

УДК 543.31

ИММОБИЛИЗАЦИЯ АССОЦИАЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-МОНИТОРИНГА ИНДЕКСА БПК И ТОКСИЧНОСТИ ПРИРОДНЫХ ВОД

Харькова А.С., к.х.н. ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»
Арляпов В.А., д.т.н., доц. ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»

Введение. Большинство стандартных методов оценки состояния качества природных сред не позволяют проводить экспресс-мониторинг, так как при анализе необходимо проводить инкубацию пробы, поэтому актуальны разработки устройств, позволяющих сократить время анализа. Данное исследование посвящено формированию биосенсора для экспресс-оценки двух показателей качества природных вод: индекса биохимического потребления кислорода (БПК) и токсичности. Изобретения и полезные модели для определения этих показателей являются модификациями стандартного метода или относятся к биосенсорам первого поколения, которые не позволяют проводить анализ в анаэробных условиях [1, 2]. Формирование аналитического сигнала за счет использования медиаторов электронного транспорта позволяет миниатюризировать систему анализа, но зачастую большинство описанных биосенсоров требуют дополнительное введение медиатора в систему, безреагентных моделей сравнительно мало [1, 2]. Целью данной работы является формирование безреагентного экспресс-устройства для мониторинга индекса БПК и токсичности. Для достижения поставленной цели необходимо провести выбор микроорганизмов, наиболее чувствительных к данным показателям, и обеспечить сопряжение биоматериала с преобразователем. Для формирования безреагентных медиаторных систем зарубежные и отечественные исследователи прибегают к применению композитных материалов на основе углеродных нанотрубок и редокс-активных полимеров [3]. Редокс-активные полимеры представляют собой как правило биосовместимый каркас ковалентносвязанный с медиаторами электронного транспорта. Фиксация медиатора с помощью редокс-активных полимеров является новым направлением развития медиаторных биосенсоров, добавление углеродных наноматериалов увеличивает проводимость, тем самым повышая аналитический сигнал и чувствительность анализа.

Основная часть. Для каждого показателя качества природных вод были сформированы ассоциации микроорганизмов. Наибольшим биотехнологическим потенциалом для оценки токсичности обладает ассоциация на основе бактерий *P. yeai* и дрожжей *S. cerevisiae*: комбинация указанных микроорганизмов позволяет получать стабильные (стандартное отклонение аналитического сигнала при 15 последовательных измерениях не превышает 7,5%) и воспроизводимые рецепторные элементы (стандартное отклонение аналитического сигнала пяти сформированных систем не превышает 5,6%) с высокой чувствительностью как к ионам тяжелых металлов, так и к органическому токсиканту – фенолу (при введении ионов меди $15,9 \text{ мг/дм}^3$ или фенола $1,6 \text{ мг/дм}^3$ активность рецепторного элемента снижается на 50%), высоким сроком эксплуатации (4 суток, системы для оценки токсичности зачастую одноразовые [2]), в течение которого соотношение жизнеспособных микроорганизмов в аналитической системе не отличается от первоначального.

Для определения БПК сформирована рецепторная система на основе дрожжей *O. polymorpha* и *B. adenivorans*. Благодаря высокой стабильности состава и чувствительности (диапазон определяемых концентраций БПК составляет 2-140 мг/дм^3) рецепторная система позволяет проводить анализ в пределах ПДК (4 мг/дм^3). Благодаря стабильному составу ассоциации в течение 15 суток, отсутствию конкуренции между микроорганизмами, рецепторный элемент на основе сформированной ассоциации более предпочтителен биорецептору на основе активного ила, так как упрощается процесс стандартизации при формировании аналитических систем.

Для формирования композитных материалов использовали углеродные нанотрубки, модифицированные карбоксильными и аминогруппами, методом циклической вольтамперометрии и импедансной спектроскопии исследовали электрохимические свойства композитов. При введении наноматериалов значение сопротивления переноса заряда по сравнению с системами на основе редокс-полимеров значительно уменьшается (на два порядка), что свидетельствует о повышении проводимости и достижении более высоких скоростей электронного переноса. Использование амминированных нанотрубок менее эффективно, вероятно, электроноакцепторные свойства карбоксильных групп наноматериала способствуют процессу передачи электронов. Для иммобилизации ассоциации дрожжей *O. polymorpha* и *B. adenivorans* выбраны композиты: модифицированный нейтральным красным хитозан и УНТ, а для иммобилизации ассоциации дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *P. yeii* - модифицированный нейтральным красным БСА и УНТ. Методом амперометрии выбрана рабочая концентрация нейтрального красного 5 ммоль/дм³ и рабочие количества биомассы 2,5 мг и 3,3 мг, углеродных нанотрубок 500 мкг и 375 мкг для формирования биорецепторов мониторинга БПК и токсичности. Нижняя граница определяемых концентраций для определения БПК составляет 0,6 мг/дм³, при этом время единичного замера 4-5 минут. Разработанный рецепторный элемент для оценки токсичности по чувствительности к ионам Ni²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ и к фенолу превосходит биосенсоры-аналоги [2] (концентрации токсикантов, вызывающие снижение активности рецепторного элемента на 50% составляют 9,4; 3,2; 7,6 и 7,5 мг/л, соответственно), при этом время единичного замера 10 минут. Рецепторные элементы прошли апробацию на образцах поверхностных вод Тульской области и городского округа Ступино, которая показала высокую корреляцию результатов анализа с результатами стандартных методов.

Выводы. Сформирован рецепторный элемент для оценки токсичности на основе ассоциации дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *P. yeii*, иммобилизованной в композит на основе модифицированного нейтральным красным БСА и УНТ, и рецепторный элемент на основе ассоциации дрожжей *O. polymorpha* и *B. adenivorans* иммобилизованной в композит на основе модифицированного нейтральным красным хитозана и УНТ, для оценки БПК. Высокие аналитические возможности рецепторных систем в перспективе позволяют их использовать в качестве прототипов экспресс-анализаторов поверхностных вод.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, номер гранта МК-4815.2022.1.4.

Список использованных источников:

1. Arlyapov V.A., Plekhanova Y.V., Kamanina O.A., Nakamura H., Reshetilov A.N. Microbial Biosensors for Rapid Determination of Biochemical Oxygen Demand: Approaches, Tendencies and Development Prospects // Biosensors. – 2022. – V. 12(10). – N. 842.
2. Fang D., Gao G., Yang Y., Wang Y., Gao L., Zhi J. Redox Mediator-Based Microbial Biosensors for Acute Water Toxicity Assessment: A Critical Review // ChemElectroChem. – 2020. – V. 7(12). – PP. 2513-2526.
3. Eivazzadeh-Keihan R., Noruzi E.B., Chidar E., Jafari M., Davoodi F., Kashtiaray A., Gorab M. G., Hashemi S.M., Javanshir S., Cohan R.A., Maleki A., Mahdavi M. Applications of carbon-based conductive nanomaterials in biosensors // Chemical Engineering Journal. – 2022. – V. 442(1). – N. 136183.