

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ РЕДОКС-АКТИВНЫХ ПОЛИМЕРОВ  
НА ОСНОВЕ УНТ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МАТРИЦ  
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БПК-БИОСЕНСОРА**

*В.А. Арляпов, А.С. Харькова, С.К. Курбаналиева, Л.С. Кузнецова*

*Тульский государственный университет, Тула, Россия*

Экспресс-оценка загрязнения объектов окружающей среды, в частности, определение органических примесей в поверхностных, грунтовых и сточных водах, является актуальной задачей. Важной характеристикой степени загрязненности окружающей среды, в частности воды, органическими веществами является индекс биохимического потребления кислорода (БПК). Продолжительность стандартного метода определения БПК составляет минимум 5 суток (для определения БПК<sub>5</sub>), что может стать причиной попадания загрязняющих веществ в природные водоёмы, их эвтрофикации и гибели полезных гидробионтов [1]. Существует несколько методов, обеспечивающих высокую точность измерения БПК, однако их использование затруднено в силу высокой стоимости специализированного оборудования, необходимости привлечения обученного персонала и значительной длительности анализов [2].

Альтернативой стандартному методу являются кислородные и медиаторные микробные биосенсоры. Наиболее перспективными являются медиаторные биосенсоры, так как при измерении их аналитический сигнал не зависит от концентрации растворенного кислорода, позволяя тем самым проводить анализ в анаэробных условиях. Кроме того, их использование позволяет изменять рабочий потенциал, тем самым снижая шумовые помехи, связанные с окислительно-восстановительными реакциями на электроде окислителей или восстановителей, присутствующих в пробе. Современным и эффективным подходом к созданию медиаторных биосенсоров является использование редокс-активных полимеров, полученных на основе сшивки медиатора с полимерами, применяющимися для иммобилизации микроорганизмов [3]. Интерес к подобным разработкам вызван преимуществами данных материалов при создании биосенсоров на их основе. Редокс-активные полимеры достаточно эффективны, обеспечивают стабильность сенсора, безреагентность анализа, отсутствие вымывания медиатора в процессе работы и могут использоваться для создания биосенсоров на основе клеток микроорганизмов.

Несмотря на множество преимуществ синтезированных и описанных в литературе 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 целью данной работы стало исследование возможности создания биоэлектродов на основе бактерий *P. yeii* и редокс-активных полимеров на основе бычьего сывороточного альбумина и хитозана, модифицированных медиаторами электронного транспорта и углеродными нанотрубками для создания высокочувствительного БПК-биосенсора.

В качестве медиаторов для получения проводящих систем за счет наличия необходимых функциональных групп и медиаторных свойств использовали нейтральный красный (НК) и ферроценкарбоксальдегид (ФЦ). Выбор бычьего сывороточного альбумина (БСА) и хитозана (ХИТ) для синтеза редокс-активных полимеров обусловлен их высокой биосовместимостью и нетоксичностью. Данные свойства необходимы при использовании разработанных редокс-активных полимеров в качестве матриц для иммобилизации микроорганизмов при создании биосенсоров. Как было показано в работе [4], бактерии *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 обладают способностью окислять широкий спектр органических соединений; 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, в котором глутаровый альдегид играл роль сшивающего реагента. Химическую структуру полученных матриц, модифицированных медиатором, изучали с помощью ИК-спектроскопии. Физическая структура исследуемых проводящих гидрогелей была изучена методом сканирующей электронной микроскопии.

Показано, что 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. yeii* встраиваться в данный полимер. При использовании углеродных нанотрубок происходит их равномерное распределение в структуре синтезированных матриц.

Электрохимические свойства полученных проводящих гелей исследовали методом циклической вольтамперометрии. 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. 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; УНТ играют роль мостиков, по которым электроны переносятся по редокс-активному полимеру на электрод. Кроме того, введение нанотрубок увеличивает площадь контакта проводящей матрицы с поверхностью электрода.

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. В случае, если прыжковый механизм осуществляется достаточно быстро и процесс лимитируется поверхностной реакцией на электроде – ток пропорционален скорости развертки. Типичные виды изучаемых циклических зависимостей представлены на рис. 1 а.

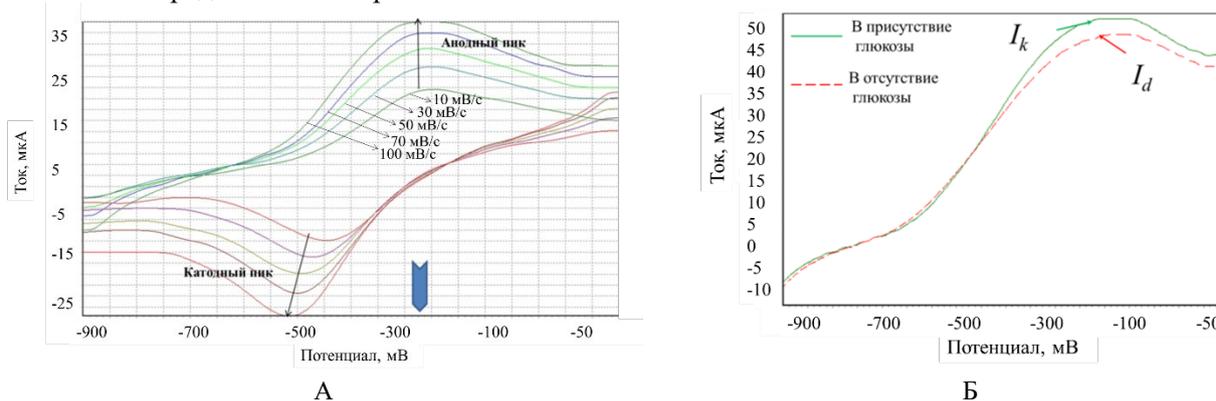


Рис. 1. Типичный вид вольтамперных зависимостей для исследования электрохимических свойств полученных матриц: а) вольтамперограмма редокс-активного полимера БСА-НК при увеличении скорости развертки от 10 мВ/с до 100 мВ/с; б) изменение предельного анодного тока в результате окисления глюкозы бактериями *P. yeii*, иммобилизованными в редокс-активный полимер на основе БСА-НК при скорости развертки 10 мВ/с.

Определенные лимитирующие стадии электрохимического процесса для полученных матриц представлены в таблице 1. Выявление лимитирующей стадии позволило применить модель Николсона [5] и модель Лавирона [6] для нахождения гетерогенной константы переноса электрона. Для исследования возможности применения редокс-активных полимеров для иммобилизации микроорганизмов были найдены константы взаимодействия микроорганизмов с ковалентно связанными медиаторами электронного транспорта с использованием моделирования Николсона-Шайна [7], которое широко используется для анализа константы скорости взаимодействия медиаторов, в том числе и модифицированных, с различными ферментами, в наших предыдущих исследованиях было показано возможность использования данной модели с клетками микроорганизмов [8]. В данной модели рассматривается изменение предельного анодного тока до и после введения в систему окисляемого субстрата. При избытке концентрации субстрата и низкой концентрации медиатора скорость биохимической стадии взаимодействия медиатора с биоматериалом имеет псевдопервый порядок, а константа взаимодействия связана с изменением предельного анодного тока уравнением Николсона и Шайна.

**Таблица 1.** Гетерогенные константы скорости переноса электронов для исследуемых матриц и константы взаимодействия бактерий *P. yeii* с ковалентно связанными медиаторами.

Редоксактивный полимер	Лимитирующая стадия переноса электронов	Гетерогенная константа переноса, см/с	Константы взаимодействия бактерий <i>P. yeii</i> с ковалентно связанными медиаторами, (дм <sup>3</sup> /(мг·с))
БСА-НК	ПР	0,0119±0,0006	36±2
БСА-НК-УНТ	ПР	0,041±0,001	73±3
ХИТ-НК	ПМ	0,054±0,003	43±2
ХИТ-НК-УНТ	ПР	0,14±0,01	51±2
БСА-ФЦ	ПР	0,45±0,01	51±4
БСА-ФЦ-УНТ	ПР	0,55±0,01	55±1
ХИТ-ФЦ	ПР	0,44±0,02	52±3
ХИТ-ФЦ-УНТ	ПР	0,55±0,03	57±2

Наибольшая скорость электродного обмена достигается при использовании матриц на основе БСА, модифицированного ферроценом. Следует отметить, при модификации матриц наноматериалами предполагается увеличение скорости переноса электрона на электрод, а, следовательно, увеличение гетерогенной константы переноса электронов, что подтверждается полученными результатами. Предположительно это происходит за счет увеличения общей проводимости геля, в частности увеличивается эффективность прыжковой составляющей переноса электронов. Наилучшие константы скорости взаимодействия клеток бактерий с медиатором так же достигаются при добавлении углеродных нанотрубок, что подтверждает перспективу их внедрения в матрицу. В целом, константы скорости взаимодействия ковалентно связанных медиаторов с бактериями *P. yeii* выше, чем при использовании немодифицированных медиаторов [8]. Следует отметить, что наибольшая константа скорости взаимодействия достигается в системе на основе БСА-НК-УНТ, однако для этой же системы характерны самые низкие константы скорости гетерогенного переноса электронов на электрод, что в последствии может негативно отразиться на чувствительности биосенсора. Таким образом, полимеры на основе ковалентно-связанного медиатора ферроцена более предпочтительны как по константе гетерогенного переноса электронов, так и по константе скорости взаимодействия с бактериями *P. yeii*.

Для проведения анализа БПК<sub>5</sub> необходимо, чтобы разработанный биосенсор мог регистрировать биохимическое окисление широкого спектра органических субстратов, поэтому была исследована субстратная специфичность биосенсоров на основе созданных проводящих систем. Анализ субстратной специфичности позволяет сделать вывод о том, что характер окисления субстратов меняется в зависимости от используемой матрицы. 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>.

Для количественного определения содержания анализируемых веществ в образце были изучены гиперболические зависимости ответа сенсора от БПК<sub>5</sub>, которые были аппроксимированы уравнением Михаэлиса-Ментен. Для анализа стабильности и устойчивости ответа сенсора при длительном использовании были исследованы такие характеристики, как долговременная и операционная стабильность. В таблице 2 представлены все характеристики разработанных медиаторных биосенсоров на основе бактерий *P. yeii* и аналогов.

Таблица 2. Сравнительные характеристики аналитических и метрологических характеристик медиаторных биосенсоров

Биоматериал/проводящая система	Долговременная стабильность, сутки	Относительное стандартное отклонение, % (n=15)	Линейный диапазон БПК <sub>5</sub> , мг/дм <sup>3</sup>	Время анализа, мин	Ссылка
<i>P. yeai</i> /БСА-ФЦ	38	5,7	2,5–47	5	Данная работа
<i>P. yeai</i> / БСА-ФЦ-УНТ	25	5,9	0,1–2	5	
<i>P. yeai</i> / ХИТ-ФЦ	49	6,6	2,5–18,9	5	
<i>P. yeai</i> / ХИТ-ФЦ-УНТ	50	5	0,1–4,5	5	
<i>B. subtilis</i> /ГЦК/ГФ/ПП	60	1,8	4–60	15	[9]
Активный ил/МС/ХИТ/ГФ	65	2,9	1–100	9	[10]

ГЦК – гексацианоферрат (III) калия; ГФ – графен; ПП – полипирол; МС – метиленовый синий

По полученным данным можно отметить, что нижняя граница определяемых концентраций БПК<sub>5</sub> разработанных биосенсоров с использованием гелей на основе ферроцена и УНТ превосходит многие известные аналоги. УНТ позволяют увеличить эффективность переноса электронов за счет повышения константы гетерогенного переноса электронов на электрод. Исходя из полученных результатов, биосенсор на основе бактерий *P. yeai* и проводящей системы ХИТ-ФЦ-УНТ по селективности, долговременной стабильности и диапазону определяемых концентраций является перспективной для создания БПК-биосенсора.

Апробация биосенсора на основе бактерий *P. yeai* и проводящей системы ХИТ-ФЦ-УНТ была проведена на четырнадцати образцах поверхностных вод. Отбор проб и определение БПК<sub>5</sub> стандартным методом проводилось согласно действующим нормативным документам. Статистическая обработка (Модифицированный тест Стьюдента) полученных результатов показала, что данные, полученные обоими методами, отличаются незначимо. Разработанный биосенсор можно использовать в качестве альтернативы стандартному анализу.

**Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 20–33–70078 Стабильность).**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Готовцев А.В., Данилов-Данильян В.И., Никаноров А.М. Проблемы мониторинга БПК // Водные ресурсы. – 2012. – Т. 39. – №. 5. – С. 510–510.
2. Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетиллов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т.47. – № 1. – С. 5–15.
3. Faezeh Ghorbani Zaman, Hichem Moulahoum, Metin Ak, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur. Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors. // Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – V. 118 – P. 264–276
4. Харьковская А.С., Арляпов В.А., Туровская А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетиллов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 2. – С. 199–209.
5. Nicholson R.S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics //Analytical Chemistry. – 1965. – V. 37. – I. 11. – P. 1351–1355.
6. 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. – V. 101. – I. 1. – P. 19–28.
7. Nicholson R.S., Shain I. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems //Analytical Chemistry. – 1964. – V. 36. – №. 4. – P. 706–723.
8. Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Turovskaya A.D., Shvets V.I., Reshetilov A.N. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity. // Enzyme and Microbial Technology. – 2020. – V. 132.
9. Hu J., Li Y., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Biosensor Based on Immobilized *B. Subtilis* on Three-Dimensional Porous Graphene-Polypyrrole Composite //Sensors. – 2017. – V. 17. – №. 11. – P. 2594.
10. Niyomdech S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkul P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2017. – V. 241. – P. 473–481.