 1).

Важно отметить, что в России аналогичные анализаторы до настоящего времени промышленно не выпускались, и отсутствовала аттестованная методика экспресс-определения БПК. Несмотря на выпуск экспериментального образца анализатора, работа по улучшению потребительских характеристик биосенсора продолжается. Применение золь-гель технологий иммобилизации микроорганизмов в органомодифицированные силикагели позволило разработать стабильный биорецепторный элемент для БПК-биосенсора, который сохранял свою активность после УФ-облучения [5]. Высокой чувствительности определения БПК с помощью биосенсора при исследовании чистых водных объектов удалось достичь путем применения искусственной ассоциации микроорганизмов в рецепторном элементе сенсора [6, 7]. Пространственное разделение микроорганизмов в геле позволило добиться более высокой стабильности в работе биосенсора [8] (рис 2).

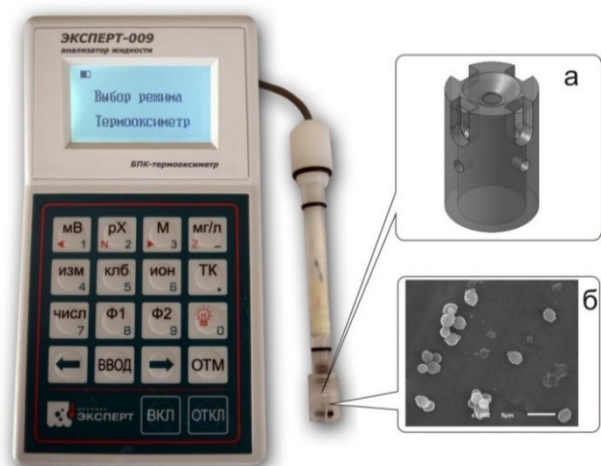
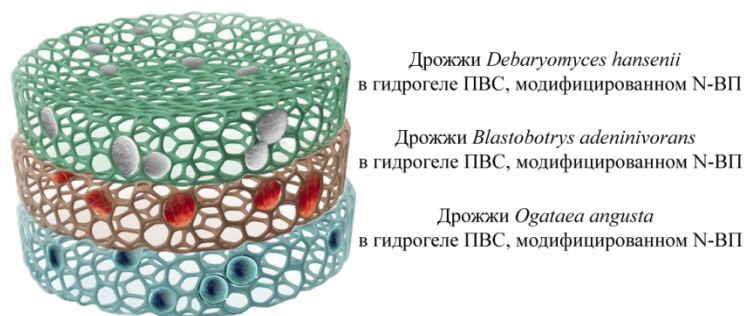
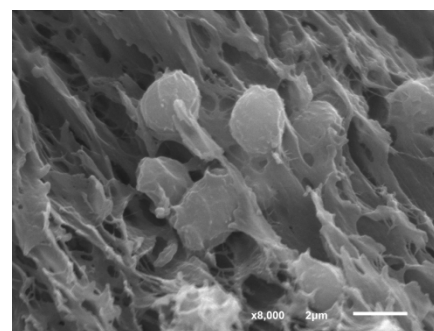


Рисунок 1. Внешний вид БПК-термооксиметра «Эксперт-009» с амперометрическим датчиком; а – фиксатор биорецепторного элемента, б – микрофотография дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, используемых в биорецепторном элементе

Медиаторы – ферроцен, 1,1'-диметилферроцен, ферроценкарбоксальдегид, ферроценацетонитрил, нейтральный красный, 2,6 – дихлорфенолиндифенол, тионин, метиленовый синий и феррицианид калия в сочетании с иммобилизованными дрожжами *Debaryomyces hansenii* использовали в составе рецептора биосенсора [10].



А



Б

Рисунок 2. А – схема послойной иммобилизации дрожжевых микроорганизмов *Ogataea angusta*, *Blastobotrys adeninivorans*, *Debaryomyces hansenii* в гель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном; Б – СЭМ фотография рецепторного элемента на основе модифицированного ПВС с иммобилизованными микроорганизмами после набухания в буферном растворе (показан слой с дрожжами *D. hansenii*).

Три бактериальных штамма SPB1, SPB2 и SPB3, выделенные из активного ила очистных сооружений, наиболее эффективно по сравнению с остальными штаммами окисляли модельный раствор на основе глюкозы и глутаминовой кислоты в присутствии медиатора ферроцена. Изучена возможность использования выделенных штаммов в качестве основы медиаторного амперометрического БПК-биосенсора. Анализ генов 16S рРНК показал, что штаммы SPB1, SPB2 и SPB3 на 99.79–100 % близки к штаммам *Paracoccus yeii* BAA-599T, *Pseudomonas veronii* DSM 11331T и *Bacillus proteolyticus* TD42T, соответственно. Анализ десяти проб сточной воды (до и после очистки) и рек Тульской области показал, что использование ферроцена и клеток штамма *P. yeii* SPB1 позволило получать данные, имеющие высокую корреляцию ($R = 0.9934$) с результатами стандартного метода [11].

Для повышения эффективности переноса электрона использовали двухмедиаторные системы на основе комбинаций медиаторов, потенциально способных к переносу электронов, и дрожжей *Debaryomyces hansenii*. Разработанные двухмедиаторные биосенсоры по своим характеристикам превосходили свои одномедиаторные аналоги [12]. В другом исследовании расширили спектр микроорганизмов, способных участвовать в медиаторном переносе электронов [13]. Использование окислительно-восстановительных полимеров на основе бычьего сывороточного альбумина и хитозана, ковалентно связанных с медиаторами и содержащих углеродные нанотрубки, для иммобилизации бактерий *Paracoccus yeai* ВКМ В-3302 позволило сконструировать БПК-биосенсор с высокой чувствительностью (рис 3). Результаты биосенсорного анализа поверхностных вод коррелировали с результатами стандартного метода ($R = 0,9916$) [9].

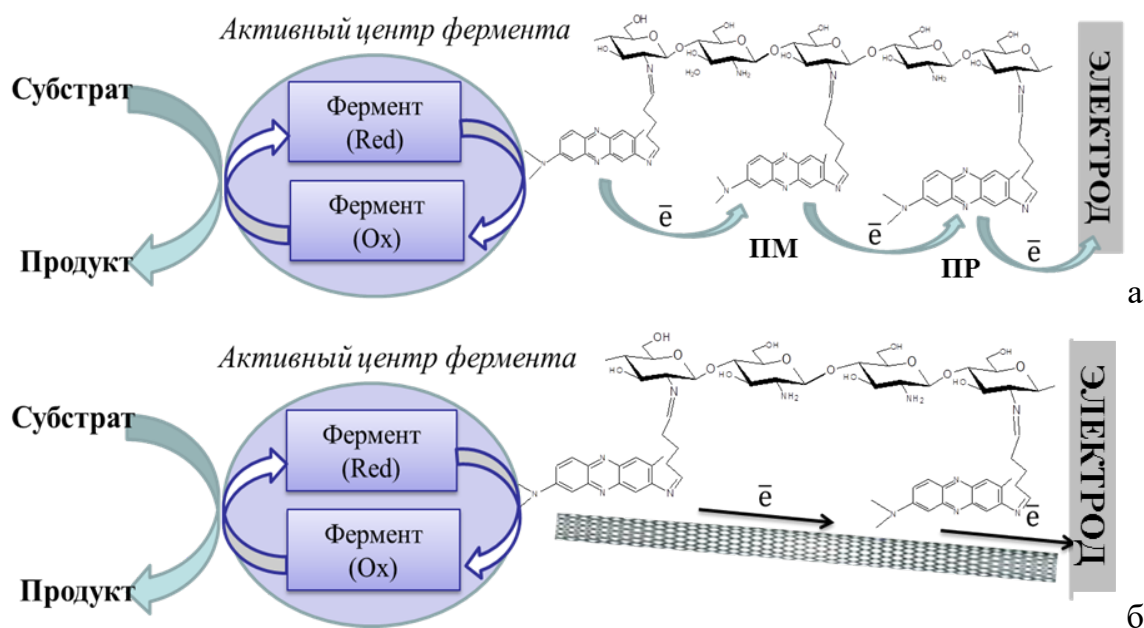


Рисунок 3. Перенос электронов на электрод в редокс-активном полимере на основе хитозана и нейтрального красного а) – в отсутствие углеродных нанотрубок; б) – в присутствии углеродных нанотрубок. (ПР – поверхностная реакция на электроде, ПМ – прыжковый механизм переноса электронов)

Следует отметить, что в последнее время основное внимание ученых направлено на разработку микробных топливных элементов, которые способны не только вырабатывать электроэнергию из органических соединений в сточных водах, но и регистрировать БПК, о чем свидетельствуют последние обзоры в этой области [14–16]. Для детекции индекса биохимического потребления кислорода применили анод микробного топливного элемента, который формировали, используя активированный графитовый электрод, модифицированный поливиниловым спиртом, содержащим N-винилпирролидон и иммобилизованные бактерии *Gluconobacter oxydans*. Применение этой матрицы позволило получить микробный топливный элемент с высокой чувствительностью и минимальным временем единичного измерения индекса БПК₅, составляющими 8.3 мВ дм³/мг O₂ и 30 мин соответственно. При этом нижняя граница определяемых значений биохимического потребления кислорода была 0.34 мг O₂/дм³. Полученные результаты БПК₅ сточных вод коррелировали с данными стандартного метода (коэффициент корреляции составлял 0.99). Параметры предложенной модели биосенсора превосходили описанные аналоги по таким характеристикам, как нижний предел детекции и минимальное время одиночного измерения [17].

Исследования выполнены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки РФ (No. FEWG-2020-0008).

Литература

- Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. // *Water Res.* 2014. V.49. P. 62–82.
- Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор). // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2011. Т.47(1). С. 5–15.
- Арляпов В.А., Алферов В.А. Понаморева О.Н. Амперометрические биосенсоры. Применение для экологического мониторинга и контроля биотехнологических процессов, LAP LAMBER Academic Publishing. 2013. 245 с.
- Арляпов В.А., Юдина Н.Ю., Алферов С.В., Асулян Л.Д., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Биосенсорный электрод на основе композиции поливиниловый спирт – N-винилпирролидон для экспресс-определения биохимического потребления кислорода. // *Сенсорные системы.* 2012. Т. 26. № 3. С. 246–255.
- Kamanina O, Arlyapov V, Rybochkin P, Lavrova D, Podsevalova E, Ponamareva O. Application of organosilicate matrix based on methyltriethoxysilane, PVA and bacteria *Paracoccus yeei* to create a highly sensitive BOD. 3 *Biotech.* 2021; 11(7):331.
- Arlyapov V, Kamanin S, Ponamareva O, Reshetilov A. Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and microbial technology.* 2012; 50(4–5):215–20.
- Yudina N, Arlyapov V, Chepurnova M, Alferov S, Reshetilov A. A yeast co-culture-based biosensor for determination of waste water contamination levels. *Enzyme and microbial technology.* 2015; 78:46–53.
- Arlyapov V, Yudina N, Machulin A, Alferov V, Ponamareva O, Reshetilov A. A Biosensor based microorganisms immobilized in layer-by-layer films for the determination of biochemical oxygen demand. // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2021. V.7(1). P.133–41.
- Arlyapov VA, Kharkova AS, Kurbanaliyeva SK, Kuznetsova LS, Machulin AV, Tarasov SE, et al. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor. // *Enzyme and microbial technology.* 2021. V.143. P.109706.
- Зайцева А.С., Арляпов В.А., Юдина Н.Ю., Носова Н.М., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе ферроцена и дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 3. С. 341–348.
- Харькова А.С., Арляпов В.А., Туровкая А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетилов, А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т.55. С. 119–209.
- Zaitseva A, Arlyapov V, Yudina N, Alferov S, Reshetilov A. Use of one – and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii*. // *Enzyme and microbial technology.* 2017. V.98. P.43–51
- Kharkova A, Arlyapov V, Ilyukhina A, Ponamareva O, Alferov V, Reshetilov A. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay. // 3 *Biotech.* 2021 V.11(5).
- Hao, S., Sun, X.X., Zhang, H., Zhai, J.F. and Dong, S.J. Recent development of biofuel cell based self-powered biosensors. // *Journal of Materials Chemistry.* 2020. V. B 8(16). P. 3393–3407.
- Do M, Ngo H, Guo W, Chang S, Nguyen D, Liu Y, et al. Microbial fuel cell-based biosensor for online monitoring wastewater quality: A critical review. *Science of the Total Environment.* 2020 V.712. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135612.
- ElMekawy A, Hegab H, Pant D, Saint C. Bio-analytical applications of microbial fuel cell-based biosensors for onsite water quality monitoring. // *Journal of Applied Microbiology.* 2018. V.124(1). P.302–13.
- Alferov S, Arlyapov V, Alferov V, Reshetilov A. Biofuel Cell Based on Bacteria of the Genus *Gluconobacter* as a Sensor for Express Analysis of Biochemical Oxygen Demand. // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2018. V.54(6). P.689–94.