

На правах рукописи

Каро

ХАРЬКОВА АННА СЕРГЕЕВНА

**МИКРОБНЫЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
ЭКЗОГЕННЫХ МЕДИАТОРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА ДЛЯ
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва - 2019

Работа выполнена на кафедре химии естественнонаучного института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет».

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент
кафедры химии Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Тульский
государственный университет»

Арляпов Вячеслав Алексеевич

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор, ведущий
научный сотрудник кафедры химической
энзимологии Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова»

Еремин Сергей Александрович

доктор химических наук, профессор, заведующий
кафедрой физической химии Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Саратовский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Казаринов Иван Алексеевич

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет»

Защита диссертации состоится «21» октября 2019 года в 15 ч 00 мин на заседании диссертационного совета Д 212.131.06 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» по адресу 119571, Москва, проспект Вернадского, д.86, ауд. М-119.

С авторефератом диссертации можно ознакомиться на интернет-сайтах ВАК РФ <http://vak.ed.gov.ru> и <https://mirea.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» по адресу: 119454, Москва, проспект Вернадского, д.78 и на интернет сайте <https://mirea.ru>.

Автореферат разослан « »

2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.х.н., доц.



В.С.Лебедева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Последнее десятилетие отмечено интенсивным использованием микроорганизмов для количественного определения показателей качества воды (индекса биохимического потребления кислорода, индекса токсичности). В основе функционирования большинства биоанализаторов лежат ферментативные реакции микроорганизмов с анализируемыми компонентами. Одновременно происходит потребление кислорода клетками, что фиксируется физико-химическими преобразователями (амперометрический или оптический кислородный датчик). Скорость потребления кислорода микроорганизмами является аналитическим сигналом для определения концентрации аналита по методу градуировочного графика. Необходимо учитывать, что концентрация растворенного кислорода в кювете зависит от поступления кислорода из атмосферы, автопотребления кислорода кислородным датчиком (расход кислорода на электрохимическое восстановление в единицу времени) и поглощение кислорода компонентами датчика (например, поступление кислорода в рабочий электролит кислородного электрода) учет данных процессов позволяет снизить погрешность измерения потребления кислорода живыми системами. Главным недостатком биосенсоров, основанных на фиксации потребления кислорода биокатализатором, является невозможность использования данных анализаторов в анаэробных условиях, например, для автоматического контроля качества анаэробной очистки по индексу биохимического потребления кислорода.

Альтернативой могут стать медиаторные биосенсоры. В устройствах данного типа в систему «аналит-микроорганизм» вводится специальное соединение – медиатор электронного транспорта, обладающий окислительно-восстановительными свойствами и способный восстанавливаться под действием микроорганизмов. Количество восстановленного клетками медиатора пропорционально метаболической активности биоматериала, что можно зафиксировать с помощью физико-химических преобразователей, например, если к электрохимической ячейке приложить внешний потенциал, равный окислительно-восстановительному потенциалу используемого медиатора, то в результате последовательных окислительно-восстановительных реакций в системе возникает ток, изменение которого пропорционально концентрации определяемого вещества или смеси.

Таким образом, формирование аналитического сигнала носит комплексный характер и основано на биохимических и электрохимических процессах, происходящих в системе «аналит-микроорганизм-медиатор-электрод». На сегодняшний день формирование систем «микроорганизм-медиатор-электрод» носит или эмпирический характер, или основано на моделировании функционирования медиаторных биосенсоров в рамках двухсубстратной

ферментативной реакции и определении «индекса эффективности», что позволяет количественно сравнить эффективность медиаторов электронного транспорта. Однако, рассматривая систему «электрод – медиатор – микроорганизмы» в целом, не углубляясь в происходящие процессы, выявить причину низких характеристик биосенсора становится труднорешаемой задачей. Более универсальным подходом создания медиаторных биосенсоров может стать учет количественных характеристик процессов, происходящих в данной системе, что позволяет выбрать более эффективный медиатор для используемого микроорганизма или выявить причину низких характеристик биосенсора и пути ее устранения.

Цель работы состояла в разработке биоэлектрохимических основ формирования рецепторных элементов микробных медиаторных биосенсоров и создание на этой базе макета биосенсора для экологического мониторинга.

Задачи исследования:

1. Выбрать биоматериал для формирования медиаторного биоэлектрода БПК-биосенсора среди микроорганизмов ВКМ, естественной популяции активного ила, а также индивидуальных бактерий, выделенных из данной популяции. Оценить долговременную стабильность и чувствительность сформированных биоэлектродов к стандартному раствору глюкозо-глутаматной смеси.

2. Выявить наиболее эффективный медиатор электронного транспорта для используемых микроорганизмов на основе исследования процессов переноса электронов в системе «субстрат-микроорганизм-медиатор-электрод». По константам скорости взаимодействия медиатора и биоматериала, а также константам гетерогенного переноса электронов с медиатора на электрод сформировать наиболее перспективные системы «микроорганизм-медиатор» для создания биосенсора.

3. Изучить возможность использования двухмедиаторных систем с целью улучшения параметров работы биосенсора за счет увеличения эффективности переноса электронов от биоматериала на электрод.

4. Сформировать лабораторные модели микробных медиаторных биосенсоров для экологического мониторинга, установить рабочие параметры использования медиаторных биоэлектродов и определить характеристики созданных биосенсорных систем.

5. Апробировать разработанные биосенсоры для анализа индекса БПК-проб воды различного происхождения и оценки индекса токсичности парфюмерно-косметической продукции.

Научная новизна.

Впервые на основе констант взаимодействия микроорганизмов с медиатором и констант гетерогенного переноса электронов на угольно-пастовый электрод выявлены

наиболее эффективные медиаторы для бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 и дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482. Эффективность выбранных медиаторов подтверждена характеристиками биосенсоров.

Впервые на основе полученных констант взаимодействия дрожжей *D. hansenii* с медиаторами электронного транспорта, гетерогенных констант переноса электронов на электрод, а также констант скорости взаимодействия ферроцена и медиаторов феназинового ряда предложен подход к формированию двухмедиаторных систем, позволяющий увеличить эффективность переноса электронного транспорта, что положительно влияет на характеристики биосенсора.

Впервые показано, что бактерии активного ила *Paracoccus yeii* способны к окислению широкого спектра органических веществ и чувствительны к основным модельным токсикантам, что позволяет использовать данные микроорганизмы при создании универсальных биорецепторных систем для определения биохимического потребления кислорода и индекса токсичности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Используемый подход выбора медиатора по константам скорости взаимодействия с биоматериалом и электродом является универсальным и может использоваться при разработке биосенсоров для мониторинга других показателей.

Разработанные электрохимические системы могут использоваться в дальнейшем для создания прототипа медиаторного биосенсора для определения токсичности и индекса БПК, чувствительность которого не будет уступать известным аналогам. Работа вносит практический вклад в разработку микробных биосенсоров и позволяет в перспективе производить недорогие и эффективные экспресс-анализаторы качества воды.

В полученном в результате работы патенте на полезную модель № 164144 «Устройство для экспресс-мониторинга индекса биохимического потребления кислорода» от 21.10.2015 (бюллетень № 23) отражено повышение технических характеристик за счет использования двухмедиаторных систем.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Экспериментальные результаты по определению констант скорости переноса заряда для различных медиаторов электронного транспорта на угольно-пастовый электрод и констант скорости взаимодействия медиаторов электронного транспорта с микроорганизмами.

2. Установленные закономерности влияния количественных характеристик медиаторного переноса электронов на основные параметры работы биосенсора.

3. Результаты определения БПК₅ проб природной и сточной воды, а также индекса токсичности парфюмерно-косметической продукции с помощью разработанных биосенсоров.

Степень достоверности и апробация работы. Работа была отмечена *II премией и медалью VIII Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»* (Москва, 2015), *золотой медалью* выставки 20-го Международного салона изобретений и инновационных технологий «Архимед» (Москва, 2017); *дипломом победителя* Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология» (Тула, 2014). Основные положения диссертационной работы представлялись на IX и XI Международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017-2019 гг.); I Международном форуме молодых ученых «наука будущего – наука молодых» (Севастополь, 2015 (*работа отмечена дипломом финалиста*)); Международной научно-технической конференции «Системы контроля окружающей среды» (Севастополь, 2016 г.); Всероссийских конференциях с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология» (Тула, 2013-2018), 22-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, из которых 3 индексируются в базах Web of Science; 7 сообщений в прочих научных журналах, тезисов и материалов конференций.

Личный вклад автора состоял в непосредственной постановке задач исследования, в планировании и получении основных экспериментальных результатов направленных на разработку биосенсоров для экологического мониторинга. Лично автором были выполнены исследования кинетики переноса электронов на каждой отдельной стадии медиаторного биоэлектрокатализа в системе «микроорганизм – медиатор – угольно-пастовый электрод», анализ и систематизация полученных результатов. Харьков А.С. участвовала в проведении совместных экспериментов, в частности, в исследовании по идентификации выделенных микроорганизмов. Полученные, проанализированные и систематизированные результаты позволили автору совместно с научным руководителем сформировать биоэлектрохимические основы формирования рецепторных элементов лабораторных моделей БПК-биосенсора и биосенсора для определения индекса токсичности.

Место проведения работы. Работа выполнялась на кафедре химии Естественнонаучного института ФГБОУ ВО Тульского государственного университета при поддержке гранта РФФИ № 16-48-710959 р_а «Изучение закономерностей функционирования печатных электродов, модифицированных графитовыми наноматериалами и медиаторами электронного транспорта» (2015-

2017), Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК «Разработка биосенсоров на основе электродов, модифицированных углеродными наноматериалами, для контроля биотехнологических процессов, экологического мониторинга и клинической диагностики» (2016-2017 г.). Автор работы является победителем конкурса Программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса», реализуемой Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере договор №4887ГУ1/2014 и №9391 ГУ2/2015 «Разработка БПК-биосенсора на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* и бимедиаторной системы ферроцен – метиленовый синий».

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка публикаций, списка литературы, включающего 191 источник. Работа содержит 47 рисунков и 20 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выбор микроорганизмов для создания медиаторных биоэлектродов

Основания для выбора биоматериала при создании тест-систем зависят от измеряемого показателя. В случае экспресс оценки БПК₅ необходимо, чтобы используемые микроорганизмы потребляли широкий спектр органических соединений. В соответствии с данным критерием, дрожжи *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 являлись перспективным биоматериалом для создания БПК-биосенсоров, основанных на регистрации потребления кислорода микроорганизмами – биосенсоров первого поколения. Бактерии *Gluconobacter oxydans* subsp *industrius* ВКМ В-1280 и *Escherichia coli* К802 метаболизируют спирты и углеводы, на основе данных микроорганизмов разрабатывают медиаторные БПК-анализаторы. Активный ил является инокулятом в стандартном методе анализа; обеспечивая высокую долю биodeградации органических веществ, он широко используется для создания БПК-анализаторов. Для проведения исследований активный ил был предоставлен АО «ТулаГорВодоканал». Следует отметить, что из-за постоянно меняющегося микробного состава существенно усложняется процесс стандартизации биоэлектродов. Для решения данной проблемы из активного ила выделяли индивидуальные культуры микроорганизмов SPB1, SPB2 и SPB3 и использовали для создания биорецепторного элемента БПК-биосенсора. У штаммов, способных к осуществлению медиаторного переноса, были определены нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК. Уровни сходства выделенных штаммов с типовыми штаммами известных видов составили 99.79% (для SPB3 – *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T), 100% (для SPB2 –

Bacillus proteolyticus TD42^T) и 100% (для SPB1 – *Paracoccus yeii* ВАА-599^T). Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рНК депонированы в международные базы данных DDBJ/ENA/GenBank под номерами MG280784, MG280785 и MG280783, соответственно.

Используемые микроорганизмы должны обеспечивать высокую чувствительность определения БПК₅ и высокий срок эксплуатации биоэлектродов. В качестве основы биоэлектродов были использованы угольно-пастовые электроды, они просты в изготовлении и удобны при эксплуатации: их можно модифицировать органическими и неорганическими соединениями и многократно регенерировать, что обусловило выбор данных электродов в качестве рабочих. Формирование рабочих медиаторных электродов осуществляли заполнением пластиковой трубки площадью 6 мм² пастой на основе 100 мг графитовой пудры и 40 мкл минерального масла.

Оценку чувствительности проводили по значению нижней границы определяемого диапазона БПК₅. Биоэлектроды калибровали модельным раствором, суммарно содержащим 300 мг/дм³ глюкозы и глутаминовой кислоты (1:1). В соответствии с ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97 значение БПК₅ данного раствора составляет 205 мгО₂/дм³. Рабочий потенциал биосенсорных измерений составил 250 мВ, данное значение наиболее часто используется при работе с медиатором ферроценом. Выбор ферроцена в качестве модельного медиатора обусловлено тем, что электрохимическая реакция с его участием не зависит от рН среды, что позволило использовать оптимальный рН рабочего электролита для соответствующего микроорганизма. Кроме того, малая растворимость ферроцена в воде позволяет модифицировать графитовую пасту, вводя в ее состав раствор медиатора требуемой концентрации в ацетоне, иммобилизуя, таким образом, медиатор на поверхности рабочего электрода.

Следует отметить, что дрожжи *O. polymorpha* и бактерии *E. coli* не давали сигнал при введении раствора глутаминовой кислоты, поэтому данные микроорганизмы не подходят для создания БПК-анализатора. Для остальных систем было найдено значение нижней границы определяемых концентраций (табл. 1) – минимальная величина БПК₅, которую можно зарегистрировать при этом относительное стандартное отклонение аналитического сигнала не превышает 30%. Срок эксплуатации оценивали по значению долговременной стабильности (табл. 1) – времени, в течение которого аналитический сигнал составляет не менее 50% от первоначальной величины.

Таблица 1. Характеристики биоэлектродов.

Биоматериал	Нижняя граница определяемых значений БПК ₅ , мгО ₂ /дм ³	Долговременная стабильность, сутки
<i>D. hansenii</i>	25	39
<i>G. oxydans</i>	10	30
Активный ил	0,01	-*

Таблица 1 (Продолжение). Характеристики биоэлектродов.

Биоматериал	Нижняя граница определяемых значений БПК ₅ , мгО ₂ /дм ³	Долговременная стабильность, сутки
<i>P. yeii</i>	1,3	22
<i>B. proteolyticus</i>	1,4	9
<i>P. veronii</i>	1,9	14

*В ходе функционирования биоэлектродов на основе активного ила характер окисления различных субстратов резко менялся, поэтому время стабильной работы сенсора установить не удалось.

Биоэлектроды на основе популяции активного ила характеризуются наибольшей чувствительностью при оценке БПК₅ (нижняя граница 0,01 мгО₂/дм³). Следует отметить, что нижняя граница определяемых значений БПК₅ аналогов более 5 мгО₂/дм³, не позволяя проводить анализ проб, значение которых ниже предельно-допустимых. Несмотря на высокие показатели чувствительности биоэлектроды на основе активного ила использовать нецелесообразно, так как из-за постоянно меняющегося микробного состава популяции данные электроды характеризовались низкой стабильностью (табл. 1).

Биосенсоры на основе индивидуальных бактерий, выделенных из активного ила, характеризуются более высокой стабильностью по сравнению с использованием целой популяции. Среди микроорганизмов, выделенных из активного ила, бактерии *P. yeii* показали максимальную долговременную стабильностью и наименьшую нижнюю границу определяемых концентраций. Полученные результаты обусловили выбор данного штамма для дальнейшей работы. Так как данный штамм представляет интерес для дальнейших научных исследований, он был включен в открытый фонд ВКМ ИБФМ РАН как *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302.

Несмотря на высокую нижнюю границу определяемых концентраций биоэлектрода на основе *D. hansenii*, данные микроорганизмы являются перспективным биоматериалом для создания БПК-биосенсоров, так как характеризуются широкой субстратной специфичностью и высокой долговременной стабильностью. Однако для данного биоматериала не все медиаторы являются эффективными акцепторами электронов [68]. Зачастую медиаторный перенос от дрожжевых клеток на электрод затруднен, так как для данного биоматериала не все медиаторы являются эффективными акцепторами электронов, поэтому выбор медиаторов или медиаторных систем, обладающих высокими константами взаимодействия с данным микроорганизмом, позволит повысить чувствительность разрабатываемого биосенсора. Таким образом, на основе полученных результатов, бактерии *P. yeii* и дрожжи *D. hansenii* были выбраны как наиболее перспективные микроорганизмы для медиаторных БПК-биосенсоров.

2. Оценка возможности использования различных соединений как медиаторов электронного транспорта для бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii*

Медиаторный перенос электронов с участием целых клеток микроорганизмов состоит из нескольких стадий: окисление биоматериалом исследуемого анализа, восстановление медиатора биоматериалом и электродная реакция с участием медиатора. Для того чтобы медиаторный электрокатализ был наиболее эффективен необходимо, чтобы последние две стадии были наиболее быстрыми, тогда аналитический сигнал будет определяться стадией взаимодействия биоматериала с определяемым веществом. Оценку эффективности медиаторов было предложено проводить на основе констант взаимодействия биоматериала и медиатора, а также константы гетерогенного переноса электронов.

Определение константы взаимодействия биоматериала и медиатора

В качестве медиаторов электронного транспорта для бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii* использовали соединения, описанные во второй главе, все исследуемых медиаторы удовлетворяют всем требованиям предъявляемым к медиаторам электронного транспорта. Кроме того, данные соединения зачастую используются при разработке проводящих гелей, выявление эффективного акцептора электронов для выбранных микроорганизмов сформирует основу для создания безреагентных биосенсоров. Для определения константы взаимодействия медиаторов электронного транспорта с бактериями *P. yeii* и дрожжами *D. hansenii* исследовали кинетику восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола, метиленового синего, тионина и нейтрального красного выбранными микроорганизмами в анаэробных условиях для исключения влияния конкуренции медиатора и растворенного кислорода как акцепторов электронов. Начальную скорость восстановления медиатора при введении субстрата определяли по уменьшению оптической плотности при длине волны, соответствующей максимуму поглощения исследуемого медиатора.

Для описания медиаторного переноса использовали механизм «пинг-понг», где биохимические реакции в системе «субстрат-микроорганизм-медиатор» протекают согласно схемам 1-2.



Уравнение скорости (3) ферментативных реакций, протекающих в соответствие со схемами 1-2, при избытке субстрата преобразуется в уравнение типа Михаэлиса-Ментен для медиатора, а при концентрации медиатора $[M] \ll K_M$ данное уравнение преобразуется в линейный вид (4).

$$V = \frac{\frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} [E]_0}{1 + \frac{k_4}{k_2 + k_4} \frac{1}{k_{-1} k_2} \frac{1}{[S]} + \frac{k_2}{k_2 + k_4} \frac{1}{k_{-3} + k_4} \frac{1}{[M]}} = \frac{k_{kat} [E]_0}{1 + K_S \frac{1}{[S]} + K_M \frac{1}{[M]}} \quad (3)$$

$$V \xrightarrow{K_S \ll 1} \frac{k_{kat} [E]_0 [M]}{[M] + K_M} \xrightarrow{[M] \ll K_M} \frac{k_{kat}}{K_M} [E]_0 [M] = \frac{k_2 k_4}{k_{-3} + k_4} [E]_0 [M] = k_{взаим} [E]_0 [M] \quad (4)$$

где [S] и [M] – концентрация субстрата и медиатора соответственно;

[E] – концентрация ферментного комплекса *in vivo*;

$k_{кат}$ – каталитическая константа реакции;

K_S и K_M – константы Михаэлиса для субстрата и медиатора, соответственно.

Для определения константы скорости взаимодействия медиатора с клетками ($k_{взаим}$) регистрировали с помощью спектрофотометра СФ-104 (Аквилон, Россия) зависимости скорости восстановления медиаторов микроорганизмами от начальной концентрации медиатора (Рис. 1) и в соответствии с уравнением 3 проводили аппроксимацию гиперболической функцией для нахождения K_M . При концентрации медиатора $[M] \ll K_M$ зависимость линейна, а тангенс угла наклона равен $k_{взаим}[E]_0$. Для нахождения константы $k_{взаим}$, полученное произведение делили на титр клеток (табл. 2).

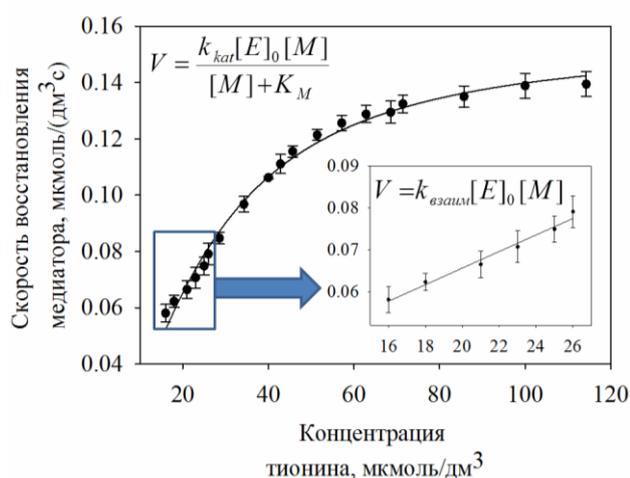


Рис. 1. Зависимость скорости восстановления тионина бактериями *P. yeii* от начальной концентрации медиатора.

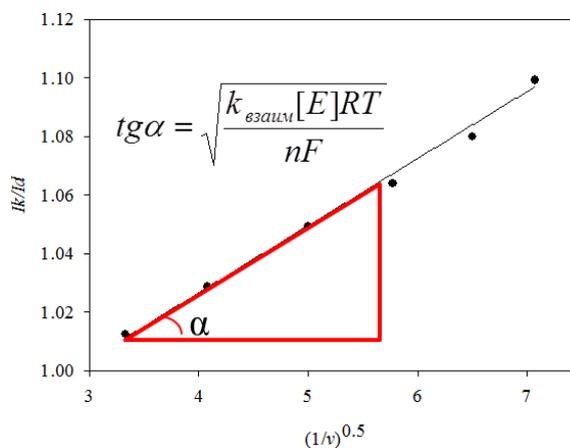


Рис. 2. Зависимость отношения предельных токов в присутствии и в отсутствие субстрата от $(1/v)^{0.5}$ в системе «дрожжи *D. hansenii* – медиатор ферроценацетонитрил».

Константы взаимодействия медиатора и биоматериала были найдены методом циклической вольтамперометрии, используя вольтамперометрический анализатор Экотест-ВА (Эконикс-Эксперт, Россия). При условии избытка субстрата и низких концентрациях медиатора константа взаимодействия медиатора с биоматериалом может быть вычислена с использованием уравнение Николсона и Шайна (5):

$$\frac{I_k}{I_d} = \sqrt{\frac{k_{\text{взаим}}[E]RT}{nFv}} \quad (5)$$

Где: I_k – предельный ток в присутствии субстрата, I_d – предельный ток в отсутствие субстрата, $k_{\text{взаим}}$ – константа скорости взаимодействия медиатора и биоматериала.

Для определения констант скорости были получены зависимости отношения предельных анодных токов в присутствии и в отсутствие субстрата (I_k/I_d) от $1/v^{1/2}$ и по тангенсу угла наклона линейной регрессии (Рис. 2) находили $k_{\text{взаим}}$ (табл. 2).

Таблица 2. Константы взаимодействия бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii* с медиаторами.

Медиатор	Константа взаимодействия $k_{\text{взаим}}$, $\text{дм}^3/(\text{г}\cdot\text{с})$	
	Дрожжи <i>D. hansenii</i>	Бактерии <i>P. yeii</i>
Метиленовый синий	0,006±0,002* (0,007±0,001)**	0,021±0,001 (0,023±0,001)
2,6-Дихлорфенолиндофенол	0,008±0,003 (0,008±0,002)	0,013±0,002 (0,015±0,005)
Тионин	0,015±0,005 (0,014±0,004)	0,013±0,004 (0,015±0,003)
Нейтральный красный	0,019±0,005 (0,018±0,003)	0,013±0,003 (0,012±0,001)
Гексацианоферрат (III) калия	0,014±0,003	0,019±0,003
Ферроцен	0,013±0,003	0,023±0,001
1,1'-Диметилферроцен	0,0079±0,0005	0,0038±0,0009
Ферроценкарбоксальдегид	0,0037±0,0001	0,007±0,001
Ферроценацетонитрил	0,0006±0,0002	0,0014±0,0001

*Константы, найденные электрохимическим методом.

**В скобках указаны константы, найденные спектрофотометрическим методом.

Следует отметить, что вне зависимости от метода анализа, полученные константы различаются статистически незначимо. Для дрожжей *D. hansenii* наиболее перспективным медиатором является нейтральный красный. Для бактерий *P. yeii* можно выделить метиленовый синий и ферроцен как наиболее эффективные медиаторы. В целом можно отметить, что производные ферроцена медленнее взаимодействуют с биоматериалом, что вероятно связано с более низкой диффузионной подвижностью из-за модификации пасты. Следует учитывать и тот факт, что медиаторы феназинового ряда обладают способностью проникать в клетку, что может обуславливать высокие скорости взаимодействия с дрожжевыми клетками данных медиаторов.

Определение гетерогенной константы переноса электронов на электрод

Константы гетерогенного переноса электрона на электрод для каждого медиатора были найдены методом циклической вольтамперометрии. Исследовали

зависимости предельного анодного тока (I_p) от скорости развертки потенциала (v). Если линейная зависимость достигалась в координатах I_p от v (уравнение 7), то дальнейший расчет гетерогенных констант проводили с использованием математической модели Лавирона (уравнение 9), а если в координатах I_p от $v^{1/2}$ (уравнение 6) - Николсона (уравнение 8).

Модель Николсона	Модель Лавирона
$I_p = 0,496 \sqrt{-\alpha n F S C_o} \sqrt{\frac{D F v}{RT}}$ (6)	$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v S \Gamma_0$ (7)
$k_s = \psi \pi \sqrt{\frac{n F v}{RT}} D$ (8)	$\log(k_s) = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log\left(\frac{RT}{n F v}\right) - \frac{\alpha(1 - \alpha) n F \Delta E}{2,3RT}$ (9)

n - число электронов; F - число Фарадея; S - рабочая площадь поверхности электрода; D - коэффициент диффузии медиатора; R - универсальная газовая постоянная; v - скорость развёртки; C_o - концентрация медиатора в растворе; T - температура; α - значение коэффициента переноса; Γ_0 - поверхностная концентрация электроактивного вещества на электроде; ψ - параметр, влияющий на разность потенциалов пиков (ΔE); I_d - предельный ток.

Обе модели применимы как для обратимых, так и для необратимых систем. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Гетерогенные константы переноса электронов на угольно-пастовый электрод (скорость развертки 100 мВ/с).

Медиатор	Константа гетерогенного переноса электронов, ($\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$)
Метиленовый синий	0,025±0,009
Гексацианоферрат (III) калия	0,0067±0,0009
Тионин	0,022±0,005
2,6-Дихлорфенолиндофенол	0,069±0,004
Нейтральный красный	0,017±0,005
Ферроцен	0,4±0,1
Ферроненацетонитрил	0,14±0,05
Ферроценкарбоксальдегид	0,03±0,01
1,1'-Диметимферроцен	0,07±0,01

В целом можно отметить, что для ферроцена и его производных константы гетерогенного переноса выше, чем для других медиаторов. Самая высокая скорость электронного обмена достигается в системе «ферроцен-угольно-пастовый электрод». Вероятно, это связано с лимитирующей стадией передачи электронов: в первом случае благодаря адсорбции электроактивные молекулы производных ферроцена находятся вблизи поверхности электрода; в остальных системах на перенос электронов существенно влияние оказывает диффузионная подвижность медиаторов, чем она выше, тем выше константа гетерогенного переноса электронов.

На основе констант взаимодействия медиатора и биоматериала (табл. 2) и констант гетерогенного переноса электронов (табл. 3) для бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii* были выбраны два медиатора электронного транспорта, обеспечивающие высокую скорость взаимодействия с биоматериалом и высокую скорость переноса электронов на электрод. Высокая скорость реакций с участием медиатора электронного транспорта является необходимым критерием выбора медиатора, если данное условие выполняется, то аналитический сигнал будет определяться биохимической реакцией между используемым микроорганизмом и определяемым соединением. Следует отметить, что существуют другие способы оценки эффективности медиаторов электронного транспорта, которые находят широкое применение при разработке биосенсоров и биотопливных элементов, однако обе работы не учитывают скорость электрохимической стадии передачи электронов с молекул медиатора на электрод. Предложенный подход является более универсальным и позволяет учесть как биохимический аспект взаимодействия медиатора с биоматериалом, так и электрохимический процесс переноса электронов.

Таким образом, было сформировано четыре системы «медиатор-микроорганизм» для создания амперометрического медиаторного БПК-биосенсора: «ферроцен-бактерии *P. yeii*» и «ферроцен-дрожжи *D. hansenii*», выбраны на основе максимальной константы гетерогенного переноса электронов на угольно-пастовый электрод. Выбор системы «нейтральный красный-дрожжи *D. hansenii*» и «метиленовый синий-бактерии *P. yeii*» обусловлен высокими константами взаимодействия медиаторов и биоматериалом.

3. Выбор рабочих параметров медиаторных биосенсоров и формирование БПК-анализаторов

Чтобы зарегистрировать изменение стационарного тока, связанного с взаимодействием биоматериала и анализируемого вещества требуется создать градиент потенциалов, поэтому к электроду необходимо приложить потенциал, величина которого составляет значение не менее окислительно-восстановительного потенциала используемого медиатора. Рабочие значения определяли исходя из результатов циклических вольтамперограмм как потенциал анодного пика: ферроцен – 250 мВ, нейтральный красный – 335 мВ, метиленовый синий – 401 мВ. При выбранных параметрах проводили дальнейшее исследование возможности использования систем «микроорганизм-медиатор» как основы формирования амперометрических медиаторных биосенсоров.

При формировании биосенсора выбирали рабочие параметры создания биоэлектродов (концентрация медиатора и значение удельной плотности биомассы на электроде), при которых будет достигаться максимальный генерируемый аналитический сигнал – ответ сенсора. Для этого получали зависимости ответов

биосенсоров от исследуемого рабочего параметра. Установлено, что медиаторные биосенсоры на основе дрожжей *D. hansenii* и бактерий *P. yeii* обладают максимальным аналитическим сигналом, когда удельная плотность биомассы на электроде составляет 0,15 мг/мм²; при 10% содержании ферроцена от общей массы графитовой пудры вне зависимости от типа микроорганизмов; концентрация нейтрального красного в кювете должна быть порядка 0,2 ммоль/дм³ (при использовании дрожжей *D. hansenii*), а метиленового синего – порядка 0,07 ммоль/дм³ (при использовании бактерий *P. yeii*). Дальнейшие исследования проводили при указанных параметрах. Для биосенсоров на основе выбранных систем «микроорганизм-медиатор» были получены зависимости аналитического сигнала от величины БПК₅ модельного раствора глюкозо-глутаматной смеси (рис. 3) и определены основные характеристики микробных медиаторных БПК-биосенсоров (таблица 4).

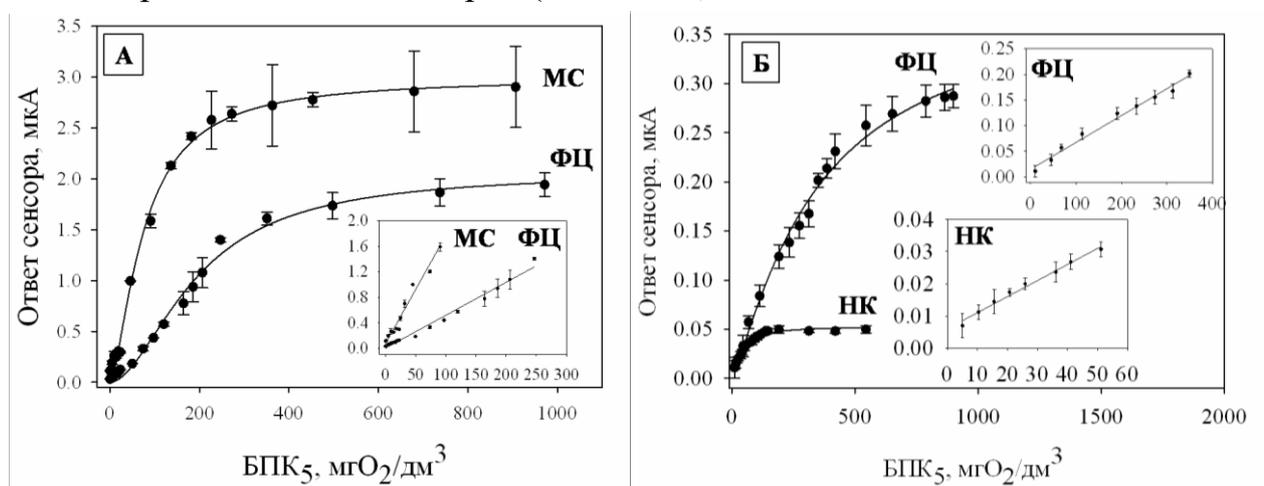


Рис. 3. Градуировочные зависимости ответа микробных биосенсоров от БПК₅ в модельном растворе. В качестве биоматериала использованы: А – бактерии *P. yeii*, Б – дрожжи *D. hansenii*. Медиаторы электронного транспорта: МС – метиленовый синий, ФЦ – ферроцен, НК – нейтральный красный.

Таблица 4. Микробные медиаторные БПК-биосенсоры на основе бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii*.

Характеристика	Биоматериал			
	Бактерии <i>P. yeii</i>		Дрожжи <i>D. hansenii</i>	
	МС	ФЦ	НК	ФЦ
Длительность единичного измерения, мин	7 - 12	4 - 6	5 - 10	8 - 20
Долговременная стабильность, сутки	14	22	16	39
Относительное стандартное отклонение 15 измерений, %	2,4	2,9	2	2,2
Линейный диапазон БПК ₅ , мг/дм ³	1,4-90	1,3-200	5,1-53	25,2-320

Разработанные медиаторные биосенсоры позволяют получать стабильный сигнал – относительное стандартное отклонение не превышает 3% (табл. 4). Для анализа природных вод, где значение БПК₅ может быть довольно низким и составлять ~2 мг/дм³ (чистые природные воды), медиаторные биосенсоры на основе дрожжей *D. hansenii* малопригодны, т.к. биосенсоры на их основе обладают высокой нижней границей определяемых концентраций. Так как параметр БПК₅ является интегральным, биорецепторный элемент должен обладать высокой субстратной специфичностью, поэтому был оценен характер окисления различных субстратов разработанными системами (Рис. 4).

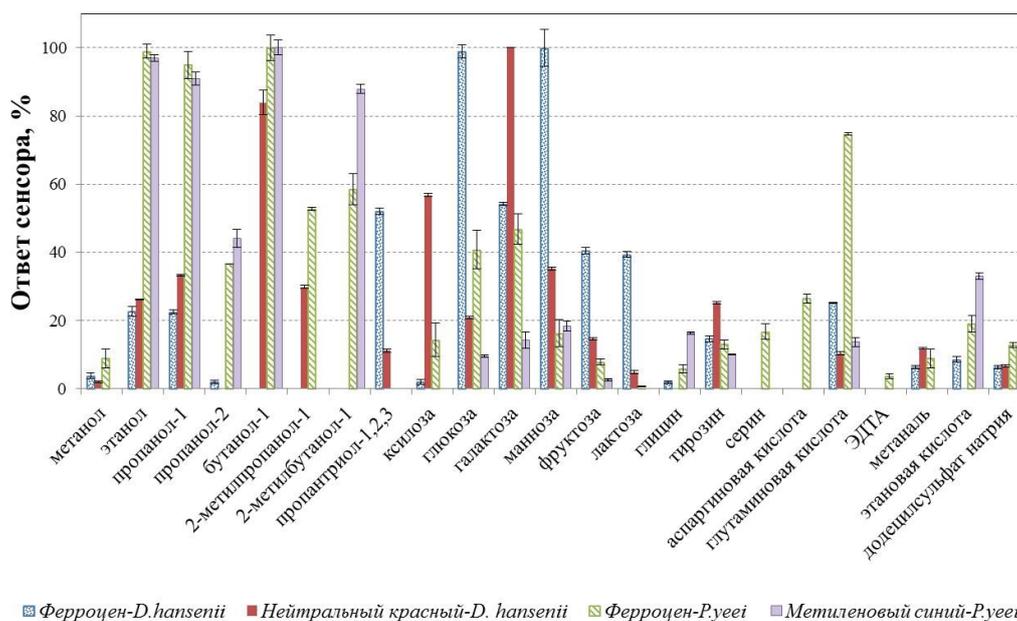


Рис. 4. Селективность биоэлектродов на основе систем «бактерии *P. yeii* – ферроцен», «бактерии *P. yeii* – метиленовый синий», «дрожжи *D. hansenii* – ферроцен» и «дрожжи *D. hansenii* – нейтральный красный».

Узкая субстратная специфичность дрожжей *D. hansenii* в составе медиаторного биосенсора по сравнению с аналогом – биосенсором первого поколения, вероятно связана с низкой эффективностью медиаторного переноса электронов от данных дрожжей на электрод. Данный вывод косвенно подтверждает более широкую субстратную специфичность медиаторных биоэлектродов на основе бактерий *P. yeii* относительно биоэлектродов на основе дрожжей *D. hansenii* (Рис. 4), что вероятно обусловлено большей доступностью ферментных систем бактерий для медиатора электронного транспорта.

В целом наиболее пригоден для создания БПК-биосенсора биорецепторный элемент на основе бактерий *P. yeii* и медиатора ферроцена (табл. 4 и рис. 4). Использование дрожжей *D. hansenii* ограничено низкими параметрами биосенсора. При разработке биосенсоров для определения интегральных показателей на основе дрожжевых клеток различные исследователи используют двухмедиаторные системы с целью увеличения эффективности переноса электронов от эукариотических клеток на

электрод. Следует отметить, что для прокариот данный подход практически не применяется или показывает свою неэффективность. Ферментные системы бактерий зачастую доступны для иммобилизованных медиаторов и введение второго медиатора не приводит к существенным изменениям. Исходя из выше изложенного, перспективным направлением использования дрожжей *D. hansenii* в составе медиаторных биосенсоров является формирование двухмедиаторных систем для данных микроорганизмов.

4. Формирование двухмедиаторных систем для увеличения эффективности медиаторного переноса электронов

При формировании двухмедиаторной системы необходимо, чтобы один из медиаторов быстро взаимодействовал с микроорганизмом, а второй быстро передавал электроны на электрод. Исходя из полученных констант гетерогенного переноса электронов (табл. 3), ферроцен превосходит другие используемые медиаторы по скорости передачи электрона на угольно-пастовый электрод, поэтому он был выбран в качестве одного из компонентов системы. Выбор второго медиатора на основе констант взаимодействия с исследуемыми эукариотами сделать сложно, так как различие в константах взаимодействия ферроцена и других медиаторов не превышает 1,5 раз. Для формирования двухмедиаторных систем совместно с ферроценом использовали нейтральный красный, тионин и метиленовый синий, так как они способны проникать в живые организмы. Предполагаемый механизм переноса электронов представлен на рис. 5.

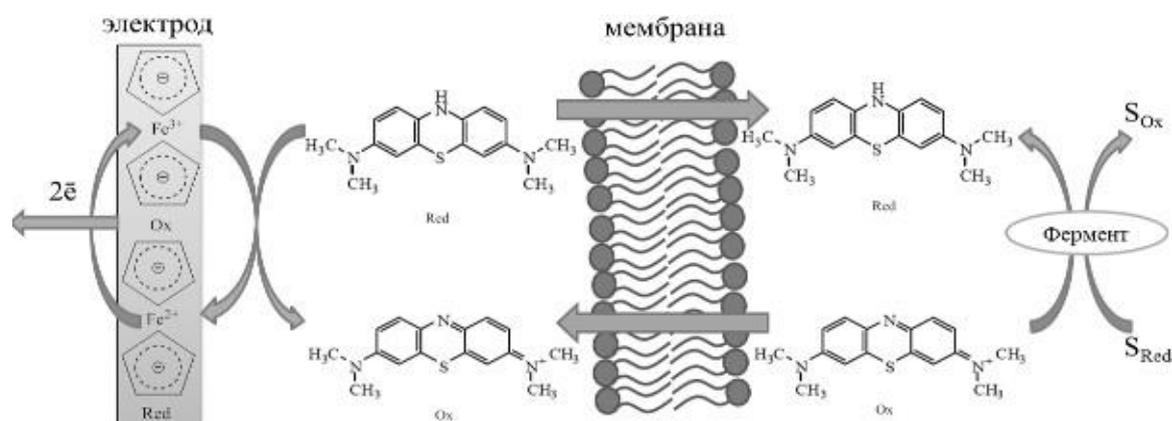


Рис. 5. Предположительный механизм функционирования рабочего электрода двухмедиаторного биосенсора.

При введении второго медиатора в систему, необходимо учитывать скорость взаимодействия двух медиаторов между собой. Константу взаимодействия двух медиаторов находили по уравнению 5 в результате анализа предельных анодных токов в присутствии (I_k) и отсутствие микроорганизмов (I_d). Константы взаимодействия двух медиаторов $0,18 \pm 0,02$; $56,2 \pm 0,7$; $4,8 \pm 0,2$ $\text{дм}^3/(\text{ммоль} \cdot \text{с})$ для

систем «ферроцен-нейтральный красный», «ферроцен-метиленовый синий», «ферроцен-тионин», соответственно.

Для дальнейшего использования системы на основе двух медиаторов в составе биосенсора были выбраны рабочие параметры (концентрации медиаторов и удельная плотность биомассы на электроде). Вне зависимости от состава двухмедиаторной системы рабочее значение удельной плотности биомассы составляет 0,16 мг/мм², содержание ферроцена в пасте - 10% (масс.). Рабочая концентрация медиатора тионина - 2,2 ммоль/дм³, а для нейтрального красного и метиленового синего - 1,1 ммоль/дм³. Основные характеристики биосенсоров определялись при указанных параметрах (табл. 5).

Таблица 5. Характеристики биосенсора на основе *D. hansenii* и двухмедиаторной системы.

Характеристика	Двухмедиаторная система		
	Ферроцен-метиленовый синий	Ферроцен-нейтральный красный	Ферроцен-тионин
Длительность единичного измерения, мин	3,5-6	7-10	8-20
Долговременная стабильность, сутки	43	24	37
Относительное стандартное отклонение 15 измерений, %	1,2	2,0	2,2
Линейный диапазон БПК ₅ , мг О ₂ /дм ³	2,7-7,2	11,3-19,5	4,6-16,7

С ростом константы взаимодействия двух медиаторов растет чувствительность биоэлектродов. Исходя из характеристик полученных биосенсоров для дальнейших исследований были выбраны системы на основе дрожжей *D. hansenii* и комбинации медиаторов ферроцен-метиленовый синий (табл. 5) и бактерий *P. yeai* и медиатора ферроцена (табл. 4). Следует отметить, что разработанные биосенсоры не уступают известным аналогам, но и превосходят их по значению нижней границы определяемых концентраций.

5. Апробация разработанных биосенсоров на образцах воды различного происхождения

Апробация биосенсоров была проведена на десяти образцах воды: сточные воды АО «ТулаГорВодоканал» до и после очистки, образцы воды из рек Тулицы, Холькельц, Дубовки, Вашаны и Плавы, болотная вода. Отбор проб и определение БПК₅ стандартным методом проводилось согласно действующим нормативным документам ПНД Ф 14.1;2;3;4.123-97 с помощью анализатора Эксперт-001-4.0.1 (Эконикс-Эксперт, Россия) (Рис. 6). Для сравнения результатов определения БПК

стандартным методом и с помощью разработанных медиаторных биосенсоров, была проведена статистическая обработка результатов анализа, (тест Фишера, модифицированный тест Стьюдента и приближение Уэлча). Статистически незначимое различие результатов двух методов позволяет использовать оба разработанных биосенсора для анализа проб сточной и природной воды.

Для формирования более универсальной рецепторной системы исследовали возможность использования биосенсора на основе бактерий *P. yeii* для оценки токсичности проб на примере парфюмерно-косметической продукции. Биосенсор на основе дрожжей для данной цели не подходит, так как известно, что они устойчивы к действию тяжелых металлов и других токсикантов.

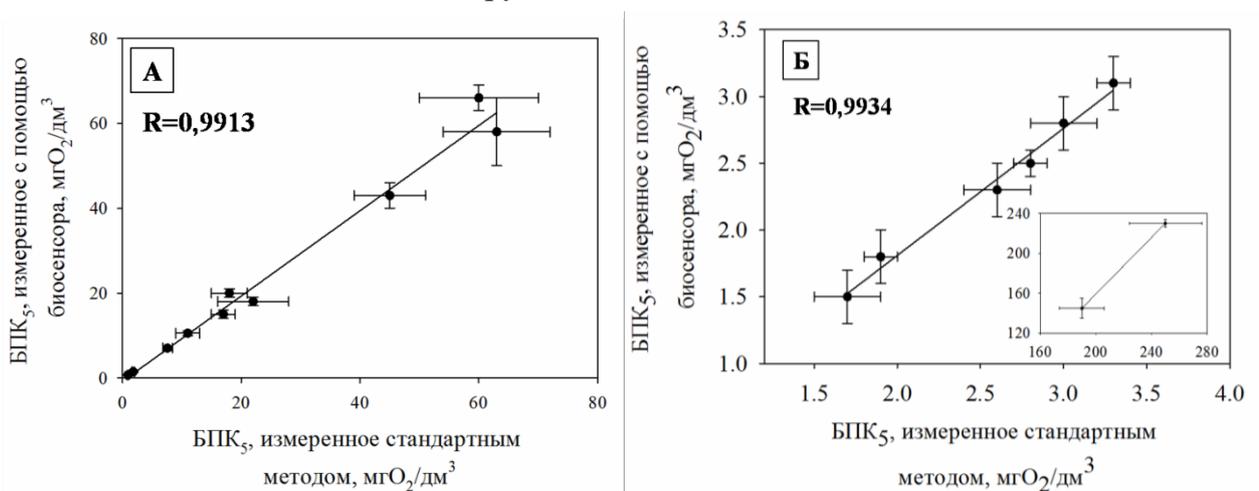


Рис. 6. Корреляция полученных значений БПК₅ исследуемых проб, измененных двумя методами. Рецепторные системы биосенсора: А – дрожжи *D. hansenii* и двухмедиаторная системы на основе ферроцена и метиленового синего, Б – бактерии активного ила *P. yeii* и ферроцен.

Для оценки возможности использования биосенсора на основе бактерий *P. yeii* и медиатора ферроцена для данных целей была проведена апробация на образцах шампуня, жидкого туалетного мыла и косметического крема. В качестве референтного метода использовали метод определения токсичности с помощью тест-объекта ряски малой ГОСТ 32426-2013. Регистрируемым параметром являлся индекс токсичности, определяемый как степень снижения активности биорецепторного элемента биосенсора и степень ингибирования удельной скорости роста ряски (референтный метод). Образец считается нетоксичным, если значение индекса токсичности не превышает 20% (табл. 6).

Таблица 6. Определение общей токсичности исследуемых проб.

Образец	Индекс токсичности (референтный метод), %	Индекс токсичности (биосенсорный метод), %
Шампунь №1	13±3 (нетоксичен)	15±2 (нетоксичен)
Шампунь №2	40±4 (токсичен)	37±2 (токсичен)
Туалетное мыло	21±2 (токсичен)	20±1 (токсичен)
Косметический крем	18±2 (нетоксичен)	19±2 (нетоксичен)

Результаты, полученные двумя методами, различаются статистически незначимо, поэтому разработанный биосенсор можно использовать как альтернативу стандартному методу анализа. Таким образом, биосенсор на основе рецепторной системы «бактерии активного ила *P. yeii* – ферроцен» может стать прототипом анализатора, позволяющего определять два интегральных показателя качества воды: БПК₅ и индекса токсичности.

ВЫВОДЫ

1. На основе значений нижней границы определяемых концентраций и долговременной стабильности было показано, что наиболее перспективными микроорганизмами для формирования биоэлектродов БПК-биосенсора являются дрожжи *D. hansenii* и бактерии *P. yeii*, выделенные из активного ила.

2. Предложенный подход выбора медиатора электронного транспорта, учитывающий как скорость его взаимодействия с микроорганизмами, так и скорость передачи электрона на электрод, позволил сформировать 4 рецепторные системы («бактерии *P. yeii* - ферроцен», «бактерии *P. yeii* – метиленовый синий», «бактерии *P. yeii* – метиленовый синий», «дрожжи *D. hansenii* – ферроцен», «дрожжи *D. hansenii* – нейтральный красный»), в которых достигается наиболее высокая скорость взаимодействия медиатора с микроорганизмами и с электродом.

3. Впервые в присутствии дрожжей *D. hansenii* получены константы взаимодействия ферроцена, иммобилизованного в графитовую пасту, с фенизиновыми медиаторами. Найденные константы позволили установить, что наиболее перспективной двухмедиаторной системой для исследуемых эукариот является комбинация ферроцена и метиленового синего. Эффективность разработанной системы была подтверждена характеристиками БПК-биосенсора.

4. Для всех исследуемых систем были найдены рабочие параметры: рабочий потенциал, концентрация медиатора и удельная плотность биомассы на электроде. На основе полученных результатов были сформированы 2 лабораторные модели медиаторных БПК-биосенсоров по значению нижней границы, не уступающие известным аналогам и позволяющие проводить анализ водных объектов, значение БПК₅ которых не превышает ПДК.

5. Статистически незначимое различие результатов определения БПК₅ образцов воды различного происхождения, найденных стандартным и биосенсорным методом, позволяет использовать оба разработанных биосенсора

для анализа проб. Биосенсор на основе бактерий *P. yeai* и медиатора ферроцена апробирован на образцах парфюмерно-косметической продукции, найденные значения индекса токсичности коррелируют с результатами, полученными с помощью стандартной методики. Разработанные электрохимические системы могут использоваться в дальнейшем при создании прототипа медиаторного биосенсора для автоматического мониторинга качества воды, позволяя определять два показателя: БПК₅ и индекс токсичности.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в Web of Science

1. **Zaitseva A.S. (Харькова А.С.)**, Arlyapov V.A., Yudina N.Yu., Alferov S.V., Reshetilov A.N. Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* // Enzyme and Microbial Technology. - 2017. - V. 98. - P. 43-51.

2. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Арляпов В.А., Юдина Н.Ю., Носова Н.М., Алферов В.А., Решетиллов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе ферроцена и дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* // Прикладная биохимия и микробиология. - 2017. - Т. 53, № 3. - С. 381–387.

3. **Харькова А.С.**, Арляпов В.А., Туровкая А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетиллов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила // Прикладная биохимия и микробиология. - 2019. -Т. 55, №2. - С. 199-209.

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК

1. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Арляпов В.А., Решетиллов А.Н. Медиаторный биосенсор на основе микроорганизмов активного ила для экспресс-определения низких значений БПК₅ // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. - 2017. - Т. 13, № 1. - С. 50-57.

2. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Косарева К.И., Алферов В.А., Арляпов В.А. БПК-биосенсор на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* и бимедиаторной системы ферроцен-метиленовый синий // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. Тула: Изд-во ТулГУ. -2015.- Вып. 3. - С. 249–259.

3. Юдина Н.Ю., **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Козлова Т.А., Арляпов В.А. БПК-биосенсор на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* и медиатора нейтральный красный // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. - 2013.- Вып. 2, Ч.1.- С. 289–297.

4. Юдина Н.Ю., Арляпов В.А., **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Решетиллов А.Н. Влияние времени культивирования, состава исследуемых проб и условий анализа на окислительную активность дрожжей *Debaryomyces hansenii* // Известия Тульского

государственного университета. Естественные науки. Вып. 3. Тула: Изд-во ТулГУ.- 2012. -С. 186-197.

Патенты

1. Устройство для экспресс-мониторинга индекса биохимического потребления кислорода: пат. ПМ № 164144 Рос. Федерация: МПК С12М 1/34, С12М 1/40, С12Q 1/02 / **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Юдина Н.Ю., Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алферов В.А. ; заявитель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет» (ТулГУ) - № 2015145398/10; заявл. 21.10.2015; опубл. 20.08.2016, бюл. № 23, патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "Эконикс-Эксперт" – лицензионный договор РД0241891 19.01.2018; опубл. 19.01.2018, бюл. № 2.

Статьи в прочих научных журналах, тезисы докладов

1. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Алферов В.А. Биоэлектродкатализ в системах «субстрат-клетки-медиатор-электрод» как основа медиаторных биосенсоров и биотопливных элементов // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 20-22 февраля 2017 г., в 2-х томах. Том 2. М.: ООО «РЭД ГРУПП», 2017.- С.445-448.

2. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**. Медиаторный БПК-биосенсор для экспресс-анализа индекса биохимического потребления кислорода // Материалы I Молодежной научно-практической конференции с международным участием «Естественнонаучные, инженерные и экономические исследования в технике, промышленности, медицине и сельском хозяйстве». – Белгород: Изд-во НИУ БелГУ, 2017.- С. 507- 510.

3. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Белова Ю.В., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Использование одностенных нанотрубок для создания БПК-анализаторов. Успехи синтеза и комплексообразования // Тезисы докладов I Всероссийской молодежной школы-конференции. Москва, РУДН, 25-28 апреля 2016 г. – Москва: РУДН, 2016. – 341 с. ил.- С. 249.

4. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Арляпов В.А., Алферов В.А. БПК-биосенсор на основе активного ила и медиатора феррицианида калия // Международный научный форум «Наука будущего - наука молодых». Сборник тезисов. Севастополь, 29 сентября - 2 октября 2015 г.- С. 40-41.

5. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)** Экспресс-анализатор индекса биохимического потребления кислорода // Тезисы Международной научно-технической конференции «Системы контроля окружающей среды – 2016». Севастополь, 24 – 27 октября 2016 г. – Севастополь: ИПТС, 2016.- С. 37.

6. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.)**, Казакова С.С., Туровская А.Д. Определение констант скорости взаимодействия клеток *D. hansenii* с медиаторами электронного

транспорта при окислении глюкозы // Всероссийская конференция с элементами научной школы молодежи «Экотоксикология - 2016»: материалы конференции. Тула: Изд-во ТулГУ, 2016.- С. 90-92.

7. **Зайцева А.С. (Харькова А.С.),** Алексеева А.О., Арляпов В.А. Разработка макета БПК-биосенсора на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* и медиаторов ферроцен – метиленовый синий // Материалы VIII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 17-20 марта 2015 г. В 2-х частях. Часть II. М.: ЗАО «Экспо-биохим- технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015.- С. 382-383.

Харькова Анна Сергеевна
МИКРОБНЫЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
ЭКЗОГЕННЫХ МЕДИАТОРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА ДЛЯ
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Изд. лиц. ЛР №020300 от 12.02.97. Подписано в печать __.__.20__

Формат бумаги 60×90/16

Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в Издательство ТулГУ

300012, г. Тула, просп. Ленина, 95