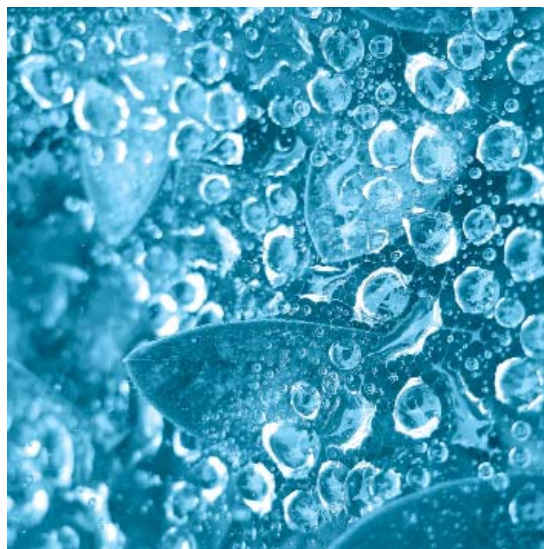


# БПК-БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ АССОЦИИИ ДРОЖЖЕВЫХ ШТАММОВ

**Исследованы практические аспекты применения дыхательной активности дрожжевых микроорганизмов для разработки БПК-сенсоров. Проведен сравнительный анализ параметров биораспознающих элементов БПК-биосенсора на основе индивидуальных штаммов микроорганизмов *Pichia angusta*, *Arxula adeninovorans* и *Debaryomyces hansenii*, а также их ассоциаций. Выявлено, что параметры рецепторных элементов на основе ассоциаций микроорганизмов превосходят рецепторные элементы на основе отдельных штаммов. Разработанные лабораторные модели применили для измерения индекса БПК образцов бродильной массы на разных стадиях брожения и сточных вод очистных сооружений.**



## Введение

Возрастающий уровень использования органических соединений в мире приводит к значительному загрязнению природных и искусственных водоемов легкоутилизируемыми веществами. К предприятиям, которые являются потенциальными источниками таких загрязнений, относятся перерабатывающие предприятия пищевой и биотехнологической промышленности: сахарные, спиртовые, консервные заводы, мясокомбинаты, маслозаводы и др., что приводит к эвтрофикации водоемов. Основным отходом при эксплуатации спиртопроизводящих заводов является спиртовая барда. Кроме нее в отходах этих предприятий имеется ряд других веществ (эфиральдегидные фракции, сивушные масла, спиртовой конденсат и т.д.), из-за этого расположенные на незащищенных участках поля фильтрации этих предприятий оказывают существенное влияние на состояние водоемов, ухудшая их качество и делая их непригодными для питьевого водоснабжения.

Широкий спектр органических соединений, поступающих в водоемы со стоками перерабатывающих предприятий, делает выполне-

**С.С. Каманин,**  
аспирант кафедры химии естественнонаучного факультета, ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

**В.А. Арляпов,**  
кандидат химических наук, доцент кафедры химии естественнонаучного факультета, ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

**О.Н. Понаморева,**  
кандидат химических наук, доцент кафедры химии естественнонаучного факультета, ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

ние полного химического анализа трудновыполнимой задачей. Поэтому для анализа состояния окружающей среды часто прибегают к интегральным методам, которые основаны на получении общей оценки содержания органических загрязнителей в пробе. Одним из таких методов является измерение индекса биохимического потребления кислорода (БПК), продолжительность тестов которого составляет 5 сут и более. В связи с этим актуальной является задача разработки методов биохимической диагностики загрязнения, сочетающих чувствительность методов биотестирования и операционные характеристики химических сенсоров [1]. Для оперативного анализа разрабатываются методы оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов [2]. В БПК-биосенсорах в качестве распознающих элементов применяют микроорганизмы, способные метаболизировать широкий спектр органических соединений. Для создания биораспознающих элементов БПК-сенсоров используют либо чистые культуры микроорганизмов с определенными потребительскими свойствами (широкий спектр окисляемых субстратов, устойчивость к воздействию негативных факторов окружаю-

шей среды), либо ассоциации микроорганизмов (искусственные ассоциации, активный ил) [3]. Обычно БПК-биосенсоры на основе чистой культуры имеют преимущество в стабильности функционирования биосенсорной системы. В то же время использование ассоциаций микроорганизмов позволяет существенно повысить спектр окисляемых субстратов и, соответственно, правильность определения БПК [4].

В 1977 г. Карубе (Karube) и др. представили публикацию, в которой впервые описали микробный сенсор для быстрого определения БПК [5]; в качестве биоматериала были использованы микроорганизмы, взятые из активного ила очистных сооружений. Исследования по использованию активного ила в качестве основы рецепторного элемента БПК-биосенсора продолжаются и в настоящее время. Так, в работе [6] описан БПК-биосенсор на основе препарата активного ила, клетки микроорганизмов в котором убиты нагреванием при 300 °С. Чтобы получить широкую субстратную специфичность, можно создать ассоциацию из нескольких микроорганизмов различных типов. Такой подход использовали для разработки БПК-биосенсора на основе коиммобилизованных клеток дрожжей *Trichosporon cutaneum* и бактерий *Bacillus subtilis* [7]. Имобилизацию биоматериала производили в золь-гелевую матрицу, что обеспечило повышенную стабильность сенсора (время жизни более 40 сут). Пределы определения БПК находились в диапазоне 1-60 мг/л. Сенсор был использован для определения БПК в озерной воде и коммунальных стоках. Создан БПК-биосенсор с комбинированным рецепторным элементом, содержащим иммобилизованные клетки *Trichosporon cutaneum* (высокая чувствительность к глюкозе) и *Bacillus licheniformis* (высокая чувствительность к глутаминовой кислоте) [8]. Применение в рецепторном элементе смешанной культуры позволило увеличить чувствительность и повысить соответствие получаемых результатов данным БПК<sub>5</sub>-метода. При клеточной нагрузке биорецептора  $1,1 \times 10^8$  клеток/мл $\times$ см<sup>2</sup> (*Trichosporon cutaneum*) и  $2,2 \times 10^8$  клеток/мл $\times$ см<sup>2</sup> (*Bacillus licheniformis*) были получены удовлетворительные параметры биосенсора, в частности, линейный диапазон сигналов заключался в диапазоне от 0,5 мг/л до 40 мг/л БПК при чувствительности порядка 5 нА/мг БПК. Однако точность измерения биосенсора со смешанной популяцией низкая, поэтому трудность состоит в получении воспроизводимых результатов. В случае совместной иммобилизации дрожжевых и бактериальных клеток бактерии могут

**В.А. Алферов,**  
кандидат химических наук, профессор кафедры химии естественно-научного факультета, ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

**А.Н. Решетилов\*,**  
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВПО Пущинский государственный естественно-научный институт, заведующий лабораторией биосенсоров, ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

вытеснять дрожжи через 20 сут функционирования биосенсора, что также снижает его качество [4].

Таким образом, разработка стабильных рецепторных элементов БПК-биосенсоров на основе ассоциации дрожжевых микроорганизмов с широким спектром окисляемых веществ является актуальной задачей современной аналитической биотехнологии. В работе исследованы параметры БПК-биосенсоров на основе ассоциации дрожжевых штаммов, обладающих широкой субстратной специфичностью. В задачи работы входило определение характеристик биосенсоров: спектра определяемых веществ, чувствительности, диапазона измерения долговременной стабильности, операционной стабильности и сравнение их с аналогичными параметрами сенсоров с рецепторными элементами на основе выделенных штаммов. Разработанные биосенсорные системы применили для измерения индекса БПК образцов бродильной массы на разных стадиях брожения и муниципальных сточных вод очистных сооружений.

## Материалы и методы исследования

### Биосенсорные измерения

Электрохимические измерения проводили с использованием гальванопотенциостата IPC 2L, интегрированного с персональным компьютером, и специализированного программного обеспечения IPC-micro («Кронас», Россия) для регистрации и обработки сигналов сенсоров. Средняя величина тока, соответствующая содержанию кислорода в дистиллированной воде 9,2 мг/дм<sup>3</sup>, составляла 30 нА при шуме  $\pm 0,25$  нА.

Измерения выполнены в кювете объемом 5 мл. Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буфер (рН 6,8), концентрация солей составляла 20 мМ. Раствор перемешивали магнитной мешалкой (200 об/мин). Пробы вводили автоматическими микропипетками переменного объема (200-1000 мкл, 20-200 мкл) («Биохит», Финляндия). Для построения градуировочных зависимостей использовали модельную смесь глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС) с концентрацией 3 г/дм<sup>3</sup>, которую применяют в качестве стандарта в Российской Федерации [9] и в международной практике [10], как стандарт в определении БПК<sub>5</sub>. В соответствии с определением принимали, что БПК<sub>5</sub>, равное 205 мг/дм<sup>3</sup>, соответствует

\* Адрес для корреспонденции: [anatol@ibpm.pushchino.ru](mailto:anatol@ibpm.pushchino.ru)

раствору, содержащему 1,5 и 1,5 г/дм<sup>3</sup> глюкозы и глутаминовой кислоты, соответственно. Для определения окисляемых микроорганизмами веществ использовали растворы соединений одинаковой концентрации 1 моль/дм<sup>3</sup>, отбираемая аликвота составляла 100 мм<sup>3</sup>. В кювете происходило разбавление раствора до концентрации 244 ммоль/дм<sup>3</sup>. Каждое измерение производили в трех повторениях. Измеряемым параметром (откликом биосенсора) являлась максимальная скорость (нА/мин) изменения выходного сигнала биосенсора при добавлении субстратов. После каждого измерения осуществляли промывание электрода буферным раствором в течение 5-10 мин для восстановления концентрации кислорода в приэлектродном пространстве до первоначального уровня.

#### Культивирование дрожжевых микроорганизмов

Дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, *Pichia angusta* ВКМ Y-2559 и *Arxula adeninovorans* ВГИ 78(6) были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Биомассу *D. hansenii* ВКМ Y-2482 выращивали на богатой минеральной среде (жидкая глюкозо-пептонная питательная среда). Состав жидкой среды: глюкоза – 10 г/дм<sup>3</sup>, пептон – 5 г/дм<sup>3</sup>, дрожжевой экстракт – 0,5 г/дм<sup>3</sup> («Sigma», США), дистиллированная вода – 200 см<sup>3</sup>. Среду для выращивания микроорганизмов стерилизовали автоклавированием при давлении в 1 атм в течение 45 мин. Биомассу выращивали аэробно 18-20 ч в качалочных колбах объемом 750 см<sup>3</sup> при температуре 29 °С. Затем полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре при 8000 об/мин 10 мин. Далее центрифугат промывали 20 мМ фосфатным буфером pH 6,8. Осевшие клетки расуспендировали в свежей порции буфера, распределяли по порциям и осаждали на центрифуге «Eppendorf» 3 мин при 8000 об/мин. Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при +4 °С.

Микроорганизмы *P. angusta* ВКМ Y-2559 выращивали в жидкой среде при температуре 28 °С в качалочных колбах объемом 750 см<sup>3</sup> с 100 см<sup>3</sup> среды следующего состава (г/дм<sup>3</sup>):

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,5; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 0,4;  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•3H<sub>2</sub>O – 0,9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O – 3,9;  
дрожжевой экстракт – 0,5; глицерин – 10;  
MnSO<sub>4</sub> – 0,0012; CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O – 0,0003;  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>•4H<sub>2</sub>O – 0,0002;  
CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O – 0,0015; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 0,01;  
ЭДТА – 0,001.

#### Ключевые слова:

БПК-сенсоры,  
ассоциации  
микроорганизмов,  
броидильные  
производства,  
производство спирта

Среду для выращивания дрожжей стерилизовали автоклавированием при давлении 1,1 атм в течение 30 мин. В колбы с односуточной жидкой культурой метилотрофных дрожжей добавляли микропипеткой по 1 см<sup>3</sup> метанола к 100 см<sup>3</sup> культуральной жидкости и снова ставили на качалку в термостат при 28 °С не менее чем на 12 час. После слива индуцированную культуральную жидкость центрифугировали на центрифуге TG16WS («Поликом LTD», Россия) при 4500 об/мин в течение 15 мин. Биомассу непосредственно в центрифужном стакане промывали 30 мМ калийфосфатным буфером pH 7,5. Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при +4 °С.

Микроорганизмы *A. adeninovorans* ВГИ 78(6) культивировали в аэробных условиях при 37 °С 24 ч в водной среде следующего состава: 0,3 % пептон, 0,3 % мясной экстракт, 0,3 % дрожжевой экстракт и 1,0 % глюкоза, как описано в [11]. После культивирования клетки собирали центрифугированием на центрифуге TG16WS при 4500 об/мин в течение 15 мин и отмывали двукратно 20 мМ натрий-фосфатным буфером с pH 6,8. Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при +4 °С.

#### Формирование биораспознающего элемента

Выращенные клетки микроорганизмов непосредственно перед иммобилизацией промывали фосфатным буферным раствором (20 мМ, pH 6,8), центрифугировали, осадок сырой биомассы взвешивали и разбавляли буферным раствором до концентрации 200 мг/см<sup>3</sup> и 5 мм<sup>3</sup> полученного раствора наносили на фрагмент стекловолоконного фильтра Whatman GF/A размером 3×3 мм<sup>2</sup> («Sigma», США). Рецепторный элемент подсушивали в течение 5-15 мин и фиксировали с помощью капроновой сетки на электроде.

Для приготовления рецепторных элементов на основе ассоциаций нескольких штаммов использовали отдельные суспензии каждой дрожжевой культуры с содержанием биомассы 200 мг/см<sup>3</sup>. При изготовлении рецепторного элемента на основе двух штаммов суспензии клеток отдельных культур смешивались в соотношении 1:1, при изготовлении рецепторного элемента на основе ассоциации трех штаммов – в соотношении 1:1:1, после чего 5 мкл полученного раствора наносили на стекловолоконный фильтр Whatman GF/A.

#### Определение БПК<sub>5</sub> стандартным методом разбавления

В качестве референтного метода для определения БПК<sub>5</sub> был использован метод разбавления. Анализ проводили строго в соответс-

твии с методикой, указанной в ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 [9]. Определение содержания растворенного кислорода в исследуемых пробах производилось йодометрическим методом Винклера в соответствии со стандартной методикой.

## Результаты и их обсуждение

**А**нализ окислительной способности микроорганизмов и калибровочных зависимостей биосенсоров на основе каждого из исследуемых штаммов проведен ранее [12, 13]. Дрожжи *A. adeninovorans* обладают широкой субстратной специфичностью и активно используются для анализа БПК с использованием биосенсора [14]. Микроорганизмы *P. angusta* отличаются высокой чувствительностью к спиртам [15], что позволяет использовать их для анализа стоков спиртовых производств, а для дрожжей *D. hansenii* характерна устойчивость к негативным факторам окружающей среды [16]. Целые клетки микроорганизмов иммобилизовали на стекловолоконной мембране методом адсорбции. В силу своей простоты и безреагентности такой способ иммобилизации в меньшей степени приводит к деструкции клеток.

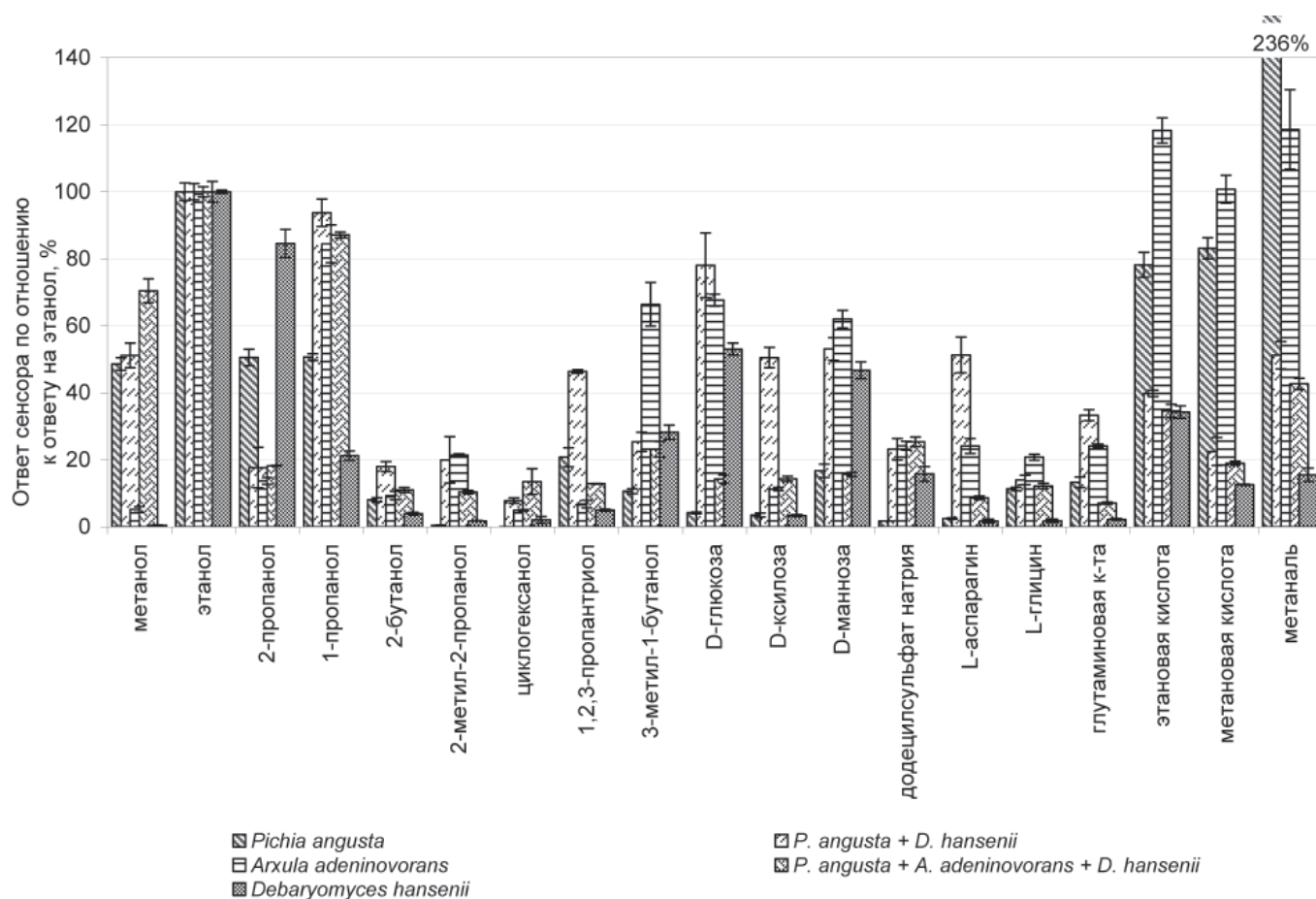
На основе анализа полученных результатов по окислительной активности микроорга-

низмов (рис. 1) была составлена ассоциация из трех дрожжевых штаммов *D. hansenii*, *A. adeninovorans* и *P. angusta* как потенциального биораспознающего элемента БПК-сенсоров. Предполагалось, что биоматериал сенсора будет сочетать в себе широкую субстратную специфичность, высокую чувствительность и устойчивость к неблагоприятным условиям среды.

Следует отметить, что, несмотря на широкий спектр окисляемых субстратов, штамм *A. adeninovorans* проявляет низкую окислительную активность по сравнению с другими штаммами, поэтому в качестве второго рецепторного элемента использовали только два штамма – *D. hansenii* и *P. angusta*. Известно, что физиолого-биохимические свойства микроорганизмов, иммобилизованных в одной матрице, могут иметь значительные отличия от таковых единичных штаммов [17].

*Стабильность биорецепторных элементов на основе ассоциаций дрожжевых штаммов*  
По операционной и долговременной стабильности биосенсоров на основе ассоциаций

**Рис. 1.** Субстратная специфичность биораспознающих элементов на основе ассоциаций микроорганизмов и на основе единичных дрожжевых штаммов. ↓



микроорганизмов можно судить об устойчивости уровня откликов сенсора на протяжении длительного срока эксплуатации. Операционную стабильность определяли как относительное стандартное отклонение отклика при проведении 10 последовательных измерений ответов биосенсора на стандартный раствор ГГС с концентрацией 3 г/дм<sup>3</sup>, который используется в стандартной методике определения БПК [9] (табл. 1). Биосенсоры на основе двух ассоциаций микроорганизмов обладают близкими значениями относительного стандартного отклонения (8 и 6 % для ассоциаций на основе двух и трех штаммов, соответственно). Операционная стабильность биораспознающих элементов на основе ассоциаций несколько ниже, чем у рецепторных элементов на основе отдельных штаммов; чувствительность ассоциативных рецепторных элементов аналогична чувствительности биораспознающих элементов на основе отдельных штаммов, входящих в ассоциацию (табл. 1).

Для оценки долговременной стабильности рецепторного элемента биосенсора используют параметры tL10 и tL50, которые характеризуют время, необходимое для снижения начального ответа сенсора до уровня 90 и 50 % от максимального, соответственно. Не рекомендуется использовать сенсоры после того, как уровень отклика будет ниже 50 % от наблюдавшегося максимума [18]. Для получения долговременной стабильности ежедневно измеряли отклик биосенсора на стандартный раствор ГГС (табл. 1). На 25-е сут измерений ответ сенсора на основе ассоциации *P. angusta* + *D. hansenii* составляет 50 % от максимального, и сенсор был непригоден для дальнейшего проведения измерений. В случае рецепторного элемента на основе ассоциации *P. angusta* + *A. adeninovorans* + *D. hansenii* время падения актив-

ности на 50 % от максимальной составляет 31 сут. Таким образом, биосенсор на основе ассоциации из трех штаммов обладает более высокой долговременной стабильностью.

#### Специфичность полученных биорецепторных элементов

Для анализа БПК важным является не только высокая селективность определения, но также широкий спектр определяемых соединений, что позволяет существенно повысить правильность анализа и создавать биосенсоры, пригодные для анализа БПК различных типов реальных образцов. Ввиду различной чувствительности сенсоров сравнение спектров определяемых соединений проводилось после нормирования откликов сенсоров. За 100 % принимали отклик каждого сенсора на этанол, отклики сенсора на остальные соединения представлены как отношение отклика сенсора на определяемое соединение к отклику этого же сенсора на этанол (рис. 1).

Сенсоры на основе ассоциаций микроорганизмов способны определять большее число органических соединений, чем сенсоры на основе каждого из штаммов в отдельности. У биосенсора на основе ассоциации микроорганизмов наблюдаются высокие отклики на неразветвленные низшие спирты, отклики на остальные соединения сопоставимы по величине.

Сравнительный анализ субстратной специфичности рецепторных элементов позволил выяснить, что замена части биомассы эффективных микроорганизмов *D. hansenii* и *P. angusta* на биомассу *A. adeninovorans* приводит к снижению уровня сигнала сенсора в присутствии большинства соединений (исключение составляют низшие спирты). Изменяются относительные отклики сенсора – на углеводы и низшие спирты становятся сопоставимы по величине.

Использование в биосенсорном анализе ассоциации микроорганизмов вместо индивиду-

Таблица 1

Характеристики разработанных рецепторных элементов

Рецепторный элемент	Операционная стабильность, %	Долговременная стабильность, сут	Чувствительность, нА·дм <sup>3</sup> /мин·мг О <sub>2</sub>	Диапазон определяемых концентраций, мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	Длительность одиночного измерения, мин
<i>Pichia angusta</i> ВКМ Y-2518	7	18	0,23±0,01	7-280	10–14
<i>Debaryomyces hansenii</i> ВКМ Y-2482	4	>30	0,265±0,006	4-270	12–17
<i>Arxula adeninovorans</i> ВГИ 78(6)	2	40	0,044±0,002	1-78	13–16
<i>P. angusta</i> + <i>D. hansenii</i>	8	25	0,24±0,02	2-54	7–10
<i>P. angusta</i> + <i>A. adeninovorans</i> + <i>D. hansenii</i>	6	31	0,19±0,01	1-93	10–15

альных штаммов позволяет увеличить спектр окисляемых субстратов без потери воспроизводимости результатов и стабильности биораспознающего элемента. Полученные результаты позволяют предположить, что биосенсоры на основе разработанных рецепторных элементов могут эффективно использоваться для анализа БПК<sub>5</sub> сточных вод.

#### Градуировочная зависимость БПК-биосенсоров

Градуировочные зависимости получали путем регистрации отклика сенсора на различные концентрации градуировочного раствора. После построения градуировочных зависимостей биосенсоров проводился расчет основных параметров, таких, как чувствительность, диапазон определяемых концентраций.

Зависимости отклика биосенсора от содержания ГГС (в пересчете на индекс БПК) имеют сигмоидальный вид (рис. 2).

Биорецепторы на основе целых клеток микроорганизмов являются биорецепторами каталитического типа, т.е. биологический ответ в таких системах обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов. Для аппроксимации полученных зависимостей можно применять уравнение ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен:

$$y = \frac{ax}{b + x},$$

Где:  $x$  – БПК в кювете;

$y$  – ответ сенсора;

$a$  – максимальный ответ сенсора;

$b$  – уровень БПК, при котором ответ сенсора составляет половину от максимального.

Для снижения ошибок анализа, как правило, ограничиваются использованием линейного участка зависимости (рис. 2). Чувствительность определения БПК с помощью биосенсоров определяли как тангенс угла наклона линейного участка градуировочной зависимости. Нижнюю границу определяемых концентраций рассчитывали статистическим методом [19] (табл. 1).

Нашли, что биораспознающий элемент на основе штамма *D. hansenii* обладает самой высокой чувствительностью среди биораспознающих элементов на основе одиночных исследованных штаммов. Чувствительность рецепторного элемента на основе *A. adeninovorans* ниже двух других рецепторных элементов, что отрицательно влияет на качество анализа. Рецепторный элемент на основе ассоциации трех штаммов характеризуется более высокими максимальным ответом сенсора и параметром  $b$ , что расширяет диапазон определяемых концентраций.

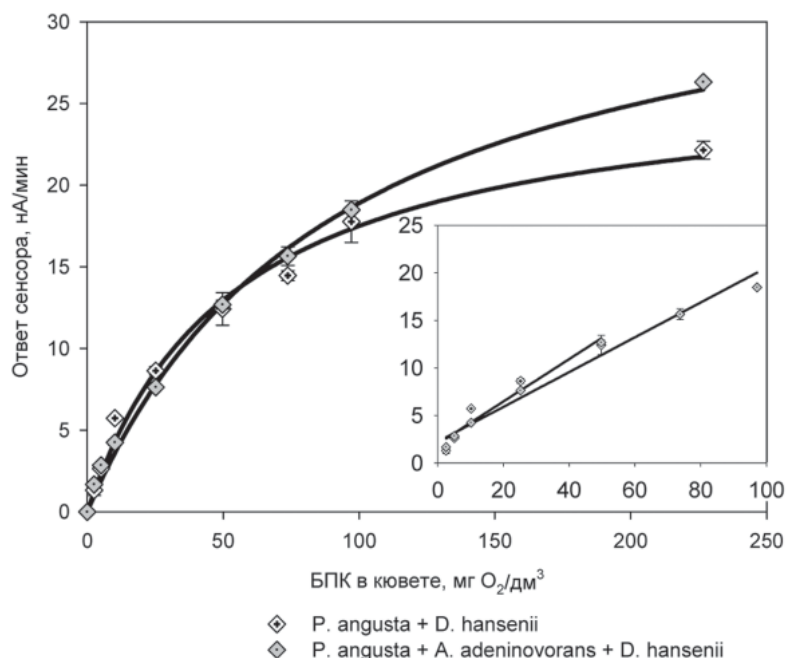


Рис. 2. Зависимости ответов сенсоров от значения БПК в кювете.

Чувствительность ассоциативных сенсоров сравнима с чувствительностью сенсоров на основе отдельных штаммов, однако рецепторные элементы на основе ассоциаций позволяют определять более низкие значения БПК<sub>5</sub> в пробах. При использовании ассоциаций микроорганизмов происходит расширение спектра определяемых соединений (рис. 1).

Нижняя граница определяемых концентраций у рецепторного элемента на основе ассоциации из двух штаммов выше, чем у ассоциации из трех штаммов, несмотря на более высокий коэффициент чувствительности (табл. 1). Биосенсоры на основе ассоциации *P. angusta* + *A. adeninovorans* + *D. hansenii* могут применяться для анализа проб водоемов, классифицированных как чистые; рецепторный элемент *P. angusta* + *D. hansenii* делает возможным анализ проб умеренно загрязненных водоемов.

#### Анализ образцов бродильной массы и сточных вод

Апробацию разработанных БПК-сенсоров проводили на образцах сточных вод очистных сооружений г. Пушкино (Московская область), отобранных на разных стадиях процесса очистки, и на модельных образцах отходов бродильных производств, которые представляли собой бродильную массу, отобранную на разных стадиях процесса брожения ржаной муки. Результаты анализа БПК<sub>5</sub> полупродуктов брожения и сточных вод биосенсорным методом и стандартным методом представлены в табл. 2.

Значения БПК<sub>5</sub>, определённые с помощью биосенсора на основе ассоциации микроор-

Таблица 2

Результаты измерения БПК<sub>5</sub> полупродуктов брожения и сточных вод, полученные с использованием биосенсора на основе ассоциации дрожжевых штаммов и стандартным методом

Анализируемые образцы	БПК <sub>5</sub> , измеренное с помощью биосенсора на основе ассоциации <i>P. angusta</i> + <i>D. hansenii</i>	БПК <sub>5</sub> , измеренное с помощью биосенсора на основе ассоциации <i>P. angusta</i> + <i>A. adeninovorans</i> + <i>D. hansenii</i>	БПК <sub>5</sub> , измеренное стандартным методом
Пробы бродильной массы, г О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>			
Осахаренная масса	14,2±0,2	15±0,2	16±1
Барда (начальная стадия)	7,8±0,4	12±1	11±0,5
Барда, брожение 5 ч	252±8	270±10	280±20
Барда, брожение 24 ч	397±5	400±30	410±20
Образцы сточных вод, мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>			
Оценка на входе в очистку	60±5	60±5	58±3
1-я очистка	40±6	41±1	38±3
2-я очистка	15±1	12±1	11±1
Оценка на выходе очистки	4,24±0,04	6,5±0,9	6±0,3

ганизмов достоверно совпадают со значениями БПК<sub>5</sub> полученными по стандартной методике. Модифицированный тест Стьюдента показал отсутствие систематической погрешности биосенсорного анализа относительно анализа по стандартной методике.

## Заключение

Разработаны рецепторные элементы на основе ассоциаций дрожжевых штаммов *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482, *Arxula adeninovorans* ВГИ (78)-6 и *Pichia angusta* ВКМ У-2518. Показано, что рецепторные элементы на основе ассоциаций обладают высокой операционной стабильностью. Долговременная стабильность рецепторного элемента на основе ассоциации штаммов *P. angusta*, *D. hansenii* и *A. adeninovorans* составляет 31 сут, а для рецепторного элемента на основе ассоциации штаммов *P. angusta* и *D. hansenii* – 25 сут. Выявлено, что параметры рецепторных элементов на основе ассоциаций микроорганизмов по некоторым показателям, таким, например, как долговременная стабильность и нижняя граница определяемых концентраций, превосходят рецепторные элементы на основе отдельных штаммов. Специфичность

полученных рецепторных элементов на основе ассоциаций гораздо ниже, чем при использовании отдельных штаммов. Увеличение числа штаммов, входящих в ассоциацию, расширяет возможности по применению биораспознающего элемента для определения БПК<sub>5</sub>. Проведен анализ образцов бродильной массы на разных стадиях брожения и сточных вод очистных сооружений г. Пушкино. Значения БПК<sub>5</sub>, определённые с помощью биосенсора на основе ассоциации микроорганизмов в большинстве случаев совпадают со значениями БПК<sub>5</sub>, полученными по стандартной методике с учетом доверительного интервала. Статистический анализ полученных данных показал отсутствие систематической погрешности биосенсорного анализа при сравнении со стандартной методикой.

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы, госконтракт № 16.512.11.2209, 16.512.11.2126 и программы «СТАРТ-11», реализуемой Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, госконтракт № 9373р/15101.*

## Литература

1. D'Souza S.F. Microbial biosensors. Review // Biosens. Bioelectron. 2001. V. 16. P. 337-353.
2. Bourgeois W. On-line monitoring of wastewater quality: a review Bourgeois W., Burgess J.E., Stuetz R.M. // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2001. V 76. P. 337-348.
3. Пономарева О.Н. Теория и применение микробных биосенсоров для оперативного мониторинга биохимического потребления кислорода / О.Н. Пономарева, В.А. Арляпов, В.А. Алферов, А.Н. Решетилков // Вестник биотехнологии, 2009. Т. 5. № 1. С. 42-48.
4. Lehmann M. Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* 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 / Lehmann M., Chan C., Lo A., Lung M., Tag K., Kunze G., Riedel K., Gruendig B., Renneberg R. // Biosens. Bioelectron. 1999. V. 14. P. 295-302.
5. Karube I. Microbial electrode BOD sensors / Karube I., Mitsuda S., Matsunaga T., Susuki S. // Biotechnol. Bioeng. 1977. V. 19(10). P. 1535-1547.

6. Tan T.C. Thermally killed cells of complex microbial culture for biosensor measurement of BOD of wastewater / Tan T.C., Lim E.W.C. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005. V. 107. I. 2. P. 546-551.
7. Jia J, Tang M, Chen X, Qi L, Dong S. Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material / Jia J, Tang M, Chen X, Qi L, Dong S. // *Biosens. Bioelectron*. 2003. 18(8). P. 1023-1029.
8. Suriyawattanakul L., Surareungchai W., Sritongkam P., Tanticharoen M., Kirtikara K. The use of co-immobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor / Suriyawattanakul L., Surareungchai W., Sritongkam P., Tanticharoen M., Kirtikara K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2002. V. 59(1). P. 40-44.
9. ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97. 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. М.: ГУАК Госкомэкологии России. 1997. 25 с.
10. Liu J. Microbial BOD sensors for wastewater analysis / Liu J., Mattiasson B. // *Water Research*. 2002. V. 36. P. 3786-3802.
11. Tag K. Measurement of biodegradable substances with a mycelia-sensor based on the salt tolerant yeast *Arxula adenivorans* LS3 / Tag K., Lehmann M., Chan C., Renneberg R., Riedel K., Kunze G. // *Sensors and Actuators B*. 2000. № 67. P. 142-148.
12. Арляпов В.А. Микробные биосенсоры для экспресс-определения БПК сточных вод предприятий пищевой промышленности / В.А. Арляпов, О.Н. Пономарева, В.А. Алферов, Т.В. Рогова, И.В. Блохин, И.Ф. Чепкова, А.Н. Решетиллов // *Вода: химия и экология*. 2008. № 3. С. 23 – 30.
13. Пономарева О.Н. Биосенсор для экспресс-анализа биохимического потребления кислорода на основе дрожжевых микроорганизмов родов *Candida* и *Debaryomyces* / О.Н. Пономарева, В.А. Арляпов, С.С. Каманин, Н.Ю. Юдина, В.А. Алферов // *Вестник биотехнологии*. 2010. Т. 6. № 3. С. 5–12.
14. Воронова Е. А., Ильясов П. В., Кувичкина Т. Н., Китова А. Е., Емельянова Е. В., Решетиллов А. Н. Использование дрожжей рода *Arxula* для определения БПК // Международная научная конференция «Микроорганизмы и биосфера» – М.: Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 2007 – с. 23-24
15. Kunze G. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications / Kunze G., Kang H. A., Gellissen G. Springer Netherlands. 2009. P. 47-64.
16. Вудворд Д. Иммунизированные клетки и ферменты. Методы /под. ред. Д. Вудворда. М.: Мир, 1988. 251 с.
17. Пономарева О.Н. Биосенсоры и биотопливные элементы на основе целых клеток микроорганизмов и выделенных из них ферментов. Обзор. // *Известия Тульского государственного университета. Серия: Естественные науки*, 2009. № 1, С. 138-157.
18. Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification / Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. // *Biosensors and Bioelectronics*. 2001. V. 16. I. 1-2 P. 121-131.
19. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. Пер. с нем. – М.: Мир, 1994. 268 с.



S.S. Kamanin, V.A. Arlyapov, O.N. Ponomareva, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov

## BOC-BIOSENSOR BASED ON YEAST STRAINS

Practical application of respiratory activity of yeast micro-organisms for BOC-sensors have been developed. A comparative analysis of BOC-sensor parameters based on individual strains such as *Pichia angusta*, *Arxula adenivorans* and *Debaryomyces hansenii* has been

carried out. It was revealed that the receptor elements based on microorganism associations are superior to that based on individual strains. This laboratory models were tried to change the BOC index of fermentive mass at different stages of wastewater fermentation.

**Key words:** BOC-sensors, microorganism association, fermentation, alcohol production, BOC (biochemical oxygen consumption)