

На правах рукописи

ИЛЬЯСОВ ПАВЕЛ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ БИОСЕНСОРОВ
ДЛЯ АНАЛИЗА УГЛЕВОДОВ, КСЕНОБИОТИКОВ
И ПАРАМЕТРОВ СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино-2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской Академии Наук

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор **Решетиллов Анатолий Николаевич**

Официальные оппоненты:

Игнатов Олег Владимирович, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией физиологии микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН, г. Саратов);

Ибрагимов Ренат Исмагилович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет».

Ведущая организация: ФГБУН Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН, г. Москва)

Защита состоится 18 мая 2012 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета ДМ 002.136.01 при ФГБУН Институт биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Институт биологии Уфимского научного центра.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н., доцент



Уразгильдин Руслан Вилисович

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность проблемы. Последнее десятилетие отмечено интенсивным изучением аналитических возможностей и практическим применением биосенсорных систем. Потребности медицинской диагностики, различных областей биотехнологии, промышленности, экологических служб ставят перед аналитической химией комплекс задач, связанных с разработкой простых в применении, недорогих, высокочувствительных и специфичных методов и приборов на их основе для обнаружения заданных веществ в образце. Одновременное удовлетворение указанным требованиям достаточно проблематично. Вместе с тем в биосенсорах, совмещающих идеи и достижения современной биологии, электронных технологий, химических наук многие из перечисленных условий выполняются.

Принцип детекции, реализованный в биосенсорах, основан на том, что биоматериал (ферменты, клетки, антитела и др.), иммобилизованный на физическом датчике (преобразователе), при взаимодействии с определяемым соединением генерирует зависимый от его концентрации сигнал, который регистрируется преобразователем электрохимического, оптического или иного типа и после обработки данных представляется в численном виде. Простота устройства, оперативность, специфичность и низкая стоимость биосенсорного анализа создают развитию этой области аналитической биотехнологии высокую степень приоритета.

Использование микроорганизмов в качестве основы биосенсоров является известным подходом. В ряде работ показано, что микробные биосенсоры могут быть эффективно использованы для анализа широкого спектра соединений при биотехнологических процессах и экологическом мониторинге. Важными моментами, указывающими на перспективность микробных биосенсоров, является многообразие ферментативного аппарата микробных клеток, что открывает возможность подбора микроорганизмов для анализа практически любого соединения, а также тот факт, что ферменты внутри клеток находятся в "эволюционно оптимизированных условиях" - это в ряде случаев приводит к высокой стабильности аналитических сигналов. Немаловажным с практической точки зрения фактором является более низкая стоимость микробных биосенсоров по сравнению с ферментными ввиду отсутствия необходимости очистки ферментов и использования кофакторов. Перечисленные факты обуславливают актуальность исследований, направленных на совершенствование и получение новых знаний в этой области.

К важным задачам в области создания амперометрических микробных биосенсоров следует отнести повышение селективности анализа; поиск штаммов, окисляющих токсичные соединения, с целью создания приборов эффективного экологического мониторинга; использование технологий рекомбинантных ДНК для получения микроорганизмов с заданными свойствами с целью повышения аналитического потенциала микробных сенсоров; поиск новых подходов к улучшению характеристик/параметров биосенсорной детекции. Анализ упомянутых проблем и вопросов служит

продвижению в решении основных задач биосенсорики – созданию надежных, высокочувствительных и селективных методов и устройств биодетекции.

1.2 Цель и задачи исследования. Целью работы являлось создание и исследование характеристик лабораторных моделей микробных биосенсоров, предназначенных для детекции углеводов, спиртов и ксенобиотиков.

Достижение поставленной цели требовало решения ряда задач, основными из которых являлись:

- литературный анализ характеристик созданных к настоящему времени моделей микробных биосенсоров;
- скрининг свойств штаммов-кандидатов для формирования биосенсорных анализаторов;
- разработка моделей биосенсоров на основе выбранных микроорганизмов;
- исследование характеристик микробных сенсоров для детекции легкоутилизируемых субстратов: углеводов, спиртов, полиолов;
- разработка и исследование микробных сенсоров для определения веществ, представляющих опасность для экосистем - ароматических ксенобиотиков, ПАВ, нитрита;
- оценка возможности повышения селективности биосенсорного анализа нафталина;
- использование дополнительной оксигенации среды измерения с помощью полностью фторированных углеводородов с целью стабилизации и направленного изменения параметров микробных биосенсоров.

Такая постановка задач исследования позволила:

- получить результаты, которые вносят вклад в теорию и практику биосенсорного анализа;
- разработать модели биосенсорных устройств, которые могут рассматриваться как прототипы анализаторов, предназначенных для практического использования .
- расширить представления и получить новые данные о некоторых физиолого-биохимических характеристиках микроорганизмов, которые могут быть успешно использованы для создания новых моделей биосенсоров;

1.3 Научная новизна работы. Работа является комплексным исследованием по оценке аналитического потенциала микроорганизмов и характеризуется следующими элементами новизны:

- на основе теоретического анализа предсказана и экспериментально подтверждена эффективность использования бактерий рода *Gluconobacter* в биосенсорах для определения углеводов и спиртов. Показана их потенциальная полезность для оценок концентрации глюкозы в сыворотке крови человека; глюкозы, глицерина в ферментационных средах, не содержащих другие утилизируемые субстраты;
- впервые использованы штаммы бактерий рода *Pseudomonas* в электрохимических биосенсорах для детекции ароматических соединений, представляющих серьезную опасность для экосистем – нафталина,

- поверхностно-активных соединений (ПАВ), а также создан биосенсор на основе дрожжей рода *Arxula* для оценки БПК;
- впервые продемонстрирована возможность направленного изменения селективности детекции нафталина с помощью микробного амперометрического сенсора;
 - впервые проведена сравнительная оценка эффективности использования в биосенсорах микроорганизмов рода *Nitrobacter*, характеризующихся различными типами метаболизма – авто-, миксо- и гетеротрофным. На основе миксотрофного штамма создан высокоселективный микробный биосенсор для детекции нитрита;
 - впервые экспериментально реализована идея стабилизации условий измерения микробными биосенсорами и способ повышения их чувствительности за счет дополнительной оксигенации среды измерения с помощью перфтордекалина - полностью фторированного органического соединения.

1.4 Практическая значимость работы. На основе полученных результатов представляется возможным сделать следующие выводы.

Биосенсор на основе клеток *G. oxydans* характеризуется высокой чувствительностью к глюкозе (нижний предел определения находится в области 20 мкМ) и позволяет производить надежную оценку ее содержания в сыворотке крови человека с погрешностью, не превышающей 5-7%. Эта же модель сенсора успешно апробирована в биотехнологической практике для определения содержания глюкозы в ферментационной среде при культивировании грибов рода *Mucor*; показана возможность оценки содержания ксилозы и этанола в однокомпонентных средах.

Протестирован ряд моделей микробных биосенсоров для детекции анионных и неионогенных ПАВ. Наиболее перспективным среди них признан сенсор на основе штамма *P. rathonis* T, характеризующийся преимущественной чувствительностью анализа к ДСН и АБС. Упомянутый сенсор был использован для анализа модельных сточных вод, содержащих ПАВ.

Модель биосенсора для детекции нафталина характеризуется нижним пределом детекции, равным 0.8 мкМ, что фактически совпадает с величиной ПДК нафталина в водных средах, установленной согласно санитарным нормам РФ. Это обстоятельство, а также высокая селективность модели, позволяют рекомендовать ее в качестве прототипа анализатора нафталина.

Разработанные модели биосенсоров на основе штаммов-деструкторов бифенила и хлорированных бензоатов обладают широкой субстратной специфичностью и проявляют чувствительность к широкому спектру ароматических соединений. Это дает возможность сделать вывод об их потенциальной перспективности в качестве сенсоров БПК в средах, загрязненных ароматическими соединениями.

Биосенсор для детекции нитрита, разработанный на основе штамма *N. vulgaris*, характеризуется высокой чувствительностью и селективностью и может быть использован для количественного определения нитрит-ионов.

Одной из областей его использования может быть оценка содержания нитрита при биодegradации нитроароматических соединений.

Разработанный на основе культуры *Arxula adeninovorans* биосенсорный анализатор БПК характеризуется широкой субстратной специфичностью и устойчивостью к действию токсических компонентов муниципальных сточных вод и позволяет выполнять оценку БПК в речной воде и сточных водах различного происхождения.

Результаты, полученные при исследовании эффектов гипeroxигенации на характеристики микробного биосенсора, могут быть использованы в практических целях для расширения пределов детекции и повышения чувствительности биосенсорных анализаторов.

Созданные модели биосенсоров можно рассматривать как прототипы для разработки промышленных высокочувствительных и надежных биосенсорных систем для эффективного использования в медицине, биотехнологии, службах санитарно-эпидемиологического контроля для анализа качества питьевых источников, службах экологического мониторинга; на промышленных предприятиях для анализа состава и концентрации загрязнителей, поступающих в сточные воды.

1.5 Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались, публиковались и обсуждались на ряде конференций (см. список публикаций).

1.6 Реализация и внедрение результатов исследований. Теоретические положения, методики расчета и результаты исследований диссертации использованы в ряде НИР, выполненных в течение 1998-2011 гг., в том числе:

1. НИР в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России" на 2007-2012 гг. Разработка экспрессной портативной аналитической системы для определения уровня глюкозы в крови на основе тест-полосок и глюкометра к ним.

2. Программа Европейского союза INCO Copernicus, проект "Biological Tools For a Sustainable Water Management (BIOTOOLS)", номер регистрации в Европейской Комиссии по Грантам PL971233. Продолжительность работ по гранту – 3 года, начало работ – 1998 г.

3. Грант Правительства Москвы (2000 г). "Москве – чистую воду. Разработка многоканального микробного биосенсора для анализа токсичных соединений в сточных водах". Руководитель проекта - Решетилов А.Н.

4. Грант регионального конкурса РФФИ (Тульский регион) "Закономерности функционирования ферментных систем бактериальных клеток в условиях естественного и электрокаталитического окисления субстратов". Выполнялся совместно с ТулГУ. Сроки гранта - 2001-2002 гг.

1.7 Публикации. Основные теоретические и практические результаты диссертации опубликованы в 26 статьях в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем перечне ВАК. Доклады доложены и получили одобрение на 23 международных, всероссийских и межвузовских научно-практических конференциях, перечисленных в конце автореферата. Основные положения защищены 2 патентами на изобретения.

1.8 Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения полученных результатов, заключения и выводов. Изложена на 122 страницах текста, включает 35 рисунков и 7 таблиц. Раздел "Результаты" состоит из 5 подразделов. Список литературы включает 210 источников.

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Регистрация сигналов

В качестве преобразователя биосенсоров была использована амперометрическая система Ingold 5313/010 и потенциостаты IPC2L и IPC 2000. Измерения проводили в кювете емкостью 2-5 мл при температуре 20°C, постоянном перемешивании раствора и в диапазоне 50-90% от насыщения по кислороду. В качестве измерительной среды использовались калий-фосфатные буферные растворы с различными рН и ионной силой, а также растворы K_2HPO_4 , KH_2PO_4 и NaCl. Измеряемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала биосенсора (нА/с), а также, в ряде случаев – амплитуда сигнала (нА).

2.2. Культивирование и иммобилизация клеток.

В данной работе был использован штамм *Pseudomonas aeruginosa* 142, известный как деструктор хлорированных бензоатов, а также четыре штамма *P. putida*, характеризующихся способностью к утилизации бифенила: *P. putida* 2d-8, *P. putida* 14d-2-3, *P. putida* 14d-2-10 и *P. putida* 2d-K-3. Эти штаммы были предоставлены коллекцией Лаборатории метаболизма неприродных соединений ИБФМ РАН.

Штаммы бактерий-деструкторов поверхностно-активных веществ были получены из коллекций Института биокolloидной химии им. А.В. Думанского (Украина). В число штаммов входили: *Pseudomonas rathonis* Т - деструктор волгоната, *Pseudomonas* sp. 2Т/1 - деструктор додецилсульфата натрия (ДСН), *P. aeruginosa* 1С - деструктор алкилсульфатов и додецилсульфата натрия, *P. putida* К - деструктор метаупона, *Achromobacter eurydice* ТК - деструктор моноалкилсульфосукцината, а также *Comamonas testosteroni* ТI - деструктор нонилфенолэтоксилата (ОП-10).

Для первоначального скрининга микроорганизмов с точки зрения возможности их использования в составе биосенсорного анализатора нафталина был отобран ряд штаммов *P. putida*, принадлежащих коллекции Лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и характеризующихся различной генетической

организацией. Для изучения вопроса о специфичности клеток и возможности повышения селективности детекции использовали элиминантный (не содержащий плазмид биодеградации) штамм BS238. Культивирование всех вышеуказанных штаммов производили в жидкой минеральной среде с использованием предполагаемого субстрата сенсора в качестве единственного источника углерода и энергии.

Клетки 25 штаммов рода *Gluconobacter*, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН (ВКМ), а также коллекций Щелковского витаминного завода и Всероссийского научно-исследовательского Витаминного института (ВНИВИ), культивировали в жидкой среде с добавлением сорбита (10%) и дрожжевого экстракта (0.3%). Полученная биомасса сохраняла активность при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в стерильных условиях в течение 2-3 месяцев.

Клетки трех штаммов рода *Nitrobacter* выращивали на средах, рекомендованных для данных штаммов German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Культивирование проводили в 20-мл объеме без перемешивания в течение 3 недель при температуре $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. В качестве индикатора убыли нитрита использовали α -нафтиламин.

После окончания культивирования клетки всех штаммов собирали центрифугированием, ресуспендировали в калий-фосфатном буфере и использовали для формирования рецепторного элемента биосенсора.

Иммобилизацию клеток подавляющего большинства культур производили методом физической адсорбции на стеклобумаге GF/A (Великобритания). 10 мкл клеточной суспензии, имеющей оптическую плотность порядка 5 единиц, переносили на бумагу и высушивали. Рецепторный элемент, содержащий клетки, помещали на измерительную поверхность электрода и плотно фиксировали с помощью капроновой сетки и прижимного кольца.

При конструировании ряда сенсоров применяли иммобилизацию клеток в 2% агаровый гель. 10 мкл клеточной суспензии, содержащей 5×10^8 клеток/мл, смешивали при 40°C с 40 мкл расплавленного геля и переносили на нейлоновую сетку; плотность клеток в полученном рецепторном элементе составляла величину порядка 2×10^7 клеток/см².

При иммобилизации клеток в кальций-альгинатный гель в 6% (масса/объем) расплав альгината натрия при 35°C и добавляли бактериальные клетки, ресуспендированные в 150 мМ NaCl. Смесь гомогенизировали и продавливали при постоянном давлении через иглу шприца с внутренним диаметром 0.6 мм в 200 мМ раствор CaCl₂, инкубированный на льду. Средний диаметр полученных гранул составлял 1.1 мм.

При иммобилизации клеток в поливиниловый спирт к 10% раствору ПВС приливали равный объем водной суспензии клеток, тщательно перемешивали, выливали в чашку Петри и облучали ультрафиолетом в течение 15—90 мин. Полученную мембрану разрезали на фрагменты и промывали в течение 1—2 ч.

При иммобилизации клеток с глутаровым альдегидом проводили следующим образом. Фрагменты стеклобумаги GF/A размером 5×5 мм²

погружали в 3% раствор глутарового альдегида на 1 мин, а затем переносили в суспензию клеток (15 мг/мл). Через 1 мин мембрану извлекали и отмывали в калий-фосфатном буфере в течение 5-10 мин. Полученный рецепторный элемент подсушивали и использовали для формирования биосенсора.

При исследовании эффектов гипероксигенации измерения проводили в кювете объемом 10 мл при температуре 20 °С и постоянном перемешивании раствора, в качестве которого использовали 20 мМ калий-фосфатный буфер, рН 6.0. В контрольных условиях уровень кислорода в среде составлял 13 мг/л. Повышенную концентрацию кислорода (58 мг/л) задавали внесением в ячейку перфтордекалина, предварительно полностью насыщенного кислородом. Отношение "перфтордекалин/измерительный раствор" составляло 2/5 (объем/объем).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Скрининг штаммов рода *Gluconobacter*

Определение содержания глюкозы в крови человека является актуальной задачей для медицинской диагностики в связи с возможностью предупреждения и лечения сахарного диабета; в биотехнологии контроль за содержанием глюкозы важен для оптимизации ферментационных процессов, протекающих в присутствии этого субстрата. Несмотря на разнообразие существующих лабораторных моделей биосенсоров, а также значительное количество выпускаемых промышленностью глюкозоанализаторов, все еще открытыми остаются многие вопросы, в частности, сравнительных оценок параметров ферментных и микробных электродов.

Для выяснения подобных вопросов в рамках данной работы проведен скрининг 25 штаммов рода *Gluconobacter*, содержащих высокоактивную PQQ-зависимую альдозодегидрогеназу, и исследованы параметры модели микробного биосенсора на основе отобранного штамма *G. oxydans* № 6.

Штаммы рода *Gluconobacter*, использованные в настоящей работе, были получены из трех источников: 6 штаммов, относящихся к разным видам рода - из ВКМ (ИБФМ РАН), 9 штаммов вида *G. oxydans* - из коллекции Щелковского витаминного завода и еще 10 штаммов того же вида - из коллекции ВНИВИ. Нам представлялось важным сравнить относительные субстратные специфичности этих штаммов. По нашим предположениям, близкие штаммы (например, 9 штаммов из коллекции Щелковского витаминного завода, выделенные из биомассы ферментера после длительного культивирования) должны были характеризоваться сходными диаграммами относительной специфичности; в то же время диаграммы специфичности штаммов, относящихся к разным видам рода, должны были существенно различаться.

Результаты оценок показали, что по специфичности к исследованным субстратам наиболее сходны между собой были штаммы из коллекции Щелковского витаминного завода. Коэффициенты корреляции, полученные при сравнении их ответов на различные субстраты, составили 0.97-0.99. Более того,

эти штаммы характеризовались также довольно близкими абсолютными величинами ответов на глюкозу (за исключением штаммов 1, 4.1 и 9.7), и, следовательно, на остальные субстраты. Это обстоятельство также указывает на сходство ферментативных (а возможно, и генетических) систем исследованных штаммов из коллекции Щелковского витаминного завода. Несколько меньшим сходством друг с другом характеризовались штаммы из коллекции ВНИВИ - коэффициенты корреляции для них составили от 0.85 до 0.98 при среднем значении 0.93; на это же указывает и значительный разброс абсолютных величин их ответов. Тем не менее, сходство этих штаммов друг с другом (а также со штаммами из коллекции Щелковского витаминного завода), на наш взгляд, было достаточно велико.

Иную картину наблюдали при исследовании штаммов, принадлежащих ВКМ. Это - штаммы, выделенные из различных источников; три из них - штаммы вида *G. oxydans*, для двух из них не идентифицирован, а еще один относится к виду *G. cerinus*. Помимо сильно различающихся абсолютных величин их ответов на глюкозу, были заметны также значительные различия в графиках относительной субстратной специфичности. Коэффициенты Стьюдента, рассчитанные на основе данных этих графиков, составляют от 0.07 до 0.92 при среднем значении 0.45. Эти факты говорят о том, что сходство ферментативных систем, обеспечивающих метаболизм исследованных субстратов, для штаммов из ВКМ незначительно.

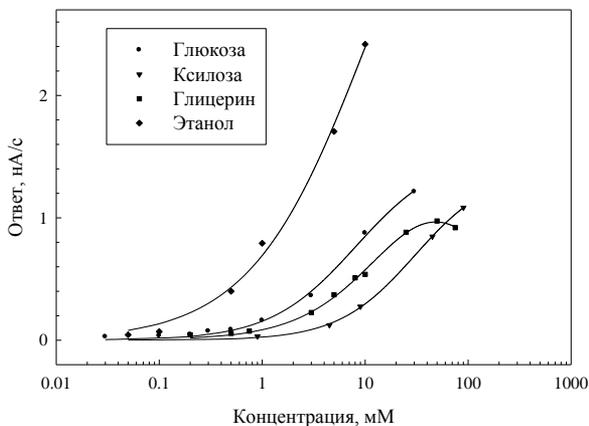


Рисунок 1. Калибровочные кривые биосенсора на основе клеток *G. oxydans* № 6 из коллекции Щелковского витаминного завода для различных субстратов. Условия регистрации: 10 мМ калий-фосфатный буфер pH 6.0, температура 20 °С.

Для дальнейших исследований был отобран штамм *G. oxydans* № 6 из коллекции Щелковского витаминного завода. Биосенсор на его основе обладал высокой чувствительностью к глюкозе и этанолу и немного меньшей - к глицерину и ксилозе (рис. 1), а также арабинозе и сорбиту.

3.1.1. Определение содержания глюкозы в сыворотке крови.

На рис. 2 представлены результаты измерения содержания глюкозы в сыворотке крови человека. В случайной выборке присутствовали образцы, взятые как у больных сахарным диабетом, так и у клинически здоровых людей. Измерения производили тремя способами: 1) с помощью микробного сенсора на основе штамма *G. oxydans* № 6, 2) выпускаемым промышленностью анализатором глюкозы "Эксан-Г" (Литва) и 3) ортотолуидиновым методом, принятым в биохимических лабораториях медицинских учреждений России.

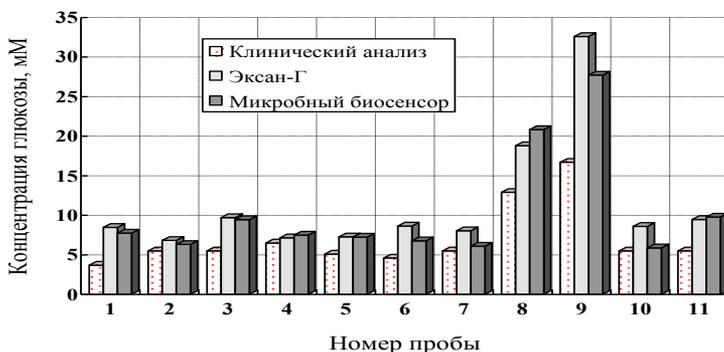


Рисунок 2. Детекция глюкозы в образцах сыворотки крови человека тремя независимыми методами.

Результаты измерений образцов микробным сенсором хорошо коррелировали с результатами оценок ортотолуидиновым методом, а также с данными, полученными с помощью ферментного анализатора глюкозы "Эксан-Г". Коэффициент корреляции для обоих случаев составлял 0.97. Микробный сенсор позволял производить оценку содержания глюкозы с ошибкой измерения, не превышающей 5%. Эти данные, а также нечувствительность сенсора к присутствию аскорбиновой кислоты, находящейся в крови человека в концентрациях до 5 мМ, свидетельствует о возможности применения микробного сенсора для детекции глюкозы в сыворотке крови как у здоровых, так и у больных сахарным диабетом людей.

3.1.2. Оценка содержания глюкозы в ферментационной среде.

Показана возможность использования микробного сенсора на основе клеток *G. oxydans* № 6 для оценки содержания глюкозы в ферментационных средах при культивировании штамма *Mucor* sp. Этот штамм является продуцентом полиненасыщенных жирных кислот типа линоленовой и арахидоновой и использует глюкозу в качестве единственного источника углерода и энергии. С помощью микробного сенсора удалось произвести оценку зависимости концентрации глюкозы от времени культивирования. Данные, полученные независимыми методами (методом Сомоджи-Нельсона и глюкозоанализатором "Эксан-Г"), оказались близки. Результаты

статистического анализа, выполненного с помощью t-теста Стьюдента с уровнем значимости 5%, показали, что статистически достоверного различия между оценками не существуют.

Отметим в заключение данного раздела, что созданные модели демонстрируют принципиальную возможность эффективного использования активности целых клеток *G. oxydans* в биосенсорах амперометрического типа. Сенсоры обладают высокой чувствительностью и позволяют выполнять анализ глюкозы в сыворотке крови человека, глицерина и глюкозы в ферментационных средах, не содержащих других окисляемых *G. oxydans* субстратов. Факторами, которые делают указанные модели практически полезными, являются

- низкая стоимость бактериальных клеток, используемых для формирования рецепторного элемента, по сравнению с применением очищенных ферментов;
- высокая чувствительность к субстратам, которые часто используются в биотехнологических процессах;
- стабильность рецепторного элемента.

Приведенные характеристики сенсоров и примеры их использования свидетельствуют о том, что в ряде случаев широкая специфичность биосенсора не должна рассматриваться как его недостаток; выход может состоять в поисках ситуаций, в которых возможно наиболее эффективное применение его характеристик, например, анализ однокомпонентных сред или сред, не содержащих других утилизируемых субстратов. Полученные результаты говорят о перспективности использования клеток данной культуры как основы биосенсоров, имеющих практическую полезность для медицины, биотехнологии.

3.2. Детекция ксенобиотиков и БПК

Цель исследований, выполненных в рамках данного раздела, состояла в оценке принципиальной возможности создания на основе микробных биосенсорных устройств амперометрического типа для детекции ПАВ и ароматических соединений, а также ионов нитрита и БПК. Задачи исследования включали изучение эффективности штаммов, входящих в состав биорецепторного элемента, и оценку специфичности полученных моделей.

3.2.1. Детекция анионных ПАВ.

В процессе работы по созданию сенсора для анализа поверхностно-активных веществ был проведен скрининг субстратной специфичности штаммов-деструкторов ПАВ с точки зрения перспектив использования в качестве основы анализатора. Результаты исследования показали, что биосенсоры на основе штаммов бактерий-деструкторов АПАВ характеризовались высокой чувствительностью к этим соединениям. Нижняя граница детекции ДСН для различных штаммов составляла 0.25-0.50 мг/л (0.86-1.73 мкМ). Линейную зависимость между изменением тока (нА/сек) и концентрацией ДСН наблюдали в пределах 0.25-200 мг/л. Следует заметить,

что широкий диапазон измеряемых концентраций ДСН (0.25 - 1500 мг/л) может найти важное практическое применение для определения АПАВ как в промышленных и бытовых сточных водах, так и в природных водоемах.

При оценке специфичности штаммов было показано, что все культуры характеризуются значительным сходством специфичностей и высокой чувствительностью к большинству анионных, неионогенных и катионных ПАВ. Следует отметить, что стабильность сигналов при измерении КПАВ была весьма низкой; фактически, рецепторный элемент биосенсора терял свою активность после первого же измерения. Вероятно, это связано с выраженным антимикробным действием КПАВ. Из всего спектра соединений (помимо ПАВ) штаммы давали ответы только на нафталин, фенилендиамин-сульфат и некоторые жирные кислоты, а среди углеводов и спиртов были получены ответы только на этанол и пропанол. Наиболее узкой субстратной специфичностью и высокой чувствительностью к ДСН и некоторым ПАВ других классов обладали штаммы *P. rathonis* T и *Pseudomonas* sp. 2T/1, которые обеспечивали удовлетворительные параметры биосенсорной детекции и могли быть использованы в биосенсорах для определения ПАВ в реальных образцах проб.

Операционную стабильность сенсора (длительность функционирования одного рецепторного элемента) оценивали путем многократного измерения ДСН в концентрации 200 мг/л в течение 3-5 суток; на протяжении этого периода биосенсор находился в буферном растворе с перемешиванием и комнатной температуре. Падение величины сигнала на протяжении этого периода для *P. rathonis* T и *Pseudomonas* sp. 2T/1 составляло не более 5-10%.

В дальнейшем при работе с моделью сенсора на основе штамма *P. rathonis* T было предпринято исследование, направленное на оценку оптимального метода иммобилизации клеток. В рамках этого исследования рецепторный элемент сенсора формировали путем включения клеток *P. rathonis* T в агаровый, агарозный и кальций-альгинатный гели, поливиниловый спирт (ПВС), адгезии на хроматографической стеклобумаге GF/A (Whathman, Великобритания) и поперечного сшивания с бычьим сывороточным альбумином и глутаровым альдегидом. Иммобилизованные клетки хранили при температуре 4°C и 100%-ной влажности. В качестве тестового субстрата использовали ДСН.

Как показали результаты эксперимента, стабильность рецепторного элемента биосенсора при включении *P. rathonis* T в агаровый гель была в 2.5 раза выше по сравнению с включением в кальций-альгинатный гель и мембрану из ПВС, а воспроизводимость сигналов была наиболее высокой при иммобилизации в агарозный гель. Наиболее быстрое восстановление активности рецепторного элемента наблюдалось при иммобилизации клеток на стеклобумаге GF/A, в мембраны из ПВС и агарового геля. Таким образом, включение клеток в агаровые гели позволяет продолжительное время сохранять их активность при измерении ПАВ.

В рамках проекта с целью оценки возможности детекции ПАВ в образцах сложного состава были проведены измерения откликов сенсоров на основе С.

testosteroni ТІ и *P. rathonis* Т на модельные смеси АБС, ДСН и ОП-10 (производное нонилфенолэтоксилата). Разработка модели сенсора на основе *C. testosteroni* ТІ и оценка ее характеристик была произведена в Институте биокolloидной химии им. А.В. Думанского (Украина), причем была продемонстрирована повышенная чувствительность данного сенсора к неионогенным ПАВ, в частности, к ОП-10. Полученные данные показали, что при анализе данных смесей концентрация ДСН являлась главным фактором, определяющим величину сигнала для обоих сенсоров. Для сенсора на основе *P. rathonis* вклад и АБС, и ОП-10 был пренебрежимо мал. В то же время, в случае сенсора на основе *C. testosteroni* ТІ концентрация АБС также влияла на величину сигнала, хотя и на порядок менее слабо, чем ДСН. Рост концентраций ОП-10 не вызывал сколько-нибудь значимого изменения отклика сенсоров. В целом, результаты свидетельствуют о том, что при использовании данных сенсоров для анализа смесей, содержащих протестированные соединения, будет возможна детекция SDS.

Таким образом, в ходе исследования был протестирован ряд моделей микробных биосенсоров для детекции анионных и неионогенных ПАВ. Наиболее перспективным среди них признан сенсор на основе штамма *P. rathonis* Т, характеризующийся преимущественной чувствительностью анализа к ДСН и АБС. Упомянутый сенсор был использован для анализа модельных сточных вод, содержащих ПАВ.

3.2.2. Детекция нафталина

Сравнительная оценка скорости окисления нафталина исследуемыми микроорганизмами показала, что наиболее активным является штамм BS238 (pBS2). Сенсор на его основе позволял производить детекцию нафталина в водных средах, начиная с концентрации 0.8 мкМ, что практически совпадает с ПДК нафталина в водных средах. В полулогарифмических координатах зависимость ответов сенсора от концентрации нафталина носила линейный характер вплоть до значений концентраций порядка 10 мкМ. Таким образом, полученная модель сенсора могла бы быть полезной для определения нафталина в образцах, содержащих это соединение в концентрациях, близких к ПДК или превышающих этот уровень.

Результаты исследования зависимости ответов сенсора от параметров среды позволили установить оптимальные значения этих параметров. Так, оптимум поверхностной плотности клеток в рецепторном элементе составил $(0.8-0.9) \times 10^7$ клеток/мм², оптимум значений pH - 5.9-6.2, оптимум ионной силы раствора - 2.9 г-экв./л, а оптимум температуры - 30 °С. Оценка стабильности ответов сенсора при оптимальных условиях измерений показала, что ответы сенсора сохранялись на неизменном уровне в течение 24 часов, после чего наблюдалось постепенное снижение их величины. Среднее время 50% снижения величины ответа составляло около 4 суток, полная потеря активности клетками происходила в течение 6-8 суток.

Сенсор характеризовался достаточно высокой селективностью. Так, отношения ответов на катехол, бифенил, салицилат, этанол, пируват и глюкозу к ответам на нафталин составляли 0,30, 0,24, 0,17, 0,14, 0,12 и 0,09, соответственно; чувствительность сенсора к остальным исследованным соединениям находилась на уровне 10% от ответа на нафталин и ниже. Для повышения селективности детекции нафталина использовали элиминант штамма *P. putida* BS238, имеющий фенотип Nah⁺Sal⁻. Культивирование клеток осуществлялось на минеральной среде с сукцинатом или бензоатом в качестве единственного источника углерода и энергии. В качестве контроля использовались клетки исходного штамма, выращенные тем же способом, что и клетки элиминанта.

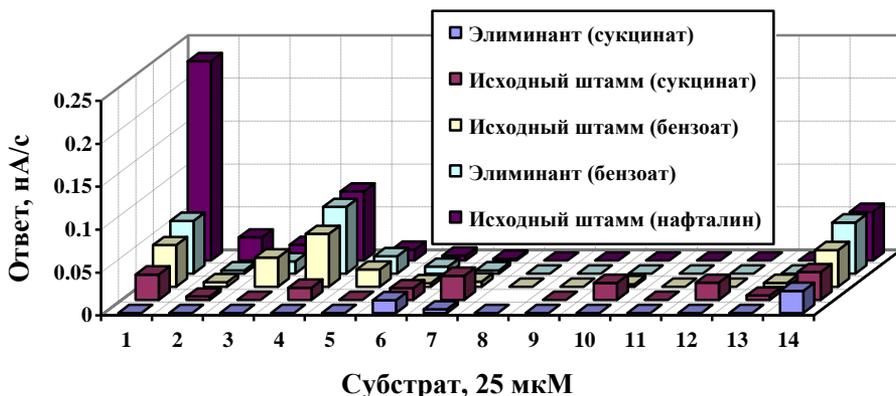


Рисунок 3. Диаграмма субстратной специфичности биосенсоров на основе исходного и элиминантного штаммов *P. putida* BS238, выращенных на различных субстратах. Условия регистрации: 50 мМ фосфатный буфер pH 6,0, температура 20 °С. Список использованных субстратов (обозначения по оси X): 1 - нафталин, 2 - салицилат, 3 - фенол, 4 - катехол, 5 - бензоат, 6 - глюкоза, 7 - этанол, 8 - ксилоза, 9 - ксилит, 10 - арабиноза, 11 - арабит, 12 - глицерин, 13 - цитрат, 14 - ацетат.

Результаты показаны на рис. 3 (для сравнения также приведен график специфичности исходного штамма, выращенного на среде с нафталином). Видно, что наибольшим сходством характеризуются диаграммы элиминантного штамма, выращенного на бензоате, и исходного штамма, выращенного на нафталине. Это сходство говорит о принципиальной возможности использования элиминантных штаммов в биорецепторе электрода сравнения при детекции нафталина. Представляются перспективными дальнейшие работы с данным и близкими к данному штаммами (а также другими плазмидами биодеградации нафталина).

3.2.3. Детекция нитрита

Определение ионов нитрита имеет значение для нужд пищевой промышленности и охраны окружающей среды. Являясь токсичным соединением сам по себе, нитрит, помимо того, может появляться в среде как

продукт деградации нитроароматических соединений и таким образом служить косвенным индикатором их исходной концентрации. Нами было предпринято исследование, направленное на создание микробного биосенсора для детекции нитрита. В работе были использованы три штамма рода *Nitrobacter*, характеризующиеся преобладанием различных вариантов метаболизма и принадлежащих German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

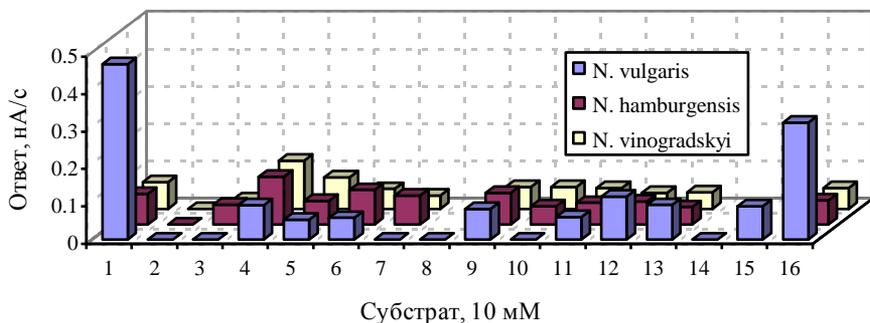


Рисунок 4. Диаграммы субстратной специфичности для моделей биосенсоров на основе штаммов *Nitrobacter*. Концентрация 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) составила 300 мкМ, в отличие от остальных субстратов, концентрации которых были равны 10 мМ. Список использованных субстратов (обозначения по оси X): 1 – нитрит, 2 – нитрат, 3 – мочевина, 4 – глюкоза, 5 – ксилроза, 6 – глицерин, 7 – ксилит, 8 – сорбит, 9 – ацетат, 10 – метанол, 11 – этанол, 12 – пропанол, 13 – изопропанол, 14 – 2-изобутанол, 15 – 2,4-ДНФ, 16 – катехол.

Диаграмма субстратной специфичности трех использованных штаммов представлена на рис. 4. Видно, что штамм *N. vulgaris* значительно превосходит остальные штаммы по показателям селективности и величины ответа на нитрит; необходимо отметить также его слабую реакцию на 2,4-динитрофенол в концентрации, составляющей 10% от насыщения (что многократно превосходит допустимые концентрации нитроароматических соединений на выходе очистных сооружений) и отсутствие ответов на нитрат и мочевину, которые также могут присутствовать в стоках. Важным обстоятельством является также отсутствие токсического действия динитрофенола на рецептор биосенсора. Диаграммы, отражающие селективность штаммов *N. hamburgensis* и *N. vinogradskyi*, характеризуются значительным сходством и низкими значениями ответов на нитрит. Видимо, преимущества *N. vulgaris* перед другими двумя штаммами обеспечены ростом в миксотрофных условиях, при котором происходит стимуляция систем окисления нитрита небольшими концентрациями органических соединений. Очевидно, что подобная стимуляция невозможна в случае автотрофного роста (*N. vinogradskyi*), а при гетеротрофном росте происходит репрессия нитритоксидоредуктазы. Таким образом, использование штамма *N. vulgaris* представляется оптимальным с точки зрения биосенсорной детекции, в связи с чем он был использован для дальнейших исследований.

Сенсор на основе *N. vulgaris* характеризовался высокой чувствительностью к ионам нитрита. Нижний предел детекции находился в области 10 мкМ нитрита. Значение кажущейся K_M , рассчитанное с помощью аппроксимации по Хиллу, составило 1.09 мМ со стандартной ошибкой расчета 0.19 мМ. Исследование зависимости ответов сенсора от внешних условий показали, что датчик характеризуется узким рН-оптимумом в области 6.8-7.0 единиц рН. Отметим, что рН-оптимум окисления нитрита, характерный для *N. vinogradskyi*, находится в области 7.6 единиц рН, что достаточно близко к указанному нами значению. Зависимость ответов сенсора от ионной силы измерительного раствора имеет типичный вид; осмотический оптимум располагается в области $\mu = 1.75$ г-экв./л (что эквивалентно использованию 30 мМ раствора NaCl).

3.2.4. Создание БПК-сенсора

В ходе исследований, результаты которых представлены в данном разделе, нами был создан микробный БПК-сенсор на основе клеток дрожжевого штамма *Arxula adeninovorans* ВГИ(78)-6, произведена оценка его характеристик (чувствительности, субстратной специфичности) и тестирование возможности использования созданного сенсора для анализа БПК в реальных образцах. Кроме того, нами также был сконструирован сенсор на основе близкородственного штамма *A. adeninovorans* ВКМ Y-2636.

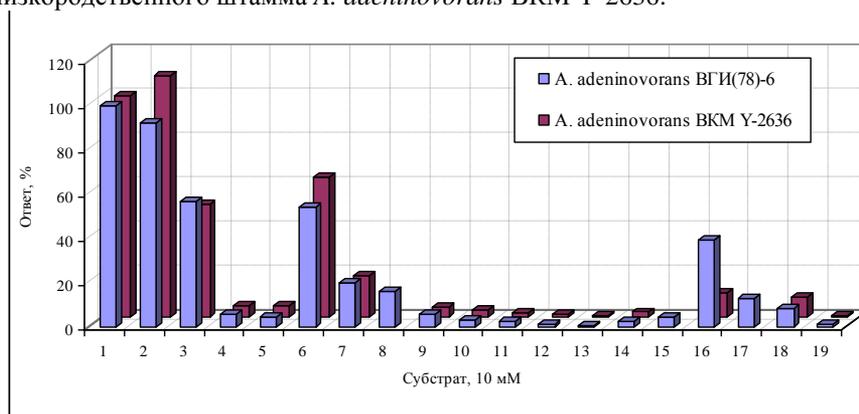


Рисунок 5. Субстратная специфичность сенсоров на основе *A. adeninovorans*. Обозначения по оси X: 1 – этанол, 2 – н-бутанол, 3 – пропанол, 4- изопропанол, 5 – изобутанол, 6 – глюкоза, 7 – ксилоза, 8 – сахароза, 9 – арабиноза, 10 – сорбоза, 11 – глицерин, 12 – ксилит, 13 – арабит, 14 – цитрат, 15 – пируват, 16 – глутаминовая кислота, 17 – SDS, 18 – бензоат, 19 – катехол.

На рис. 5 приведена диаграмма субстратной специфичности созданных БПК-сенсоров. Данные сенсоры были наиболее активны по отношению к спиртам с неразветвленной углеродной цепью и глюкозе; наименее предпочтительными субстратами из числа протестированных для них являлись катехол и сахароспирты. Вместе с тем, их специфичность является достаточно широкой с точки зрения возможности их использования для оценки БПК.

Калибровочные зависимости обоих сенсоров на основе *A. adeninovorans*, также имели близкий характер. В качестве калибровочного стандарта была использована глюкозно-глутаматная смесь (ГГС); принято считать, что раствор, содержащий по 150 мг/л глюкозы и глутаминовой кислоты, эквивалентен водной среде с БПК₅, равным 220 мг/л. Различия кинетических констант и чувствительности приведенных параметров для обоих сенсоров находились в пределах ошибки, что позволяет говорить о равной возможности их практического использования.

Исследование операционной стабильности сенсоров показало, что их сигналы оставались практически стабильными (т.е. падение сигнала не превышало 10%) в течение 3 суток. В дальнейшем снижение сигнала приводило к необходимости внесения поправок, и через 10 суток непрерывной работы остаточное значение сигнала падало до 10% от исходного уровня.

Воспроизводимость ответов сенсора оценивали путем последовательного измерения величины сигнала сенсора при вводе фиксированной концентрации калибровочного стандарта (эквивалент 600 мг/л БПК). Коэффициент вариации показаний сенсора (CV) составил 6.25%, значение БПК, определенное по калибровке, было равно 607 ± 38 мг/л. Таким образом, созданный сенсор позволял адекватно оценивать БПК в модельных пробах.

Сенсор на основе *A. adeninovorans* ВГИ(78)-6 был использован для анализа реальных образцов сточных вод. В общей сложности было протестировано около 30 образцов сточных вод с различных предприятий г. Серпухов и муниципальных очистных сооружений г. Пущино. Коэффициенты корреляции биосенсорной детекции и традиционного определения БПК₅, полученные при анализе данных образцов, составили 0.947 и 0.944, соответственно.

Кроме того, было проведено измерение проб воды, взятой 26.10.2004 из р. Ока в районе населенных пунктов Дракино, Лужки, Пущино, Прилуки, городского пляжа г. Серпухов, а также из пруда поселка Данки. Максимальные значения БПК (около 80 мг/л) отмечены для речной воды в районе Серпухова и деревни Лужки, которая располагается ниже по течению по отношению к Серпухову, минимальные – для речной воды в районе деревни Дракино (выше по течению от Серпухова, 26 мг/л) и воды из пруда поселка Данки (17 мг/л). Высокое значение БПК в районе Серпухова и ниже по течению, вероятно, связано со сбросом сточных вод промышленными и муниципальными предприятиями города. Также следует отметить довольно высокое значение БПК для речной воды в целом; этот факт может быть обусловлен смывом органики в Оку во время осенних дождей и ослабленной работой систем самоочищения воды осенью.

В дополнение к приведенным выше результатам, сенсор был протестирован на растворах органических соединений, предоставленных Лабораторией технологии кожевенных производств НИИ кожевенно-обувной промышленности. Полученные пробы содержали высокие концентрации органических соединений, а также $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и Na_2S , характеризовались щелочными значениями pH (10.5-13.5) и подразделялись на две группы (содержащие и не содержащие полимерные соединения). Анализ всех проб

показал высокую концентрацию БПК; при этом пробы группы 1 вызвали аналитический сигнал типичного вида, в то время как после внесения в измерительную кювету проб группы 2 сигнал имел двухфазный характер, что, по-видимому, было обусловлено деградацией клетками полимеров, присутствующих в пробах, с их последующей утилизацией. Состав проб и высокие значения рН не оказывали заметного влияния на стабильность сенсора.

3.3. Исследование эффектов гипероксигенации на ответ биосенсора

Распространенной конфигурацией микробного сенсора является иммобилизация клеток на электроде типа Кларка, в которой для измерения используется эффект изменения скорости дыхания при появлении в среде анализируемого соединения. Недостатком микробных биосенсоров такого типа является зависимость сигналов от концентрации кислорода в среде измерения. Изучение эффектов дополнительной оксигенации при измерениях микробными сенсорами до настоящего времени не проводили.

В рамках выполненного исследования были изучены эффекты гипероксигенации (увеличения уровня кислорода в среде измерения до 400% от насыщения) при выполнении анализа с помощью микробного биосенсора. Основу рецепторного элемента составляли клетки *G. oxydans*, в качестве модельного анализируемого соединения была выбрана глюкоза. Оксигенацию среды осуществляли с помощью перфтордекалина - полностью фторированного органического соединения, обеспечивающего высокую растворимость кислорода.

Равновесный уровень оксигенации измерительного раствора достигался через 15 мин после введения перфтордекалина в измерительную кювету и был стабилен не менее 2 часов. Время измерения биосенсором одиночной пробы составляло 3-5 мин; время его восстановления зависело от измеряемой концентрации глюкозы и не превышало 15 мин. Это позволяло за указанный период (120 мин) выполнить 6-7 тестов, после чего производили замену перфтордекалина на его новую порцию, насыщенную кислородом.

При низких значениях поверхностной плотности биомассы в рецепторе ($0.005 \text{ мг сырого веса/мм}^2$) увеличение содержания растворенного кислорода практически не влияло на зависимость сигналов сенсора от концентрации глюкозы. Аналогично, при низких концентрациях субстрата (ниже $0.3\text{-}0.5 \text{ мМ}$) увеличение содержания O_2 также не оказывало эффекта на зависимость ответов от поверхностной плотности микроорганизмов в рецепторном элементе для всех исследованных значений концентрации иммобилизованных бактерий.

Увеличение содержания растворенного кислорода в среде приводило к существенному возрастанию амплитуды ответов биосенсора при повышенной плотности биомассы (выше 0.01 мг/мм^2) и концентрации субстрата (выше 1 мМ). Так, при плотности клеток 0.025 мг/мм^2 и концентрации глюкозы 3 мМ степень приращения амплитуды ответов A_o/A_k (A_o и A_k - амплитуда сигналов сенсора при гипероксигенации измерительной среды и в контрольных условиях, соответственно) составляла 250%, а при плотности клеток 0.1 мг/мм^2 и той же концентрации глюкозы этот показатель увеличивался до 1000%.

Характерным для этих условий являлось также возрастание наклона калибровочной кривой, т.е. чувствительности биосенсора. При высоком содержании O_2 в области значений плотности биомассы 0.1 мг/мм^2 максимальный наклон калибровочной кривой составлял 143.2 нА/мМ по сравнению с 4.8 нА/мМ при нормальных условиях (рис. 6). Гипероксигенация, кроме того, расширяла диапазон детекции за счет увеличения верхнего предела измерений. Как видно из рисунка 15, при плотности биомассы 0.1 мг/мм^2 и концентрациях глюкозы выше 0.5 мМ калибровочная зависимость в нормальных условиях практически достигала насыщения, которое исчезало при повышении содержания кислорода до 58 мг/л .

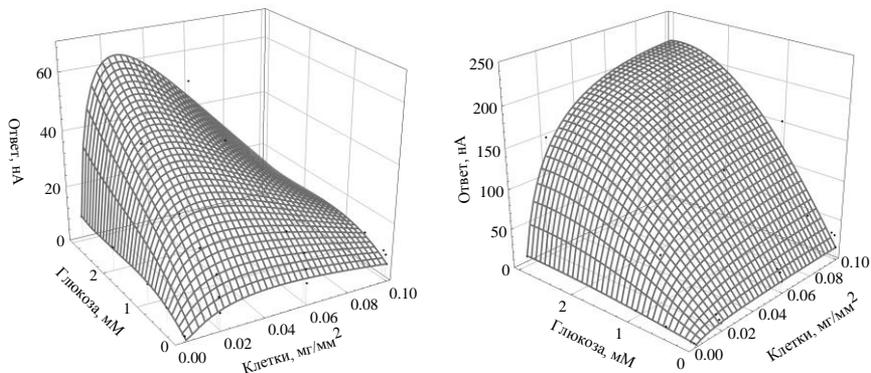


Рисунок 6. Приращение амплитуды ответа при гипероксигенации среды (справа) по сравнению с нормальными условиями (слева).

Наблюдаемые эффекты находятся в соответствии с известными фактами о снижении амплитуды ответов сенсора при низкой концентрации растворенного кислорода в среде. Снижение сигналов биосенсора при высоких концентрациях биомассы (0.1 мг/мл) и субстрата в контрольных условиях, показанное в данной работе, имеет ту же природу и обусловлено возникающим дефицитом кислорода в рецепторном элементе. Повышение уровня кислорода устраняет указанное ограничение и стабилизирует режим измерений.

Ранее внимание исследователей часто было направлено на оценку характеристик биосенсоров в неоптимизированных условиях, обусловленных сниженной концентрацией растворенного кислорода. Полученные в данной работе результаты указывают на возможность управлять характеристиками микробных сенсоров, варьируя содержание кислорода. Увеличение его уровня позволяет получить положительные эффекты - расширить диапазон измеряемых концентраций субстрата, а также повысить абсолютное значение регистрируемых сигналов. Это улучшает качество и надежность измерений за счет роста отношения “сигнал/шум”. Указанные эффекты наиболее выражены при высоких концентрациях субстрата и иммобилизованной в рецепторном элементе биомассы. Представляется перспективным проведение аналогичных оценок для моделей микробных биосенсоров на основе других культур

микроорганизмов и при использовании различных ПФОС. Непрерывная подача ПФОС в измерительную ячейку, по-видимому, позволила бы получить возможность длительного стабильного мониторинга анализируемых процессов.

ВЫВОДЫ

1. Создана и исследована модель микробного биосенсора на основе *G. oxydans* для детекции ряда углеводов и спиртов. Модель характеризуется чувствительностью к этанолу, глюкозе, ксилозе, арабинозе, глицерину и сорбиту. Показана перспективность данной модели как возможного прототипа анализатора глюкозы. Продемонстрирована возможность использования созданного биосенсора для анализа проб сыворотки крови.

2. Протестирован ряд моделей микробных биосенсоров для детекции анионных и неионогенных ПАВ. Наиболее перспективным среди них признан сенсор на основе штамма *P. rathonis* T, характеризующийся преимущественной чувствительностью анализа к ДСН и АБС. Упомянутый сенсор был использован для анализа модельных сточных вод, содержащих ПАВ.

3. Произведена оценка возможности повышения селективности биосенсорной детекции нафталина. Найдено, что элиминантный штамм *P. putida* BS238 при культивировании на бензоате обладает субстратной специфичностью, близкой к специфичности того же штамма, несущего плазмиду pBS2; вместе с тем, наличие ответа на нафталин не позволяет использовать биосенсор на основе элиминантного штамма в качестве электрода сравнения в системе для детекции нафталина. Представляются перспективными дальнейшие исследования, направленные на поиск штаммов, позволяющих осуществлять дифференциальную детекцию нафталина.

4. Продемонстрирована эффективность модели микробного биосенсора для детекции ионов нитрита на основе миксотрофного штамма *N. vulgaris*. Показана возможность биосенсорной детекции нитрита в диапазоне концентраций 0.01-10 мМ, что в сочетании с высокой селективностью также делает разработанную модель перспективной как прототип промышленно выпускаемого анализатора.

5. Искусственное повышение концентрации растворенного кислорода приводит к значительному увеличению сигналов сенсора при высокой плотности иммобилизованных в биорецепторе клеток и/или больших концентрациях детектируемого субстрата, т. е. в случае, когда биорецепторный элемент находится в условиях недостатка кислорода. При малых концентрациях иммобилизованной биомассы и субстрата упомянутый эффект незначителен. Полученный результат расширяет представления о режимах функционирования биорецепторного элемента.

6. Разработанный на основе культуры *Arxula adeninovorans* биосенсорный анализатор БПК характеризуется широкой субстратной специфичностью и устойчивостью к действию токсических компонентов муниципальных сточных вод и позволяет выполнять оценку БПК в речной воде и сточных водах различного происхождения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи и патенты

1. Решетилов, А.Н., Ильясов, П.В., Донова, М.В., Довбня, Д.В., Боронин, А.М. Определение концентрации глюкозы в образцах сыворотки крови человека микробным биосенсором. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1995. Т. 8: С. 218-221.
2. Ильясов, П.В., Емельянова, Е.В., Ерошин, В.К., Решетилов, А.Н. Определение глюкозы в ферментационных средах с помощью микробного сенсора при культивировании грибов рода *Mucor*. Прикладная биохимия и микробиология, 1996. Т. 32(1): С. 94-99.
3. Решетилов, А.Н., Ильясов, П.В., Лахина, Л.В., Панкратова, Е.В., Першиков, Р.В. Сенсор для экспресс-оценки концентрации глюкозы в сыворотке крови. Клиническая и лабораторная диагностика, 1996. Т. 2: С. 26-29.
4. Решетилов, А.Н., Ильясов, П.В., Слепенькин, А.В., Старовойтов, И.И., Филонов, А.Е., Гаязов, Р.Р., Боронин, А.М. Бактерии *Pseudomonas* как основа рецепторного элемента микробных сенсоров для детекции ароматических ксенобиотиков. Доклады Российской Академии Наук, 1996. Т. 348(4): С. 552-555.
5. Reshetilov A.N., Donova M.V., Dovbnya D.V., Boronin A.M., Iliasov P.V., Leathers T.D., Greene R.V. Evaluation of a *Gluconobacter oxydans* whole cell biosensor for amperometric detection of xylose. Biosensors and Bioelectronics. 1997. V. 12. № 3. P. 241-247.
6. Reshetilov A.N., Semenchuk I.N., Iliasov P.V., Taranova L.A. The amperometric biosensor for detection of sodium dodecyl sulfate. Analytica Chimica Acta. 1997. Т. 347. № 1-2. С. 19-26.
7. Reshetilov, A.N., Iliasov, P.V., Filonov, A.E., Gayazov, R.R., Kosheleva, I.A., Boronin, A.M. *Pseudomonas putida* as a receptor element of microbial sensor for naphthalene detection. Process Biochemistry, 1997. V. 32(6): P. 487-493.
8. Reshetilov A.N., Efremov D.A., Iliasov P.V., Boronin A.M., Kukushkin N.I., Greene R.V., Leathers T.D. Effects of high oxygen concentrations on microbial biosensor signals. Hyperoxygenation by means of perfluorodecalin. Biosensors and Bioelectronics. 1998. Т. 13. № 7-8. С. 795-799.
9. Решетилов, А.Н., Донова, М.В., Довбня, Д.В., Ильясов, П.В., Боронин, А.М., Леазерс, Т., Грин, Р. Мембранно-связанные дегидрогеназы целых клеток *Gluconobacter oxydans* как основа сенсоров для определения сахаров, спиртов и полиолов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1998. Т. 126(7): С. 68-71.
10. Решетилов, А.Н., Ефремов, Д.А., Ильясов, П.В., Кукушкин, Н.И., Грин, Р., Леазерс, Т., Боронин, А.М. Эффекты высоких концентраций кислорода при измерениях микробным биосенсором. Гипероксигенация среды с помощью перфтордекалина. Доклады Академии наук. 1998. Т. 358 (6): С. 833-835.
11. Ильясов, П.В., Шмалько, Т.А., Луста, К.А., Королев, П.Н., Решетилов, А.Н. Сравнительная оценка свойств бактерий рода *Gluconobacter* для

биосенсорной детекции органических субстратов. Прикладная биохимия и микробиология, 1998. Т. 34(5): С. 529-533.

12. Семенчук, И.Н., Таранова, Л.А., Ильясов, П.В., Решетилов, А.Н. Селективность микробного биосенсора при различных способах иммобилизации бактерий-деструкторов. Химия и технология воды, 1998. Т. 20(6): С. 649-655.

13. Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Slepkin A.V., Grechkina G.M., Starovoitov I.I. Pseudomonas-based amperometric detection of biphenyl and chlorinated benzoates. Analytical Letters. 1999. Т. 32. № 1. С. 11-23.

14. Морозова, Н.О., Ильясов, П.В., Борисов, И.А., Панкратова, Е.В., Кувичкина, Т.Н., Решетилов, А.Н. Биосенсорное определение глюкозы в физиологических жидкостях с использованием бактерий *Gluconobacter oxydans*. Известия Тульского государственного университета. Серия "Экология и безопасность жизнедеятельности", 1999. V. 5: p. 45-47.

15. Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Knackmuss H.J., Boronin A.M. The nitrite oxidizing activity of nitrobacter strains as a base of microbial biosensor for nitrite detection. Analytical Letters. 2000. Т. 33. № 1. С. 29-41.

16. Таранова, Л.А., Семенчук, И.Н., Ильясов, П.В., Решетилов, А.Н. Влияние условий культивирования *Pseudomonas rathonis* T на характеристики биосенсора для определения анионных поверхностно-активных веществ. Прикладная биохимия и микробиология, 2000. Т. 36(2): С. 204-208.

17. Семенчук, И.Н., Таранова, Л.А., Каленюк, А.А., Ильясов, П.В., Решетилов, А.Н. Влияние различных способов иммобилизации на стабильность микробного биосенсора на основе *Pseudomonas rathonis* T при детекции поверхностно-активных веществ. Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36(1). С. 83-84.

18. Reshetilov A.N., Trotsenko J.A., Morozova N.O., Iliasov P.V., Ashin V.V. Characteristics of *Gluconobacter oxydans* B-1280 and *Pichia methanolica* MN4 cell based biosensors for detection of ethanol. Process Biochemistry. 2001. Т. 36. № 10. С. 1015-1020.

19. Taranova L., Semenchuk I., Manolov T., Iliasov P.V., Reshetilov A. Bacteria-degraders as the base of an amperometric biosensor for detection of anionic surfactants. Biosensors and Bioelectronics. 2002. Т. 17. № 8. С. 635 - 640.

20. Китова, А.Е., Кувичкина, Т.Н., Ильясов, П.В., Аринбасарова, А.Ю., Решетилов, А.Н. Биосенсор реакторного типа на основе клеток *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 для определения 2,4-динитрофенола. Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 5. С. 585-590.

21. Решетилов А.Н., Ильясов, П.В., Фесай А.П., Иващенко Г.В., Таранова Л.А., Винтер-Нильсен М., Эмнеус Д. Оценка субстратной специфичности моделей биосенсоров на основе штаммов-деструкторов полициклических ароматических соединений. Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 64-71.

22. Reshetilov, A.N., Taranova, L.A., Semenchuk, I.N., Iliasov, P.V., Borisov, V.A., Korzhuk, N.L., Emneus, J. Bacteria-degraders based microbial sensors for the detection of surfactants and organic pollutants. In Environmental Chemistry (Green

Chemistry and Pollutants in Ecosystems), Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D. (Eds). 2005, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 707-724.

23. Reshetilov, A.N., Iliasov, P.V., Plekhanova, Y.V., Sigaev, V.I., Tolchinskiy, A.D., Dyadishchev, N.R., Borovick, R.V. Biosensor detection of microorganisms based on registration of their metabolic activity and immunoassay. In Commercial and Pre-Commercial Cell Detection Technologies for Defence against Bioterror. Technology, Market and Society. NATO Science for Peace and Security., Lechuga, L.M., Milanovich, F.P., Skladal, P., Ignatov, O. (Eds.) 2008, IOS Press: Amsterdam - Berlin - Oxford - Tokyo - Washington, DC. p. 99-114.

24. Никашина А.А., Пурьгин П.П., Решетилов А.Н., Ильясов, П.В. Использование биосенсоров на основе микроорганизмов-деструкторов для детекции нефтепродуктов. Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. 2010. Т. 53. № 1. С. 125-127.

25. Reshetilov, A.N., Iliasov, P.V., Reshetilova, T.A. The microbial cell based biosensors. In Intelligent and Biosensors, Somerset, V.S. (Ed.) 2010, INTECH: Vukovar, Croatia. p. 289-322.

26. Reshetilov, A., Iliasov, P., Reshetilova, T., Rai, M. Nanobiosensors and Their Applications. In Metal Nanoparticles in Microbiology, Rai, M., Duran, N. (Eds.). 2011, Springer, Berlin-Heidelberg. P. 269-283.

Патенты.

1. Кувичкина, Т.Н., Воронова, Е.А., Ильясов, П.В., Китова, А.Е., Емельянова, Е.В., Решетилов, А.Н. Биосенсор для определения загрязненности воды органическими веществами. Патент РФ на полезную модель № 73975. Зарегистрирован 10.06.2008. Заявка № 2007144733. Бюллетень изобретений полезных моделей. 2008. № 16.

2. Решетилов, А.Н., Ильясов, П.В., Кувичкина, Т.Н., Емельянова, Е.В., Кнакмусс, Г.-И. Биосенсорная система для определения 2,4-динитрофенола и ионов нитрита и биосенсоры для этой системы. Патент РФ № 2207377. Заявка № 2000127429/13 (029202). Бюллетень изобретений полезных моделей. № 18. С. 934.

Тезисы на конференциях

1. Iliasov, P.V., Slepkin, A.V., Starovoitov, I.I., Reshetilov, A.N. On the possibility of using some *Pseudomonas* sp. strains in biosensors for biphenyl detection. Proceedings of EERO workshop. Enzymatic and genetic aspects of environmental biotechnology. 1995. Pushchino, p. 7.

2. Iliasov, P.V., Starovoitov, I.I., Reshetilov, A.N. *Pseudomonas*-based amperometric detection of chlorinated benzoates Proceedings of The 10th European Conference on Solid-State Transducers "EUROSENSORS X". 1996. Leuven, Belgium, p. 913-916.

3. Morozova, N.O., Iliasov, P.V., Ashin, V.V., Aleksandrova, I.F., Reshetilov, A.N. Comparative characteristics of *Gluconobacter oxydans* B-1280 and *Pichia pinus* MN4 cells at biosensoric ethanol detection. Proceedings of The 10th European Conference on Solid-State Transducers "EUROSENSORS X". 1996. Leuven, Belgium, p. 421-424.

4. Ильясов, П.В. Опыт практического использования микробного биосенсора на основе культуры *Gluconobacter* для анализа глюкозы. Материалы Пушкинской городской научной конференции молодых ученых. 1996. Пушкино, с. 36.
5. Морозова, Н.О., Ашин, В.В., Ильясов, П.В., Решетилов, А.Н. Изучение алкогольоксилирующей активности культур *Gluconobacter oxydans* и *Pichia metanolica* с целью их использования в биосенсорах для детекции этанола. Материалы Пушкинской городской научной конференции молодых ученых. 1996. Пушкино, с. 52-55.
6. Семенчук, И.Н., Ильясов, П.В., Таранова, Л.А., Решетилов, А.Н. Амперометрический микробный сенсор для детекции додецилсульфата натрия. Материалы Пушкинской городской научной конференции молодых ученых. 1996. Пушкино, с. 66-69.
7. Семенчук И.Н., Ильясов, П.В. Модель микробного биосенсора для детекции ПАВ. Материалы Пушкинской городской научной конференции молодых ученых. 1996. Пушкино, с. 80.
8. Решетилов, А.Н., Старовойтов, И.И., Ильясов, П.В. Микробный биосенсор для детекции хлорированных бензоатов. Материалы международной конференции памяти академика А.А.Баева. 1996. Москва, с. 170.
9. Semenchuk, I.N., Iliasov, P.V., Taranova, L.A., Reshetilov, A.N. A model of microbial *Pseudomonas rathonis* based biosensor for surfactants detection. Proceedings of Second Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis. 1996. Lund, Sweden, p. 24.
10. Semenchuk, I.N., Iliasov, P.V., Taranova, L.A., Reshetilov, A.N.. Models of microbial sensors for detection of xenobiotics. Proceedings of IIIrd NEXUSPAN Workshop on Microsystems in Environmental Monitoring. 1996. Moscow, p. 62-63.
11. Reshetilov, A.N., Iliasov, P.V., Makarenko, A.A. Biosensoric detection of xenobiotics. Proceedings of Fourth International Scientific Workshop "Biosensors and biosensing devices in medicine and environmental sciences". 1997. Toshkent, Uzbekiston, p. 8.
12. Морозова, Н.О., Ильясов, П.В., Борисов, И.А., Панкратова, Е.В., Кувичкина, Т.Н., Решетилов, А.Н. Биосенсорный метод определения глюкозы в биологических жидкостях с помощью бактерий *Gluconobacter oxydans*. Материалы VIII конференции "Новые направления биотехнологии". 1998. Москва, с. 89.
13. Reshetilov, A.N., Iliasov, P.V., Kukushskin, N.I., Greene, R.V., Leathers, T.D. Biosensor Enhancement by Hyperoxygenation. Proceedings of the Fifth World Congress on Biosensors. 1998. Berlin, Germany, p. 222.
14. Morozova, N.O., Iliasov, P.V., Borisov, I.A., Pankratova, E.V., Kuvichkina, T.N., Reshetilov, A.N. Biosensoric glucose determination in physiological fluids using *Gluconobacter oxydans* bacteria. Proceedings of European medical and biological engineering conference EMBEC-99. 1999. Vienna, Austria.
15. Iliasov, P.V., Kuvichkina, T.N., Arinbasarova, A.Y., Kitova, A.E., Reshetilov, A.N., Boronin, A.M. 2,4-Dinitrophenol Degradation by *Rhodococcus*

Erythropolis HL PM-1 cells. Материалы конференции Biocatalysis-2000: Fundamentals and Applications. 2000. Moscow, p. 114.

16. Кувичкина, Т.Н., Ильясов, П.В., Китова, А.Е., Аринбасарова, А.Ю., Решетилов, А.Н. Подход к созданию колоночного биосенсора: определение 2,4-динитрофенола с помощью иммобилизованных клеток *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1. Материалы всероссийской конференции с международным участием по современным проблемам разработки и применения химических и физических сенсоров и микросистемной техники "Сенсоры и микросистемы" 2000. Санкт-Петербург, с. 139.

17. Кувичкина, Т.Н., Ильясов, П.В., Китова, А.Е., Аринбасарова, А.Ю., Решетилов, А.Н. Колоночный биосенсор на основе иммобилизованных клеток *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 для определения 2,4-динитрофенола. Материалы 4-го Международного семинара-презентации инновационных научно-технических проектов "Биотехнологии-2000". 2000. Пушино, с. 81.

18. Решетилов, А.Н., Яковлев, М., Гореленков, А.В., Ильясов, П.В. Многоканальный микробный биосенсорный анализатор нитрофенолов и ионов нитрита. Материалы 4-го Международного семинара-презентации инновационных научно-технических проектов "Биотехнологии-2000". 2000. Пушино, с. 95.

19. Кувичкина, Т.Н., Ильясов, П.В., Макаренко, А.А., Китова, А.Е., Аринбасарова, А.Ю., Решетилов, А.Н. Определение токсичных моноароматических соединений с использованием микробных сенсоров. Материалы международной научной конференции "Проблемы биологической и экологической биотехнологии". 2000. Оболенск, с. 403.

20. Воронова, Е.А., Автух, А.Н., Ильясов, П.В., Китова, А.Е., Решетилов, А.Н. Модель микробного сенсора для определения биологического потребления кислорода. Материалы всероссийской молодежной школы-конференции "Современная биотехнология - защите окружающей среды". 2006. Пушино.

21. Воронова, Е.А., Ильясов, П.В., Кувичкина, Т.Н., Китова, А.Е., Емельянова, Е.В. Использование дрожжей рода *Axhula* для определения биологического потребления кислорода. Материалы международной научной конференции "Микроорганизмы и биосфера". 2007. Москва, с. 23-24.

22. Кувичкина, Т.Н., Ашин, В.В., Антонова, О.Ю., Китова, А.Е., Ильясов, П.В., Воронова, Е.А., Решетилов, А.Н. Микробные сенсоры амперометрического типа для контроля окружающей среды. Определение метанола, тиогликоля, моноароматических соединений и биологического потребления кислорода. Материалы VIII международной научно-технической конференции «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии» (ФРЭМЭ 2008). 2008. Владимир, с. 178-181.

23. Никашина, А.А., Пурьгин, П.П., Ильясов, П.В., Шкидченко, А.Н., Филонов, А.Е., Решетилов, А.Н. Использование биосенсорных аналитических устройств для экологического контроля. Материалы конференции «Экотоксикология-2009». 2009. Пушино – Тула, p. 125-127.