

УДК 602.4:628.35:664

**РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРНОГО АНАЛИЗАТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА**

В.А. Алферов, В.А. Арляпов, Н.Ю. Юдина, М.Г. Зайцев

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Экспресс-оценка степени загрязнения объектов окружающей среды органическими соединениями является необходимым компонентом экологического контроля. Учитывая постоянно растущий перечень веществ, поступающих как загрязнители в окружающую среду, эффективным инструментом анализа оказываются методы, основанные на интегральной оценке органических компонентов, а не только на определении содержания индивидуальных веществ. Биохимическое потребление кислорода (БПК) является одним из наиболее широко используемых показателей для контроля чистоты водных сред и представляет, по определению, количество кислорода, необходимое для биохимического окисления органических веществ, содержащихся в образце. Традиционная методика определения БПК требует инкубирования насыщенной кислородом пробы в течение 5, 10 или 20 суток (БПК₅, БПК₁₀ или БПК₂₀, соответственно) [1, 2]. Отсутствие оперативности существенно снижает ценность традиционной методики. Поэтому активно разрабатываются методы экспресс-оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов. Принципиальным отличием данного метода от стандартного является значительное сокращение времени анализа от 5 суток до нескольких минут.

Биосенсорные анализаторы БПК представляют собой современные аналитические инструменты и с успехом используются для контроля водных экосистем (наряду с традиционными методами определения БПК) за рубежом. К преимуществам биосенсоров можно отнести: короткое время ответа, портативность, удобство в работе, а также отсутствие специальных требований к подготовке исследуемого образца [3]. Микроорганизмы, на которых основан рецепторный элемент БПК-биосенсоров, являются доступным биологическим материалом. Клетки микроорганизмов легко воспроизводятся, культивируются и поддерживаются в чистой культуре. В некоторых случаях они обеспечивают жизнеспособность и активность ферментных систем в течение нескольких лет. Важно отметить, что в России аналогичные анализаторы до настоящего времени промышленно не выпускались. Кроме того, отсутствовала аттестованная методика экспресс-определения БПК.

На данный момент описано большое количество лабораторных моделей и несколько промышленно выпускаемых биосенсорных анализаторов БПК. Биосенсоры позволяют производить определение БПК в среднем диапазоне 2–300 мг/л за время порядка нескольких минут. Однако большое количество публикаций, выходящих регулярно по данной тематике, свидетельствуют о том, что еще не получены характеристики, которые остановили бы процесс дальнейшего поиска. Актуальными проблемами разработки БПК-сенсоров являются повышение чувствительности анализа, увеличение времени жизни биоматериала в рецепторных элементах биосенсоров и упрощение требований по обслуживанию анализатора [4, 5].

Указанные вопросы составляют цель исследования данной работы. Решение описанных выше проблем может осуществляться, с одной стороны, разработкой конструкции анализатора, которая позволит упростить работу и обслуживание БПК-биосенсора при невысокой стоимости. С другой стороны, работа направлена на подбор штаммов микроорганизмов, обладающих широкой субстратной специфичностью и разработку новых способов иммобилизации биоматериала, обеспечивающих длительное время функционирование биосенсора при сохранении высокой активности биокатализатора.

Электрохимические измерения в работе проводили с использованием анализатора растворенного кислорода «Эксперт-009» (ООО «Эконикс-эксперт», Россия), сопряженного с персональным компьютером, работающим под управлением специализированного программного обеспечения EXP2PR (ООО «Эконикс-эксперт», Россия). Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения концентрации кислорода при добавлении субстратов ($\text{мг O}_2/\text{дм}^3 \cdot \text{мин}$). Датчиками являлись кислородные электроды типа Кларка с иммобилизованными клетками микроорганизмов. В качестве модельной использовали смесь глюкозы и глютаминовой кислоты (ГГС) в массовом соотношении 1:1 (глюкоза: глютаминовая кислота), которую применяют как стандарт в определении БПК₅ в Российской Федерации и международной практике [1, 2]. В соответствии с нормативной документацией [1] принимали, что БПК₅, равное $205 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$, соответствует раствору, содержащему $150 \text{ мг}/\text{дм}^3$ глюкозы и $150 \text{ мг}/\text{дм}^3$ глютаминовой кислоты ($\text{БПК}_5 = 0,68 \times C_{\text{ГГС}}$).

Основной задачей при определении показателя БПК является измерение концентрации кислорода в ходе биохимической реакции с иммобилизованными микроорганизмами. Каждый микроорганизм имеет определенную субстратную специфичность, то есть способен окислять определенный круг субстратов. Стандартный метод определения БПК требует инкубирования насыщенной кислородом пробы воды, в которую вносят активный ил (смесь различных микроорганизмов), имеющий очень широкий спектр окисляемых субстратов. Таким образом, использование микроорганизмов с широкой субстратной специфичностью является необходимым требованием и позволяет повысить правильность определения БПК методом с использованием биосенсора.

В работе произведена оценка спектра окисляемых субстратов для 10 штаммов микроорганизмов, относящихся к родам: *Archula*, *Pichia*, *Candida* и *Debaryomyces*. Все используемые культуры микроорганизмов были получены во Всероссийской коллекции микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Оценка субстратной специфичности отдельных штаммов исследуемых микроорганизмов проведена с использованием 34 субстратов, относящихся к различным классам органических соединений. В качестве метода иммобилизации было использовано включение в гидрогель модифицированного поливинилового спирта (ПВС). ПВС химически и микробиологически стабилен, нетоксичен и биосовместим [6], что обуславливает эффективное использование полимера в качестве матрицы для иммобилизации клеток микроорганизмов. Новым подходом авторского коллектива к иммобилизации микроорганизмов для создания распознающих элементов биосенсоров является использование N-винилпирролидона для модификации ПВС [7]. N-винилпирролидон не только практически нетоксичен, но и повышает активность некоторых микроорганизмов [8]. Использование N-винилпирролидона для модификации ПВС позволяет значительно повысить механические характеристики полимера и, как результат, долговременную стабильность получаемых рецепторных элементов при сохранении высокой чувствительности и широкой субстратной специфичности [6]. На рисунке 1 представлен пример диаграммы субстратной специфичности для дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованных в химически модифицированный ПВС.

В результате изучения субстратной специфичности показано, что из всех используемых микроорганизмов дрожжи *D. hansenii* ВКМ Y-2482 характеризуются наиболее широкой субстратной специфичностью и окисляют вещества большой группы представленных классов органических соединений, таких как спирты, углеводы, аминокислоты и поверхностно-активные вещества, нитрофенолы, которые могут быть обнаружены в сточных и поверхностных водах.

Характеристики разработанного биосенсорного анализатора на основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованных в химически модифицированный поливиниловый спирт, представлены в таблице 1.

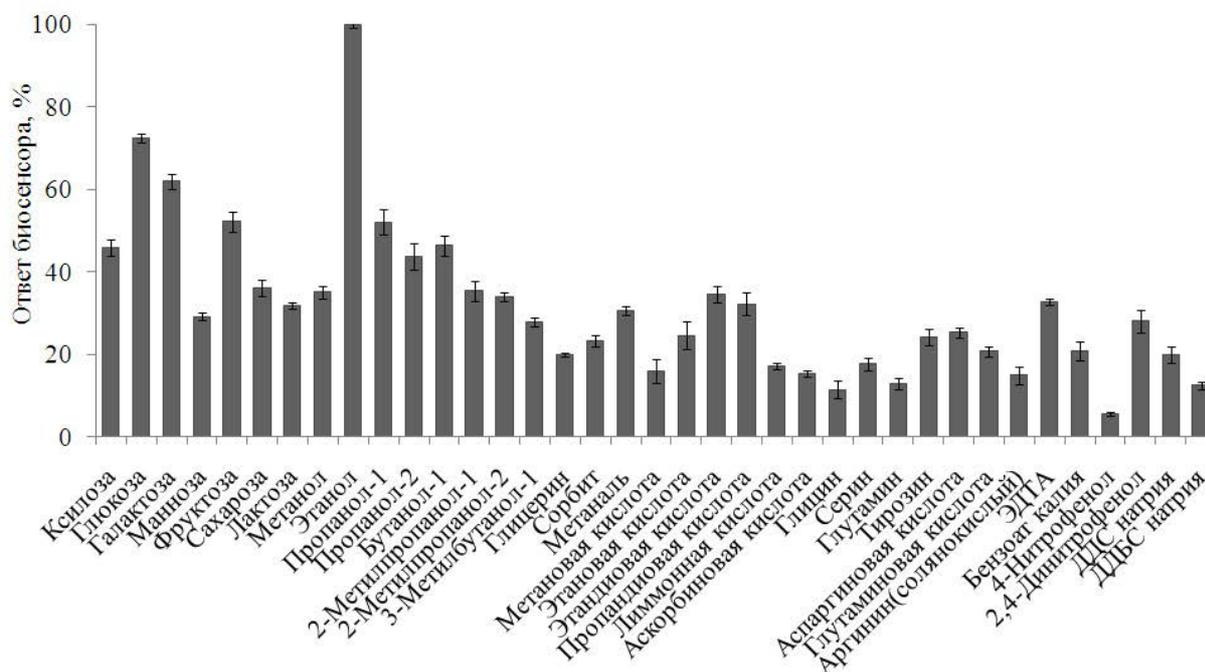


Рисунок 1. Субстратная специфичность рецепторного элемента на основе дрожжей *Debaromyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованных в химически модифицированный ПВС.

Таблица 1. Характеристики биосенсорного анализатора на основе микроорганизмов *D. hansenii*.

Характеристика биосенсора	Описание характеристики	Значение характеристики
Операционная стабильность	Относительное стандартное отклонение по 15 последовательным измерениям, %	2,0
Долговременная стабильность	Время, в течение которого величина ответа биосенсора на одну и ту же концентрацию ГГС составляло не менее 25 % от начальной, суток	42
Чувствительность	Тангенс угла наклона линейного участка зависимости ответа сенсора от БПК ₅ , мин ⁻¹	0,0047 ± 0,0003
Длительность одиночного измерения	мин	5–7
Диапазон определяемых содержаний БПК ₅	мг О ₂ /дм ³	0,16–30,0

Полученное значение нижней границы (0,16 мг О₂/дм³) позволяет анализировать образцы воды категории «очень чистая». Важно отметить, что разработанный амперометрический биосенсорный анализатор по аналитическим и метрологическим характеристикам не только не уступает мировым аналогам [3, 4], но и частично превосходит их. Так, он обладает более низкой нижней границей определяемых значений БПК₅ в сравнении с описанными прототипами [9, 10]. Кроме того, единичный анализ БПК с помощью разработанного анализатора требует меньших временных затрат [4, 11].

ФБУ «ЦСМ Московской области» на собственной испытательной базе с 01.09.2015 по 11.12.2015 г. провёл испытания созданного анализатора в целях утверждения типа анализаторов растворенного кислорода «Эксперт-009» в соответствии с программой испытаний, утвержденной ФБУ «ЦСМ Московской области» 25.09.2015 г. Результаты испытаний положительные. Испытания разработанного амперометрического биосенсорного анализатора проводились на базе «Центра экспертизы, аттестации и сертификации ТулГУ» (Аттестат аккредитации № РОСС RU.001.21АЛ36).

Анализируемые пробы представляли собой сточные воды городских очистных сооружений, отобранные на разных стадиях очистки, сточные воды пищевого комбината, талые воды с территории металлоперерабатывающего предприятия и поверхностные воды нескольких водоемов Тульской области. Определение БПК₅ стоков стандартным методом разбавления проводилось согласно действующим в РФ нормативным документам [1]. Корреляция между значениями БПК, определенными с помощью разработанного анализатора, и значениями БПК, определенными стандартным методом разбавления составила $R = 0,9999$ (рисунок 2).

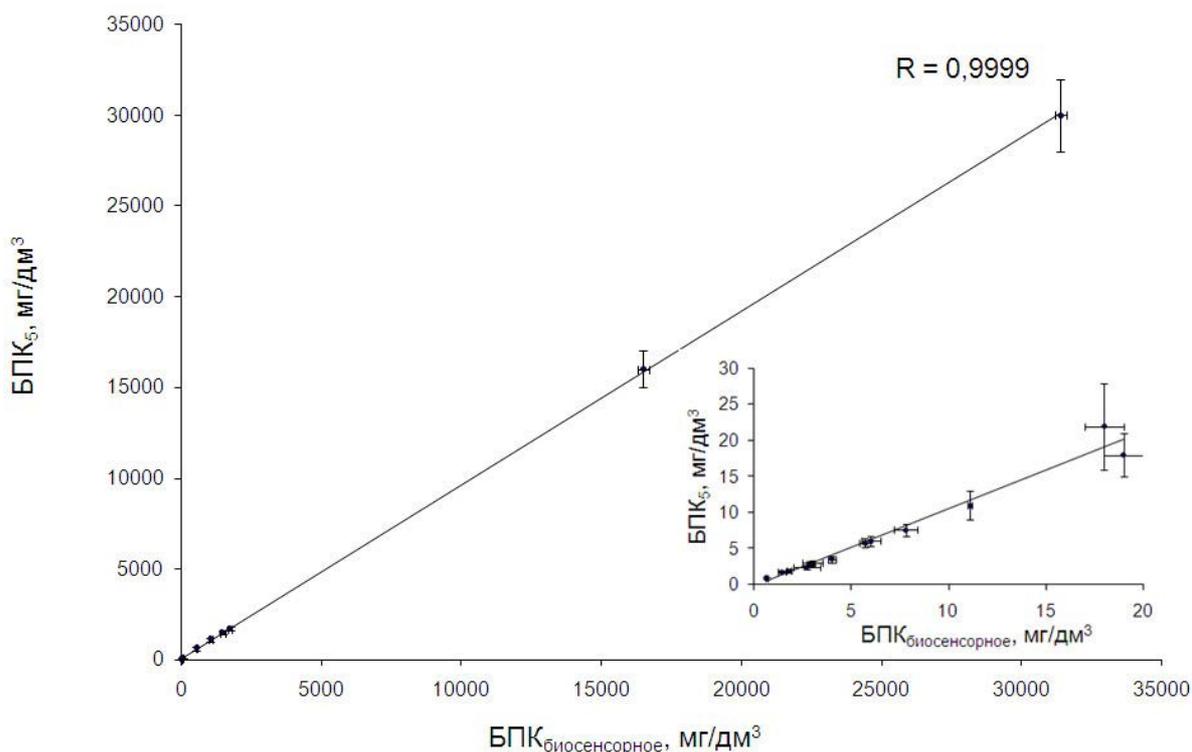


Рисунок 2. Корреляция между значениями БПК, определенными с помощью разработанного биосенсора и значениями БПК, определенными стандартным методом.

Важно отметить, что по коэффициенту корреляции между значениями БПК₅, определенными стандартным методом, и значениями БПК, определенными с использованием биосенсора, разработанный амперометрический анализатор превосходит большинство известных коммерчески-доступных аналогов [3, 11]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанного биосенсорного анализатора как прототипа опытных образцов приборов для серийного применения.

На основе полученных результатов создана методика МУ 09–16/001 «Методика (метод) выполнения измерений биохимического потребления кислорода после 5 дней инкубации (БПК₅) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах с помощью анализатора растворенного кислорода с амперометрическим датчиком с рецепторным элементом на основе иммобилизованных микроорганизмов». Данная методика аттестована Федеральным государственным бюджетным учреждением здравоохранения «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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПКполн) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. // Министерство охраны окружающей среды и природных ресурсов. РФ. 1997. Москва: 25 с.
2. Water quality-determination of biochemical oxygen demand after n days (BODn) – Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition. 2003.
3. Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review // *Water research*. 2014. Т. 49. С. 62–82.
4. Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода // *Прикладная биохимия и микробиология*. Т. 47. № 1. 2011. С. 5–15.
5. Bourgeois W., Burgess J.E., Stuetz R.M. On-line monitoring of wastewater quality: a review // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2001. V 76. 337–348.
6. Handbook of Biosensors and Biochips. // Edited by Marks R.S., Cullen D.C., Karube I., Lowe C.R., Weetall H. 2007. 356 p.
7. В.А. Алферов, Н.М. Филатова, Л.Д. Асулян, И.В. Блохин, А.А. Горячева. Получение стабильного рецепторного элемента биосенсора, иммобилизацией бактериальных клеток *Glucosobacter ohydans* в пленку из поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. // *Известия ТулГУ Естественные науки*. 2011. № 1. С. 210–219.
8. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов // *Прикл. биохим. микробиол.* 2008. № 2. С. 30–31.
9. Jianbo J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S. Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material // *Biosen. Bioelectron.* 2003. V. 18. № 8. P. 1023–1029.
10. Jiang Y., Xiao L-L, Zhao L, Chen X., Wang X., Wong K-Y. Optical biosensor for the determination of BOD in seawater. // *Talanta* 2006. V. 70. № 1. P. 97–103.
11. Chang I.S., Moon H., Jang J.K., Kim B.H. Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors // *Biosen. Bioelectron.* 2005. V. 20. № 9. P. 1856–1859.