

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ ГИБРИДНЫХ ПРОВОДЯЩИХ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БПК-БИОСЕНСОРА

Курбаналиева С.К. (Тульский государственный университет)
Научный руководитель – к.х.н., доц. каф. химии Арляпов В.А.

В работе исследована возможность использования проводящих гидрогелей на основе хитозана, ковалентно связанного с медиатором ферроценом и содержащего включенные углеродные нанотрубки, для иммобилизации бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302. Разработанный на основе иммобилизованных в созданную матрицу бактерий биосенсор обладает высокой чувствительностью, дает стабильный сигнал на протяжении длительного времени и был успешно использован для определения БПК образцов сточных и поверхностных вод.

Экспресс-оценка загрязнения объектов окружающей среды, в частности, определение органических примесей в поверхностных, грунтовых и сточных водах, является актуальной задачей. Важной характеристикой степени загрязненности окружающей среды, в частности воды, органическими веществами является индекс биохимического потребления кислорода (БПК). Существует несколько методов, обеспечивающих высокую точность измерения БПК, однако они находятся в невыгодном положении из-за высокой стоимости специализированного оборудования, необходимости обученного персонала и длительности анализов. Альтернативой стандартному методу являются медиаторные микробные биосенсоры. Их аналитический сигнал при измерении не зависит от концентрации растворенного кислорода, позволяя тем самым проводить анализ в анаэробных условиях.

Современным и эффективным подходом к созданию медиаторных биосенсоров является использование матриц, полученных на основе сшивки медиатора с полимерами, применяющиеся для иммобилизации микроорганизмов, как в работе Харьковской А.С. «Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила». Электропроводящие гели достаточно эффективны, обеспечивают стабильность сенсора, безреагентность анализа, и отсутствие вымывания медиатора в процессе работы, а также могут использоваться для создания биосенсоров на основе клеток микроорганизмов. Также, в работе HuJ. «Development of a mediator-type bioelectro chemical sensor based on polyurugoleim mobilized ferricyanide and microorganisms for biochemical oxygen demand fast detection» был разработан медиаторный биодатчик для измерения БПК в низких концентрациях на основе микроорганизмов *Bacillus subtilis*, иммобилизованных на трехмерном пористом композите графен-полипиррол, который был получен гидротермальным методом с последующей электрополимеризацией. Диапазон определяемых значений БПК составил 4-60 мг/дм³. В работе HuJ. «Mediated BOD Microsensor Based on Poly (NeutralRed) and Bacteria Modified Interdigitated Ultramicroelectrode Array» создан биоэлектрохимический датчик медиаторного типа с использованием полипиррола, иммобилизованного медиатора феррицианида и клеток *Pseudomonas* для быстрого определения биохимического потребления кислорода. Созданный датчик позволял давать стабильный сигнал (относительное стандартное отклонение – 2%) в широком диапазоне БПК₅ 5-100 мг/дм³.

В данной работе в качестве медиатора использовали ферроценкарбоксальдегид за счет наличия необходимых функциональных групп для сшивки. Выбор полимера хитозана для синтеза электропроводящих гидрогелей обусловлен высокой биосовместимостью и нетоксичностью соединения, что необходимо при использовании разработанной электропроводящей мембраны в качестве матрицы для иммобилизации микроорганизмов при создании биосенсоров. Для создания БПК-анализаторов благодаря способности окисления широкого спектра органических соединения были выбраны клетки бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302. Для улучшения характеристик биосенсора и облегчения

переноса электронов между медиатором и электродом в систему вводили одностенные углеродные нанотрубки.

Результаты определение содержания железа в синтезированной матрице на основе ферроцена, полученные методом атомно-абсорбционной спектроскопии показали, что массовая доля ферроцена в матрице ХИТ-ФЦ составила 6,2%. Так как сшивка хитозана в щелочной среде трудноосуществима из-за его малой растворимости, реакция нуклеофильного присоединения усложняется. Структура изучаемых проводящих гидрогелей была изучена методом сканирующей электронной микроскопии, где выявили, что полученные гидрогели имеют размер пор около 10 мкм, что позволяет эффективно иммобилизовать используемые микроорганизмы *P. yeii*. При использовании углеродных нанотрубок происходит их равномерное встраивание в структуру синтезированных матриц.

Электрохимические свойства полученных проводящих гелей исследовали методом циклической вольтамперометрии, с помощью чего было выявлено, что лимитирующей стадией процесса является поверхностная реакция. Также были найдены гетерогенная константа переноса электронов и константа взаимодействия бактерий *P. yeii* с ковалентно связанным медиатором, которые соответственно составили $0,25 \pm 0,01$ см/с и $2,89 \pm 0,03$ л/мг*с.

Для разработанной матрицы были определены такие характеристики биосенсора, как: долговременная и операционная стабильности, субстратная специфичность, нижняя граница определяемых содержаний для каждой матрицы. Было выявлено, что исследуемая проводящая система позволяет получать стабильный сигнал на протяжении длительного времени и является высоко чувствительной, так как нижняя граница составила $0,1 \text{ мг O}_2 / \text{дм}^3$.

Проведен анализ сточных вод с использованием биосенсора на основе матрицы хитозана, модифицированного ферроценом и УНТ. Полученные данные незначимо различаются с результатами стандартного метода. Что указывает на перспективу использования разработанного биосенсора в качестве альтернативы стандартному анализу.

По данной работе в результате исследований по разработке чувствительного анализатора качества воды был получен патент об «Устройстве для экспресс-анализа индекса биохимического потребления кислорода» бюл. №28 от 02.10.2019.

Измерения проводили с использованием гальванопотенциостата «IPC-Micro» («Вольта», Санкт-Петербург, Россия), интегрированного с ПК. В среднем нижняя граница варьирует в диапазоне 0,1-2 мг/л, а предел обнаружения – 5%. Время функционирования сенсора составляет более 30 дней, время единичного измерения от 3 до 5 минут. По сравнению с аналогичными моделями данный прибор экономичен и позволяет быстро получать стабильный сигнал. Вместе с гальванопотенциостатом используется электрохимическая ячейка с электродом сравнения и рабочим электродом. В общей сумме затраты на прибор составляют 35000 рублей.

Таким образом в данной работе был разработан электропроводящий гидрогель на основе хитозана, модифицированного ферроценкарбоксальдегидом и содержащего включенные углеродные нанотрубки. С использованием исследуемого биосенсора была проведена апробация на 8 образцах сточных вод по Тульской области, и было выявлено, что разработанный биосенсор является перспективным для использования в качестве альтернативы стандартному анализу.