

УДК 602.4:628.35:664

МИКРОБНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА (ОБЗОР)

© 2011 г. О. Н. Понаморева*, В. А. Арляпов*, В. А. Алфёров*, А. Н. Решетилов**

*Тульский государственный университет, Тула, 300600
e-mail: chem@tsu.tula.ru

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290
e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 04.09.2009 г.

Рассмотрены последние достижения в применении биосенсоров для определения индекса биологического потребления кислорода (БПК) в воде. Особое внимание уделено принципам функционирования микробных БПК-сенсоров, суммирована информация о биораспознающих элементах таких систем и способах иммобилизации биокомпонентов в сенсорах пленочного типа. Подробно рассмотрены характеристики некоторых моделей БПК-сенсоров.

В результате бытовой активности и интенсивной промышленной деятельности человека в последнее время происходит нарастающее по масштабам загрязнение водоемов рек, озер и водохранилищ. Экспресс-оценка степени загрязнения объектов окружающей среды органическими соединениями является важным и, в некоторых случаях, жизненно необходимым компонентом экологического контроля. Учитывая постоянно растущий перечень веществ, поступающих как загрязнители в окружающую среду, можно констатировать, что выполнение полного химического анализа является сложной и дорогостоящей процедурой. Эффективным инструментом анализа оказываются методы, основанные на интегральной оценке органических компонентов. В этой связи значительное внимание уделяется разработке биосенсорных методов контроля, позволяющих выполнить интегральную оценку загрязненности, значительно повышающих оперативность анализа и снижающих его стоимость [1].

Важнейшей интегральной характеристикой качества воды является биохимическое потребление кислорода (БПК) — количество растворенного кислорода (мг), необходимое для окисления всех биоразлагаемых органических соединений, находящихся в 1 дм³ воды. Единица индекса БПК имеет обозначение мг О₂/л или мг О₂/дм³. Оценка БПК — это эмпирический тест, в котором используют стандартизованную лабораторную процедуру, чтобы определить потребление кислорода в анализируемых пробах воды. БПК определяют условно по изменению содержания кислорода до и после размещения и выдерживания в течение определенного периода времени образца воды в специальных герметично закрытых колбах. Стандартный метод определения БПК предполагает инкубирование насыщенной кислородом пробы воды, в которую вно-

сят активный ил (смесь различных микроорганизмов), в течение 5, 7, 10 или 20 сут (БПК₅, БПК₁₀, БПК₇ или БПК₂₀ соответственно) при 20°C [2]. Полученный результат характеризует суммарное содержание биохимически окисляющихся органических примесей в воде, а также способность воды к самоочищению. В поверхностных водах величины БПК₅ изменяются обычно в пределах 0.5–4 мг/дм³ и подвержены сезонным и суточным колебаниям. Весьма значительны изменения величин БПК₅ в зависимости от степени загрязненности водоемов. В зависимости от категории водоема величина БПК₅ регламентируется следующим образом: не более 3 мг/дм³ для водоемов хозяйственно-питьевого водопользования и не более 6 мг/дм³ для водоемов хозяйственно-бытового и культурного водопользования. Для морей (I и II категории рыбохозяйственного водопользования) БПК₅ при 20°C не должна превышать 2 мг/дм³. БПК-тест находит также широкое применение на очистных сооружениях для оценки эффективности уменьшения биоразлагаемых соединений в процессах очистки стоков. Традиционный БПК-тест имеет определенные преимущества, он является универсальным методом измерения большинства образцов сточных вод и водных объектов и, кроме того, не требует дорогостоящего оборудования. Он имеет, однако, серьезные ограничения по времени анализа. Отсутствие оперативности существенно снижает ценность традиционной методики. По указанной причине реально могут возникнуть экологически опасные ситуации, при которых остается «за кадром» поступление на водоочистные сооружения аварийно загрязненных вод или наоборот, недоочистка их в процессе регенерации.

Для оперативного анализа разрабатываются методы оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов. Биосенсор — это инте-

грированное устройство, которое способно обеспечивать количественную и полуколичественную аналитическую информацию с использованием биологического распознающего элемента, находящегося в тесном контакте с преобразователем. Исследования по созданию БПК-биосенсоров проводятся с конца 70 годов прошлого века [3, 4], но разработки таких систем интенсивно продолжаются и в настоящее время [5, 6]. Следует отметить, что с помощью биосенсоров возможно быстрое определение БПК (BPK_{6c}), которое коррелирует, но не всегда полностью идентично величине традиционного BPK_5 . В последнее время развиваются новые подходы в биосенсорном анализе БПК, которые позволяют достичь приемлемой корреляции между показаниями биосенсора и традиционных методов. Корреляция данных, полученных с помощью биосенсорного анализатора, с данными, полученными методом BPK_5 , могут иметь значения порядка 0.95–0.98 [7]. Так, для калибровки БПК-биосенсора используют специализированные синтетические сточные воды или биораспознающий элемент БПК-биосенсора создают на основе специфических микроорганизмов, способных к эффективному окислению веществ конкретных стоков. Таким образом, целесообразно производить разработку биосенсоров, выбор соответствующих микроорганизмов и калибровочных растворов, которые обеспечивали бы наиболее эффективную детекцию БПК в соответствии с конкретным типом сточных вод, т.е. разрабатывать специализированные БПК-биосенсоры.

Распространенность и востребованность исследований по разработке биосенсорных систем определения БПК закономерно привели к коммерциализации и промышленному выпуску ряда моделей. БПК-сенсорные системы все еще имеют ряд ограничений, которые затрудняют их применение: недостаток стандартизации и недоработки законодательства в большинстве стран, сложные требования обслуживания и недостаточная устойчивость применяемых культур микроорганизмов к действию тяжелых металлов и различных токсичных веществ [6].

В обзорах по микробным биосенсорам [1], а также по применению биосенсоров для анализа объектов окружающей среды и экологическом мониторинге [6–8] приводятся примеры разработанных БПК-сенсоров. Отмечена важная роль биораспознающих элементов на основе эукариотических микроорганизмов в биосенсорах для решения проблем охраны окружающей среды, в том числе для определения БПК водных объектов [9]. Суммирована подробная информация о БПК-сенсорах, в основном тонкопленочного типа на основе кислородного электрода, а также о некоторых коммерчески доступных биосенсорных системах, разработанных до 2000 г. [5].

В настоящем обзоре обобщена информация о принципах функционирования, устройстве, анали-

тических характеристиках БПК-биосенсоров, свойствах биораспознающих элементов, приведены параметры функционирования и характеристик БПК-сенсоров разных типов.

ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БПК-БИОСЕНСОРОВ

Биосенсоры биопленочного типа на основе кислородного электрода. Большинство описанных БПК-сенсоров являются целоклеточными микробными сенсорами биопленочного типа, принцип функционирования которых основан на измерении скорости дыхания микроорганизмов, находящихся вблизи поверхности преобразователя. В 1977 г. Карубе с соавт. опубликовали работу, в которой впервые описали микробный сенсор для определения BPK_{6c} [3] с использованием микроорганизмов, взятых из активного ила очистных сооружений. Особенностью таких биосенсоров является то, что между пористой (чаще всего, целлюлозной) и газопроницаемой (как правило, тефлоновой) мембраной кислородного электрода содержится слой микробной пленки в качестве биологического распознающего элемента (рис. 1).

Растворенный кислород диффундирует через аэрированный фосфатный буфер, сквозь диализную мембрану в слой иммобилизованных клеток, где часть кислорода расходуется иммобилизованными микроорганизмами на окисление органических соединений, содержащихся в пробе. Оставшийся кислород проникает через газопроницаемую тефлоновую мембрану и восстанавливается на катоде кислородного электрода. Сила тока в системе прямо пропорциональна количеству восстановившегося на электроде кислорода. После установления равновесия между диффузией кислорода и скоростью эндогенного дыхания иммобилизованных микроорганизмов в буферном растворе регистрируют равновесный ток (фоновый). Когда образец сточной воды вводят в измерительную кювету, органические вещества анализируемой пробы диффундируют через диализную мембрану и утилизируются иммобилизованными микроорганизмами, в результате увеличивается скорость дыхания микроорганизмов и потребление кислорода. В этом случае меньшее количество кислорода восстанавливается на электроде. Ток уменьшается до тех пор, пока не установится новое равновесие. При промывке измерительной кюветы буферным раствором восстанавливаются скорость эндогенного дыхания микроорганизмов и прежнее равновесие в системе. Так как процесс контролируется диффузией субстрата, сигнал сенсора будет в определенной степени пропорционален концентрации легко окисляемых субстратов в образце (рис. 2).

Для получения ответа биосенсора обычно используют два метода обработки: равновесный или динамический (определение по конечной точке) и

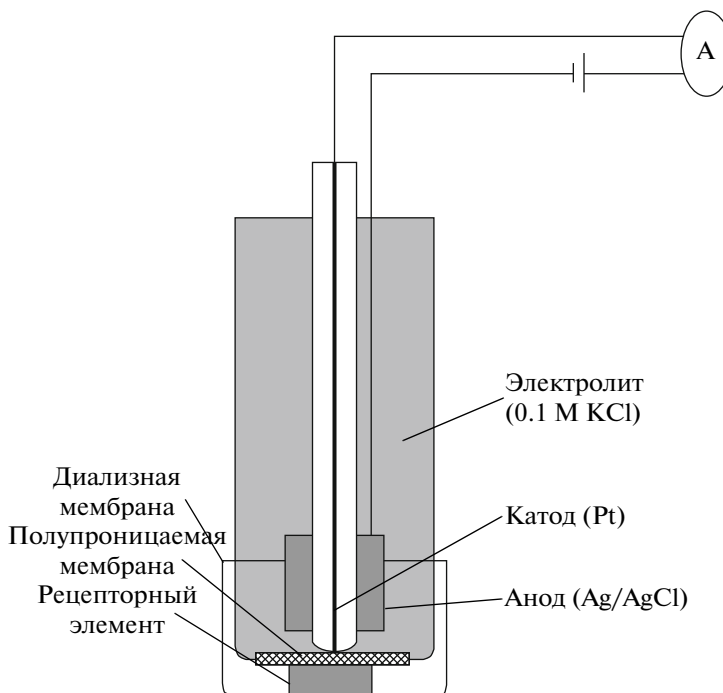


Рис. 1. Схема БПК-бенсора биопленочного типа на основе кислородного электрода Кларка.

кинетический (определение начальной скорости) [10]. В равновесном методе для определения BPK_{6c} используется разность между током в двух равновесных состояниях. Время измерения составляет 15–30 мин с последующим восстановлением в течение 1 ч. В кинетическом методе в качестве ответа сенсора используют начальное изменение силы тока от времени после добавления образца. Этот параметр отображает ускорение скорости микробного дыхания и, в определенной степени, пропорционален концентрации субстрата. В этом случае ответ сенсора регистрируется в течение 15–30 с, а время восстановления биораспознающего элемента составляет менее 10 мин. Следует отметить, что более высокой чувствительности можно достичь при использовании в качестве ответа начальной скорости отклика биосенсора при незначительной потере в воспроизводимости [11]. Таким образом, кинетический метод обработки сигнала биосенсора более предпочтителен в том случае, когда необходим постоянный контроль БПК, например, в ходе очистки сточных вод, или при анализе большого числа проб [12].

В настоящее время разрабатываются новые биопленочные БПК-сенсоры на основе кислородного электрода [5–8]. При проведении исследований основное внимание уделяют совершенствованию параметров БПК-сенсоров: увеличению стабильности, повышению корреляции данных, полученных биосенсорным и стандартными методами оценки BPK_5 . Прежде всего это связано с поиском или созданием новых эффективных микроорганизмов, примени-

ем современных материалов и новых методов иммобилизации биоматериала.

Сенсорные системы биореакторного типа. Для определения BPK_{6c} используют сенсорные системы биореакторного типа с респирометром для постоянного измерения дыхательной активности суспензии микроорганизмов. Строго говоря, в соответствии с определением IUPAC такие системы не являются биосенсорами, так как биораспознающий элемент не находится в прямом контакте с преобразователем. Однако такие системы нашли широкое применение на предприятиях по очистке сточных вод для непрерывного контроля степени очистки

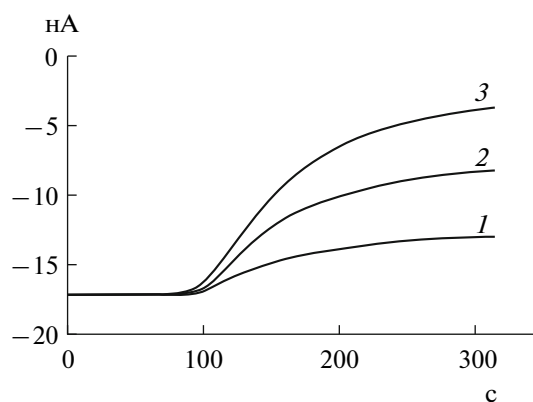


Рис. 2. Типичный отклик амперметрического БПК-сенсора биопленочного типа. Концентрация смеси глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС, мг/дм³): 1 – 10, 2 – 30, 3 – 60.

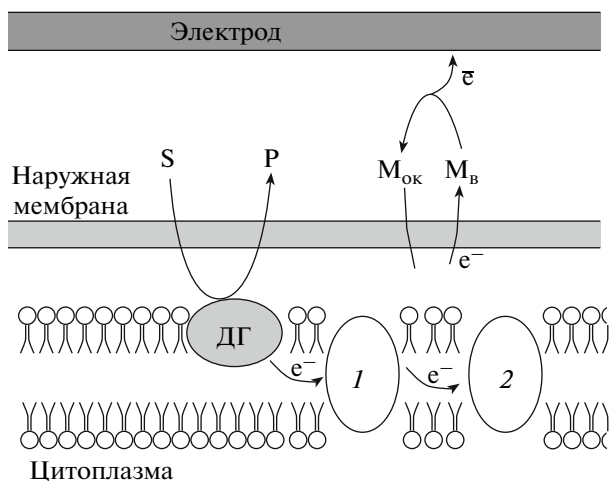


Рис. 3. Принцип функционирования микробного медиаторного биосенсора. S — субстрат, P — продукт, $M_{ок}$ — окисленная форма медиатора, $M_{в}$ — восстановленная форма медиатора, ДГ — мембрано-локализованные дегидрогеназы, 1, 2 — ферменты дыхательной цепи.

[13]. Общим для всех БПК-сенсоров респирометрического типа является наличие биореакторов, в которых активный ил (или индивидуальные микроорганизмы) и легко окисляемые органические вещества находятся в одной среде [14]. Образцы сточных вод постоянно транспортируются через проточный реактор, имеющий небольшой объем [15, 16]. Наиболее часто в качестве биораспознающего элемента в таких системах используют неидентифицированные микроорганизмы из сточных вод, например активный ил. Для повышения воспроизводимости результатов предложено использовать индивидуальные штаммы микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов, которые относятся к родам *Trichosporon* [17], *Rhodococcus* и *Is-sachenkia* [18].

Одним из преимуществ биореакторной конфигурации распознающих элементов является то, что в таких системах можно легко заменить преобразователь. При этом не нарушается активность микроорганизмов. Кроме того, БПК-сенсор биореакторного типа имеет более стабильные рабочие характеристики по сравнению с биопленочным типом [19]. Недостатком таких устройств является стационарное расположение и невозможность обеспечения полевых измерений. Таким образом, биосенсорные системы реакторного типа имеют строго определенное назначение — непрерывный контроль процессов очистки сточных вод на соответствующих предприятиях.

Биосенсоры медиаторного типа. На величину БПК, определяемую с помощью микробного дыхания, влияют количество растворенного кислорода в образце. Эту нежелательную зависимость можно снизить или полностью ликвидировать за счет использования медиаторов. Так, известно, что некоторые синтетические соединения (искусственные

акцепторы электронов) способны восстанавливаться определенными микроорганизмами, т.е. конкурируют за электроны с кислородом (естественным акцептором электронов) [20]. Если эти соединения обладают обратимыми окислительно-восстановительными свойствами, то они могут служить переносчиками электронов от биокаталитических систем микроорганизмов на электрод (рис. 3).

При использовании медиаторов результаты измерений становятся практически независимыми от парциального давления кислорода в среде, если в процессе окисления восстановленного медиатора не участвуют протоны, то медиаторный электрод может быть относительно нечувствителен к изменениям pH. Таким образом, одним из наиболее перспективных направлений является разработка БПК-биосенсоров с применением медиаторов электронного транспорта [5, 20–27]. Равновесное состояние тока в таких системах наступает в течение нескольких секунд, что обеспечивает более высокую скорость анализа. В медиаторных микробных сенсорах генерируются токи, на порядки превышающие те, которые имеют место при использовании кислородного электрода [28], что обеспечивает возможность создания микросенсоров. Необходимой характеристикой биосенсоров является возможность их миниатюризации. При использовании технологии изготовления печатных электродов возможно создание недорогих одноразовых биодатчиков на основе целых клеток микроорганизмов для расширения возможностей их использования широким кругом потребителей [29].

Еще одним преимуществом применения редокс-красителей является возможность регистрации БПК в анаэробных условиях, так как ферменты дыхательной цепи микроорганизмов способны регенерироваться за счет восстановления искусственных акцепторов электронов. Предложена быстрая микробная технология измерения БПК в анаэробных условиях в присутствии косубстрата — гексацианоферрата(III) калия [30]. Добавление в измерительную кювету субстрата увеличивает катаболическую активность микроорганизмов и приводит к накоплению восстановленной формы медиатора, который успешно реокисляется на рабочем электроде; количество электричества измеряют с помощью кулонометрического преобразователя.

Микробные биотопливные элементы как БПК-сенсоры. Карубе с соавт. [31] разработали сенсор на основе биотопливного элемента для определения БПК₆₀. На рис. 4 представлена схема функционирования БПК-сенсора на основе микробного биотопливного элемента (БТЭ).

Генерируемый в биотопливном элементе ток является результатом биоокисления водорода или образования продуктов из органических соединений путем восстановления под действием бактерий *Clostridium butyricum* в анаэробных условиях. Значи-

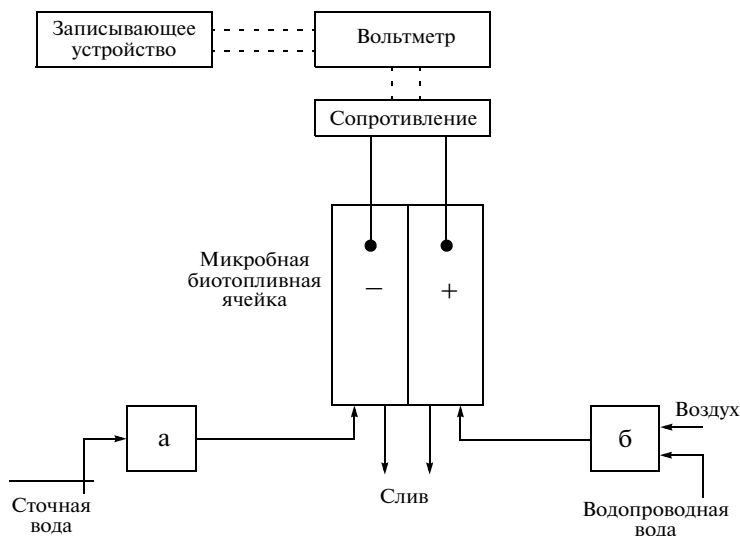


Рис. 4. Схема функционирования БПК-сенсора на основе микробного БТЭ. Устройства для удаления взвешенных частиц (а) и перемешивания водной фазы и воздуха (б).

тельный вклад в разработку БПК-сенсоров на основе безмедиаторного биотопливного элемента уже в начале нашего века внесли корейские исследователи [32–36]. Огромным достижением при разработке БПК-сенсоров стала высокая долговременная стабильность системы на основе функционирования безмедиаторного топливного элемента: сенсор работал в течение 5 лет без какого-либо обслуживания [34]. В то же время к недостаткам этой системы следует отнести большое время ответа (около 1 ч) и стационарность системы, что ограничивает область практического применения такого БПК-сенсора.

БПК-биосенсоры оптического типа. В связи с интенсивным развитием в конце прошлого века оптоволоконной техники появилась возможность для создания миниатюрных биосенсоров оптического типа [37–45]. При разработке оптических БПК-сенсоров существует два подхода: использование люминесцентных бактерий в биораспознающем элементе сенсора или применение люминесцирующей подложки для биоматериала. В первом случае принцип измерения основан на соотношении между интенсивностью люминесценции, продуцируемой бактериями, и клеточной ассимиляции органических соединений из образцов сточных вод [37, 38, 40, 45]. Во втором – в материал подложки вносят кислородчувствительные красители, а в качестве биораспознающего элемента в этой матрице используют целые клетки микроорганизмов. Интенсивность дыхания микроорганизмов зависит от содержания органических соединений в анализируемой пробе, которые окисляются микроорганизмами в присутствии кислорода. Изменение содержания кислорода в пленке регистрируют с помощью красителя оптическими методами [39–44]. Оптические биосенсоры обладают высо-

кой чувствительностью и позволяют определять низкие значения БПК. Важным достоинством таких систем является возможность создания микроплат и микросенсоров, биосенсоров на чипе [40, 45].

Другие типы БПК-биосенсоров. Методы анализа БПК с использованием биосенсоров не ограничиваются описанными выше. Так, например, разработан биосенсор для определения БПК очистных сооружений в режиме реального времени [46]. Основной рабочий принцип биосенсора основан на непрерывном измерении концентрации CO₂, произведенного деградацией микроорганизмами углеродной составной стоков.

Нестандартный подход для определения БПК описан в работе [47]. Образцы сточной воды различной степени очистки шведского целлюлозного завода и чистая вода были проанализированы с помощью амперометрического биосенсора с несколькими ячейками и электродами с применением математических методов хемотронии при обработке массива полученных данных (так называемого биосенсорного “языка”). Образцы сточной воды были описаны такими параметрами, как химическое потребление кислорода, биологическое потребление кислорода, общее количество органического углерода, подавление нитрификации, ингибирование дыхания и токсичность по отношению к *Vibrio fischeri*, пресноводной морской водоросли *Pseudokirchneriella subcapita* и пресноводного ракообразного *Daphnia magna*.

Еще один подход к детекции БПК основан на регистрации изменений температуры, вызванных микробиологической деструкцией органических соединений. Этот подход основан на использовании калориметрических преобразователей; биосенсор на основе такого преобразователя описан

в работе [48]. Однако в последнее время это направление интенсивно не разрабатывается.

БИОРАСПОЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ БПК-СЕНСОРОВ

Микроорганизмы как основа биораспознавания. Для создания биораспознающих элементов БПК-сенсоров используют либо чистые культуры с определенными свойствами (широкий спектр окисляемых субстратов, устойчивость к воздействию негативных факторов окружающей среды, специфичность в отношении определенных стоков), либо смесь идентифицированных микроорганизмов (искусственные ассоциации), либо индуцируемый консорциум микроорганизмов, либо активный ил и даже термически убитые бактерии. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки.

Обычно БПК-биосенсоры на основе чистой культуры имеют преимущество в стабильности функционирования биосенсорной системы. В то же время такие биосенсоры могут показывать заниженное значение БПК из-за ограниченного спектра окисляемых одним штаммом субстратов. В качестве биокатализаторов наиболее часто используют целые клетки таких бактерий, как *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*; дрожжей. *Arxula adenivorans*, *Hansenula anomala*, *Klebsiella*, *Candida*, *Trichosporon*, *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи являются более предпочтительным биоматериалом для биосенсоров почти всех типов, поскольку устойчивы к негативным факторам окружающей среды и могут функционировать в распознающем элементе биосенсора длительное время [49, 50]. В то же время дрожжевые культуры подвержены контаминации сильнее бактериальных.

Для увеличения количества окисляемых субстратов используют ассоциации микроорганизмов, чаще всего состоящие из двух штаммов, например *Trichosporon cutaneum* и *Bacillus licheniformis* [51]. Как и большинство ранее описанных БПК-сенсоров, которые разрабатывались с целью улучшения сходимости и операционной стабильности, в биораспознающем элементе использовали смесь из двух идентифицированных штаммов. Это привело к расширению субстратной специфичности и стабилизации функционирования сенсора в течение длительного периода. БПК-сенсоры, основанные на сложной микробной популяции, такой, как активный ил и микробные консорциумы, имеют способность к детекции широкого спектра субстратов. Однако из-за нестабильности композиции в консорциуме со временем наблюдается нарастающая нестабильность в функционировании сенсора.

Для биосенсоров, основанных на живых клетках, требуется постоянное поддержание жизнедеятельности и поступление питательных веществ и минералов при длительном хранении. БПК-сенсоры на основе

убитых нагреванием клеток лишены этого недостатка. Такие клетки, сохранившие активность основных окисляющих ферментов, могут в дальнейшем храниться в фосфатном буфере в течение длительного периода времени при комнатной температуре [52–54].

Иммобилизация микроорганизмов. Микробные клетки на поверхности физико-химического преобразователя удерживаются в большинстве случаев с помощью простой адсорбции. В этом случае клетки помешают, главным образом, на пористую мембрану путем всасывания или удержания воды гидрогелями, в качестве которых применяют водный раствор поливинилового спирта [53] или поликарбомоилсульфонат [54, 55]. Для миниатюризации БПК-сенсора используют метод кросс-сшивания резины (ENT-3400) под действием УФ для иммобилизации клеток на поверхности микрокислородного электрода [56]. В качестве альтернативы возможно использование одноразовых БПК-сенсоров, в которых биопленка должна легко заменяться. Разработан БПК-сенсор, биораспознающий элемент которого был приготовлен смешиванием магнитного порошка с активным илом. Намагниченный ил затем размещали на тефлоновой мембране катода и удерживали за счет магнитных взаимодействий [57].

Одним из перспективных современных направлений создания биораспознающих элементов на основе целых клеток микроорганизмов является разработка их иммобилизации в золь–гель матрицы [58, 59]. Такие элементы имеют высокую проницаемость для анализируемых проб, хорошую прочность и стабильность, а также низкую токсичность для иммобилизованных микроорганизмов. Однако получение таких биопленок представляет довольно сложную задачу, так как большинство методов образования золь–гелей основано на температурной обработке смеси реагентов.

ХАРАКТЕРИСТИКА БПК-СЕНСОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

Эффективность биосенсора определяется его аналитическими и метрологическими характеристиками и рабочими параметрами. Они включают свойства аналитического сигнала (величина и время отклика) в ответ на добавление анализируемого вещества, обратимость системы после удаления анализируемого соединения, стабильность биодатчика, технику измерения, операционные условия и многие другие. Однако оптимизация биосенсорной системы является комплексной задачей, так как часто улучшение одного свойства приводит к ухудшению другого.

Для получения количественной информации о содержании анализируемых веществ в образце необходимо знать калибровочные характеристики БПК-биосенсора, то есть зависимость аналитического сигнала от концентрации. При описании калибров-

ки необходимо указывать, в каких условиях она была получена, и для какого калибровочного раствора. Линейность зависимости ответов БПК-биосенсора от концентрации в определенном интервале является мерой возможности определения БПК при анализе сточных вод с различными концентрациями субстратов. Широкий линейный интервал желателен для точности и надежности измерений. Линейность характеристики БПК-биосенсоров при измерении в стационарном состоянии меньше, чем при использовании начальной скорости изменения сигнала биосенсора. Кроме собственно калибровочной зависимости для сравнения эффективности биосенсоров используются такие количественные характеристики, как чувствительность и предел обнаружения [60]. Коэффициент чувствительности определяется, как значение производной от калибровочной характеристики биосенсора по концентрации измеряемого вещества; как правило, указывается максимальное значение этого параметра. Другой важной характеристикой является нижний предел обнаружения. В случае амперометрических биосенсоров можно проследить следующую закономерность. Повысить чувствительность сенсора возможно путем увеличения количества биоматериала. Однако это в определенном диапазоне количества биоматериала может приводить к смещению предела обнаружения в область более высоких концентрации анализируемого соединения. Таким образом, объективной характеристикой биосенсора может являться отношение его предела обнаружения к чувствительности.

Линейность и количественные характеристики калибровочной зависимости связаны с устройством преобразователя, типом сенсора и концентрацией клеток в распознающем элементе. БПК-сенсоры с высокой плотностью клеток в биопленке обычно более чувствительны, но имеют более узкий линейный интервал определяемых концентраций. На эти параметры также влияет чувствительность сенсора в отношении определенных типов органических соединений. БПК-сенсор может давать неодинаковые линейные характеристики при использовании разных калибровочных растворов и образцов с различным составом органических субстратов. В качестве растворов для калибровки прибора обычно используется раствор смеси глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС) с концентрацией 205 мг/дм³ или другие смеси органических соединений (так называемые синтетические сточные воды). В настоящее время значительное внимание уделяют разработке калибровочных растворов – синтетических сточных вод, которые содержат примерный перечень тех соединений, которые являются основными компонентами анализируемых образцов воды [12, 40, 61–65]. Была предложена концепция нормализованного ответа для того, чтобы определить, подходит калибровочный раствор для данного образца или нет; с этой целью ответ биосенсора на калибровочный раствор

должен походить на ответ анализируемого образца воды [12].

Поскольку БПК-сенсоры разрабатывались для создания быстрого альтернативного аналитического метода, то анализ с помощью биосенсоров должен иметь точность, не хуже традиционного метода БПК. БПК определяют 5-суточным тестом по стандартному раствору ГГС, для которого усредненная величина БПК₅ составляет 205 мг/л, а стандартное отклонение – 30.5 мг/л, что составляет около 15.4%. Повторяемость измерений БПК-сенсоров биопленочного типа характеризуется стандартным отклонением 10–11%) для сенсора на основе одного штамма, и возрастает до 15% для сенсоров, основанных на ассоциации микроорганизмов [5].

Важным потребительским качеством биосенсоров является время выполнения одного анализа, которое складывается из времени ответа биосенсора и восстановления активности биорецепторного элемента. Время ответа БПК-сенсора варьирует, прежде всего, в зависимости от применяемой техники измерения. Сигнал сенсора при использовании электрохимического кислородного преобразователя (электрод типа Кларка) удается зарегистрировать за 5–25 мин при измерениях в стационарном состоянии и через 15–30 с при измерении начальной скорости. При измерениях в стационарном состоянии время установления нового устойчивого состояния зависит от концентрации субстрата в образце и значительно увеличивается при анализе образцов с высокой концентрацией субстратов. Обычно время, требуемое на восстановление базового сигнала, позволяющего приступить к очередному измерению, больше, чем время сигнала, т.е. составляет 15–60 мин при измерении по конечному значению и 5–10 мин при измерении по начальной скорости соответственно. Время восстановления также возрастает при увеличении времени измерения и может увеличиваться до нескольких часов.

Следует отметить, что сточные воды некоторых производств, например зерноперерабатывающих предприятий (спиртовые, пивоваренные, крахмалопаточные) характеризуются высоким содержанием органических загрязнений, что приводит к гибели естественных экосистем вокруг таких предприятий при неконтролируемом сбросе отработанного материала в окружающую среду. В этом случае основной проблемой является утилизация жидких отходов. Первый шаг утилизации состоит в проверке отходов на содержание органических компонентов. Для таких предприятий не только практически сложно, но и нерационально стремиться к созданию универсального БПК-сенсора. Целесообразно производить разработку биосенсоров и выбор соответствующих микроорганизмов, которые обеспечили бы наиболее эффективную детекцию БПК в соответствии с конкретным типом сточных вод,

Характеристика и параметры БПК-сенсоров

Микроорганизм, иммобилизация	Условия измерения	Характеристика	[Ссылка], год
БПК-биосенсоры на основе кислородного электрода			
Клетки <i>Trichosporon cutaneum</i> и <i>Bacillus subtilis</i> , коиммобилизованные в золь-гелевую матрицу на основе кремнезема и сополимера 4-винилпиридина с поливиниловым спиртом.	Определение БПК в озерной воде и коммунальных стоках.	Время жизни сенсора более 40 сут. Пределы определения БПК 1–60 мг О ₂ /л.	[59], 2003
Клетки <i>Trichosporon cutaneum</i> и <i>Bacillus licheniformis</i> , коиммобилизованные на тефлоновой мембране.	Калибровка по ГГС.	Время измерения 5–10 мин при нижнем пределе детекции 0.5 мг О ₂ /л БПК.	[50], 2002
Клетки <i>Klebsiella</i> sp., выделенные из активного ила и иммобилизованные на тефлоновой мембране.	ГГС, определение лактозы в сточных водах молокозавода.	Время ответа сенсора 15 мин, время регенерации активности рецепторного элемента 20 мин. Оптимум рН и температуры 7.0 и 30°C соответственно.	[61], 2001
Клетки <i>Arxula adeninovorans</i> , иммобилизованные в поликарбомоилсульфонат.	Определение БПК в коммунальных и промышленных сточных водах из различных источников, в том числе в стоках с высоким содержанием солей.	Сенсор стабилен в течение 40 сут. Работоспособность сохраняется без уменьшения активности. Линейная зависимость калибровки до 550 мг О ₂ /л, стабилен в области рН 6.5–7.5.	[55], 1999
Препарат активного ила, клетки в котором убиты нагреванием при 300°C в течение 1.75 мин.	Калибровка по ГГС.	–	[52], 2005
Клетки <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , инкапсулирование в кальций-альгинатный гель.	ГГС, анализ образцов сточных вод.	Соответствие между БПК _{6с} и БПК ₅ характеризуется высокой корреляцией (0.95 для шести измерений).	[49], 2009
Ассоциация микроорганизмов, иммобилизованных на нейлоновой мембране.	ГГС, анализ образцов сточных вод.	Время ответа 90 мин, стабильность в течение 400 циклов измерений, хранение при 4°C, нижний предел детекции 1 мг О ₂ /л, воспроизводимость 1.85–2.25%.	[50], 2008
Клетки <i>Gluconobacter oxydans</i> , иммобилизованные адсорбцией на стекловолоконном фильтре.	ГГС, анализ стоков пищевых производств.	Время стабильной работы 12 сут, чувствительность 0.28 нА дм ³ /мин мг. Длительность измерения 7–10 мин, линейный диапазон зависимости ответа биосенсора 2.0 – 20.3 мг О ₂ /дм ³ .	[66] 2008
Клетки <i>Arxula adeninovorans</i> , иммобилизованные адсорбцией на стекловолоконном фильтре.	ГГС, анализ стоков пищевых производств.	Время стабильной работы 28 сут, чувствительность 0,83 нА дм ³ /мин мг, длительность одиночного измерения 8–12 мин, линейный диапазон зависимости ответа биосенсора от БПК ₅ 1.4–11.6 мг О ₂ /дм ³ .	[66] 2008
БПК-биосенсоры медиторного типа			
Бактерии <i>Pseudomonas fluorescens</i> , иммобилизованные в ацетатцеллюлозную мембрану, в сочетании с медиатором гексацианоферратом калия.	Синтетические сточные воды, анализ образцов сточных вод.	Диапазон определения от 15 до 260 мг О ₂ /дм ³ . После 35 сут. хранения ответ сенсора составлял половину от первоначального.	[21], 2001
Новые дрожжевые штаммы (SPT1 и SPT2), закрепленные на стеклогуглеродном электроде с помощью диализной мембраны, медиатор — феррицианид.	ГГС, анализ образцов сточных вод.	Оценка БПК в пределах 2–100 мг О ₂ /л. Время измерения 5 мин.	[22], 2001

Таблица. Окончание

Микроорганизм, иммобилизация	Условия измерения	Характеристика	[Ссылка], год
<p>Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, двухмедиаторная система с феррицианидом и липофильным медиатором менадионам.</p> <p>Стеклоуглеродный электрод, модифицированный феррицианидом в ионообменном полисилоксане. Бактерии <i>Gluconobacter oxydans</i> в графитовой пасте, медиатор ферроцен.</p>	Анализ образцов речной и морской воды.	Линейный диапазон в интервале от 1 мкМ до 10 мМ концентрации гексацианоферрата(II) ($r^2 = 0.9995$, относительное стандартное отклонение 1.3%).	[24], 2007
	ГГС, образцы морской воды.	Сходимость 3,8%, воспроизводимость 7,7%, корреляция БПК _{6с} и БПК ₅ 0.988.	[26], 2008
	ГГС, анализ стоков пищевых производств.	Время стабильной работы биосенсора 30 сут, чувствительность 4 нА дм ³ /мг, длительность одного измерения 7 мин, линейный диапазон зависимости ответа биосенсора от БПК ₅ 34–680 мг О ₂ /дм ³ .	[67], 2008
Оптические БПК-биосенсоры			
<p>Клетки <i>Pseudomonas putida</i>, адсорбированные на нитроцеллюлозной мембране.</p> <p>Рекомбинантный штамм <i>Escherichia coli</i>, содержащий фрагменты lux-оперона <i>Vibrio fischeri</i>.</p> <p>Клетки <i>Bacillus subtilis</i>, иммобилизованные в композитный золь-гель кварца и поливинилового спирта. Кислородчувствительная пленка из трис(4,7-дифенил-1,10-фенантролин) рутения(II).</p> <p>Микроорганизмы <i>Bacillus licheniformis</i>, <i>Dietzia maris</i> и <i>Marinobacter marinus</i> из морской воды, иммобилизованные в поливиниловом спирте с чувствительным к кислороду комплексом рутения.</p>	Синтетические сточные воды, образцы речной воды.	Оценка БПК в диапазоне 1–10 мг О ₂ /л, нечувствителен к присутствию хлоридов и ионов тяжелых металлов, время измерения – 15 мин.	[39], 2000
	ГГС, образцы различных сточных вод.	—	[40], 2003
	ГГС	—	[41], 2005
	ГГС, образцы морской воды.	Время устойчивой работы до 10 мес. При использовании в качестве стандарта ГГС коэффициент корреляции в диапазоне от 0.3–40 мг О ₂ /л БПК составил 0.985. Воспроизводимость ±2.3%.	[42], 2006 [43], 2006
БПК-биосенсоры на основе БТЭ			
	Мониторинг сточных вод в реальном времени	Устойчивый ток после ввода проб различной концентрации в БТЭ через 60 мин. Воспроизводимость 10% при определении БПК в концентрации 100 мг О ₂ /л.	[35], 2004 [36], 2005
БПК-биосенсоры на основе других методов регистрации			
<p>Измерение концентрации СО₂, произведенного деградацией микроорганизмами углеродной составной стоков. Контроль СО₂ с помощью инфракрасного спектрометра.</p> <p>Амперометрический биоэлектронный “язык”. Модификация электродов тирозиназой, пероксидазой хрена, ацетилхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой.</p> <p>Активный ил, рН-преобразователь. Определение СО₂ в аэробных условиях и NaOH в анаэробных.</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Колориметрический метод в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола.</p>	Определение БПК очистных сооружений.	—	[46], 2005
	Образцы сточных вод.	—	[47], 2005
	Мониторинг степени загрязнения органическими соединениями и токсичности.	—	[63], 2008
	ГГС, образцы речной воды.	Линейный интервал 1.1–22 мг О ₂ /л ⁻¹ ($r = 0.988$, $n = 3$), хранение 36 сут.	[25], 2007

т.е. создавать специализированные БПК-биосенсоры. Так, для контроля степени очистки сточных вод крахмалопаточного комбината в БПК-биосенсоре предложено использовать уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans*, которые обеспечивают высокую чувствительность по отношению к спиртам и сахарам [66, 67]; такой подход позволил разработать экспресс-метод контроля БПК стоков этого предприятия. Наиболее остро проблема загрязнения органическими соединениями окружающей среды относится к спиртовой промышленности, в частности к утилизации основного отхода производства – послеспиртовой барды. С этой целью разработан биосенсорный метод определения общего содержания легкоокисляемых органических соединений в отходах ферментационных производств [68, 69]. Метод анализа с использованием разработанного биосенсора характеризуется высокой скоростью, высокой чувствительностью и селективностью. Авторы отмечают, что биосенсоры, предназначенные для экологического контроля стоков пищевых производств, можно использовать и для мониторинга ферментационных процессов на этих производствах, это позволит сократить затраты на оборудование и увеличить экономическую отдачу предприятия.

Более подробно основные характеристики и параметры БПК-биосенсоров различных типов представлены в таблице.

Таким образом, определение БПК с помощью биосенсоров является достаточно развитым направлением аналитической биотехнологии. Однако БПК-сенсоры все еще имеют ряд ограничений, которые затрудняют их применение, поэтому проведение в России собственных исследований и выполнение работ, создающих основу для выпуска коммерческих БПК-биосенсоров является актуальным. Биосенсорные анализаторы БПК представляют собой надежные, простые и дешевые аналитические инструменты и могут с успехом использоваться для контроля водных экосистем наряду с традиционными методами определения БПК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госконтракта 02.740.11.0296 и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (ГК П258, ГК П551).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *D'Souza S.F.* // *Biosen. Bioelectron.* 2001. V. 16. P. 337–353.
2. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* Washington: Amer. Publ. Health Association, 1992. P. 5.1–5.6.
3. *Karube I., Mitsuda S., Matsunaga T., Susuki S.* // *Biotechnol. Bioeng.* 1977. V. 19. № 10. P. 1535–1547.
4. *Hikuma M., Suzuki H., Yasuda T., Karube L., Suzuki S.* // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1979. V. 8. P. 289–297.
5. *Liu J., Mattiasson B.* // *Water Res.* 2002. V. 36. P. 3786–3802.
6. *Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barcelo D.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. № 4. P. 1025–1041.
7. *Bourgeois W., Burgess J.E., Stuetz R.M.* // *J. Chem. Techn. Biotechn.* 2001. V. 76. P. 337–348.
8. *Baeumner A.J.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377. P. 434–445.
9. *Walmsley R.M., Keenan P.* // *Biotechn. Bioprocess Engineering.* 2000. V. 5. № 6. P. 387–394.
10. *Tan T.C., Li F., Neoh K.G.* // *Sens. Act. B.* 1993. № 10. P. 137–142.
11. *Yang Z., Sasaki S., Karube I., Suzuki H.* // *Anal. Chim. Acta.* 1997. V. 357. № 1–2. P. 41–50.
12. *Liu J., Bjornsson L., Mattiasson B.* // *Biosen. Bioelectron.* 2000. V. 14. № 12. P. 883–993.
13. *Iranpour R., Zermeno M.* // *Water Environ. Res.* 2008. V. 80. № 4. P. 24–29.
14. *Spanjers H., Vanrolleghem P., Olsson G., Dold P.* // *Water Sci. Technol.* 1996. V. 34. № 31. P. 117–143.
15. *Spanjers H., Klapwijk A.* // *Water Sci. Technol.* 1991. V. 24. № 7. P. 29–32.
16. *Spanjers H., Olsson G., Klapwijk A.* // *Water Sci. Technol.* 1993. V. 28. № 11–12. P. 401–415.
17. *Sohn M.-J., Lee J.-W., Chung C., Ihn G.-S., Hong D.* // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 313. № 3. P. 221–228.
18. *Heim S., Schnieder I., Binz D., Vogel A., Bilitewski U.* // *Biosen. Bioelectron.* 1999. V. 14. P. 187–193.
19. *Praet E., Reuter V., Gaillard T., Vassel J.-L.* // *Trends Anal. Chem.* 1995. V. 14. № 7. P. 371–378.
20. *Tkac J., Vostiar I., Gorton L., Gemeiner P., Sturdik E.* // *Biosen. Bioelectron.* 2003. V. 18. № 9. P. 1125–1134.
21. *Yoshida N., Yano K., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I.* // *Analyst.* 2000. V. 125. № 12. P. 2280–2284.
22. *Trosok S.P., Driscoll B.T., Luong J.H.T.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 56. № 3–4. P. 550–554.
23. *Yoshida N., Hoashi J., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I.* // *J. Biotechnol.* 2001. V. 88. № 3. P. 269–275.
24. *Nakamura H., Suzuki K., Ishikuro H., Kinoshita S., Koizumi R., Okuma S., Gotoh M., Karube I.* // *Talanta.* 2007. V. 72. № 1. P. 210–216.
25. *Nakamura H., Kobayashi S., Hirata Y., Suzuki K., Mogi Y., Karube I.* // *Anal. Biochem.* 2007. V. 369. № 2. P. 168–174.
26. *Chen H., Ye T., Qiu B., Chen G., Chen X.* // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 612. № 1. P. 75–82.
27. *Liua L., Shanga L., Liua C., Liua C., Zhanga B., Dong S.* // *Talanta.* 2010. V. 81. № 4–5. P. 1170–1175.
28. *Arlyapov V.A., Chigrinova E.Yu., Ponamoreva O.N., Reshetilov A.N.* // *Starch Science and Technology* / Ed. Zaikov G.E. New York: Nova Science Publisher, 2008. P. 161–175.
29. *Farré M., Barceló D.* // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001. № 371. P. 467–473.
30. *Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Webber J., Haya J.* // *Biosen. Bioelectron.* 2004. V. 20. P. 524–532.
31. *Karube I., Matsunaga T., Tsuru S., Suzuki S.* // *Biotechnol. Bioeng.* 1977. V. 19. № 11. P. 1727–1760.
32. *Kim M., Youn S.M., Shin S.H., Jang J.G., Han S.H., Hyun M.S., Gadd G.M., Kim H.J.* // *J. Environ. Monit.* 2003. V. 2. № 5. P. 640–643.
33. *Kim B.H., Chang I.S., Gil G.C., Park H.S., Kim H.J.* // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. P. 541–545.

34. Moon H., Chang I.S., Kang K.H., Jang J.K., Kim B.H. // *Biotechnol. Lett.* 2004. V. 26. № 22. P. 1717–1738.
35. Chang I.S., Jang J.K., Gil G.C., Kim M., Kim H.J., Cho B.W., Kim B.H. // *Biosen. Bioelectron.* 2004. V. 19. № 6. P. 607–613.
36. Chang I.S., Moon H., Jang J.K., Kim B.H. // *Biosen. Bioelectron.* 2005. V. 20. № 9. P. 1856–1859.
37. Hyun C.-K., Tamiya E., Takeuchi T., Karube I. // *Biotechnol. Bioeng.* 1993. V. 41. P. 1107–1118.
38. Karube I., Yokoyama K. // *NATO ASI Ser. E.* 1993. V. 252. P. 281–288.
39. Chee G.-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I. // *Biosen. Bioelectron.* 2000. V. 15. № 7–8. P. 371–376.
40. Sakaguchi T., Kitagawa K., Ando T., Murakami Y., Morita Y., Yamamura A., Yokoyama K., Tamiya E. // *Biosen. Bioelectron.* 2003. V. 19. № 2. P. 115–121.
41. Kwok N.-Y., Dong S., Lo W., Wong K.-Y. // *Sens. Act. B.* 2005. V. 110. № 2. P. 289–298.
42. Lin L., Xiao L.-L., Huang S., Zhao L., Cui J.-S., Wang X.-H., Chen X.N. // *Biosen. Bioelectron.* 2006. V. 21. № 9. P. 1703–1709.
43. Jiang Y., Xiao L.-L., Zhao L., Chen X., Wang X., Wong K.-Y. // *Talanta.* 2006. V. 70. № 1. P. 97–103.
44. Pang H.L., Kwok N.Y., Chan P.H., Yeung C.H., Lo W., Wong K.Y. // *Environ. Sci. Technol.* 2007. V. 4. № 11. P. 4038–4082.
45. Sakaguchi T., Morioka Y., Yamasaki M., Iwanaga J., Beppu K., Maeda H., Morita Y. // *Biosen. Bioelectron.* 2007. V. 22. № 7. P. 1345–1350.
46. Vaiopoulou E., Melidis P., Kampragou E., Aivasidis A. // *Biosen. Bioelectron.* 2005. V. 21. № 2. P. 365–371.
47. Tønning E., Sapelnikova S., Christensen J., Carlsson C., Winther-Nielsen M., Dock E., Solna R., Skladal P., Nørgaard L., Ruzgas T., Emnéus J. // *Biosen. Bioelectron.* 2005. V. 21. № 4. P. 608–617.
48. Mattiasson B., Larsson P.O., Mosbach K. // *Nature.* 1977. V. 268. P. 519–520.
49. Seo K.S., Choo K.H., Chang H.N., Park J.K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 83. № 2. P. 217–223.
50. Dhall P., Kumar A., Joshi A., Saxena T.K., Manoharan A., Makhijani S.D., Kumar R. // *Sens. Act. B.* 2008. V. 133. № 2. P. 478–483.
51. Suriyawattanakul L., Surareungchai W., Sritongkam P., Tanticharoen M., Kirtikara K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. № 1. P. 40–44.
52. Tan T.C., Lim E.W.C. // *Sens. Act. B.* 2005. V. 107. № 2. P. 546–551.
53. Qian Z., Tan T.C. // *Wat. Res.* 1999. V. 33. № 13. P. 2923–2928.
54. Tag K., Lehmann M., Chan C., Renneberg R., Riedel K., Kunze G. // *Sens. Act. B.* 2000. V. 67. P. 142–148.
55. Chan C., Lehmann M., Chan K., Chan P., Chan C., Gruendig B., Kunze G., Renneberg R. // *Biosen. Bioelectron.* 2000. V. 15. № 7. P. 343–353.
56. Lehmann M., Chan C., Lo A., Lung M., Tag K., Kunze G., Riedel K., Gruendig B., Renneberg R. // *Biosen. Bioelectron.* 1999. V. 14. P. 295–302.
57. Yang Z., Suzuki H., Sasaki S., Karube I. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996. V. 46. № 1. P. 10–14.
58. Sakai Y., Abe N., Takeuchi S., Takahashi F. // *J. Ferment Bioeng.* 1995. V. 80. № 3. P. 300–303.
59. Chen D., Cao Y., Liu B., Kong J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 372. P. 737–739.
60. Jianbo J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S. // *Biosen. Bioelectron.* 2003. V. 18. № 8. P. 1023–1029.
61. Thévenot R.D., Toth K., Durst A.D., Wilson G.S. // *Biosen. Bioelectron.* 2001. V. 16. P. 121–131.
62. Kim M.-N., Park K.-H. // *Sens. Act. B.* 2001. V. 80. P. 9–14.
63. Melidis P., Vaiopoulou E., Aivasidis A. // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2008. V. 31. № 3. P. 277–352.
64. Tanaka H., Nakamura E., Minamiyama Y., Toyoda T. // *Water Sci. Technol.* 1994. V. 30. № 4. P. 215–227.
65. Jung J., Sofer S., Lakhwala F. // *Biotechnol. Tech.* 1995. V. 9. № 4. P. 289–294.
66. Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алферов В.А., Рогова Т.В., Блохин И.В., Ченкова И.Ф., Решетиллов А.Н. Вода: химия и экология. 2008. № 3. С. 20–22.
67. Арляпов В.А., Чигринова Е.Ю., Понаморева О.Н., Решетиллов А.Н. Express Detection of BOD in Wastewaters of Starch-Processing Industry. *Starch Science and Technology* / Ed. Zaikov G.E. New York: Nova Science Publisher. 2008. P. 161–175.
68. Решетиллов А.Н., Алферов В.А., Леденев В.П., Сергеев В.И. // Ликероводочное производство и виноделие. 2008. Т. 3. № 99. С. 20–22.
69. Решетиллов А.Н., Алферов В.А., Леденев В.П., Сергеев В.И. // Ликероводочное производство и виноделие. 2008. Т. 3. № 100. С. 24–27.

Microbial Biosensors for Detection of Biological Oxygen Demand (a Review)

O. N. Ponomoreva^a, V. A. Arlyapov^a, V. A. Alferov^a, and A. N. Reshetilov^b

^a Tula State University, Tula, 300600 Russia
e-mail: chem@tsu.tula.ru

^b Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia
e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Received September 4, 2009

Abstract—The review briefs recent advances in application of biosensors for determining biological oxygen demand (BOD) in water. Special attention is focused on the principles of operation of microbial BOD sensors; the information about biorecognition elements in such systems and the methods used for immobilization of biological components in film biosensors is summarized. Characteristics of some BOD sensor models are considered in detail.