

Аннотация проекта (ПНИЭР), выполняемого в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

Номер соглашения о предоставлении субсидии (государственного контракта)
14.574.21.0062

Название проекта

Разработка и подготовка промышленного выпуска амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс-определения биохимического потребления кислорода.

Тематическое направление

Науки о жизни

Исполнитель

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Тульский государственный университет"

Цели и задачи исследования

Целью выполнения проекта является: получение значимых научных результатов и решение комплекса научно-практических задач, позволяющих создать и в короткий срок вывести на рынок новый вид научно-технической продукции – биосенсорный анализатор для экспресс-определения биохимического потребления кислорода.

Основной идеологической задачей проекта является соединение знаний, опыта, имеющегося научного задела и интеллектуальной собственности коллектива исследователей Тульского государственного университета и опыта разработки и организации промышленного выпуска приборов аналогичного назначения коллектива сотрудников ООО «Эконикс-Эксперт». Главной научно-технической задачей проекта является разработка экспериментального образца нового аналитического прибора, предназначенного для экспресс-определения биохимического потребления кислорода в поверхностных пресных, подземных, питьевых и сточных водах. Реализация проекта позволит сократить срок коммерциализации результата до 1,5 – 2 лет, необходимых для проведения сравнительно несложных опытно-технологических работ.

Актуальность и новизна исследования

Учитывая постоянно растущий перечень загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду, а также ужесточение гигиенических показателей их нормирования, полный химический анализ загрязнения вод, почв, растительности представляет собой очень сложную и дорогостоящую задачу. Поэтому возрастающее внимание уделяется экспресс- методам контроля, ориентированным, на детектирование опасных уровней загрязнения и оценку совокупного воздействия токсикантов на окружающую среду. Биохимическое потребление кислорода (БПК) является одним из наиболее широко используемых показателей для контроля чистоты водных сред. Существующий метод определения БПК основан на тестах, продолжительность которых составляет 5, 10 или 20 суток (ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97). В силу значительной продолжительности процедуры метод не является адекватным в современных условиях жизни, поскольку представляет результаты анализа со значительной задержкой (минимум 5 суток от момента поступления пробы). В настоящее время все промышленные предприятия и водоочистные сооружения РФ

используют для повседневного рутинного анализа сточных вод упомянутый метод БПК₅.

В данном проекте предлагается разработка аналитического прибора нового поколения, предназначенного для экспресс-оценки индекса БПК.

Принципиальным отличием метода анализа с использованием разрабатываемого прибора от существующего является сокращение времени анализа от 5 суток до 5 - 15 мин. С помощью данного анализатора возможно осуществлять анализ в режиме реального времени, для измерения не требуется привлечения высокоспециализированного персонала. Прибор может использоваться как в стационарных условиях, так и в составе подвижных лабораторий.

Описание исследования

Решение проблемы разработки биосенсорных анализаторов для экспресс-анализа БПК основано на соответствующем выборе биологического материала, типа преобразования и метода иммобилизации. Биосенсорный анализатор представляет собой устройство, состоящее из нескольких взаимосвязанных функциональных узлов: измерительной кюветы, устройства для перемешивания пробы и буферного раствора, измерительного электрода с биорецепторным элементом и электрода сравнения, электронного блока и компьютерной программы управления режимами работы, регистрации и обработки данных. При попадании пробы анализируемой воды в измерительную кювету с буферным раствором иммобилизованные микроорганизмы окисляют биоразлагаемые органические вещества содержащиеся в пробе. Процессы окисления в биологической системе регистрируются высокоточным электрохимическим методом. Полученный аналитический сигнал обрабатывается с помощью специализированного программного обеспечения.

Принципиальной особенностью проводимых исследований является использование иммобилизованных клеток и их ассоциаций и регистрация их активности с помощью амперометрических преобразователей, применяемых при создании биосенсорных устройств; подход обеспечит оперативность и надежность получаемых данных и позволит получить количественные характеристики исследуемых процессов биоэлектрокатализа.

Экспериментальные исследования проведены на уникальном оборудовании, которое специально разработано по техническому заданию авторов проекта. Высокочувствительный электрохимический метод регистрации окислительной активности биологического материала основан на компьютерной обработке сигналов и позволяет производить высокоточные измерения в наноамперном диапазоне токов, что дает возможность исследовать свойства микрограммовых количеств биомассы.

Планируемые к выпуску биосенсорные анализаторы БПК будут основаны на анализаторах жидкости выпускаемых индустриальным партнером - ООО "Эконикс-Эксперт" (г. Москва). ТулГУ будет заниматься разработкой биорецепторных элементов БПК-сенсора. ООО "Эконикс-Эксперт" будет разрабатывать технологическую составляющую анализатора и заниматься доработкой программного обеспечения.

Результаты исследования

В ходе выполнения проекта проведен выбор эффективных биокатализаторов из широкого набора микроорганизмов по спектру окисляемых субстратов. Оценка

субстратной специфичности клеток *Pichia angusta*, *Candida baidini*, *Candida maltosa*, *Candida blankii*, *Debaryomyces hansenii*, *Arxula adeninovorans*, *Saccharomyces pasterianus* и *Gluconobacter oxydans* была проведена по 18 различным субстратам. Произведен выбор эффективных биокатализаторов из широкого набора микроорганизмов по устойчивости при иммобилизации на электроде, стабильности при хранении и стабильности при работе. Таким образом, по совокупности исследованных характеристик для дальнейшей работы по разработке и подготовке промышленного выпуска амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс-определения биохимического потребления кислорода были отобраны микроорганизмы *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, *Arxula adeninovorans* ВКМ Y-2677 и *Gluconobacter oxydans* ВКМ B-1280. Произведена разработка структурной схемы прибора, определено назначение и основные технические характеристики отдельных узлов объекта разработки. Составлена общая структурная схема анализатора, выделены основные узлы и их характеристики. Произведена разработка согласованных между Исполнителем и Индустриальным партнером основных технических требований к объекту разработки с учетом технологических возможностей ИП. В соответствии со структурной схемой анализатора определена компоновка узлов, сформулированы основные технические требования к ним. Составлены схема амперометрического датчика Кларка с закрепляемым биорецептором, работающего в режиме измерения концентрации кислорода и технические требования к нему.

Произведена разработка стабильных и воспроизводимых биорецепторных элементов биосенсоров на основе различных способов иммобилизации целых клеток микроорганизмов. Анализируя полученные данные можно сделать вывод о том, что для дальнейшей работы целесообразно применять иммобилизацию в гидрогель поливинилового спирта модифицированного N-винилпирролидоном. Показано, что клетки *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованные всеми использованными методами, способны окислять широкий круг субстратов, которые могут быть обнаружены в сточных водах, что является перспективными с точки зрения возможности их использования для оценки БПК.

Произведена разработка программного обеспечения экспериментального образца биосенсорного анализатора Создано встроенное в измерительный преобразователь анализатора программное обеспечение, реализующее алгоритмы работы в режиме градуировки и измерения экспресс-БПК. Регистрации и последующая обработка полученной временной зависимости производятся непосредственно в ИП без подключения к ПК и привлечения сторонних программных средств.

Созданный экспериментальный образец биосенсорного анализатора по своим метрологическим и аналитическим характеристикам (чувствительность, диапазон определяемых содержаний, экспрессность) не уступает существующим мировым аналогам («QuickBOD α1000», «BOD-3300», «HABS-2000», «ARAS», «BODypoint» и «BSBmodul»). Разработанные в ходе выполнения проекта анализаторы нового поколения могут использоваться для выполнения ежедневных текущих анализов проб воды на предприятиях системы водоочистки РФ, Станциями санитарно-эпидемиологического контроля,

службами МЧС, МинПрироды, экологическими структурами и биотехнологическими предприятиями.

Практическая значимость исследования

Широкомасштабное использование разрабатываемого анализатора приведет к существенному сокращению времени химического анализа сточных, природных и поверхностных вод, что в свою очередь повысит экономическую эффективность служб и организаций занимающихся контролем состояния водных ресурсов. Использование современного физико-химического метода анализа вместо морально устаревшего классического химического метода анализа БПК позволит повысить уровень автоматизации анализа, в том числе путем встраивания разрабатываемых анализаторов в состав технологического оборудования для контроля качества сточных вод очистных сооружений на предприятиях. Последнее, в свою очередь, избавит от необходимости постоянного отбора проб и даст возможность проводить «он-лайн» мониторинг. Долгосрочный социально-экономический эффект от применения разрабатываемой продукции будет заключаться в улучшении экологической ситуации в стране. Использование простого и надежного экспресс-метода контроля содержания загрязняющих органических веществ в воде позволит быстро определять экологически-опасные ситуации реагировать на них.