

УДК 543.95:543.55:543.38

АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК ОСНОВА БИОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДИХЛОРМЕТАНА

© 2013 г. Ю. В. Плеханова, Ю. Е. Фирсова, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко, А. Н. Решетилов

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН Пушкино, Московская обл., 142290

e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 15.05.2012 г.

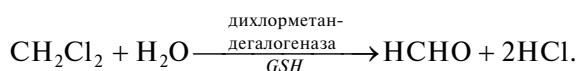
Клетки бактерий-деструкторов дихлорметана (ДХМ) иммобилизовали сорбцией на различных типах мембран, которые фиксировали на измерительной поверхности рН-чувствительного полевого транзистора. Наличие ДХМ в среде (0.6–8.8 мМ) вызывало изменение выходного сигнала транзистора, обусловленное появлением ионов H^+ в среде в результате утилизации ДХМ метиловобактериями. Из 4 штаммов метиловобактерий – *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4, *Methylobacterium extorquens* ДМ17, *Methylopila helvetica* ДМ6 и *Ancylobacter dichloromethanicus* ДМ16 – наиболее высокая и стабильная активность в отношении деградации ДХМ выявлена у штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4. Из 11 типов мембран для иммобилизации клеток в качестве оптимальных носителей выбраны нитроцеллюлозные мембраны типа Millipore и хроматографическая стеклобумага GF/A, позволяющие получать стабильные сигналы биосенсора в течение 2 нед. без замены биорецептора.

DOI: 10.7868/S0555109913020141

Широкое использование дихлорметана (ДХМ), некоторые области применения которого показаны на рис. 1, требует постоянного контроля за его содержанием в городских и промышленных стоках. ДХМ относится к классу галогенированных производных метана и является распространенным загрязнителем окружающей среды [1–3]. Известно, что ДХМ обладает высокой токсичностью для млекопитающих, вызывает образование опухолей печени и легких у мышей и крыс [4], оказывает канцерогенное действие на эритроциты, печень и почки человека [5, 6].

ДХМ считается одним из основных загрязнителей воды и атмосферы, так как в атмосфере период его полураспада составляет 70 сут, а в водных средах около 700 лет [7, 8], поэтому, разработка высокочувствительных, экспрессных и простых по конструкции аналитических устройств, таких, как биосенсоры, для определения ДХМ в промышленных и городских стоках является актуальной задачей.

ДХМ эффективно утилизируется некоторыми видами метилотрофных бактерий. Первый этап утилизации ДХМ как источника углерода и энергии микроорганизмами заключается в гидролитическом дегалогенировании с образованием формальдегида и неорганического хлорида. Реакция катализируется дихлорметандегалогеназой [9]:



Этот процесс у аэробных метиловобактерий, использующих ДХМ в качестве источника углерода

и энергии, сопровождается образованием в цитоплазме высоких концентраций HCl. При этом ионы H^+ и Cl^- экскретируются в среду [10].

Процесс биодеструкции ДХМ обычно оценивают с помощью газовой хроматографии [11], с использованием радиоизотопов [12], а также спектрофотометрически по концентрации ионов хлора в культуральной жидкости [13]. Известен также биосенсор для определения ДХМ [14], основанный на комбинации преобразователей, состоящий из проточного калориметра и электрода, чувствительного к ионам хлора. Анализ основан на использовании клеток *Hyphomicrobium* DM2, иммобилизованных в альгинат.

Поскольку при биодеградации ДХМ в среду выделяются не только ионы хлора, но и протоны, этот процесс можно отслеживать с помощью рН-чувствительных полевых транзисторов (ПТ) [15, 16]. Миниатюрные ПТ часто применяют в качестве электрохимических преобразователей сигналов биосенсоров для детекции различных токсичных соединений, например пестицидов (атразин [17], 2,4-Д [18]), токсинов (β -бунгаротоксин из яда змеи *Bungarus multicinctus* [19]). Известно применение полевых транзисторов, содержащих алкогольоксидазу и клетки метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* для определения формальдегида [20]. Применение полевых транзисторов для определения дихлорметана неизвестно.

Цель работы – создание биосенсора на основе полевого транзистора с иммобилизованными на нем клетками метилотрофных деструкторов ДХМ



Рис. 1. Области применения дихлорметана.

для детекции ДХМ в лабораторных условиях и изучение параметров биосенсорного анализа.

МЕТОДИКА

Реагенты. В качестве иммобилизационных материалов в экспериментах использовали хроматографическую стекlobумагу GF/A (“Whatman”, Великобритания); нитроцеллюлозные мембраны Millipore с различным размером пор (“Sigma”, США, размер пор 0.22, 0.30, 0.45 и 0.65 мкм); регенерированную целлюлозу на полипропилене (размер пор ~500 Å), полисульфонамид на лавсане (размер пор ~1000 Å), полиэфирсульфон на лавсане (размер пор ~0.22 мкм), ацетат целлюлозы на тканевом лавсане (размер пор ~1000 Å), которые получены на ЗАО ТНЦ “Владипор” (Россия); нетканые материалы – термоскрепленный полипропилен ТС-1 и ТС-2 (ОАО “НИИ нетканых материалов”, г. Серпухов, Моск. обл., Россия). В качестве компонентов измерительной среды использовали хлорид натрия, натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрий фосфорнокислый однозамещенный (“Диакон”, Россия), дихлорметан (“Синтакон”, Россия).

Рецепторный элемент биосенсора. Для приготовления рецепторного элемента биосенсора использовали суспензии клеток аэробных деструкторов ДХМ: *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 ВКМ В-2191 (=DSM 6343), *Methylopila helvetica* ДМ6, *Ancylobacter dichloromethanicus* ДМ16 ВКМ В-2484 (=DSM 21507) и *Methylobacterium extorquens* ДМ17. Штаммы выделены из мест с длительным селективным давлением поллютанта: из загрязненного грунта и ила очистных сооружений химических предприятий Швейцарии, Германии и России.

Бактерии выращивали на среде “К”, содержащей (г/л): KH_2PO_4 – 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0, NaCl –

0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.002, pH 7.2. Культивирование на ДХМ проводили в колбах Эрленмейера объемом 300 мл, содержащих 50 мл среды, закрытых заворачивающимися крышками с резиновой мембраной (“Precision Sampling Corp.”, Baton Rouge, США) при 29°C на качалке (180 об/мин). ДХМ вносили в среду через мембрану шприцем порциями до конечной концентрации 10 мМ. По мере сдвига pH до 5.0 добавляли 3.0 М NaOH до pH 7.0. Для культивирования *A. dichloromethanicus* ДМ16 в стерильную среду “К” добавляли биотин и пантотенат (20 мкг/л).

Выращенные таким образом клетки с индуцированной дихлорметандегалогеназой центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин, промывали дважды калий-фосфатным буфером и затем разбавляли исходный объем клеток в два раза таким же буфером; 5 мкл суспензии клеток наносили на мембрану, имеющую размер 3×3 мм² и подсушивали на воздухе в течение 10–15 мин. Затем мембрану закрепляли с помощью фиксатора на поверхности измерительного электрода, которым являлся ПТ.

Преобразователь сигнала биосенсора. В работе использовали ПТ, изготовленные на НПО “Позитрон” (г. Санкт-Петербург, Россия. pH-чувствительной мембраной служил слой пятиокиси тантала на затворной области ПТ. Химическая чувствительность ПТ составляла 45–56 мВ/pH. После усиления сигнал поступал на компьютер для регистрации и обработки данных. Измеряемым параметром являлась амплитуда сигнала ПТ. Измерения выполняли в стеклянной кювете объемом 2.0 мл при постоянном перемешивании и температуре 20–22°C в натрий-фосфатном буфере (pH 7.2, 1 мМ).

Оценка диффузионной проницаемости мембран. Фрагменты мембран помещали на затворную pH-

чувствительную область транзистора, регистрировали базовый уровень сигнала затем добавляли 10 мкл 0.1 М HCl (конечная концентрация в кювете 0.5 мМ). Регистрировали время от внесения вещества до начала развития сигнала и скорость изменения сигнала, коррелирующие со скоростью диффузии протонов в данном материале.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг штаммов метилобактерий по интенсивности биодеградации ДХМ. На рис. 2 представлены калибровочные зависимости, позволяющие определять ДХМ с помощью метилобактерий *M. dichloromethanicum* ДМ4, *M. extorquens* ДМ17, *M. helvetica* ДМ6, *A. dichloromethanicus* ДМ16, использующих ДХМ в качестве источника углерода и энергии сериновым (ДМ4, ДМ17, ДМ6) или рибулозобисфосфатным (ДМ16) путями C₁-метаболизма. Калибровочные зависимости для четырех штаммов микроорганизмов описываются уравнениями, представленными в табл. 1. Основные характеристики биосенсоров, вычисленные на основании этих зависимостей, показаны там же. Область линейности, соответствующее уравнение регрессии и коэффициент вариации вычислены с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

Для создания биосенсора лучшие характеристики выявлены у штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4. Штамм характеризовался высокой активностью в отношении деградации ДХМ и устойчивостью к различным факторам окружающей

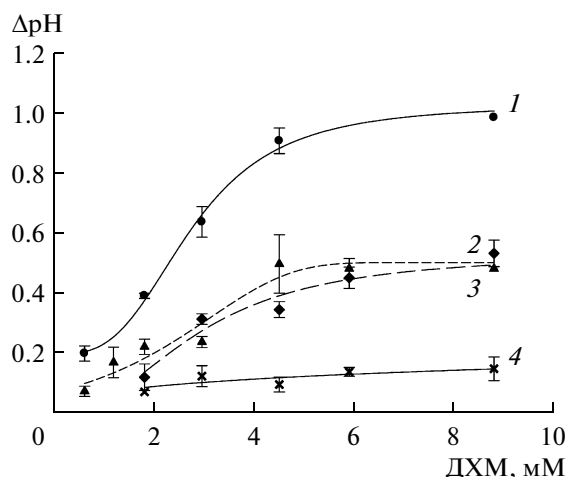


Рис. 2. Калибровочные зависимости для определения ДХМ с помощью различных штаммов микроорганизмов: 1 – *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4; 2 – *Methylopila helvetica* ДМ6; 3 – *Methylobacterium extorquens* ДМ17; 4 – *Ancylobacter dichloromethanicus* ДМ16. Ось Y – сигнал биосенсора.

среды: ультрафиолетовому излучению, пероксиду водорода, колебаниям pH и температуры, высушиванию [21]. Кроме того, клетки этого штамма хорошо иммобилизовались на носителях и не утрачивали способности к деградации поллютанта при длительном культивировании в неселективных условиях, что связано с хромосомной локализацией соответствующих генов [22].

Таблица 1. Основные характеристики биосенсоров на основе разных бактериальных штаммов – деструкторов ДХМ

Характеристика	<i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> ДМ4	<i>Methylopila helvetica</i> ДМ6	<i>Methylobacterium extorquens</i> ДМ17	<i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> ДМ16
Уравнение, описывающее калибровочную зависимость	$V = V_0 + \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_0 = 0.16$; $V_{max} = 0.88$; $h = 2.73$; $K_M = 2.67$; $R^2 = 0.99$	$V = V_0 + \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_0 = 0.09$; $V_{max} = 0.42$; $h = 3.50$; $K_M = 2.15$; $R^2 = 0.92$	$V = \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_{max} = 0.53$; $h = 2.75$; $K_M = 2.72$; $R^2 = 0.98$	$V = \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_{max} = 0.14$; $h = 3.53$; $K_M = 1.82$; $R^2 = 0.58$
Линейный диапазон детекции, мМ	1.0–4.5 мМ	0.6–1.8	1.8–6.0	1.8–3.0
Уравнение регрессии для линейного участка	$y = 0.2067x$	$y = 0.1277x$	$y = 0.0757x$	$y = 0.0408x$
Коэффициент корреляции	0.99	0.96	0.99	0.99
Коэффициент чувствительности, pH/мМ	0.26	0.19	0.16	0.07
Минимальный предел обнаружения, мМ	0.6	0.6	1.8	2.0
Диапазон детекции, мМ	0.6–8.8	0.6–6.0	1.8–8.8	2.0–8.8
Коэффициент вариации, %	7	8–20	8	11–28

Таблица 2. Данные по диффузионной проницаемости мембран и активности клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4 на разных типах мембран

Тип мембраны	ΔT , с	V_0 , рН/с	A_1 , рН	A_4 , рН
ПТ без мембраны	20	4.4	—	—
GF/A	55	0.4	0.07 ± 0.0064	0.32 ± 0.0197
Полисульфонамид на лавсане	45	0.6	0.06 ± 0.0111	0.05 ± 0.005
Ацетат целлюлозы на тканевом лавсане	56	1.0	0.04 ± 0.0108	0.06 ± 0.0197
Полиэфирсульфон на лавсане	65	0.6	0.10 ± 0.0115	0.09 ± 0.0099
Регенерированная целлюлоза на полипропилене	124	0.6	0.10 ± 0.0115	0.18 ± 0.074
Термоскрепленный полипропилен ТС 1	201	0.5	0.11 ± 0.0107	0.12 ± 0.049
Термоскрепленный полипропилен ТС 2	113	0.7	0.06 ± 0.0112	0.17 ± 0.015
Millipore type GS (0.22 мкм)	60	1.6	0.03 ± 0.0061	0.20 ± 0.0099
Millipore type PH (0.30 мкм)	37	1.4	0.06 ± 0.0107	0.18 ± 0.035
Millipore type HVLP (0.45 мкм)	92	1.5	0.04 ± 0.0081	0.21 ± 0.074
Millipore type DA (0.65 мкм)	60	1.4	0.07 ± 0.0115	0.49 ± 0.0099

Оценка операционной стабильности биосенсора на основе штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4 проводилась на основании статистической обработки выборки из 17 измерений концентрации ДХМ, равной 1.8 мМ. Коэффициент вариации (отношение среднеквадратичного отклонения, составляющего 0.027 рН, к среднему арифметическому значению сигнала, равному 0.37 рН) составил 7.3%.

Оценка диффузионной проницаемости различных типов мембран с помощью ПТ. Физико-химические параметры мембран: размер пор, структура, ионообменные и, в частности, протонсвязывающие свойства влияют на скорость диффузии субстратов к иммобилизованным клеткам. В свою очередь, скорость диффузии определяет время сенсорного измерения. Таким образом, крайне важной является сравнительная характеристика диффузионной проницаемости различных мембран. Для измерения этой величины регистрировали сигналы транзистора, возникающие при скачкообразном изменении рН раствора при внесении в кювету раствора соляной кислоты.

Установленные в результате этих экспериментов величины ΔT (время, прошедшее от введения вещества до начала развития сигнала ПТ) и максимальная начальная скорость изменения тока (V_0) для мембран приведены в табл. 2. Время ответной реакции самого транзистора, не содержащего покрытий на измерительной поверхности, не превышало 20 с и связано со временем, необходимым на перемешивание магнитной мешалкой введенного вещества в кювете.

По возрастанию параметра ΔT мембраны располагаются в следующий ряд: Millipore (размер пор 0.30 мкм) – полисульфонамид на лавсане – GF/A – ацетат целлюлозы на тканевом лавсане – Millipore

(размер пор 0.22 мкм)/Millipore (размер пор 0.65 мкм) – полиэфирсульфон на лавсане – Millipore (размер пор 0.45 мкм) – ТС 2 – регенерированная целлюлоза на полипропилене – ТС 1. По уменьшению начальной скорости сигнала мембраны располагаются в следующий ряд: Millipore (размер пор 0.22 мкм) – Millipore (размер пор 0.45 мкм) – Millipore (размер пор 0.30 мкм)/Millipore (размер пор 0.65 мкм) – ацетат целлюлозы на тканевом лавсане – ТС 2 – полиэфирсульфон на лавсане/полисульфонамид на лавсане/регенерированная целлюлоза на полипропилене – ТС 1 – GF/A.

Эти результаты свидетельствуют о том, что при регистрации сигналов с помощью рН-чувствительного ПТ более предпочтительно использование нитроцеллюлозных мембран типа Millipore; они обеспечивали быструю диффузию протонов к затворной области транзистора и высокую начальную скорость ответа. Указанные факторы важны для уменьшения времени анализа, а также для снижения ошибок при измерении начальной скорости ферментативной реакции, регистрируемая величина которой может быть ограничена медленной диффузией субстратов к иммобилизованным клеткам через мембрану.

Активность клеток на различных носителях. Помимо диффузионной проницаемости мембран, необходимы оценки активности клеток микроорганизмов, иммобилизованных сорбцией на этих типах мембран, при биодеградации ДХМ, а также времени, в течение которого активность будет сохраняться.

В первые сутки измерений сигналы, полученные от клеток, иммобилизованных на различных типах носителей, были примерно одинаковы – величина сигналов варьировала в пределах 0.03–0.07 рН (при концентрации

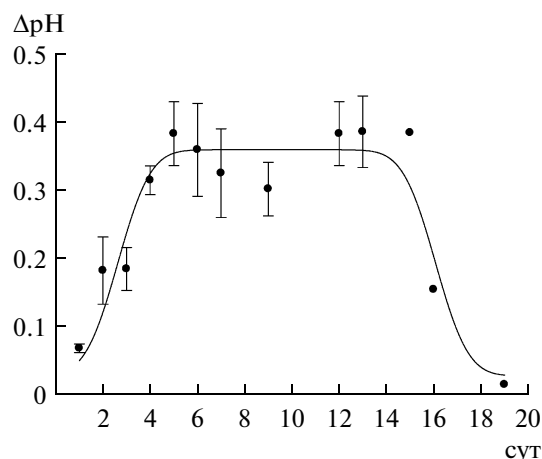


Рис. 3. Стабильность биосенсора. Концентрация клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4 на мембране GF/A – 5 мг сырой биомассы, концентрация добавленного ДХМ – 1.8 мМ. Ось Y – сигнал биосенсора.

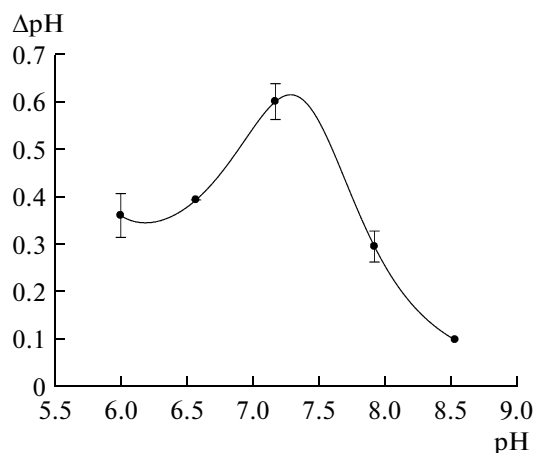


Рис. 4. Зависимость сигнала биосенсора (ΔpH) на основе клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4 от pH буферного раствора. Концентрация клеток на мембране GF/A – 4.7 мг сырой биомассы, концентрация добавленного ДХМ – 2.95 мМ. Ось Y – сигнал биосенсора.

ДХМ – 1.8 мМ). Исключение составляли три мембраны: регенерированная целлюлоза на полипропилене (0.10 рН), полиэфирсульфон на лавсане (0.10 рН) и ТС 1 (0.11 рН) – в скобках указана величина сигнала в единицах рН. На 4 сут функционирования биорецепторов активность клеток почти на всех типах мембран возрастала, исключение составляла только мембрана – “полисульфонамид на лавсане”. Далее происходила либо стабилизация сигналов на этом же уровне (полиэфирсульфон на лавсане; Millipore с размером пор 0.30, 0.45 и 0.65 мкм; GF/A), либо наблюдалось падение активности (для регенерированной целлюлозы на полипропилене; нетканых материалов – термоскрепленных полипропиленов ТС-1 и ТС-2; Millipore с размером пор 0.22 мкм; полисульфонамида на лавсане; ацетата целлюлозы на тканевом лавсане). Величины сигналов на первые (A_1) и четвертые сутки (A_4) функционирования биорецепторов показаны в табл. 2. Между измерениями биорецепторы хранились в натрий-фосфатном буфере (рН 7.2, 1.0 мМ) при температуре +4°C. Максимальная активность иммобилизованных клеток достигалась на мембранах типа Millipore (размер пор 0.65 мкм) и GF/A.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при регистрации сигналов с помощью рН-чувствительного ПТ с иммобилизованными физической сорбцией клетками *M. dichloromethanicum* ДМ4 более предпочтительно применение нитроцеллюлозных мембран типа Millipore с размером пор 0.65 мкм и хроматографической стеклотычи GF/A.

Использование данных типов мембран позволило получать стабильные сигналы биосенсора в течение 2 нед функционирования биорецептора.

На рис. 3 показана долговременная стабильность биорецептора на основе мембраны GF/A.

Влияние рН-буфера на сигнал биосенсора. Исследованы сигналы биосенсора в буферных растворах со значением рН от 6.0 до 8.5. Изучение зависимости сигналов биосенсора от начальных значений рН среды показало (рис. 4), что максимальная амплитуда ответа приходилась на значения рН 7.0–7.4, что соответствует оптимуму рН для роста этого штамма [23].

В заключение отметим, что впервые показана принципиальная возможность использования клеток микроорганизмов, способных к биодegradации ДХМ, для создания биосенсора для детекции этого растворителя на основе рН-чувствительного транзистора. Клетки метилобактерий с индуцированной активностью дихлорметандегалогеназы селективно реагируют на галометан. Выбран наиболее подходящий бактериальный штамм и оптимальный носитель для иммобилизации клеток методом сорбции. Показана возможность детекции ДХМ в лабораторных условиях в диапазоне концентраций 0.6–8.8 мМ. Такой биосенсор может найти применение на предприятиях, производящих и использующих ДХМ в своих процессах (лакокрасочные производства, фармацевтическая промышленность и т.д.), для анализа сточных вод.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.740.11.0111, ГК № 16.740.11.0020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 261–276.

2. Harper D.B. // Nat. Prod. Rep. 2000. V. 17. P. 337–348.
3. Worton D.R., Sturgers W.T., Schwander J., Mulvaney R., Barnola J.-M., Chappellaz J. // Atmos. Chem. Physics. 2006. V. 6. P. 2847–2863.
4. Mizutani K., Shinomiya K., Shinomiya T. // Forensic Sci. Int. 1988. V. 38. № 1–2. P. 113–128.
5. Green T. // Hum. Exp. Toxicol. 1997. V. 16. № 1. P. 3–13.
6. Thier R., Wiebel F.A., Hinkel A., Burger A., Brüning T., Morgenroth K., Senge T., Wilhelm M., Schulz T.G. // Arch. Toxicol. 1998. V. 72. № 10. P. 622–629.
7. Dhillon S., Von Burg R.J. // Appl. Toxicol. 1995. V. 15. P. 329–335.
8. Law K.S., Sturges W.T. Global Ozone Research and Monitoring Project – Report № 50 / Ed. C.A. Ennis. Geneva: World Meteorol. Org., 2007. 572 p.
9. Leisinger Th., Kohler-Staub D. // Methods in Enzymology. 1990. V. 188. P. 355–361.
10. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
11. Sakai T., Morita Y., Wakui C. // J. Chromatography B. 2002. V. 778. № 1–2. P. 245–250.
12. Krausova V.I., Robb F.T., González J.M. // J. Microbiol. Methods. 2003. V. 54. № 3. P. 419–422.
13. Jörg G., Bertau M. // Anal. Biochem. 2004. V. 328. P. 22–28.
14. Henrysson T., Mattiasson B. // Biodegradation. 1993. V. 4. P. 101–105.
15. Schonung M.J., Poghossian A. // Electroanalysis. 2006. V. 18. № 19–20. P. 1893–1900.
16. Решетиллов А.Н., Коржук Н.Л., Плеханова Ю.В. Биосенсорные анализаторы и их использование в медицине, биотехнологии и экологическом мониторинге. Тула: Изд-во ТулГУ, 2009. 140 с.
17. Plekhanova Yu.V., Reshetilov A.N., Yazygina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 19. P. 109–114.
18. Khomutov S.M., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Reshetilov A.N. // Analytical Letters. 1994. V. 27. № 15. P. 2983–2995.
19. Selvanayagam Z.E., Neuzil P., Gopalakrishnakone P., Sridhar U., Singh M., Ho L.C. // Biosens. Bioelectron. 2002. V. 17. № 9. P. 821–826.
20. Korpan Y.I., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Martelet C., El'skaya A.V., Gibson T.D., Soldatkin A.P. // Biosens. Bioelectron. 2000. V. 15. № 1–2. P. 77–83.
21. Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 547–552.
22. Muller E., Bringel F., Vuilleumier S. // Res. Microbiol. 2011. V. 162. № 9. P. 869–876.
23. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Leisinger T. // System. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 210–218.

Aerobic Methylobacteria as the Basis for a Biosensor for Dichloromethane Detection

Yu. V. Plekhanova, Yu. E. Firsova, N. V. Doronina, Yu. A. Trotsenko, and A. N. Reshetilov

*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Received May 15, 2012

Abstract—Cells of dichloromethane (DChM) bacteria-destroyers were immobilized by sorption on different types of membranes, which were fixed on the measuring surface of a pH-sensitive field transistor. The presence of DChM in the medium (0.6–8.8 mM) led to a change in the transistor's output signal, which was determined by the appearance of H⁺ ions in the medium due to DChM utilization by methylobacteria. Among four strains of methylobacteria—*Methylobacterium dichloromethanicum* DM4, *Methylobacterium extorquens* DM17, *Methylopila helvetica* DM6, and *Ancylobacter dichloromethanicus* DM16—the highest and most stable activity toward DChM degradation was observed in the strain *M. dichloromethanicum* DM4. Among 11 types of membranes for cell immobilization, Millipore nitrocellulose membranes and chromatographic fiber paper GF/A, which allow one to obtain stable biosensor signals for 2 weeks without a bioreceptor change, were chosen as optimal carriers.