Методические указания для студентов очной и заочной форм обучения к лабораторным работам по биоиндикации, биотестированию и биосенсорам

О.А. Катанина, В.А. Арляпов, О.Н. Понаморева, М.Г. Зайцев, Н.Ю. Юдина

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тульский государственный университет»

О.А. Каманина, В.А. Арляпов, О.Н. Понаморева, М.Г. Зайцев, Н.Ю. Юдина

Методические указания для студентов очной и заочной форм обучения к лабораторным работам по биоиндикации, биотестированию и биосенсорам

Тула
Издательство ТулГУ
2020

УДК 577.3:663

О.А. Каманина, В.А. Арляпов, О.Н. Понаморева, М.Г. Зайцев, Н.Ю. Юдина. Методические указания для студентов очной и заочной форм обучения к лабораторным работам по биоиндикации, биотестированию и биосенсорам. Тула: Издательство ТулГУ, 2020, 152 с.: ил.

В методическом пособии приведены лабораторные работы, выполнение которых будет способствовать усвоению студентами теоретического материала по дисциплинам «Биосенсоры», «Биосенсоры в экологии», «Биосенсоры и биотопливные элементы» для направлений подготовки бакалавриата 19.03.01 Биотехнология, 04.03.01 Химия, 06.03.01 Биология и магистратуры 19.04.01 Биотехнология, 04.04.01 Химия, 06.04.01 Биология.

© О.А. Каманина, В.А. Арляпов,
О.Н. Понаморева, М.Г. Зайцев, Н.Ю.
Юдина, 2020
© Изд-во ТулГУ, 2020

От авторов

Загрязнение воздуха, воды, почвы и деградация среды обитания являются причиной растущего дефицита чистых сред и сокращения биоразнообразия. В последние десятилетия доступность пресной чистой воды снижается, спрос на воду продолжается увеличиваться, особенно в районах с сухим и полузасушливым климатом. Мониторинг загрязнителей в сточных водах имеет решающее значение для определения площади загрязнения воды и их очистки. Традиционные методы обнаружения не эффективны для отслеживания нескольких вредных компонентов в сточных водах из-за их изменчивости во времени. Методы биоиндикации и биотестирования помогают оценить очаг загрязнения, но часто не дает оперативно оценить степень загрязнения. В настоящее время разработка биосенсорных установок привлекает большое внимание из-за их высокой чувствительности, селективности, надежности, простоты, низкой стоимости и получения ответов в реальном времени. В данном методическом указании собраны основные лабораторные работы по дисциплинам «Биосенсоры», «Биосенсоры в экологии», «Биосенсоры и биотопливные элементы» для направлений подготовка бакалавриата 19.03.01 Биотехнология, 04.03.01 Химия, 06.03.01 Биология и магистратуры 19.04.01, Биотехнология, 04.04.01 Химия, 06.04.01 Биология.

Содержание

Лабораторная работа № 1 Оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур 6
Лабораторная работа №2 Сосна в качестве тест – объекта в радио и общеэкологических исследованиях 16
Лабораторная работа №3 Биотестирование загрязнения воды с помощью ряски малой 23
Лабораторная работа №4 Биомониторинг окружающей среды посредством оценки стабильности развития популяцией животных 33
Лабораторная работа №5 Параметры роста микроорганизмов как тест-функция в методах биотестирования 38
Лабораторная работа №6 Биотестирования загрязнения воды с помощью микроорганизмов 45
Лабораторная работа №7 Биодиагностика почв по ферментативной активности 49
Лабораторная работа №8 Определение растворенного кислорода с помощью портативного анализатора для мониторинга объектов окружающей среды .. 55
Лабораторная работа № 9 Энзиматический метод количественного определения глюкозы в растворе 62
Лабораторная работа № 10 Биосенсорный анализатор биохимического потребления кислорода 66
Лабораторная работа №11 Определение субстратной специфичности микроорганизмов, иммобилизованных различными способами 75
Лабораторная работа №12 Определение параметров микробного медиаторного биосенсора 85
Лабораторная работа №13 Биосенсор на основе печатных электродов для определения содержания глюкозы в растворе 98
Лабораторная работа №14 Экспресс-определение глюкозы в крови с использованием глюкометра 108

Лабораторная работа № 15 Ферментативная кинетика. Выявление лимитирующих стадий биоэлектрокаталитического окисления субстрата иммобилизованными ферментами (клетками) 115
Лабораторная работа № 16 Оценка токсичности товаров народного потребления с помощью микробного сенсора 125
Лабораторная работа № 17 Принцип функционирования медиаторного микробного биотопливного элемента 134
Лабораторная работа №18. Определение микрофлоры воздуха 142
Лабораторная работа №19. Определение микрофлоры почвы 146
Лабораторная работа №20 Микробиологическое состояние природных вод 149
Рекомендуемая литература 152

Лабораторная работа № 1 Оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур

Под качеством среды понимается ее состояние, необходимое для обеспечения здоровья человека и других видов живых существ. Степень отклонения среды от нормы определяется по состоянию населяющих ее живых организмов, которое, в свою очередь, определяется по нарушению стабильности развития наиболее массовых (фоновых) видов и оценивается по пятибалльной шкале (**таблица 1.1**):

Таблица 1.1. Соотношение стабильности развития тест объекта и качества окружающей среды

Стабильность развития в баллах	Качество среды
(I)	Условно нормальное
(II)	Начальные (незначительные) отклонения от нормы
(III)	Средний уровень отклонений от нормы
(IV)	Существенные (значительные) отклонения от нормы
(V)	Критическое состояние

Стабильность развития как способность организма к нормальному функционированию (без нарушений и ошибок) является чувствительным индикатором состояния природных популяций и позволяет оценивать суммарную величину антропогенной нагрузки. Наиболее простым и доступным для широкого использования способом оценки стабильности развития является определение величины флуктуирующей асимметрии билатеральных морфологических признаков. Она представляет собой отклонения от строгой билатеральной симметрии вследствие несовершенства онтогенетических процессов и проявляется в незначительных ненаправленных различиях между сторонами (в пределах нормы реакции организма). Получаемая интегральная оценка качества среды является

ответом на вопрос – какова реакция живого организма на неблагоприятное воздействие, которое имело место в период его развития.

Объекты и средства исследования

1) Листья березы повислой (*Betula pendula Roth*).
2) Циркуль-измеритель
3) Линейка
4) Транспортир

Подготовка к отбору проб

Места сбора материала

Оценка проводится на модельных площадках, которые выбираются в зависимости от целей работы:

- Для фонового мониторинга используются несколько площадок в разных биотопах, различных по естественным условиям.
- Для оценки последствий антропогенного воздействия площадки выбираются из максимально сходных по естественным условиям биотопов с разной степенью антропогенной нагрузки, а также из мест не подверженных антропогенной нагрузке для оценки условного фонового уровня.

Выбор объекта

Оценка качества среды предполагает анализ наиболее обычных фоновых видов (модельных объектов) разных групп животных и растений.

Для характеристики состояния экосистемы рекомендуются следующие критерии отбора модельных объектов:

- выбор представителей различных систематических групп, занимающих разное место в экосистемах;
- выбор видов, обычные миграции которых не выходят за пределы исследуемых территорий;
- выбор относительно крупных организмов, которые в меньшей степени зависят от микробиотопических условий в пределах исследуемых

местообитаний, и пригодны для характеристики исследуемой территории в целом;

- выбор фоновых видов для общей характеристики местообитания и возможности сбора необходимого материала на всех исследуемых участках в течение ограниченного промежутка времени;

- выбор объектов для экстраполяции получаемых данных на человека.

В соответствии с этими критериями для оценки состояния наземных экосистем чаще всего используются следующие виды:

- древесные растения - береза повислая, а также другие виды берез, произрастающие на территории России;

- массовые виды мелких млекопитающих в большинстве местообитаний представлены рыжей полевкой или малой мышью, в условиях с большой антропогенной нагрузкой – полевой мышью.

Для характеристики водных экосистем:

- наиболее обычные, массовые виды рыб – плотва, окунь, лещ;

- земноводных - прудовая или озерная лягушка.

Минимальное необходимое и достаточное количество объектов для проведения оценки качества среды – по одному виду от каждой исследуемой группы наземных и водных организмов (растений, млекопитающих и т. д.). Для этих объектов были разработаны шкалы балльных оценок состояния организма по уровню стабильности развития.

Отбор проб полевого материала и подготовка к выполнению исследований

Объем выборки. Каждая выборка должна включать в себя 100 листьев (по 10 листьев с 10 растений с одной территории). Листья с одного растения хранятся отдельно, для того чтобы в дальнейшем можно было проанализировать полученные результаты индивидуально для каждой особи (собранные с одного дерева листья связывают за черешки). Все листья, собранные для одной выборки, необходимо сложить в полиэтиленовый

пакет, туда же вложить этикетку. В этикетке указать номер выборки, место сбора (делая максимально подробную привязку к местности), дату сбора.

Выбор деревьев. При выборе деревьев важно учитывать, чтобы листья были собраны с растений, находящихся в сходных экологических условиях (учитывается уровень освещенности, увлажнения и т.д.). Рекомендуется выбирать деревья, растущие на открытых участках (полянах, опушках), т.к. условия затенения являются стрессовыми для березы и существенно снижают стабильность развития растений. При сборе материала должно быть учтено возрастное состояние деревьев. Для исследования выбирают деревья, достигшие генеративного возрастного состояния.

Сбор листьев с растения. Сбор материала следует проводить после остановки роста листьев (в средней полосе начиная с июля). У березы повислой собирают листья из нижней части кроны дерева с максимального количества доступных веток равномерно вокруг дерева. Тип побега также не должен изменяться в серии сравниваемых выборок. Листья следует собирать только с укороченных побегов. Размер листьев должен быть сходным, средним для данного растения. Поврежденные листья могут быть использованы для анализа, если не затронуты участки, с которых будут сниматься измерения. С растения собирают несколько больше листьев, чем требуется, на тот случай, если часть листьев из-за повреждений не сможет быть использована для анализа.

Подготовка и хранение материала. Для непродолжительного хранения собранный материал можно хранить в полиэтиленовом пакете на нижней полке холодильника. Для длительного хранения надо зафиксировать материал в 60% растворе этилового спирта или гербаризировать.

Ход работы

При выполнении исследований выполняют следующие операции. Для измерения лист березы помещают пред собой брюшной (внутренней) стороной вверх. С каждого листа снимают показатели по пяти промерам с левой и правой сторон листа (**рисунок 1.1**).

Рисунок 1.1. *Схема морфологических признаков, использованных для оценки стабильности развития березы повислой (Betula pendula)*

1*- ширина левой и правой половинок листа. Для измерения лист складывают пополам, совмещая верхушку с основанием листовой пластинки. Потом разгибают лист, и по образовавшейся складке измеряется расстояние от границы центральной жилки до края листа.*

2 *- длина жилки второго порядка, второй от основания листа.*

3 *- расстояние между основаниями первой и второй жилок второго порядка.*

4 *- расстояние между концами этих же жилок.*

5 *- угол между главной жилкой и второй от основания листа жилкой второго порядка.*

Промеры 1 - 4 снимаются циркулем-измерителем, угол между жилками (**признак 5**) измеряется транспортиром. Для этого центр основания окошка транспортира совмещают с точкой ответвления второй жилки второго порядка от центральной жилки. Эта точка соответствует вершине угла. Кромку основания транспортира надо совместить с лучом, идущим из вершины угла и проходящим через точку ответвления третьей жилки второго

порядка. Второй луч, образующий измеряемый угол, получают, используя линейку. Этот луч идет из вершины угла и проходит по касательной к внутренней стороне второй жилки второго порядка. Результаты исследований заносятся в таблицу (образец таблицы см. в разделе “**Обработка и оформление результатов исследований**”).

Обработка и оформление результатов исследований

Для мерных признаков величина асимметрии у растений рассчитывается как различие в промерах слева и справа, отнесенное к сумме промеров на двух сторонах. Интегральным показателем стабильности развития для комплекса мерных признаков является средняя величина относительного различия между сторонами на признак. Этот показатель рассчитывается как среднее арифметическое суммы относительной величины асимметрии по всем признакам у каждой особи, отнесенное к числу используемых признаков. Такая схема обработки используется для растений. В **таблицах 1.2, 1.3** на примере березы приводится расчет средней относительной величины асимметрии на признак для 5 промеров у 10 листьев одного растения.

Таблица 1.2. Образец таблицы для обработки данных по оценке стабильности развития с использованием мерных признаков (промеры листа).

Номер признака										
N	1, мм		2, мм		3, мм		4, мм		5, ^{0}	
	слева	справа	слева	справа	слева	справа	слева	справа	слева	справа
1	18	20	32	33	4	4	12	12	46	50
2	20	19	33	33	3	3	14	13	50	49
3	18	18	31	31	2	3	12	11	50	46
4	18	19	30	32	2	3	10	11	49	49
5	20	20	30	33	6	3	13	14	46	53
6	12	14	22	22	4	4	11	9	39	39
7	14	12	26	25	3	3	11	11	34	40
8	13	14	25	23	3	3	10	8	39	42
9	12	14	24	25	5	5	9	9	40	32
10	14	14	25	25	4	4	9	8	32	32

Для каждого промеренного листа вычисляются относительные величины асимметрии для каждого признака. Модуль разности между промерами слева (L) и справа (R) делят на сумму этих же промеров:

$|L-R|/|L+R|$,

Например: Лист №1 (**таблица 1.2**), признак 1

$|L-R|/|L+R| = |18-20|/|18+20| = 2/38 = 0{,}052$

Полученные величины заносятся во вспомогательную **таблицу 1.3** в графы 1-5.

Вычисляют показатель асимметрии для каждого листа. Для этого суммируют значения относительных величин асимметрии по каждому признаку и делят на число признаков.

Например, для листа 1 (см. **таблица 1.3**): (0,052+0,015+0+0+0,042)/5=0,022

Результаты вычислений заносят в графу **6** вспомогательной **таблицы 1.3.** На последнем этапе вычисляется интегральный показатель стабильности развития - величина среднего относительного различия между сторонами на признак. Для этого вычисляют среднюю арифметическую всех величин асимметрии для каждого листа (значений графы **6**). Это значение округляется до третьего знака после запятой. В нашем случае искомая величина равна: (0,022+0,015+0,057+0,061+0,098+0,035+0,036+0,045+0,042+0,012)/10=0,042

Таблица 1.3. Образец вспомогательной таблицы для расчета интегрального показателя флуктуирующей асимметрии в выборке (пример заполнения таблицы).

	Номер признака					Величина асимметрии листа
N	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
1	0,052	0,015	0	0	0,042	0,022
2	0,026	0	0	0,037	0,010	0,015
3	0	0	0,2	0,044	0,042	0,057
4	0,027	0,032	0,2	0,048	0	0,061
5	0	0,048	0,33	0,037	0,071	0,098
6	0,077	0	0	0,1	0	0,035
7	0,077	0,019	0	0	0,081	0,036
8	0,037	0,042	0	0,111	0,037	0,045
9	0,077	0,020	0	0	0,111	0,042
10	0	0	0	0,059	0	0,012
Величина асимметрии в выборке:						**X=0,042**

Статистическая значимость различий между выборками по величине интегрального показателя стабильности развития (величина среднего

относительного различия между сторонами на признак) определяется по t-критерию Стьюдента. (**см Приложение 1**)

Для оценки степени выявленных отклонений от нормы, их места в общем диапазоне возможных изменений показателя разработана балльная шкала. Диапазон значений интегрального показателя асимметрии, соответствующий условно нормальному фоновому состоянию, принимается как первый балл (условная норма). Он соответствует данным, полученным в природных популяциях при отсутствии видимых неблагоприятных воздействий (например, на особо охраняемых природных территориях).

На практике, при оценке качества среды в регионе с повышенной антропогенной нагрузкой, фоновый уровень нарушений в выборке растений или животных даже из точки условного контроля не всегда находится в диапазоне значений, соответствующих первому баллу. Диапазон значений, соответствующий критическому состоянию, принимается за пятый балл. Он соответствует тем популяциям, где есть явное неблагоприятное воздействие и такие изменение состояния организма, которые приводят организм к гибели. Весь диапазон между этими пороговыми уровнями ранжируется в порядке возрастания значений показателя. Такая бальная система оценок по величине интегральных показателей стабильности развития для березы приводится ниже.

Таблица 1.4. Пятибалльная шкала оценки отклонений состояния организма от условной нормы по величине интегрального показателя стабильности развития для березы повислой (*Betula pendula*).

Балл	Величина показателя стабильности развития
I	<0,040
II	0,040 - 0,044
III	0,045 - 0,049
IV	0,050 - 0,054
V	>0,054

Представить результаты величины показателя стабильности развития с учетом доверительного интервала и сделать вывод по работе.

Вопросы для самопроверки:

1. *Определение биоиндикации*
2. *Определение биотестирования.*
3. *Основные типы загрязнителей*
4. *Требования к биоиндикаторам-растениям.*
5. *Аномалии роста у растений.*
6. *Анализ какой среды проводили с помощью березы повислой.*
7. *Принцип морфологического подхода к биотестированию.*
8. *Принцип физиологического подхода к биотестированию.*
9. *Принцип биохимического подхода к биотестированию.*
10. *Какие требования предъявляли к объектам тестирования.*

Лабораторная работа №2 Сосна в качестве тест – объекта в радио и общеэкологических исследованиях

Индикаторные растения могут использоваться как для выявления отдельных загрязнений воздуха, так и для оценки общего состояния воздушной среды. Факт исключительно высокой радиочувствительности хвойных древесных пород был отмечен во многих исследованиях зарубежных и российских ученых (**таблица 2.1**). Так, на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРС) сосна погибла на участке с плотностью радиоактивного загрязнения более $6,7*10^{14}$ Бк*/км^2 (поглощенные дозы 30—40 Гр).

Таблица 2.1. Радиационные эффекты в растительном сообществе

Характер поражения	Доза облучения, Гр		
	Весной	Осенью	Хроническое облучение
Гибель голосеменных	10	15	50
Частичное угнетение травянистых растений	25	50	100
Поражение лиственных деревьев	-	50	100
Гибель лиственных деревьев	-	125	200
Частичная гибель травянистых растений	200	325	530
Полная гибель растительности	3000	6000	-

Сосна по радиочувствительности близка к человеку (LD50 = 20 Гр), поэтому она является одним из основных природных тест-систем в радио- и общеэкологических исследованиях.

Радиационные эффекты оцениваются по следующим критериям: гибель и восстановление деревьев; сроки восстановления; морфологические изменения хвои и побегов; количественные характеристики (радиальный и

вертикальный прирост, масса и размер хвои и побегов). Репродуктивная способность оценивается по изменчивости семян.

Большинство выявленных морфологических изменений (морфозов) сосны, которая произрастала в радиоактивно загрязненных районах, связаны с изменениями в меристемных тканях — это группа клеток в стадии активного деления и роста. Такая ткань представляет собой два типа клеток: одна с высокой репродуктивной способностью, другая с различной степенью дифференциации. Известно, что чувствительность клеток прямо пропорциональна степени их дифференциации. Именно поэтому при высоких дозах облучения наблюдаются гибель верхушечных побегов и появление побегов из боковых почек, находящихся на ранних стадиях дифференциации. Более глубокие причины различий радиочувствительности меристемных тканей следует связать с биохимическими нарушениями в метаболизме клеток.

При радиоактивном облучении наблюдаются: гибель почек, хвои, побегов; торможение роста побегов и хвои; двойной прирост в течение одного года вегетации; неравномерный рост хвои на побегах; укороченность побегов при интенсивном росте хвои («метлообразные» побеги); многопочечность (появление на побегах верхних мутовок до 30 почек вместо 5—6 в норме); нарушение ориентации хвои и побегов в пространстве (появление «мятой» хвои); искривление побегов; изменение формы хвои; появление гигантизма и карликовости побегов и хвои.

Известно, что репродуктивные органы сосны обыкновенной более чувствительны к облучению, чем вегетативные. Наибольшей радиочувствительностью обладают мужские генеративные органы. Подтверждение этому специалисты наблюдали в зоне сильного и среднего радиоактивного загрязнения после аварии на Чернобыльской АЭС: мужские цветки отсутствовали в течение первых двух лет после аварии, женские цветки также были частично или полностью поражены.

Хвойные породы, помимо высокой радиочувствительности, особенно сильно страдают от сернистого газа. Чувствительность к нему убывает в последовательности: ель — пихта — сосна веймутова и обыкновенная — лиственница. Продолжительность жизни хвои сосны в нормальных условиях составляет 3—4 года. За это время она накапливает такое количество сернистого газа, которое существенно превышает пороговое значение. Под влиянием токсиканта хвоя сосны в зонах сильного загрязнения становится темно-красной, окраска распространяется от основания иглы к ее острию, и, просуществовав всего один год, хвоя отмирает и опадает. Лиственница, ежегодно сбрасывающая хвою, значительно устойчивее к сернистому газу. Поэтому по продолжительности жизни хвои сосны и характеру некрозов можно определить степень поражения сосновых насаждений сернистым газом.

По наблюдению ученых толщина воскового слоя на хвое сосны тем больше, чем выше концентрация или продолжительность воздействия на нее сернистого газа. Это послужило основанием для разработки количественного метода индикации данного соединения в атмосфере. Суть метода «помутнения по Гертелю» заключается в том, что степень помутнения экстракта хвои прямо пропорциональна количеству воска, покрывающего хвою. Чем выше мутность, устанавливаемая фотоколориметрически, тем больше концентрация сернистого газа в воздухе. Однако современные исследования показали, что помутнение водного экстракта из хвои вызвано не только воском, но и целым рядом других веществ, присутствующих в растительных тканях. В связи с этим возникли сомнения относительно достоверности результатов теста по Гертелю. Между тем накопление эпикутикулярного воска под влиянием сернистого газа обнаружено и у других растений, например у райграса. По этой причине, возможно, следует определять не интенсивность помутнения экстракта, а непосредственно *содержание воска* в растительном материале.

Вместе с тем двуокись серы вызывает у сосны обыкновенной характерные изменения в содержании *фенольных соединений,* которые наблюдаются задолго до появления видимых симптомов повреждения.

Принцип предложенного в лабораторной работе метода основан на выявленной зависимости степени повреждения хвои (некрозов и усыхания) от загрязнения воздуха в районе произрастания сосны обыкновенной.

Цель работы: экспресс-оценка качества воздуха по состоянию хвои *Pinus sylvestris.*

Объекты и средства исследования

1) Хвоя сосны (*Pinus sylvestris.*)
2) Увеличительное стекло

Ход работы:

1.Выбрать сосенки высотой 1—1,5 м на открытой местности с 8—15 боковыми побегами. Выборку хвои необходимо делать с нескольких близко растущих деревьев на площади 10×10 м^2. В блокнот вносятся сведения о месте сбора и наличии вблизи возможного интенсивного движения транспорта; указывается также время осмотра хвои. Очень важен при выборе деревьев показатель вытоптанности участка произрастания сосны. Степень вытоптанности участка оценивается баллами 1—4 (1 — вытаптывания нет; 2 — вытоптаны тропы; 3 — нет ни травы, ни кустарников; 4 — осталось немного травы вокруг деревьев). При вытоптанности территории, оцениваемой баллами 3 и 4, экспресс-оценка воздушного загрязнения невозможна.

Осмотреть у каждого дерева хвоинки предыдущего года *(***вторые** сверху мутовки). Если деревья очень большие, то обследование проводить на боковом побеге в четвертой сверху мутовке (**рисунок 2.1.**). Всего собирают или осматривают не менее 30 хвоинок. Шипик хвоинки всегда светлее. Он не оценивается. По степени повреждения и усыхания хвои выделяют несколько классов (**рисунок 2.2.**).

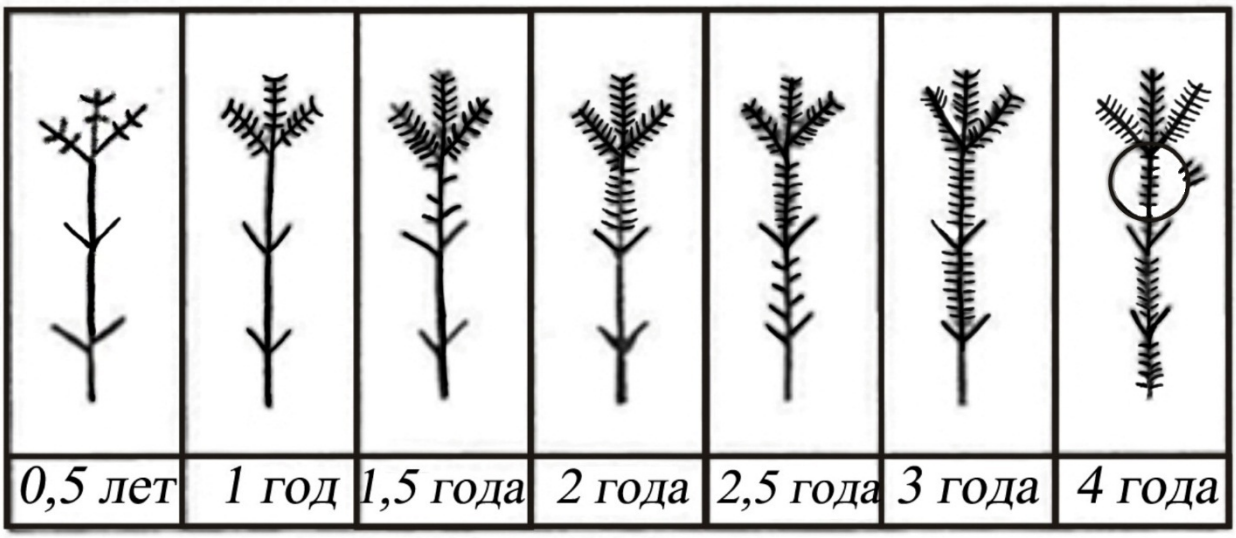


Рисунок 2.1. *Участок побега, на котором проводят обследование хвои для экспресс-анализа качества воздуха*

Рисунок 2.2. Классы повреждения и высыхания у хвои

Классы повреждения: 1 — хвоинки без пятен; 2 — хвоинки с небольшим числом мелких пятен; 3 — хвоинки с большим числом черных и желтых пятен. Классы усыхания: 1 — на хвоинках нет сухих участков; 2 — на хвоинках усох кончик 2— 5 мм; 3 — усохла 1/3 хвоинки; 4 — вся или большая часть хвоинки сухая.

2.Определить продолжительность жизни хвои. Обследовать верхушечную часть ствола за последние годы: каждая мутовка, считая сверху, — это год жизни (**см. рисунок 2.1.**).

3.Провести оценку степени загрязнения воздуха по оценочной шкале, включающей возрастные характеристики хвои, а также классы повреждения хвои на побегах второго года жизни с помощью **таблицы 2.2**.

4.Оценить, пользуясь **рисунком 2.2**, класс повреждения (некроз) и усыхания хвоинок сосны. Занести данные по всем хвоинкам в тетрадь. Провести статистическую обработку данных.

5.Определить продолжительность жизни хвои, используя **рисунок 2.1.**

6.Провести экспресс-оценку загрязнения воздуха по классу повреждения хвои на побегах второго года жизни с учетом возраста хвои с помощью **таблицы 2.2.**

Таблица 2.2. Экспресс оценка загрязнения воздуха с использованием сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*)

Максимальный возраст хвои	Класс повреждения хвои на побегах второго года жизни		
4	I	I-II	III
3	I	II	III-IV
2	II	III	IV
2	-	IV	IV-V
1	-	IV	V-VI
1	-	-	VI

I — воздух идеально чистый; II — чистый; III — относительно чистый («норма»); IV — загрязненный («тревога»); V — грязный («опасно»); VI —очень грязный («вредно»); невозможные сочетания.

7. Привести в отчете все типы повреждений хвои, указанных в задании; выводы о качестве воздуха (привести расчеты и таблицы).

Вопросы для самопроверки:

1. *Определение биоиндикации*
2. *Определение биотестирования.*
3. *Основные типы загрязнителей*

4. *Требования к биоиндикаторам-растениям.*
5. *Аномалии роста у растений.*
6. *Анализ какой среды проводили с помощью хвои.*
7. *Принцип морфологического подхода к биотестированию.*
8. *Принцип физиологического подхода к биотестированию.*
9. *Принцип биохимического подхода к биотестированию.*
10. *Какие требования предъявляли при выборе растений в лабораторной работе.*

Лабораторная работа №3 Биотестирование загрязнения воды с помощью ряски малой

Представители семейства рясковых являются самыми маленькими цветковыми растениями в мире. В результате гидрофильной эволюции они достигли крайней степени редукции всех органов, поэтому по простоте строения занимают первое место среди цветковых растений. Это водные, свободно плавающие, многолетние травянистые растения.

Ряску называют «экологической дрозофилой». Особенности морфологического строения, высокая скорость размножения, чувствительность к среде обитания — все это сделало ряску удобным объектом для биологического тестирования

Ряска малая (*Lemna minor L.*) — растение, плавающее на воде. Размер листецов 2—4 мм. Число жилок 3 (**рисунок 3.1.**). Листецы плоские, образуют группы из 3—6 растений. Встречается в стоячих водах. Корни длинные, но не достигают грунта, а выполняют главным образом функцию якоря, предотвращая переворачивание растений в воде. Встречается чаще всего в стоячих водах.

Рясковые размножаются преимущественно вегетативно, отдельный лист может пройти 10 делений за период 7—10 сут. Рясковые могут удваивать свою массу за время от 10 ч до 2 сут. при оптимальных температуре, освещении и питании.

Принцип предложенного в данной лабораторной работе метода основан на определении гибели и изменений в темпах роста ряски малой, учете морфологических изменений (хлороз, некроз поверхности листеца, расслоение листецов) при воздействии токсических веществ в исследуемой среде по сравнению с контролем.

Острое токсическое действие исследуемой воды на ряску определяется по гибели ее за определенный период времени. Критерием острой

токсичности служит гибель 50 % и более растений за 96 ч в исследуемой воде при условии, что в контроле погибло не менее 10 % растений.

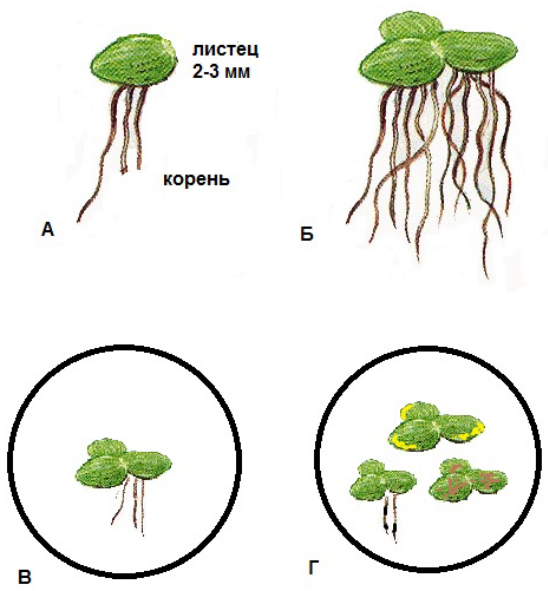


Рисунок 3.1. *Строение ряски малой (Lemna minor L.):*

А — общий вид; Б — группа листецов (один материнский и два дочерних); В — растение ряски в начале эксперимента; Г — растения ряски в конце эксперимента

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают: среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления вод, содержащих смеси веществ), вызывающую гибель 50% и более тест-организмов; безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления вод, содержащих смеси веществ), вызывающую гибель не более 10 % тест-организмов.

Хроническое токсическое действие исследуемой воды на ряску малую оценивают по смертности и скорости роста за период до 24 суток в исследуемой воде по сравнению с контролем. Критерием хронической токсичности служит гибель 20 % и более тест-организмов и (или) достоверное отклонение в скорости роста из числа выживших растений по сравнению с контролем.

Биотестирование проводится в лабораторных условиях. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов. Температура окружающего воздуха в лаборатории от + 18 до + 25 °С. Атмосферное давление 84—106 кПа (630—800 мм рт.ст.). Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничено особыми требованиями. Освещенность для ряски 2 500—3 500 лк. Интенсивность света должна быть более чем на 15 % больше по сравнению с дневным светом.

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования включает подготовку посуды, пробоотборников, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемую воду.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Она промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью и через 2—3 ч посуда тщательно промывается водопроводной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды и промывается 3—4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, — в сушильном шкафу при 160°С в течение 1 ч.

Химически чистая посуда для биотестирования должна храниться с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т. п. Вся грязная посуда после проведения анализов должна подвергаться стерилизации кипячением в течение 1 ч.

Культивационная вода используется для разведения маточной культуры, в качестве контрольной с добавлением питательного раствора для биотестирования, для разбавления исследуемых вод. Для подготовки культивационной воды питьевую воду отстаивают в течение 3 — 7 сут (до полного дехлорирования) в бутыли из бесцветного стекла. При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества допускается использование поверхностной пресной или грунтовой воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм.

В культивационной воде должны отсутствовать органические загрязняющие вещества, хлор, токсические вещества и антагонистические для ряски организмы (синезеленые водоросли, простейшие, многоклеточные); pH должен быть в пределах 4,5—7,0, температура (20±5)°С.

Прежде чем приступить к биотестированию на представителях семейства рясковых, ознакомьтесь с терминами и понятиями, применяемыми в данной лабораторной работе, которые приведены в справочном материале.

Объекты и средства исследования:

1) флуоресцентный свет или свет дневной лампы для роста ряски (полное освещение в течение 16 ч);
2) культура растений ряски;
3) чистые пластиковые контейнеры;
4) среда для культивирования — ростовой раствор (**таблица 3.1**);
5) пипетка для добавления ростового раствора;
6) увеличительное стекло;
7) пинцет для отлова ряски;
8) чистая пластиковая пленка или пластиковая пластинка;
9) 100 мл тестируемого раствора в концентрации 4 ПДК (**таблица 3.2**);
10) дистиллированная вода для контрольного варианта.

Ход работы:

В тестирование используют 5-дневный цикл развития растений.

1) Приготовить раствор для культивирования объем раствора 1 дм^3**.**

Таблица 3.1 Состав среды для культивирования ряски малой

Макроэлементы, мг/л	
KNO_3	350,00
$CaCl_2$	139,00
KH_2PO_4	90,00
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	16,50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100,00
Трилон Б	1,50
Микроэлементы (H_3BO_3, $ZnSO_4$, Na_2MoO_4, $MnCl_2$, $FeCl_3$) 1 мл/дм^3	

2) Приготовить по 100 мл растворов солей тяжелых металлов с концентрацией анализируемого иона 1 мг/мл.

3) Рассчитать по закону эквивалентов объем раствора (**Пункт 2.**), вносимого в раствор для культивирования (объем раствора 30мл) для получения указанных в **таблице 3.2** концентраций ионов.

Таблица 3.2. Варианты растворов солей тяжелых металлов, применяемых в лабораторной работе

Концентрация иона, мг/дм^3	Металл				
	(Pb^{2+})	(Ni^{2+})	(Zn^{2+})	(Cu^{2+})	(Cd^{2+})
0,0150(0,5ПДК)	+				
0,030(ПДК)	+				
0,060(2ПДК)	+				
0,120(4ПДК)	+				
0,25(0,25ПДК)		+	+	+	
0,5(0,5ПДК)		+	+	+	
1,0(ПДК)		+	+	+	
2,0(2ПДК)		+	+	+	

4,0(4ПДК)		+	+	+	
0,001(0,25ПДК)					+
0,002(0,5ПДК)					+
0,004(ПДК)					+
0,008(2ПДК)					+
0,016(4ПДК)					+

4) Приготовить контрольный раствор, не содержащий ионов тяжелых металлов (объем раствора 30 мл)

5) Используя пинцет, перенести в каждый контейнер по 10 растений **ряски малой**. Выбирать только зеленые, здоровые растения с 2 дочерними листецами и приблизительно одинаковых размеров.

6) Поместить контейнеры на 24 ч под лампу дневного света. Размещения контейнеров под прямыми солнечными лучами у окна следует избегать, чтобы предотвратить перегрев и усыхание листецов (они сжимаются, теряют тургор).

7) Контейнер с листецами оставить еще на 5 дней.

8) В конце пятого дня подсчитать количество листецов в каждом контейнере. Сложность подсчета может быть связана с малыми размерами листецов ряски, однако в этом случае можно воспользоваться лупой.

9) Записать данные учета роста тест-объекта **в таблицу (пример таблица 3.3.)** и сделать пометки, какие растения изменили цвет, зафиксировать наличие или отсутствие корней и описать общий вид растений.

10) Провести стандартную статистическую обработку и анализ полученных результатов. Первый шаг — проверка контрольного варианта с целью выявления фонового роста ряски в незагрязненных условиях. Если растения ряски в контрольном варианте не выросли или выглядят не совсем здоровыми, то результаты эксперимента аннулируются. Возможно, питательный раствор был слишком сильный или растения были не здоровы в

самом начале эксперимента; также возможны проблемы с окружающей средой во время тестирования.

Для оценки воздействия загрязнителя существует показатель мгновенного отклика популяции — коэффициент роста **(r)**, изменение которого отражает сопротивление среды, т.е. характеризует сумму всех лимитирующих факторов среды, препятствующих реализации репродуктивного потенциала (r_{max}), который рассчитывается по контролю. По истечении времени экспозиции в контроле и при каждой концентрации ионов тяжелых металлов рассчитывают общее количество листецов (включая материнские особи и листецы, отделившиеся от них) и коэффициент роста популяции r

$$r = \frac{N_t - N_0}{t},$$

где N_0 — начальная численность листецов; N_t —конечная численность листецов; t — время экспозиции (сутки). Данные записываются в таблицу учета роста тест-объекта.

11) Сделать вывод по полученным результатам

Внимание! Значение описания всевозможных изменений, происходящих с тест-объектом, очень важно. Также полезно смотреть на отдельные растения, чтобы понять особенности реакции тестируемого организма. Важно отметить, как растения реагируют в начале эксперимента, что с ними происходит потом, идет ли реакция по отдельным растениям либо реагирует вся группа. Все эти особенности внести в **таблицу 3.2.** В **таблице 3.3** представлены некоторые формы реакции ряски малой на присутствие в воде солей тяжелых металлов.

Таблица 3.3. Реакция ряски малой на ионы тяжелых металлов

Металл	Концентрация (мг/мл)	Тестовые реакции			Коэффициент роста
		Окраска листецов	Рассоединение листецов	Реакция листецов	
Контроль	0	Интенсивно	нет	нет	3,55

		зеленая			
Cd	0,25	Коричневая	есть	Сильное усыхание	2,17
Pb		Светло-бурая	Есть	Сильное усыхание	0,33
Zn		Светло-зеленая, коричневая	Есть	Сильное усыхание	0
Ti		Светло-зеленая	есть	Сильное усыхание, отпали корни	2,84
Co		Светло-зеленая	есть	Сильное усыхание	1,55
Ni		Темно-коричневая	есть	Сильное усыхание	0,60
Mo		Белая	нет	Сильное усыхание	5,84
Cu		Белая	есть	Отмирание корней	0,17
Cr		Желто-белая	нет	Сильное усыхание	4,17
Ba		Светло-зеленая	нет	Усыхание	0,17
V		Коричневая	нет	Усыхание	0,83
Mn		Светло-зеленая, бурая	нет	Сильное усыхание	1,00
Cd	0,1	Коричневая	есть	Сильное усыхние	2,17
Pb		Желтовато-зеленая	есть	Подсыхание зоны роста	0,50
Zn		Темно-бурая	есть	Усыхание	0,17
Ti		Зеленая	есть	Малозаметное увядание	4,17
Co		Светло-	есть	Сильное	1,55

		зеленая		усыхание	
Ni		Темно-коричневая	есть	Сильное усыхание	0,60
Mo		Белая	нет	Сильное усыхание	5,84
Cu		Белая	есть	Отмирание корней	0,17
Cr		Желто-белая	нет	Сильное усыхание	4,17
Ba		Светло-зеленая	нет	усыхание	0,17
V		Коричневая	нет	усыхание	0,83
Mn		Зеленая	нет	Сильное усыхание	1,67
Cd	0,025	Светло-зеленая	Есть	Подсыхание	3,33
Pb		Темно-зеленая	есть	подсыхание	1,33
Zn		Светло-зеленая, крапчатая	Нет	Усыхание	0,17
Ti		Сизо-бурая	Нет	Подсыхание краев	4,00
Co		Бурая	Есть	Усыхание	2,34
Ni		Ярко-зеленая	Есть	Подвядание	1,17
Mo		Сизо-белая	Нет	Усыхание	2,52
Cu		Белая	Есть	Отмирание корней	0,17
Cr		Ярко-зеленая	Нет	Подсыхание корней	6,25
Ba		Светло-желтая	Нет	Увядание	0,66
V		Коричневая	Нет	Усыхание	0,83
Mn		Светло-	Нет	Увядание	2,00

		зеленая Усыхание			
Cd	0,001	Белая, кра Усыхание пчатая Усыхание	Есть	Увядание	2,67
Pb		Коричневая	Нет	Увядание	2,83
Zn		Светло-коричневая	Нет	Увядание	1,17
Ti		Зеленая, светло-коричневые края	Нет	Увядание, корни отпали	3,83
Co		Зеленая	Есть	Увядание	1,54
Ni		Светло-зеленая	Нет	Подвядание, корни отпали	3,00
Mo		Желто-зеленая	Нет	Подсыхание краев	6,03
Cu		Белая с сизоватым оттенком	есть	Сильное усыхание	0,73

Вопросы для самопроверки:

1. *Определение биоиндикации*
2. *Определение биотестирования.*
3. *Основные типы загрязнителей*
4. *Требования к биоиндикаторам-растениям.*
5. *Аномалии роста у растений.*
6. *Анализ какой среды проводили с помощью березы повислой.*
7. *Принцип морфологического подхода к биотестированию.*
8. *Принцип физиологического подхода к биотестированию.*
9. *Принцип биохимического подхода к биотестированию.*
10. *Какие требования предъявляли при выборе березы.*

Лабораторная работа №4 Биомониторинг окружающей среды посредством оценки стабильности развития популяцией животных

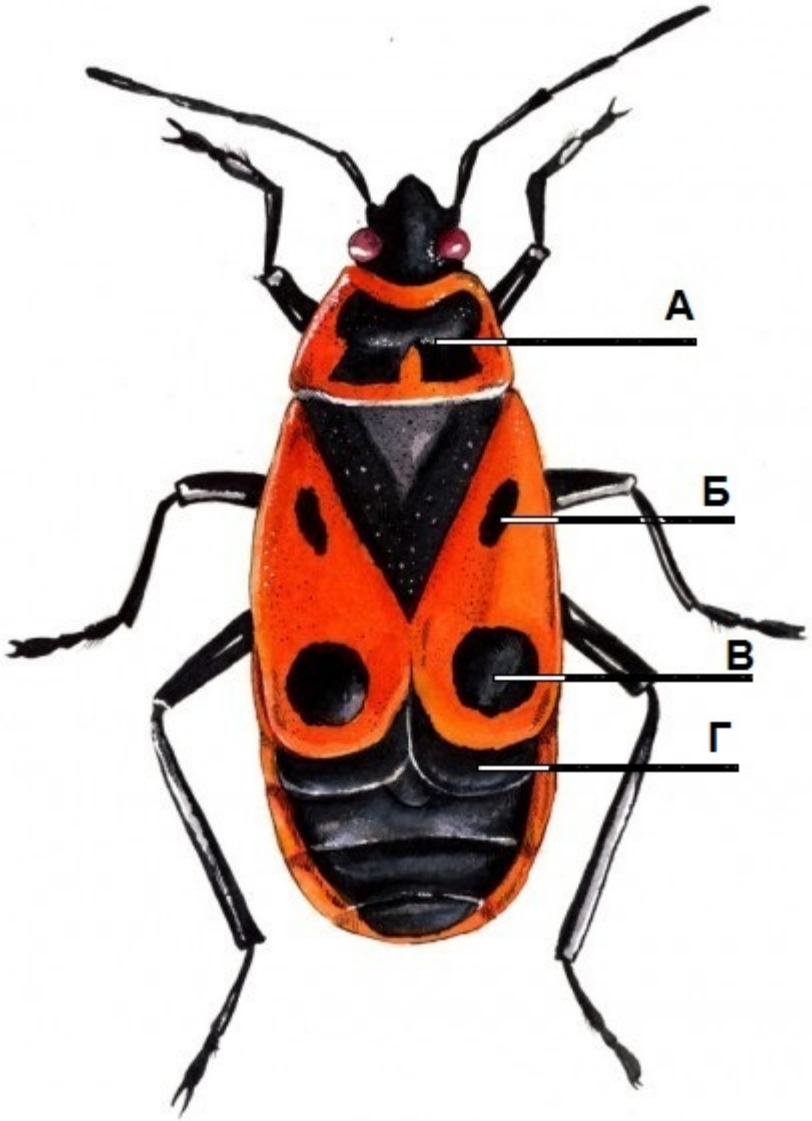


Рисунок 4.1. *- внешний вид клопа-солдатика с элементами меланизированного рисунка покрова: А, Б, В, Г.*

Асимметрия в меланизированном рисунке покрова клопа-солдатика выражается в появлении неодинаковых вариаций одного и того же элемента справа и слева. Незначительное отклонение от строгой билатеральной симметрии расценивается как случайное нарушение развития меланизированного рисунка покрова особи в конкретных условиях. Флуктуирующая асимметрия меланизированного покрова клопа-солдатика

генетически обусловлена. В литературе встречаются данные о жестком генетическом контроле появления меланизированного рисунка.

Наблюдения за содержащимися в лабораторных условиях популяциями клопа-солдатика позволили проследить формирование меланизированного рисунка покрова на разных стадиях развития особей. Факт появления меланина находится под жестким контролем генотипа, а характер распределения меланизированного рисунка в определенных склеротизированных структурах может варьироваться. Само очертание элемента генетически детерминировано нежестко, поэтому развитие каждого элемента меланизированного рисунка покрова обуславливается спектром его изменчивости. Однако в процессе развития организма в зависимости от условий существования происходит формирование конкретных вариаций для каждого элемента меланизированного рисунка покрова клопа-солдатика.

В оптимальных условиях обитания природных популяций формируется билатерально симметричный меланизированный рисунок покрова насекомых. В популяциях, подвергающихся действию различного уровня антропогенного воздействия, у определенных особей нарушается билатерально симметричный меланизированный рисунок покрова клопа-солдатика. Формирование различных вариаций элементов на правом и левом надкрыльях насекомых является следствием трансформирующего действия комплекса естественного и антропогенного воздействий. Возникающие при этом неодинаковые вариации находятся в пределах спектра изменчивости рассматриваемого элемента меланизированного рисунка покрова клопа-солдатика (**рисунок 4.2.**).

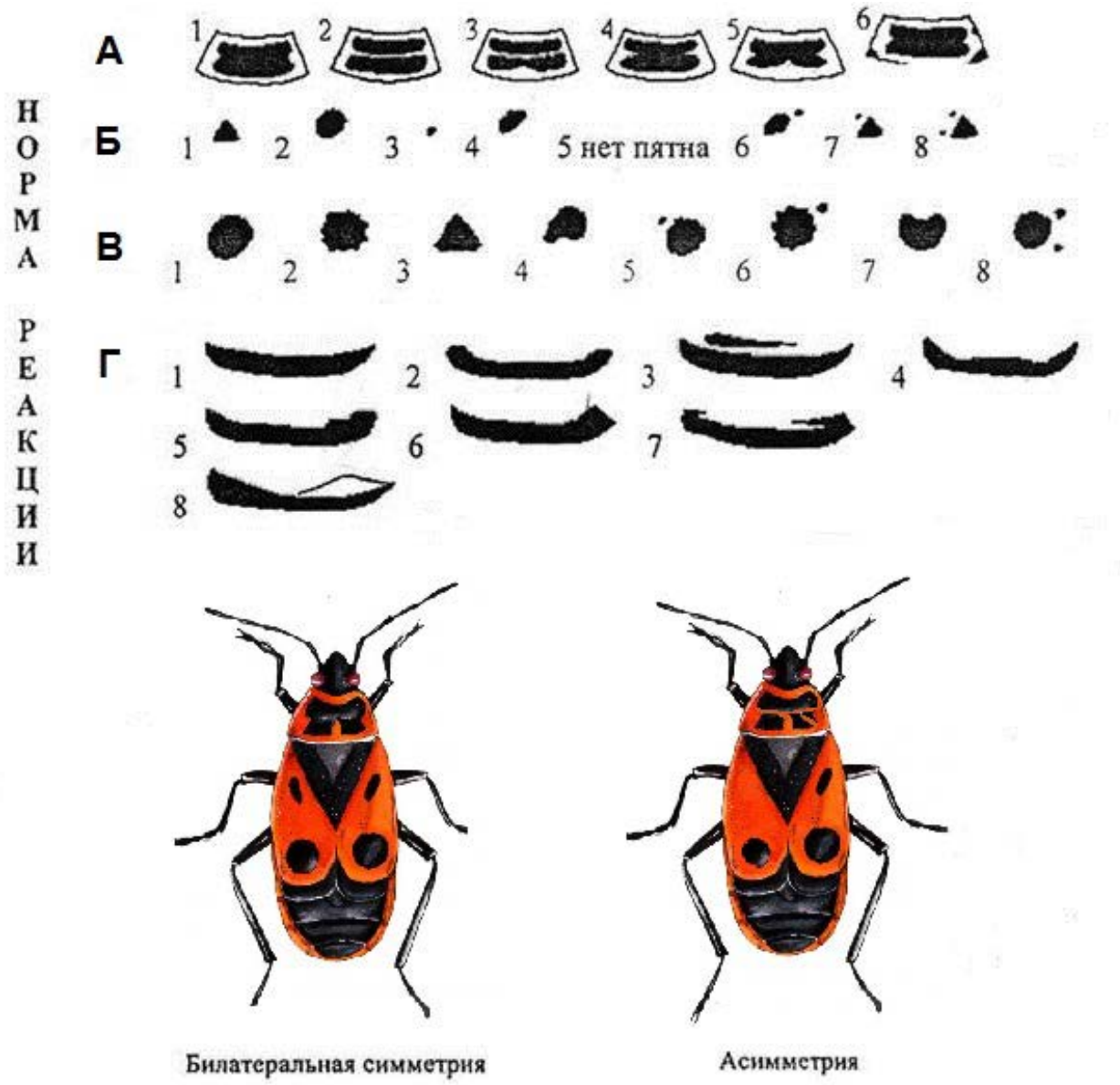


Рисунок 4.2 *- появление флуктуирующей асимметрии в меланизированном рисунке покрова клопа-солдатика.*

Информация, получаемая при анализе уровня формирования признаков методом флуктуирующей асимметрии, отражает уровень стабильности индивидуального развития в целом. Такой подход применительно к клопу-солдатику доступен в исполнении и значим в отношении получения информации о стабильности существования анализируемых популяций.

При прогрессивно возрастающем естественном и антропогенном воздействиях на развитие особей в популяциях клопа-солдатика наблюдается увеличение числа насекомых с асимметрией в меланизированном рисунке покрова.

Цель работы: освоить методику определения асимметрии билатеральных морфологических признаков как способа оценки стабильности развития.

Объекты и средства исследования

1) Коллекционные особи клопа солдатика, собранные на разных территориях.

2) Увеличительное стекло

Ход работы

1.Проанализировать меланизированный рисунок покрова каждого насекомого по наличию асимметричного проявления элементов А, Б, В и Г и определить количество особей с асимметрией одного (А, Б, В и Г), двух (А-Б, А-В, А-Г, Б-В, Б-Г и В-Г), трех (А-Б-В, А-В-Г, А-Б-Г и Б-В-Г) и четырех (П-А-В-D) элементов меланизированного рисунка покрова клопа-солдатика.

2.Вычислить среднюю частоту встречаемости асимметричного проявления элементов меланизированного рисунка покрова клопа-солдатика по формуле:

$$ЧА = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$$

где X_i - число асимметричных признаков в каждой особи, поделенное на число используемых признаков (четыре), n - число особей в выборке.

3.Материалы анализа популяций обобщить и занести в общую **таблицу 4.1**.

Таблица 4.1. Средняя частота встречаемости признаков асимметрии

№ популяции	Место сбора	Объем сбора особей	ЧА			ЧА±ΔЧА

4.Проанализировать качество внешней среды. В случае установления значения ЧА (средней частоты асимметричного проявления элементов меланизированного рисунка покрова клопа-солдатика) менее 0,0500 изучаемую среду относят к первому классу качества - условной норме. В случае установления ЧА от 0,0501 до 0,1036 - ко второму классу качества со слабым антропогенным воздействием, от 0,1037 до 0,1572 - к третьему классу качества с средним антропогенным воздействием, от 0,1573 до 0,2108 - к четвертому классу качества с сильным антропогенным воздействием, более 0,2108 - к пятому классу качества с критическим уровнем антропогенного воздействия.

5.Сделать выводы о качестве среды в районах сбора насекомых.

Вопросы для самопроверки:

1. *Определение биоиндикации*
2. *Определение биотестирования.*
3. *Какой тест-объект использовали в лабораторной работе?*
4. *Тест-реакции для животных.*
5. *Какой подход к биотестированию использовали?*
6. *Требования к биоиндикаторам-животным.*
7. *Принцип морфологического подхода к биотестированию.*
8. *Принцип физиологического подхода к биотестированию.*
9. *Принцип биохимического подхода к биотестированию.*
10. *Перечислите виды животных, используемых для биоиндикации в странах СНГ.*

Лабораторная работа №5 Параметры роста микроорганизмов как тест-функция в методах биотестирования

Культура клеток представляет собой популяцию генотипически однотипных клеток, которые функционируют и делятся *in vitro*. Рост клеточных культур *in vitro* имеет сложный характер. В целом можно выделить следующие фазы:

1) *Индукционный период (лаг-фаза).* В течении лаг-фазы не происходит сколько-нибудь заметного увеличения числа клеток или образования продуктов. Данная фаза обычно наблюдается после пересева клеточной культуры. В ней происходит адаптация микробных клеток к новой культуральной среде, перестраивается метаболизм микробной клетки.

2) *Фаза экспоненциального роста.* Характеризуется быстрым накоплением биомассы и продуктов жизнедеятельности клеточных культур. В данной фазе часто встречаются митозы по сравнению с остальными фазами рота клеточной культуры.

3) В замкнутой культуре фаза экспоненциального роста не может продолжаться бесконечно долго. Она переходит *фазу линейно роста*, характеризующуюся уменьшением числа митозов. В этой фазе наблюдается линейное увеличение числа микробных клеток в зависимости от времени культивирования.

4) *Фаза замедленного роста (переходная фаза).* В этой фазе уменьшается рост клеточной культуры за счет уменьшения числа митозов.

5) *Стационарная фаза.* Наблюдается вслед за фазой замедления роста, при этом число клеток практически не меняется. В этой фазе или происходит прекращение митотического деления клеток, или же число делящихся клеток равно числу умирающих клеток.

6) *Фаза отмирания культуры.* Период в развитии культуры, когда выросшие клетки, исчерпавшие питательные вещества среды, отмирают и автолизируются

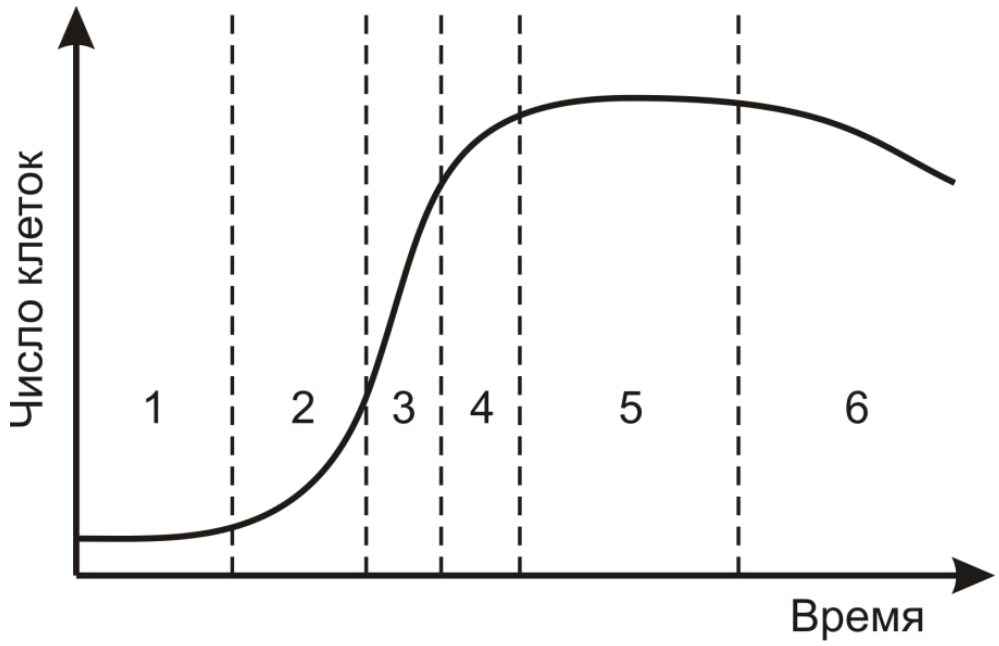


Рисунок 5.1. *Типичная кинетическая кривая роста клеточной культуры*

Последовательные переходы от фазы 1 к фазе 5 наблюдаются в значительной степени за счет истощения субстратов, необходимых для роста популяции клеток, или же за счет накопления токсичных продуктов их жизнедеятельности.

Методы измерения скорости роста микроорганизмов.

1) Прямой подсчет числа клеток с помощью микроскопа. Этот метод не позволяет отличить живые клетки от мертвых.

2) Измерение потребления субстрата или скорости образования продукта.

3) Измерение КОЕ (колонийобразующих единиц). Метод подсчета колоний – метод определения количества жизнеспособных клеток, образующих на плотной среде видимые колонии.

4) Измерение светорассеяния (нефелометрия) или мутности (турбидиметрия).

Турбидиметрия

Размер бактериальных и дрожжевых клеток относится к тому же порядку, что и длины волн видимого света, поэтому бактерии рассеивают свет, то есть имеют мутность. Эту величину можно измерить с помощью

фотометра. Светорассеяние подчиняется уравнению Бугера – Ламберта – Бера:

$$A = \lg \frac{j_o}{j} = \varepsilon \times l \times C$$

где J_0 – интенсивность падающего света, J – интенсивность прошедшего света, ε – коэффициент молярного пропускания, l – ширина кюветы, C – молярная концентрация.

Концентрация линейно зависит от количества клеток микроорганизмов. Обычно при измерении оптической плотности выбирают длины волн в диапазоне λ=500-660 нм. Оптическую плотность измеряют относительно кюветы с чистой средой (или водой). Светорассеяние характеризуется не только количеством частиц, но и их размерами и формами.

Нефелометрия

Метод основан на измерении светорассеяния под углом в 90^0 к падающему пучку света. Это высокочувствительный метод, но он может давать ошибочные результаты, если в среде есть примеси в виде частиц.

Параметры культивирования

1) Количество биомассы, достигнутое в стационарной фазе, называют выходом или *урожаем*. Эту величину выражают в граммах сухого вещества. Под урожаем понимают разность между максимальной и исходной биомассой:

$$X = X_{макс} - X_0 \qquad (1)$$

2) *Выход биомассы* рассчитывают как отношение массы продукта к объёму среды:

$$X = m/V, \qquad (2)$$

где X – выход биомассы, г/л ;

m – масса готового продукта, г

V – объём среды культивирования, л

3) *Продуктивность* по биомассе рассчитывают как отношение конечной концентрации биомассы ко времени культивирования:

$$Q_x = X/t, \quad (3)$$

где Q_x – продуктивность по биомассе, г/(л · ч)

t – время культивирования, ч

4) *Удельная скорость роста* (μ, $с^{-1}$), мера скорости роста клеток в экспоненциальной фазе, измеряемая в единицах, обратных времени. μ зависит от температуры, pH и содержания солей.

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t, \quad (4)$$

где X_0 – биомасса в начальный момент времени t=0.

График зависимости ln(*x)* от времени будет иметь вид прямой линии с наклоном μ.

5) *Время удвоения биомассы* – период, необходимый для удвоения числа клеток в экспоненциально растущей популяции. Зависимость между удельной скоростью роста и временем удвоения (t_d) биомассы находится, исходя из следующих допущений: $X = 2X_0$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0{,}693}{\mu}. \quad (5)$$

Цель работы: определить параметры роста микроорганизмов и изучить влияние ионов тяжелых металлов на выход и продуктивность биомассы микроорганизмов.

Объекты и средства исследования

1) Глюкоза
2) Пептон
3) Дрожжевой экстракт
4) Колбы Эрленмейера объемом 750 $см^3$
5) Соли тяжелых металлов
6) Чистая культура дрожжей *Debaryomyces hansenii*
7) Фотометр Эксперт – 001 (Эконикс-Эксперт, Москва).

Ход работы

1) Подготовить питательную среду на 1 колбу. Состав среды: глюкоза – 10 г/л; пептон – 5 г/л; дрожжевой экстракт – 0,5 г/л, дистиллированная вода 250мл

2) Приготовить 2 колбы со стандартной средой и 6 колб с добавлением солей тяжелых металлов (превышающих ПДК в 100 раз)

ионы	Cu^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Cr^{6+}	Mn^{2+}	Co^{2+}
ПДК*, мг/л	0,001	0,005	0,006	0,01	0,01	0,02	0,1	0,1

*ПДК в рыбохозяйственных водоемах

3) Произвести засев чистой культуры дрожжей. Каждые 2 часа необходимо проводить отбор проб культуральной жидкости (3 мл) в стерильных условиях и измерять оптическую плотность (мутность) при длине волны $\lambda = 590$ нм на фотометрте Эксперт – 001 (Эконикс-Эксперт, Москва).

4) Построить полную кривую роста в программе Sigma Plot (в координатах оптическая плотность - время (ч)) и обработать сигмоидальным уравнением. Выделить на кривой роста все фазы роста.

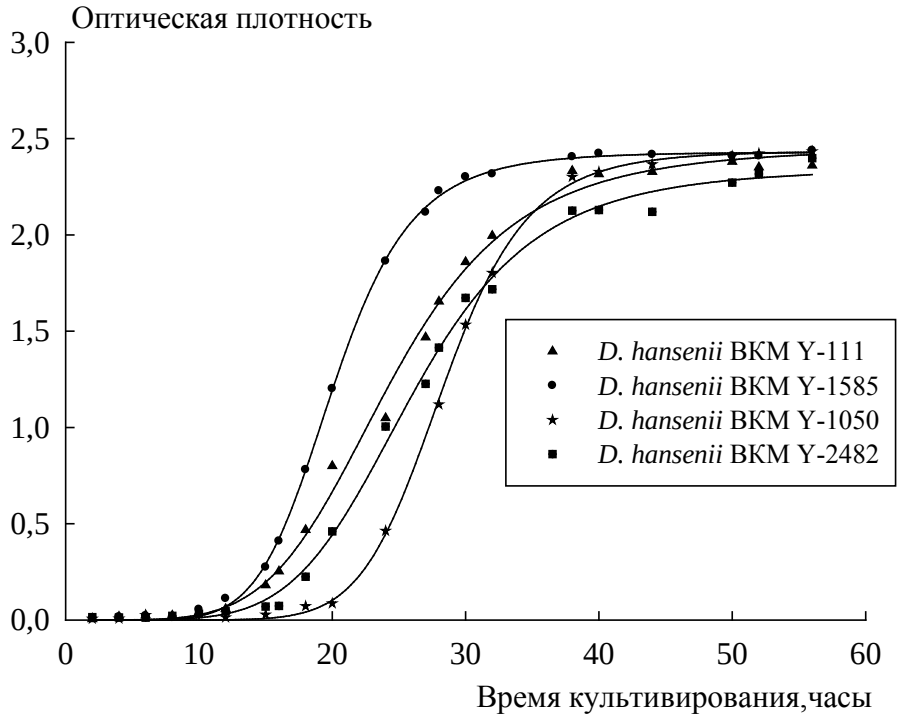
5) Построить линейный участок (экспоненциальная +линейная фаза) роста в координатах натуральный логарифм оптической плотности (lnA) – время (с). Рассчитать по тангенсу угла наклона удельную скорость роста (формула 4). Рассчитать время удвоения биомассы (формула 5).

6) После 48 часов культивирования произвести отбор 40 мл культуральной жидкости и методом центрифугирования (частота 10000 оборотов, время 10 минут) отделить биомассу от культуральной жидкости. Произвести расчет выхода биомассы (формула 2) и продуктивности (формула 3). Сделать вывод о влияние ионов тяжелых металлов на выход биомассы и продуктивность.

7) Написать общий вывод по работе.

Приложение к лабораторной работе №5.

Кривые роста дрожжей *Debaryomyces hansenii*



Параметры	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
	D. hansenii ВКМ Y-111	*D. hansenii ВКМ Y-1585*	*D. hansenii ВКМ Y-1050*	*D. hansenii ВКМ Y-2482*
Время, ч	Оптическая плотность			
2	0,005	0,008	0,007	0,0150
4	0,0170	0,0160	0,008	0,0135
6	0,0240	0,0220	0,0260	0,0120
8	0,023	0,0120		0,0220
10	0,041	0,0550		0,0330
12	0,0570	0,1110	0,0140	0,0455
15	0,1810	0,2740	0,0280	0,0695
16	0,2530	0,4090		0,0730
18	0,4680	0,7800	0,0720	0,2250
20	0,8000	1,2010	0,0870	0,4600
24	1,0490	1,8630	0,4640	1,0045
27	1,4680	2,1171		1,2265
28	1,6540	2,2280	1,1200	1,4145

30	1,8590	2,3010	1,5340	1,6725
32	1,9950	2,3160	1,8030	1,7180
38	2,3320	2,4050	2,3020	2,1260
40	2,3150	2,4230	2,3270	2,1290
44	2,3270	2,4170	2,3670	2,1200
50	2,3800	2,4090	2,4090	2,2715
52	2,3510	2,4090	2,4230	2,3165
56	2,3600	2,4380	2,4340	2,3980

Вопросы для самопроверки:

1. *Определение биоиндикации*
2. *Определение биотестирования.*
3. *Какой тест-объект использовали в лабораторной работе?*
4. *Тест-реакции для микроорганизмов.*
5. *Какой подход к биотестированию использовали?*
6. *Требования к биоиндикаторам.*
7. *Принцип морфологического подхода к биотестированию.*
8. *Принцип физиологического подхода к биотестированию.*
9. *Принцип биохимического подхода к биотестированию.*
10. *Какие биоиндикаторы лучше использовать для биомониторинга загрязнения водной среды?*

Лабораторная работа №6 Биотестирования загрязнения воды с помощью микроорганизмов

Действие токсических веществ, оказывающих вредное воздействие на организмы, по мере их влияния на экосистемы можно разделить на фазы острой и хронической токсичности. Для определения острой токсичности служат экспресс-методы продолжительностью в несколько дней (один - три и более); а для определения хронической токсичности - продолжительные опыты (месяц и более).

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают: среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления вод, содержащих смеси веществ), вызывающую гибель 50% и более тест-организмов; безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления вод, содержащих смеси веществ), вызывающую гибель не более 10 % тест-организмов.

Хроническое токсическое действие исследуемой воды на микроорганизмы оценивают по биомассе культуры за период до 24 суток в исследуемой воде по сравнению с контролем. Критерием хронической токсичности служит снижение биомассы на 20 % и более по сравнению с контролем.

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования включает подготовку посуды, пробоотборников, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемую воду.

Культивационная вода используется для разведения маточной культуры, в качестве контрольной с добавлением питательного раствора для

биотестирования, для разбавления исследуемых вод. Для подготовки культивационной воды питьевую воду отстаивают в течение 3 — 7 сут (до полного дехлорирования) в бутыли из бесцветного стекла. При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества допускается использование поверхностной пресной или грунтовой воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм.

В культивационной воде должны отсутствовать органические загрязняющие вещества, хлор, токсические вещества и антагонистические для ряски организмы (синезеленые водоросли, простейшие, многоклеточные); pH должен быть в пределах 4,5—7,0, температура (20±5)°С.

Цель работы: оценить влияние ионов тяжелых металлов на прирост биомассы культуры дрожжей.

Объекты и средства исследования

1) Глюкоза
2) Пептон
3) Дрожжевой экстракт
4) Триптон
5) NaCl
6) Пробирки, марлевые пробки.
7) Соли тяжелых металлов
8) Чистая культура дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, *Paracoccus yeei*
9) Центрифуга.

Ход работы:

1. В тестирование используют 3-дневный цикл развития микроорганизмов.

2. Приготовить раствор для культивирования объем раствора 1 дм^3 Состав среды: глюкоза – 10 г/л; пептон – 5 г/л; дрожжевой экстракт – 0,5 г/л,**.** Разлить в 13 пробирок по 15 мл.
3. Приготовить по 100 мл растворов солей тяжелых металлов с концентрацией анализируемого иона 1 мг/мл.
4. Рассчитать по закону эквивалентов объем раствора, вносимого в раствор для культивирования (объем раствора 15 или 30 мл) для получения указанных в **таблице 6.1** концентраций ионов, превышающих ПДК в 100 раз.

Приготовить пробирки со стандартной средой с добавлением солей тяжелых металлов (по три пробирки на каждый металл).

Таблица 6.1 Величина ПДК для некоторых ионов тяжелых металлов

Ионы	ПДК*, мг/л
Cu^{2+}	0,001
Cd^{2+}	0,005
Pb^{2+}	0,006
Ni^{2+}	0,01
Zn^{2+}	0,01
Cr^{6+}	0,02
Mn^{2+}	0,1
Co^{2+}	0,1

*ПДК в рыбохозяйственных водоемах

5. Приготовить контрольный раствор, не содержащий ионов тяжелых металлов (объем раствора 15 или 30 мл).
6. Полученные пробирки закрыть марлевыми пробками и простерилизовать.
7. В стерильных условиях засеять культуру дрожжевых клеток и оставить при постоянном перемешивании на 48 ч.

8. Через 48 ч отцентрифугировать полученную биомассу и оценить степень прироста или убыли биомассы относительно контроля в каждой пробирке. Представить данные с учетом доверительных интервалов.
9. Сделать вывод о влиянии ионов тяжелых металлов на прирост биомассы дрожжевых клеток.

Вопросы для самопроверки:

1. *Определение биоиндикации*
2. *Определение биотестирования.*
3. *Какой тест-объект использовали в лабораторной работе?*
4. *Тест-реакции для микроорганизмов.*
5. *Какой подход к биотестированию использовали?*
6. *Требования к биоиндикаторам.*
7. *Принцип морфологического подхода к биотестированию.*
8. *Принцип физиологического подхода к биотестированию.*
9. *Принцип биохимического подхода к биотестированию.*
10. *Какие биоиндикаторы лучше использовать для биомониторинга загрязнения водной среды?*

Лабораторная работа №7 Биодиагностика почв по ферментативной активности

Почва - это единственный компонент ландшафта, который возникает в результате взаимодействия всех других его компонентов: горных пород, климата, природных вод, растительности, микроорганизмов и животных. Являясь основной депонирующей средой, почвы сами могут рассматриваться как интегральный индикатор загрязнения природно-территориального комплекса. Загрязненные почвы являются источниками вторичного загрязнения приземного слоя воздуха, поверхностных и грунтовых вод; из почв растения поглощают минеральные вещества, вовлекая их в биологический круговорот. Таким образом, почвенный покров определяет миграцию химических элементов по цепи питания, поэтому изучение его состояния представляет собой существенную часть работ по оценке влияния антропогенных факторов на природную среду. Основные характеристики почв, которые являются объектом биоиндикации, – кислотность, механический состав, влажность, содержание питательных веществ.

По степени накопления некоторых токсичных веществ в растениях (аккумулятивная биоиндикация) судят о степени загрязнения ими почвы. Принцип метода – определение активности почвенных ферментов – основан на учете количества переработанного в процессе реакции субстрата или образующегося продукта реакции в оптимальных условиях температуры и pH среды. Определяют **каталазу** (катализирует разложение пероксида водорода), образованную в результате биохимических реакций окисления веществ молекулами кислорода; **дегидрогеназы** (группа ферментов из класса оксидоредуктаз, катализирующих перенос протонов); **инвертазу** (гидролизует гликозидную связь в сахарозе и других сахарах с образованием фруктозы и глюкозы); **уреазу** (катализирует реакцию гидролиза мочевины до аммиака и углекислого газа).

Цель работы: определение биологической активности почв на разном удалении от дороги (на примере определения инвертазной и каталазной активности).

Материалы и оборудование:

1. Фотоколориметр;
2. 5%-й раствор сахарозы;
3. Ацетатный буфер (pH 4,7);
4. Толуол;
5. Мерные колбы различного объема
6. Гидроксид калия,
7. Раствор Феллинга;
8. Система для газометрии;
9. 10%-й раствор H_2O_2;
10. $CaCO_3$.

Ход работы

Определение инвертазной активности

Приготовление раствора Феллинга (раствор ***а*** и ***б*** 1:1): Раствор **а** — 40 г $CuSO_4 \cdot 5H_20$ растворяют в воде и доводят объем до 1 л в мерной колбе, фильтруют через бумажный фильтр, раствор **б** – 200 г сегнетовой соли ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_20$) растворяют в дистиллированной воде, прибавляют 150 г КОН и доводят объем до 1 л в мерной колбе.

В пробирки вместимостью 30 мл поместить по 5 г каждого образца почвы, добавить по 10 мл 5%-го раствора сахарозы, 10 мл ацетатного буфера (pH 4,7) и 5 – 6 капель толуола. Пробирки закрыть пробками, встряхнуть, поместить в термостат при температуре 30 °С на 24 ч и периодически встряхивать их. После инкубации содержимое пробирок отфильтровать в мерные колбы на 25 мл. Довести до метки. Из фильтратов взять по 6 мл в большие пробирки, добавить по 3 мл раствора сегнетовой соли и 3 мл раствора сернокислой меди, хорошо перемешать и кипятить на водяной бане 10 мин. Получается красный осадок.

Пробирки с раствором охладить в воде, содержимое отфильтровать в большие пробирки. Прозрачный фильтрат колориметрировать на ФЭК, используя светофильтр с длиной волны 630 нм, ширина кюветы 1 см.

Для получения калибровочной кривой приготовить стандартный раствор: 6 мг глюкозы в 1 мл. Разведением приготовить серию растворов. Фотоколориметрировать и построить кривую вкоординатах: оптическая плотность — концентрация глюкозы в 1 мл. Активность инвертазы (Х) выражают в миллиграммах глюкозы на 1 г почвы за 24 ч по формуле:

$$X = \frac{A2V}{Mv};$$

где А– количество глюкозы, полученное по калибровочной кривой из оптической плотности, мг/мл; М– навеска почвы (5 г); V – общий объем фильтрата, 25 мл; υ – объем фильтрата, взятого для анализа, 6 мл. Ошибка определения – до 5 %. **По таблице 7.1** оценить степень насыщения исследуемых почв инвертазой.

Таблица 7.1. Шкала для оценки степени обогащенности почв ферментами

Степень обогащенности почв	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г за 24 ч
Очень бедная	<5
Бедная	5-15
Средняя	15-50
Богатая	50-150
Очень богатая	>150

Приготовление ацетатных буферных смесей. Для области pH 3,6–5,6 (0,01 М).Основные растворы: **А** – 0,2 М уксусная кислота (11,55 мл уксусной кислоты в 1л воды); **Б** – 0,2 М раствор ацетата натрия (16,4 г $C_6H_3O_2Na$ или 27,2 г $C_6H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ в 100 мл воды):х мл раствора А + у мл раствора Б и разбавить водой до 1 л.

Таблица 7.2. Приготовление ацетатных буферных смесей

X	У	pH	X	У	pH	X	У	pH
46,3	3,7	**3,6**	30,5	19,5	**4,4**	10,5	39,5	**5,2**
44,0	6,0	**3,8**	25,5	24,5	**4,6**	8,8	41,2	**5,4**
41,0	9,0	**4,0**	20,0	30,0	**4,8**	4,8	45,2	**5,6**
36,8	13,2	**4,2**	14,8	35,2	**5,0**			

Определение каталазной активности.

1. Подготовка системы для газометрии к работе:

Прибор состоит из: измерительной бюретки 2, соединенной посредством резиновых трубок с уравнительным сосудом 3 и реакционным сосудом 1 (пробирка или колба) (**рисунок 7.1**).

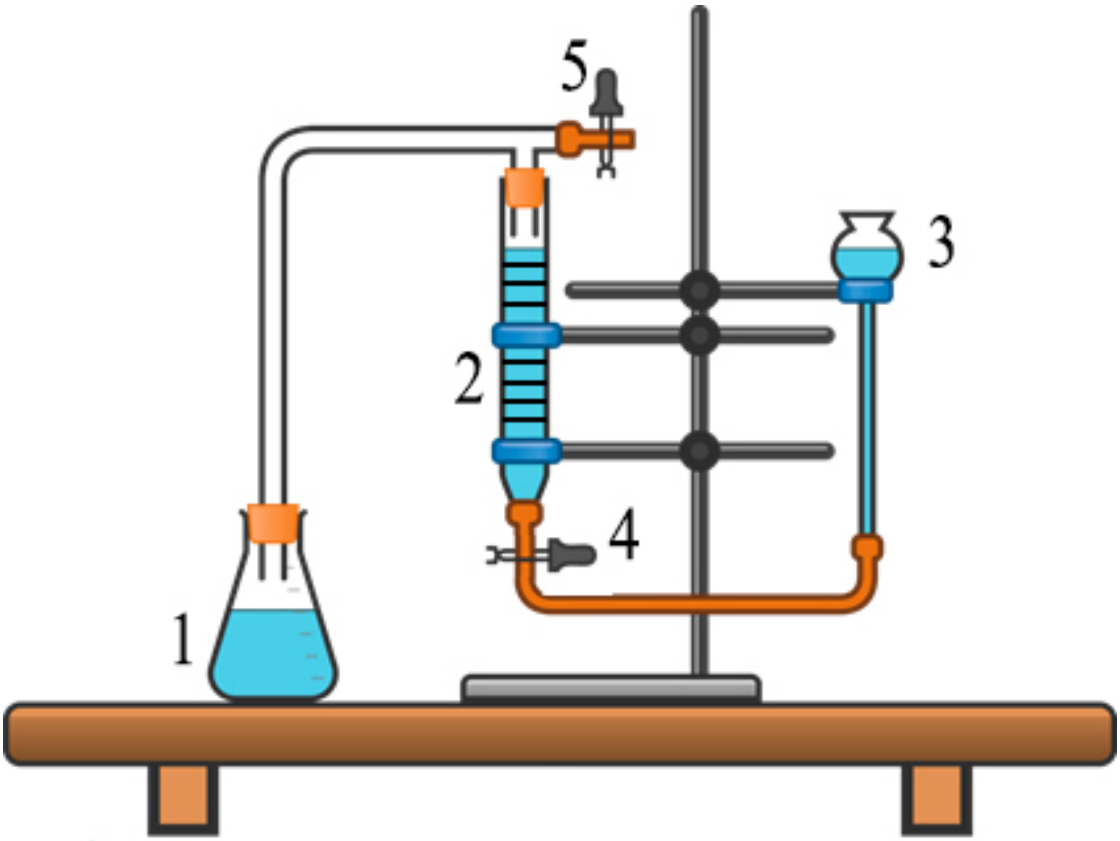


Рисунок 7.1. *Установка для газометрического определения каталазной активности в почвенных образцах*

Бюретка имеет два отвода: один отвод соединяет ее с атмосферой, другой - с реакционным сосудом. Регулировка осуществляется краном 5. Бюретка и уравнительный сосуд, заполненный подкрашенной

дистиллированной водой. Присоедините пустой реакционный сосуд к измерительной части прибора. Соедините бюретку с помощью крана 4 с отводом и установите с помощью уравнительного сосуда 3 уровень жидкости в бюретке 2 точно на нулевой отметке. Отсоедините бюретку от атмосферы и испытайте прибор на герметичность, для чего опустите уравнительный сосуд так, чтобы уровень жидкости в нем был ниже, чем в бюретке. Укрепите неподвижно уравнительный сосуд и если в течение 1-2 мин уровень воды в бюретке будет неподвижен, то можно считать, что прибор герметичен. После проверки прибора на герметичность верните уравнительный сосуд в начальное положение и приступайте к выполнению основного эксперимента. Запишите в таблицу температуру окружающей среды и атмосферное давление в начале и в конце опыта. При расчетах используйте среднее значение.

1. Навеску просеянной почвы 1 г внести в пробирку, добавить 0,5 г $CaCO_3$ и смочить 4 мл дистиллированной воды.

2. В пробирку с почвой прилить 1,7 мл 10%-го раствора перекиси водорода, быстро присоединить к колбе (пробирке) системы для газометрии и отметить начало опыта по секундомеру.

3. Взбалтывать смесь в пробирке следует во все время опыта, не касаясь непосредственно дна пробирки руками. Выделяющийся кислород вытесняет из бюретки воду, уровень которой отмечают. Количество выделившегося молекулярного кислорода учитывают при температуре 18–20^0C.

4. Измерить уровень воды в измерительной бюретке через 5 минут после начала опыта.

5. Активность каталазы выражают в объеме ($см^3$) кислорода, выделившегося на 1 г почвы в минуту. Ошибка определения до 5%.

$$A = \frac{V_{\text{кислорода}}}{5};$$

Таблица 7.2. Шкала для оценки степени обогащенности почв ферментами

Степень обогащенности почв	Каталаза, O_2 $см^3$/г за 1 мин
Очень бедная	<1
Бедная	1-3
Средняя	3-10
Богатая	10-30
Очень богатая	>30

6. Аналогичные процедуры проделать со всеми образцами почв и оценить по **таблице 7.2** обогащённость исследуемых почв каталазой.

Вопросы для самопроверки:

1. *Определение биоиндикации*
2. *Определение биотестирования.*
3. *Тест-функции объектов биотестировани.*
4. *Биохимический подход биотестирования.*
5. *Принцип метода определения активности почвенных ферментов.*
6. *Ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз.*
7. *Классификация ферментов.*
8. *Специфичность ферментов.*
9. *Ингибирование ферментативной активности.*
10. *Зависимости активности ферментов от температуры и pH.*

Лабораторная работа №8 Определение растворенного кислорода с помощью портативного анализатора для мониторинга объектов окружающей среды

Определение содержания растворенного кислорода является важной задачей. Уровень растворенного кислорода в природных водах часто прямой показатель их качества. При понижении температуры растворимость кислорода увеличивается. Так, зимой концентрация кислорода в естественных водах высока (около 20 мг/дм^3, летом же может быть 4-5 мг/дм^3). Растворенный кислород необходим для поддержания жизни водоема – необходим для аэробного окисления.

Цель работы: научиться применять современные аналитические приборы для решения практических задач в области экологии.

Объекты и средства исследования:

1) Анализатор “Эксперт-001”.
2) 2% раствор сульфита натрия.
3) Дистиллированная вода.
4) Водопроводная вода.
5) Пробы речной воды.

Ход работы

Анализатор “Эксперт-001” предназначен для измерения концентрации растворенного кислорода (O_2) в анализируемых пробах. В **таблице 8.1** приведены его основные характеристики.

Таблица 8.1.Основные характеристики прибора:

Параметр		*Значение*
Диапазон измерений	O_2	от 0,00 до 20,00 мг/ $дм^3$
	температуры	от 0 до 40 ˚С
Дискретность	O_2	0,01 мг/л
	температуры	0,1 ˚С
Приведенная погрешность измерения O_2		±2,5%
Абсолютная погрешность измерения температуры.		±0,5 °С

Подготовка прибора к работе включает следующие этапы:

1) подключить датчика к разъему “**ИЗМ**”;

2) установить элементы питания (при подключении блока питания элементы питания автоматически отключаются);

3) провести поляризацию электродов (при первом использовании поляризация должна быть не менее 1 часа).

Включение анализатора осуществляется нажатием кнопки **“ВКЛ”.**

Градуировка анализаторов по концентрации кислорода

Калибровку датчика ДКТП-02 необходимо повторять не реже 1 раза в месяц. Подготовить свободную от кислорода водную среду с температурой (20 ± 5) °С. Для этого приготовить раствор сульфита натрия (Na_2SO_3) в дистиллированной воде с концентрацией 80 г/л. Раствор после приготовления необходимо выдержать не менее 20 минут.

Подключить кислородный датчик к разъему “**O_2**” или «**T/O_2**» измерительного преобразователя. Включить анализатор, войти в режим “**Доп.Режим**” и нажать кнопку “**ВВОД**”.

Ввести в память анализатора значение атмосферного давления. Для этого с помощью кнопок “◄“ и “►“ войдите в опцию “**[Давление мм.рт.ст]**”, нажмите кнопку “**ВВОД**”. На дисплее появится надпись с каким-либо значением давления, например:

[Давление мм]

760.0

Нажать кнопку “**Числ**”. Появится сообщение “**Введите число**”. Ввести значение атмосферного давления, измеренное барометром и нажать кнопку “**ВВОД**”. После сообщения

Ввод изменения?

ДА - ВВОД НЕТ - ОТМ

нажать последовательно кнопки “**ВВОД**” и “**ОТМ**”. Вы вернетесь в режим “**Доп.Режим**”.

Кнопками “◄“ и “►“ войти в опцию “**Калибр.O_2**” и нажмите кнопку. При этом на дисплее появится окно с таблицей, со значениями температур растворов (левый столбец), сопротивлением термодатчика (средний столбец) и значениями тока (правый столбец), например:

T ^{0}C	**R Ом**	**I мкА**
нулевой раствор		**0.0014**
10.0	**901**	**0,1024**
33.0	**1079**	**0,2451**

Провести градуировку анализатора по нулевому значению кислорода.

Поместить датчик кислорода в приготовленный раствор сульфита натрия и выдержите не менее 10 мин. Кнопками “◄“ и “►“ выбрать первой строку таблицы с надписью «нулевой р-р». Нажать кнопку “**Изм**”.

После установления постоянного значения тока в правом столбце нажать кнопку “**ВВОД**”. Появится сообщение:

Ввод изменения ?

ДА - ВВОД НЕТ - ОТМ

Нажать кнопку “**ВВОД**”. Первая точка градуировки будет занесена в память ИП.

Вынуть датчик из раствора и тщательно промыть дистиллированной водой. Провести градуировку анализатора по 100%-ному насыщению воды кислородом воздуха при двух температурах диапазона температурной компенсации следующим образом.

В емкость с дистиллированной водой поместить датчик. Воду термостатировать с точностью поддержания температуры ± 0,1°С и насытить кислородом воздуха с помощью микрокомпрессора до 100% насыщения не менее 60 минут.

Установить в термостате температуру воды в начале диапазона температурной компенсации, например 10 °С. Перейти ко второй точке градуировки (следующая строка таблицы). Для этого кнопкой "►" выбрать вторую строку таблицы. Если в левом столбце записана температура, отличающаяся от температуры в термостате, нажать кнопку "**Числ**", и ввести температуру, установленную для термостата, подтвердив нажатием клавиши **ВВОД**". Затем нажать кнопку "**Изм**". При этом одновременно идет калибровка термодатчика, встроенного в датчик ДКТП-02. После установления постоянного значения тока в правом столбце нажать кнопку "**ВВОД**". Появится сообщение:

Ввод изменения ?

ДА - ВВОД НЕТ - ОТМ

Нажать кнопку "**ВВОД**". Первая точка градуировки будет занесена в память ИП.

После сообщения

Ввод изменения?

ДА - ВВОД НЕТ - ОТМ

нажать кнопку "**ВВОД**".

Аналогично провести градуировку в третьей точке градуировки (третья строка таблицы) например при температуре 33 °С.

Калибровка датчика ДКТП-02 по 1 точке.

При отсутствии термостата возможна калибровка датчика ДКТП-02 по 1 контрольной точке. Для калибровки по 1 точке комплекс должен иметь в памяти калибровку по 3 точкам, методика проведения которой описана выше. Такую калибровку рекомендуется проводить каждый день перед началом работы.

Для калибровки по 1 контрольной точке снять с датчика транспортировочный кожух, и вылить из него воду, мембрану датчика аккуратно промакнуть фильтровальной бумагой, после чего надеть кожух обратно на датчик, не накручивая его. Таким образом, датчик должен находиться во влажной атмосфере, которая будет обеспечиваться остатками воды на стенках кожуха. Накручивать кожух не допускается, т.к. при этом внутри возникнет повышение давления, что исказит результаты калибровки. Прибор перевести в режим «Термооксиметр» и нажать кнопку “**Изм**”. После стабилизации показаний, не прерывая измерения, нажать кнопку “**Клб**” и “**ВВОД**”. Период установления показаний зависит от того, как долго датчик хранился без использования. Если датчик ежедневно используется для измерений, то время установления показаний порядка 4-5 минут. При длительном хранении (неделя и больше) время установления показаний может достигать 30-40 минут. При дальнейшей работе период установления показаний датчика нормализуется и составляет 4-5 минут.

После сообщения

Давление

Введите число

Ввести текущее атмосферное давление в мм. рт.ст. и нажмите кнопку “**ВВОД**”.

Прибор автоматически рассчитает необходимую поправку и внесет ее в память. Режим измерения кислорода с учетом поправочной точки индицируется знаком “+” на дисплее справа. Для отказа от использования поправочной точки необходимо в режиме измерения кислорода нажать “**Клб**” и “**ОТМ**”, при этом прибор вернется к расчету концентрации кислорода по проведенной ранее калибровке по 3 точкам. Для повторного включения поправочной точки необходимо вновь проделать все процедуры, описанные в настоящем разделе.

Измерение содержания кислорода в пробе

Датчик опустить в раствор (вода из-под крана, речная вода, вода из аквариума и т.д.), где необходимо измерить содержание кислорода. Для измерения концентрации растворенного кислорода и температуры в анализируемой среде кнопками **“←“** и **“→“** установите режим **“Термооксиметр”**. На дисплее появится надпись:

Выбор режима

Термооксиметр

Нажмите кнопку **“ИЗМ”**. На дисплее появится результат измерения температуры и концентрации кислорода, отсчет времени измерения, например:

xx.xx ^{0}C 00 : 02

x.xx мг/дм^3

Отметить установившиеся значения результата измерения.

Выход из режима измерений осуществляется нажатием кнопки **“ОТМ”**.

Оформление результатов работы

1) Нарисовать схему установки. Описать порядок калибровки прибора.
2) Записать результаты определения содержания кислорода в различных жидких средах. Сделать вывод о соответствии содержания растворенного кислорода в анализируемых водных объектах нормативам.

Вопросы для самопроверки:

1. *Для чего определяют содержание растворенного кислорода в воде.*
2. *Что происходит с содержанием растворенного кислорода в воде с понижением и с повышением температуры и почему.*
3. *Для чего в работе применяли раствор сульфита натрия?*

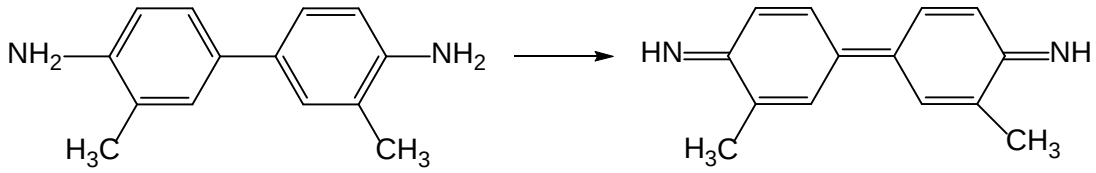
4. *Что из себя представляет датчик в приборе.*
5. *Принцип метода определения растворенного кислорода в пробе.*
6. *Как меняется содержание кислорода в растворе при изменении внешних условий?*
7. *Для решения каких экологических задач можно применять используемый в работе метод?*
8. *Принцип метода определения кислорода в пробе.*

Лабораторная работа № 9 Энзиматический метод количественного определения глюкозы в растворе

Метод предназначен для специфического определения содержания глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ не углеводной природы. Метод основан на каталитическом действии глюкозооксидазы (1.1.3.4), ускоряющей окисление β-D-глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты. Глюкозооксидаза (М=152 000 Да) относится к флавопротеинам. При окислении глюкозы в ее присутствии образуется пероксид водорода в эквимолярном количестве:

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{глюкозоксидаза}} C_6H_{12}O_7 + H_2O_2$$

Пероксид водорода разлагается ферментом пероксидазой, а выделившийся атомарный кислород окисляет добавленный к реакционной смеси хромогенный кислородный акцептор. В качестве такового применяют *о*-толидин:



восстановленная форма окисленная форма

Количественное определение глюкозы сводится к измерению экстинкции образовавшегося в опыте красителя и сравнению ее с таковой при использовании стандартного раствора глюкозы. Прямая зависимость между содержанием глюкозы и интенсивностью окраски сохраняется в пределах от 50 до 400 мг/л.

Цель работы: определить концентрацию глюкозы энзиматическим методом.

Реактивы и оборудование:

1) фотометр;

2) секундомер;

3) автоматические пипетки переменного объема;

4) пробирки;

5) 1%-ный раствор перекристаллизованного в абсолютном этаноле *о*-толидина;

6) ацетатный буфер pH=4,8 ((0,25 Н) 4 части 0,25 н уксусной кислоты смешивают с 6 частями 0,25 н ацетата натрия);

7) стандартные растворы глюкозы (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл), приготовленные на насыщенном водном растворе бензойной кислоты;

8) *Рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом.* К 70-80 мл 0,25 н. ацетатного буфера (pH=4,8) добавляют 2 мг глюкозооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1%-ного раствора *о*-толидина и доводят объем пробы до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1 – 2 ч до употребления. Он может храниться в холодильнике в темных закрытых склянках в течении 1–1,5 месяцев.

Ход работы:

1) В ходе реакции развивается окраска, интенсивность которой постепенно возрастает и достигает своего максимума при комнатной температуре через несколько минут после прибавления рабочего реактива (в зависимости от активности препарата глюкозооксидазы). Поэтому предварительно определяют время, необходимое для развития максимальной синей окраски по стандартному раствору глюкозы с концентрацией 400 мкг/мл. К пробе, содержащей 1 мл исследуемого образца, приливают 3 мл рабочего реактива для определения глюкозы и измеряют изменение интенсивности окраски стандартного раствора глюкозы после добавления рабочего реактива на фотометре Эксперт-001 с длиной волны 655 нм (кювета с длиной светового пути 10 мм), значения записывают каждые 30 сек. Сначала интенсивность окраски увеличивается, далее остается неизменной в

течение нескольких минут, а затем начинает медленно уменьшаться. После получения максимума оптической плотности измерения проводят еще 2 минуты. В соответствии с полученными данными строят график зависимости оптической плотности от времени. По полученному графику определяют время достижения максимальной оптической плотности (t_{Amax}).

2) Готовят серию стандартных растворов глюкозы в соответствие с **таблицей 9.1.**

Таблица 9.1. Состав стандартных растворов глюкозы

№	Стандартный (400 мкг/мл) раствор глюкозы, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация глюкозы, мкг/мл
1	0,125	0,875	50
2	0,250	0,750	100
3	0,375	0,625	150
4	0,500	0,500	200
5	0,625	0,375	250
6	0,750	0,250	300
7	0,875	0,125	350
8	1,000	—	400

3) Прибавление рабочего реактива в каждую пробирку проводят в определенной последовательности с точным интервалом в 2 минуты. Эту последовательность следует соблюдать и при измерении оптической плотности растворов по достижении времени t_{Amax}. Измерения проводят три раза.

4) На основании полученных величин оптической плотности (экстинкции) для всех стандартных растворов глюкозы строят градуировочную зависимость с учетом доверительных интервалов.

5) Для определения содержания глюкозы в анализируемых образцах (сок, вино и т.п.) проводят расчет величины разбавления по закону эквивалентов. При этом учитывают, что значение оптической плотности полученное для анализируемых образцов должно попасть в градуировочный

график, а для уменьшения погрешности должно быть близким к середине градуировочной прямой. Оптическую плотность анализируемых образцов также следуем измерять только после прохождения времени t_{Amax}. По построенной градуировочной зависимости рассчитывают количество глюкозы в исследуемых пробах.

Оформление результатов

1) Описать принцип метода, тип преобразователя и биологического материала.

2) построить график зависимости оптической плотности от времени.

3) Построить градуировочный график по стандартным образцам глюкозы с учетом доверительных интервалов.

4) Определить и рассчитать содержание глюкозы в анализируемых образцах, сравнить со значениями заявленными производителями.

Вопросы для самопроверки:

1. *Принцип энзиматического метода определения концентрации глюкозы.*
2. *Какие ферменты использовались в работе.*
3. *Специфичность этих ферментов.*
4. *Какая бывает специфичность ферментов.*
5. *В каком диапазоне можно проводить определение глюкозы данным методом. Почему?*
6. *Какие примеси могут мешать определению глюкозы данным методом.*

Лабораторная работа № 10 Биосенсорный анализатор биохимического потребления кислорода

Биохимическое потребление кислорода (БПК) — количество растворенного кислорода (мг), необходимое для окисления всех биоразлагаемых органических веществ, находящихся в 1 $дм^3$ воды. БПК не включает расходование кислорода на нитрификацию. Полученный результат характеризует суммарное содержание биохимически окисляемых органических примесей в воде, БПК характеризует способность воды к самоочищению.

Различают полное биохимическое потребление кислорода ($БПК_{полн.}$) и биохимическое потребление за определённый период времени (обычно берут период 5 суток – $БПК_5$). Полным биохимическим потреблением кислорода ($БПК_{полн.}$) считается количество кислорода, требуемое для окисления органических примесей до начала процессов нитрификации. Количество кислорода, расходуемое для окисления аммонийного азота до нитритов и нитратов, при определении БПК не учитывается.

Считается, что время достижения $БПК_{полн}$ равно времени, в течение которого процесс заканчивается на 99%. Для бытовых сточных вод (без существенной примеси производственных) определяют $БПК_{20}$, считая, что эта величина близка к $БПК_{полн}$. Полная биологическая потребность в кислороде $БПК_{полн.}$ для внутренних водоемов рыбохозяйственного назначения (I и II категории) при 20^oC не должна превышать 3 $мг/дм^3$. В лабораторных условиях наряду с $БПК_{полн.}$ определяется $БПК_5$ - биохимическая потребность в кислороде за 5 суток. В поверхностных водах величины $БПК_5$ изменяются обычно в пределах 0,5 – 4 $мг/дм^3$ и подвержены сезонным и суточным колебаниям.

Биохимическое окисление различных органических веществ происходит с разной скоростью. К легкоокисляемым, **«биологически мягким»**, веществам относят формальдегид, глюкозу, мальтозу, низшие

алифатические спирты, фенол, фурфурол и др. Константы скорости их окисления составляют 1,4 – 0,3 суток$^{-1}$. Среднее место (К = 0,29 – 0,05 сут.$^{-1}$) занимают крезолы, нафтолы, ксиленолы, резорцин, пирокатехин, пирогаллол, анионоактивные ПАВ и другие. К медленно разрушающимся **«биологически жестким»** веществам (К = 0,049 – 0,02 сут.$^{-1}$) относятся тимол, гидрохинон, неионогенные ПАВ и др. Зависит скорость окисления и от того, в какой мере присутствующая микрофлора адаптировалась именно к тем веществам, которые находятся в исследуемой воде.

Сезонные изменения БПК зависят в основном от изменения температуры и от исходной концентрации растворенного кислорода. Влияние температуры сказывается через ее воздействие на скорость процесса потребления, которая увеличивается в 2-3 раза при повышении температуры на 10оС. Влияние начальной концентрации кислорода на процесс биохимического потребления кислорода связано с тем, что значительная часть микроорганизмов имеет свой кислородный оптимум для развития в целом и для физиологической и биохимической активности.

Суточные колебания величин БПК5 также зависят от исходной концентрации растворенного кислорода, которая может в течение суток изменяться на 2,5 мг/дм^3 в зависимости от соотношения интенсивности процессов его продуцирования и потребления. Весьма значительны изменения величин $БПК_5$ в зависимости от степени загрязненности водоемов **(таблица 10.1)**.

Таблица 10.1. Классы качества вод в зависимости от значения БПК.

Степень загрязненности воды	Значения БПК, мг/дм^3	Класс качества воды
Очень чистая	до 0,2	I
Чистая	0,2–1,0	II
Умеренно загрязненная	1,0–2,0	III
Загрязненная	2,0–4,0	IV

Грязная	4,0–6,0	V
Очень грязная	6,0–10,0	VI
Чрезвычайно грязная	>10,0	VII

В классическом методе определения БПК загрязненная вода смешивается с чистой аэрируемой водой. Смесь разливается в пузырьки, которые закрываются таким образом, чтобы над жидкостью не оставалось слоя воздуха.

Рисунок 10.1. *Колба для стандартного метода определения БПК*

Микроорганизмы из загрязненной воды потребляют кислород, поэтому нужно быть уверенным, что он сохраняется в анализируемой воде все пять дней. Если кислород исчерпан или его концентрация становится очень низкой, результаты такого анализа использовать нельзя. Следовательно, разведение следует провести таким образом, чтобы хотя бы в одной склянке уровень кислорода оставался бы высоким и через 5 суток. Исходя из потребления кислорода в течение 5 суток и объема загрязненной воды в склянке, можно рассчитать БПК (в г/м^3 или мг/дм^3).

Для оперативного анализа разрабатываются методы оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов. Исследования по созданию БПК – биосенсоров проводятся с конца 70 годов прошлого века, но разработки таких систем интенсивно продолжаются и в настоящее время. Следует отметить, что с помощью биосенсоров возможно быстрое определение БПК (БПКбс), которое не всегда идентично величине

традиционного $БПК_5$. В последнее время развиваются новые подходы в биосенсорном анализе БПК, которые позволяют достичь приемлемой корреляции между показаниями биосенсора и традиционных методов. Корреляция данных, полученных с помощью биосенсорного анализатора, с данными, полученными методом $БПК_5$, могут иметь значения порядка 0,95 – 0,98. Так, для калибровки БПК биосенсора используют специализированные синтетические сточные воды, или биораспознающий элемент БПК биосенсора создают на основе специфических микроорганизмов, способных к эффективному окислению веществ конкретных стоков.

В качестве растворов для калибровки БПК-биосенсоров используют смеси органических соединений (так называемые синтетические сточные воды) обычно используется раствор смеси глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС) с концентрацией 150мг/дм^3 каждого компонента (суммарно 300мг/дм^3, что соответствует БПК 205 мг/дм^3 согласно ПНДФ 14.1:23.4.123-97). Таким образом, $БПК=0{,}683 \cdot С(ГГС)$, мг/дм^3

Цель работы

1. Познакомиться с методом экспресс-определения БПК с использованием микробного амперометрического биосенсора.
2. Объекты и средства исследования
3. Пробирки на 1,5 см3 типа «Эппендорф»
4. Автоматические пипетка переменного объема от 0,5 до 5000 мкл
5. Магнитная мешалка
6. pH-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 (научно-производственная фирма «Эконикс-эксперт», Москва)
7. Персональный компьютер
8. Измерительная ячейка (кювета) объемом 5 мл.
9. Глюкоза
10. Глутаминовая кислота
11. Вода дистиллированная.

Программа работы

Принцип метода

Для определения индекса БПК используется кислородный электрод, модифицированный микроорганизмами и анализатор pH-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1, который позволяет регистрировать содержание растворенного кислорода в кювете **(рисунок 10.2)**.

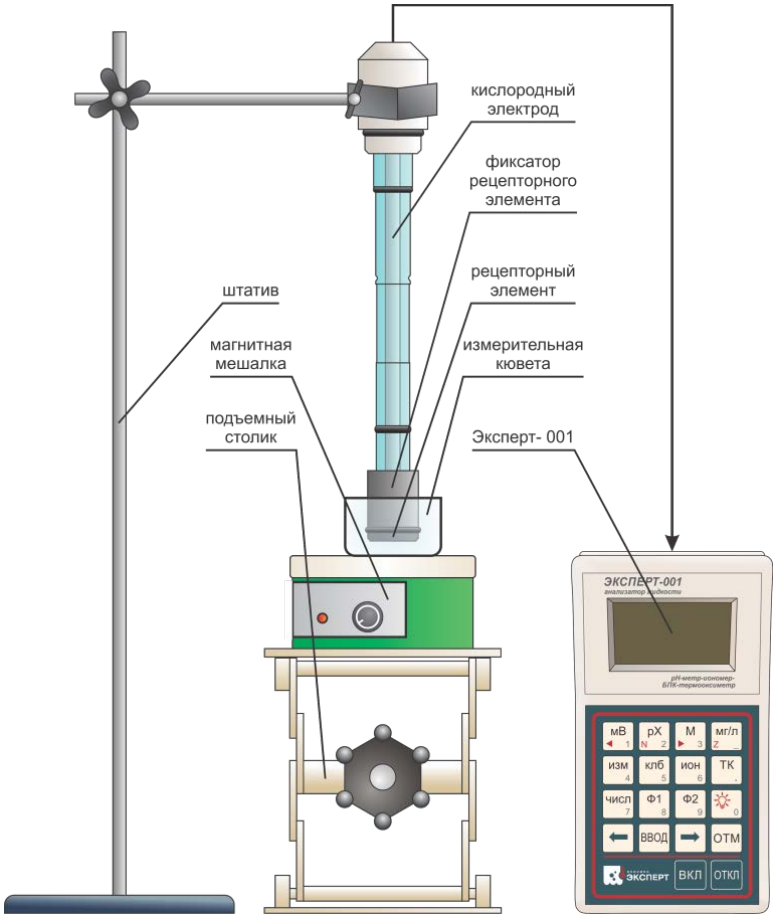


Рисунок 10.2. *Макет-БПК-биосенсора на основе БПК-термооксиметра ЭКСПЕРТ-001-4.0.1*

Подключение к персональному компьютеру позволяет управлять прибором, измерительный датчик представляет собой кислородный электрод типа Кларка, модифицированный биорецепторным элементом на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов. Измерения проводятся в кювете объемом 5 $см^3$, снабженной якорем магнитной мешалки. В кювету помещают буферный раствор и анализируемую пробу. При введении субстрата в измерительную ячейку микроорганизмы окисляют его, в

результате возрастает дыхательная активность клеток и в приэлектродном пространстве снижается концентрация кислорода, что регистрируется с помощью датчика растворенного кислорода, подключенного к анализатору «Эксперт – 001». На монитор компьютера, интегрированного с биосенсорной системой, выводится графическое отображение изменения содержания растворенного кислорода от времени (**рисунок 10.3**). По полученному графику с помощью программы Microsoft Excel вычисляется ответ сенсора (R) как максимальная скорость изменения содержания кислорода от времени. (**рисунок 10.4**)

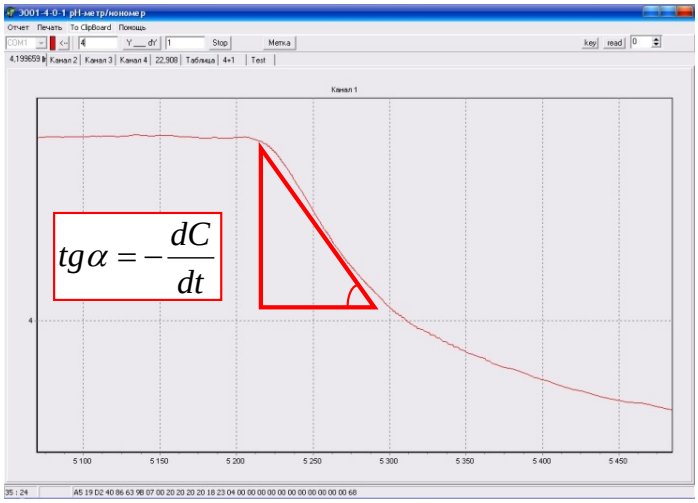


Рисунок 10.3. *Вид ответа биосенсора кюветного типа на добавление субстрата*

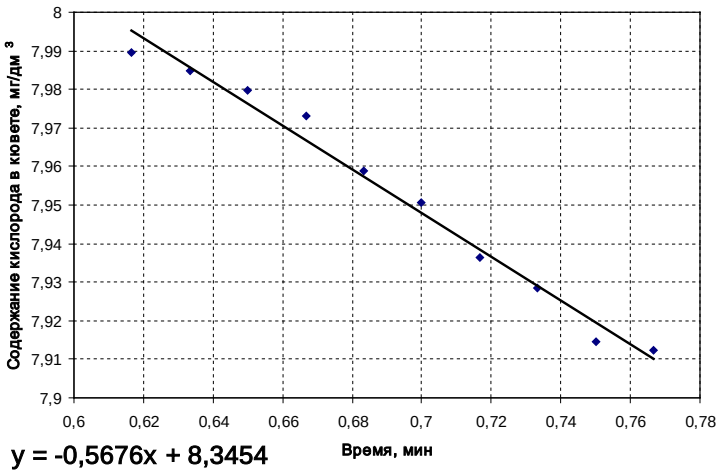


Рисунок 10.4*. Обработка ответа биосенсора в компьютерной программе Microsoft Exel (ответ биосенсора 0,5676 мг/дм^3 мин).*

Подготовка к измерению

Включение прибора «Эксперт – 001» осуществляют нажатием кнопки **«ВКЛ»** на рабочей панели анализатора. Выбирают режим работы – термооксиметр. На компьютере запускают программу «Exp2pr».

Проверяют работу электрода. Для подготовки датчика к работе заполняют внутреннее пространство электрода раствором электролита хлорида калия (прилагается в комплекте к датчику). Помещают электрод в свежеприготовленный перемешиваемый 2 % раствор сульфита натрия. В случае нормальной работы электрода по истечении 1-2 мин величина растворенного кислорода изменится до 0 мг/дм^3. Фиксируют на поверхности кислородного электрода рецепторный элемент и опускают его в электрохимическую ячейку, содержащую буферный раствор.

Проведение измерений

Для получения аналитического сигнала (отклика биосенсора) погружают электрод с биорецепторным элементом в буферный раствор, включают мешалку. В программе Exp2pr выбирают номер порта и подтверждают выбор клавишей <··, затем выбирают интервал значений оси концентраций кислорода и нажимают кнопку «**Start**». После получения стационарной концентрации кислорода в кювете, сохраняющейся в течение 1-2 минут, начинают запись данных нажатием кнопки «Записать интервал» и вводят с помощью автоматической микропипетки анализируемую пробу. Анализ проводят в течение 2-3 минут, считая от начала снижения концентрации кислорода на кривой отклика (концентрация кислорода функция времени).

Для завершения анализа снимают галочку в разделе «Записать интервал» и сохраняют таблицу в файл. Открывают сохраненный файл в программе Microsoft Excel, строят точечную диаграмму зависимости изменения концентрации кислорода от времени. На построенной диаграмме выбирают нисходящий прямолинейный участок и рассчитывают для него

тангенс угла наклона (**рисунок 10.4)**. Тангенс угла наклона соответствует коэффициенту “а” в уравнении прямой, полученном при аппроксимации линейного участка. Строят градуировочную зависимость ответа модифицированного электрода от концентрации ГГС. Между измерениями проводят промывание кюветы и электрода раствором буфера по 3 $см^3$ до выхода содержания кислорода в кювете на начальный уровень.

При этом принимают в расчет, что значение БПК пробы стандартной смеси = 0,683* концентрацию смеси ($С_{глюкозы}$ + $С_{глутаминовой\ кислоты}$). Оценку индекса БПК, соответствующего анализируемой пробе производят с помощью полученной градуировочной зависимости по раствору глюкозо-глютаминовую смеси (ГГС).

Выключение прибора осуществляют в последовательности: закрыть компьютерную программу, выключить прибор кнопкой «**ОТКЛ**» на приборной панели.

Оформление работы

1) Нарисовать схему биосенсорной установки, описать формирование рецепторного элемента.

2) Заполнить таблицу для построения градуировочной зависимости, которая содержит столбец с расчетными данными БПК

3) Построить график зависимости в координатах: ответ сенсора (мг/$дм^3$ с) – БПК (мг/$дм^3$) с помощью компьютерных программ обработки данных.

4) Привести результаты статистической обработки полученной прямой: параметры уравнений со стандартным отклонением, коэффициент смешанной корреляции R^2.

5) Рассчитать БПК неизвестной пробы. Данные представить с доверительным интервалом.

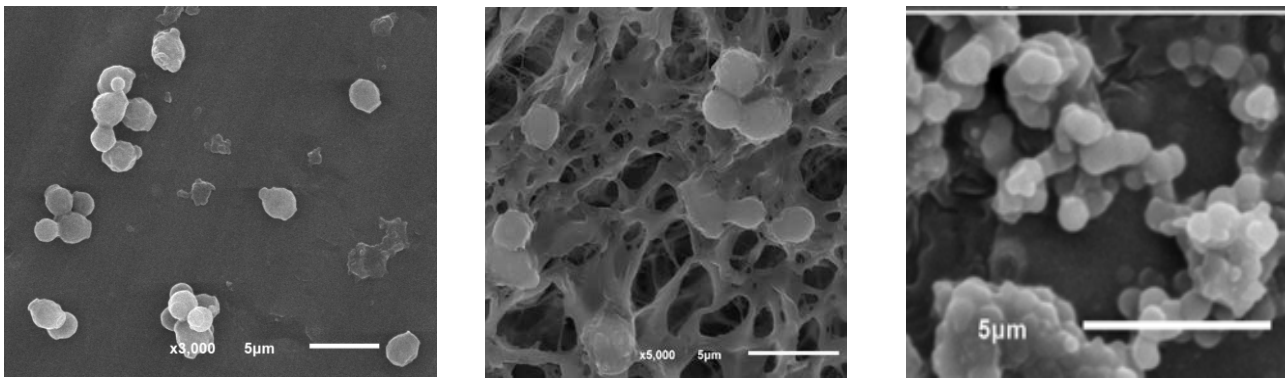
Вопросы для самопроверки:

1. *Дайте определение понятию «биосенсор».*
2. *К биосенсорам какого типа относится биосенсор, используемый в работе.*
3. *Принцип работы кислородного электрода Кларка.*
4. *Сколькиэлектродная система в кислородном электроде Кларка.*
5. *Какой метод иммобилизации биоматериала применяется в работе.*
6. *Почему в качестве анализируемого вещества использовали UUC/*
7. *Принцип метода определения БПК.*

Лабораторная работа №11 Определение субстратной специфичности микроорганизмов, иммобилизованных различными способами

Важной характеристикой любого анализа является его селективность, т.е. возможность определения каждого компонента независимо от других. В случае биосенсорного анализа селективность определяется субстратной специфичностью биоматериала, используемого для формирования рецепторного элемента сенсора. Каждый микроорганизм имеет определенную субстратную специфичность, то есть, способен окислять определенный набор субстратов. Чем меньше субстратов способна окислять используемая культура, тем выше селективность анализа.

Для определения только одного компонента системы необходимо использовать строго специфичные ферменты. Но для определения интегральных характеристик лучше использовать целые клетки, так как они являются не селективными, в силу того, что в их состав входит огромное количество разнообразных ферментов. Целые клетки применяются при мониторинге окружающей среды, для измерения величины биохимического потребления кислорода (БПК). В этом случае широкая субстратная специфичность используемого рецепторного элемента является преимуществом, так как приводит к повышению правильности результатов анализа.



а) б) в)

Рисунок 11.1. *Дрожжи Debaryomyces hansenii ВКМ Y-2482.* ***а)*** *в свободном состоянии;* ***б)*** *иммобилизованные в гидрогель модифицированного поливинилового спирта;* ***в)*** *иммобилизованные в золь-гель матрицу*

Дрожжи *Debaryomyces hansenii* выделены из соленых сред, таких как морская вода, концентрированные рассолы, соленая пища. Они относятся к одним из самых галотолерантных видов дрожжей, т.е. они могут расти в среде, содержащей 4 M NaCl. Микроорганизмы *D. hansenii* имеют огромный биотехнологический потенциал в агропромышленной и пищевой промышленности (производство сыров и колбас). Дрожжи *Debaryomyces hansenii* способны к окислению огромного спектра органических веществ (спирты, углеводы, карбоновые кислоты, аминокислоты, нитрофенолы, поверхностно-активные вещества), которые могут быть обнаружены в сточных водах.

Иммобилизация – ключевой момент в получении стабильного распознающего элемента биосенсора, от которой зависит сама возможность измерения сигнала, операционные характеристики сенсора, чувствительность и селективность определения биологических компонентов в смесях сложного состава.

Иммобилизацию ферментов и микроорганизмов можно рассматривать как прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему, при этом молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между закреплённым биоматериалом и раствором. Метод иммобилизации можно считать

пригодным, если после присоединения к носителю биологические компоненты сохраняют активность и стабильность.

Методы иммобилизации можно разделить на следующие группы:

1) физические - адсорбция на поверхности датчика или на инертной мембране, закрепление на поверхности датчика под полимерную пленку, включение в мембраны различного происхождения;

2) химические - путем сшивания бифункциональными агентами и ковалентное пришивание к поверхности;

Одним из самых распространенных методов иммобилизации клеток является физическая адсорбция на различных носителях – бумаге, стекле нейлоне, ацетилцеллюлозе, углеродных материалах. При адсорбции биоматериал удерживается Ван-дер-ваальсовыми силами, реже водородными и множественными солевыми связями и, в подходящих условиях, за счет образования комплексов с переносом электронов. Большим преимуществом такого метода является то, что он обычно безреагентен, и требует минимальной активационной очистки и обработки биоматериала. Метод исключает использование токсичных соединений и делает возможным сохранение жизнеспособности клеток. Однако существенным недостатком данного метода является низкая стабильность сенсора, связанная с небольшой прочностью удерживания биоматериала, и низкая чувствительность из-за малого количества биомассы на единицу носителя. Физическая адсорбция используется в исследовательских целях для получения сенсоров, не требующих длительного срока эксплуатации.

Капсулирование в диализную мембрану позволяет иммобилизовать дрожжи в наиболее мягких условиях. Таким образом, удается избежать связывания активных центров ферментов в составе целых клеток как в случае иммобилизации методом химической сшивки, а также избежать потери активности при адсорбции на стекловолоконном фильтре и включении в различные гели. Так же метод капсулирования в диализную мембрану является наиболее простым по сравнению с остальными методами. Данный

метод позволяет проверить жизнеспособность микроорганизмов сразу после их иммобилизации. Диализная мембрана фирмы Sigma-Aldrich предназначена для удерживания белков с молекулярной массой свыше 12000 Да.

Химические методы иммобилизации клеток основаны на образовании ковалентных связей между поверхностью клеток и материалом носителя, то есть клетка химически пришивается к носителю. Это может осуществляться как на поверхности соответствующего нерастворимого материала, так и в объеме носителя (если при формировании матрицы в присутствии иммобилизованных клеток происходят химические реакции присоединения, затрагивающие функциональные группы биополимеров клеток).

Особенности препаратов иммобилизованных клеток, полученные с применением химических методов:

1) высокая прочность препарата, за счет образования ковалентной связи между поверхностью клеток и материалом носителя, а также при изменении условий, таких как pH и температура, клетки не десорбируются с носителя, что обеспечивает устойчивые, воспроизводимые результаты в аналитических системах.

2) химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность.

Химические методы малопригодны для иммобилизации микроорганизмов, поскольку клетки теряют значительную часть своей активности.

Наиболее эффективным методом иммобилизации живых клеток является включение их в гели. Полимерные гели предотвращают вымывание клеток микроорганизмов и обеспечивают доступ субстратов и кислорода.

К недостаткам, связанных с использованием гелевых матриц относится: трудоемкость изготовления рецепторного элемента, необходимость специального подбора для каждого конкретного

микроорганизма условий иммобилизации, снижение пластической прочности гелей после иммобилизации. Однако, несмотря на это, включение клеток в полимерные гели и синтетические мембраны может успешно применяться при формировании рецепторных элементов биосенсоров для определения широкого спектра соединений.

Биорецепторные элементы на основе клеток, иммобилизованных в гелевых матрицах, как правило, характеризуются более низкими откликами по сравнению с элементами на основе адсорбированных клеток, причем для отдельных субстратов наблюдается резкое снижение откликов, то есть в зависимости от метода иммобилизации изменяется и субстратная специфичность клеток микроорганизмов. Это связано с тем, что при иммобилизации происходит полная или частичная блокировка активных центров ферментов, отвечающих за окисление этих субстратов. А так же затрудняется диффузия субстрата к клеткам.

Формирование рецепторного элемента может проведено путем включения клеток микроорганизмов в гель поливинилового спирта (ПВС), модифицированного N-винилпирролидоном, в силу того что N-поливинилпирролидон легко образует комплексы со многими соединениями (токсинами, лекарственными веществами, красителями), совмещается с различными веществами, лекарственными средствами, нетоксичен, является основой кровезаменителей.

Цель работы

Познакомиться со способами иммобилизации биоматериала и определить субстратную специфичность дрожжей *D. hansenii* иммобилизованных различными методами.

Объекты и средства исследования

1) Автоматические пипетки переменного объема: 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл, 1-5 мл.

2) Магнитная мешалка.

3) pH-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 (научно-производственная фирма «Эконикс-эксперт», Москва)

4) Персональный компьютер

5) Гель поливинилового спирта модифицированного N-винилпирролидоном

6) Гель хитозана

7) Золь-гель матрица

8) Стекловолоконный фильтр Watman GF/A

9) Диализная мембрана фирмы Sigma-Aldrich, предназначенная для удерживания белков с молекулярной массой свыше 12000 Да.

Ход работы

Принцип метода

Для определения субстратной специфичности дрожжей *Debaryomyces hansenii* используется модифицированный кислородный электрод и анализатор pH-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 (научно-производственная фирма «Эконикс-эксперт», Москва), который позволяет регистрировать содержание растворенного кислорода в кювете (**Рисунок 11.2.**).

Рисунок 11.2. *Биосенсор на основе кислородного электрода*

Прибор имеет разъемы подключения питания, подключения кислородного датчика и COM – порта. Подключение к персональному компьютеру позволяет управлять прибором, измерительный датчик

представляет собой кислородный электрод типа Кларка, модифицированный биорецепторным элементом на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов. Измерения проводятся в кювете объемом 5 $см^3$, снабженной якорем магнитной мешалки.

В кювету помещают буферный раствор и анализируемую пробу. При введении субстрата в измерительную ячейку микроорганизмы окисляют его, в результате возрастает дыхательная активность клеток и в приэлектродном пространстве снижается концентрация кислорода, что регистрируется с помощью датчика растворенного кислорода, подключенного к анализатору «Эксперт – 001». На монитор компьютера, интегрированного с биосенсорной системой, выводится графическое отображение изменения содержания растворенного кислорода от времени. По полученному графику с помощью программы Microsoft Excel вычисляется ответ сенсора (R) как максимальная скорость изменения содержания кислорода от времени.

На **рисунке 11.3** показана схема формирования рецепторного элемента на поверхности кислородного электрода

Формирование рецепторного элемента

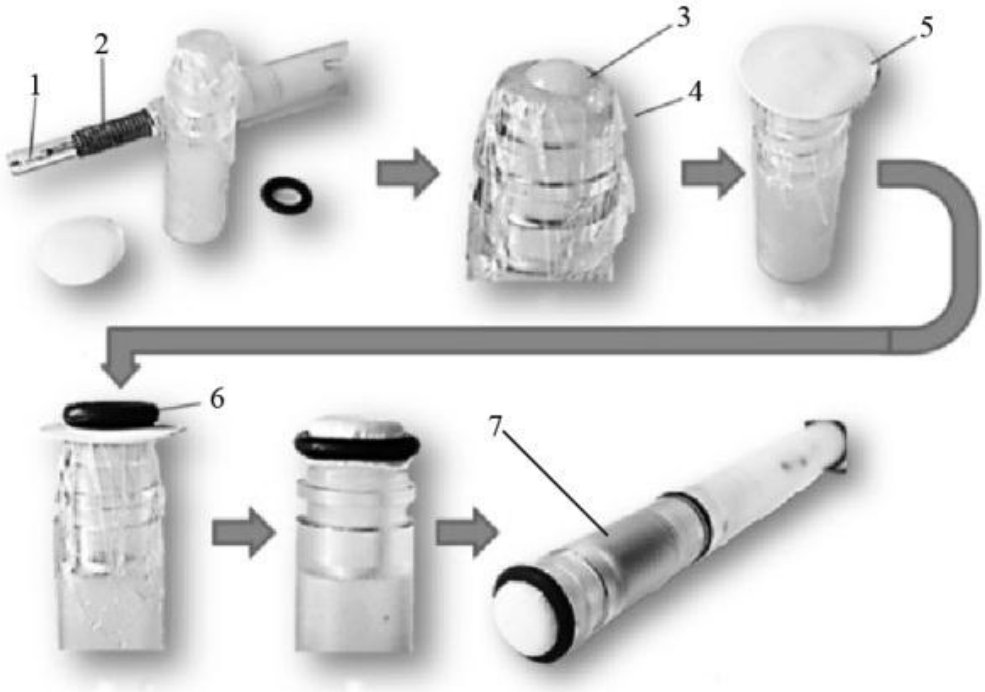


Рисунок. 11.3 *Формирование рецепторного элемента биосенсора на поверхности кислородного электрода* 1 – платиновый электрод; 2 –

серебряная проволока; 3 – суспензия дрожжевых клеток; 4 – газопроницаемая мембрана; 5 – диализная мембрана; 6 – резиновое кольцо фиксации; 7 – кислородный электрод с микроорганизмами.

Формирование рецепторного элемента путем включения дрожжевых клеток в гель поливинилового спирта

Для формирования рецепторного элемента к 20 мг дрожжей *Debaryomyces hansenii* добавляют 100 мкл геля поливинилового спирта модифицированного N-винилпирролидоном. Для распределения дрожжей в пленки проводят встряхивание в течение 5 минут на центрифуге «**Sky Line**». Полученную субстанцию наносят на планшет диаметром 5мм и оставляют на воздухе до полного высыхания. Полученный рецепторный элемент фиксируют с помощью специального колпачка.

Формирование рецепторного элемента путем адсорбции на стекловолоконном фильтре.

Суспензию дрожжей *Debaryomyces hansenii* с концентраций 150 мг/см^3 наносят на пористый стекловолоконный фильтр (Whatman GF/A, Sigma) в объеме 5мкл. Рецепторный элемент размером 3×3 мм подсушивают на воздухе в течение 15 минут при 20^{0}С. Подготовленный биорецепторный элемент помещают на поверхность кислородного электрода типа Кларка и фиксируют с помощью специального колпачка.

Формирование рецепторного элемента путем включения дрожжей в гель хитозана

Раствор геля хитозана готовят путем растворения 0,01 г хитозана в 1 мл 1,0% -ной уксусной кислоты и перемешивают в течение 3 ч при комнатной температуре до полного растворения. Для формирования рецепторного элемента разбавленную (в соотношении 1:3) биомассу смешивают с гелем хитозана в соотношении 1:1 и оставляют до полного высыхания в планшете

диаметром 5мМ. Подготовленный биорецепторный элемент помещают на поверхность кислородного электрода типа Кларка и фиксируют с помощью специального колпачка.

Формирование рецепторного элемента методом капсулирования в диализную мембрану

Для формирования рецепторного элемента проводят предварительное разбавление клеток микроорганизмов соответствующим буферным раствором в соотношении 1:1. 5 мкл полученной суспензии наносят на диализную мембрану и фиксируют на электроде с помощью резинового кольца.

Проведение измерений

Для получения аналитического сигнала (отклика биосенсора) погружают электрод с биорецепторным элементом в буферный раствор, включают мешалку, дожидаются выхода на стационар содержания растворенного кислорода и вводят измеряемый субстрат (концентрация 1 моль/л) в кювету (200 мкл). Между измерениями проводят промывание кюветы и электрода раствором буфера по 4 $см^3$ до выхода содержания кислорода в кювете на начальный уровень.

Оформление работы

1) Нарисовать схему биосенсорной установки, описать формирование рецепторных элементов.

2) Построить гистограмму субстратной специфичности дрожжей, иммобилизованных различным способом в относительных (ответ, % - субстрат) и абсолютных величинах (ответ сенсора - субстрат).

3) Сделать вывод о влияние способа иммобилизации на портрет субстратной специфичности.

Вопросы для самопроверки:

1. *Дайте определение понятию «биосенсор».*
2. *Дайте определение понятию «субстратная специфичность».*
3. *Перечислите аналитические характеристики биосенсора.*
4. *Перечислите метрологические характеристики биосенсора.*
5. *Какие методы иммобилизации использовали в работе?*
6. *Перечислите обратимые и необратимые методы иммобилизации.*
7. *Принцип работы кислородного электрода Кларка.*
8. *Перечислите физические и химические методы иммобилизации.*

Лабораторная работа №12 Определение параметров микробного медиаторного биосенсора

В биосенсорах медиаторного типа для передачи электронов от активных центров ферментов на поверхность индикаторного электрода используются искусственные акцепторы электронов, способные к обратимому окислению/восстановлению. Эти молекулы – искусственные доноры или акцепторы электрона (для окисленных и восстановленных форм фермента соответственно) обычно называют медиаторами электронного транспорта.

В каталитическом цикле медиатор сначала реагирует с восстановленным ферментом и затем диффундирует к поверхности электрода, где подвергается быстрой электрохимической реакции с переносом заряда. Отдавая электроны на электрод, сам медиатор окисляется и вступает в новые циклы переноса электронов.

В общем виде механизм функционирования амперометрических медиаторных электродов можно представить следующим образом:

$E_{клет} + S = P + E'_{клет}$,

$E'_{клет} + M_{ок} = E_{клет} + M_{восст}$

на электроде:

$M_{восст} \rightarrow M_{ок}$,

где E, E' – выделенный фермент или фермент внутри клетки до и после реакции с субстратом S; P – продукт реакции; $M_{ок}$, $M_{восст}$ – окисленная и восстановленная формы медиатора.

Медиаторные микробные электроды являются рабочими электродами в биосенсорных системах. Для формирования таких электродов используют инертные электроды поверхность которых модифицируют медиатором. Наиболее часто используют углеродо-пастовые электроды, сформированные на основе графитовой пудры и минерального масла, т.к. их легко можно модифицировать вводом медиатора в состав пасты. В общем случае

амперометрический метод основан на измерении плотности тока, протекающего в электрохимической ячейке, при постоянном приложенном потенциале (**рисунок 12.1**). Эта плотность тока – функция электрохимически активных частиц раствора (в данном случае медиатора), окисление или восстановление которых происходит на поверхности рабочего электрода.

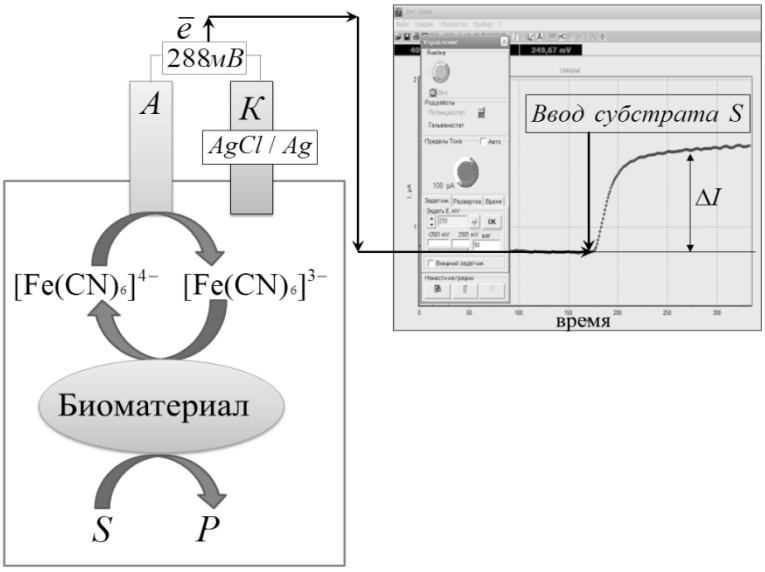


Рисунок 12.1. *Схема генерации сигнала в биосенсоре на основе водорастворимого медиатора гексацианноферрата калия*

Использование медиаторов при формировании рабочих электродов дает ряд явных преимуществ:

1) если медиатор в восстановленной форме не реагирует с кислородом, результаты измерений становятся фактически независимыми парциального давления O_2.

2) рабочий потенциал ферментного электрода определяется формальным окислительно-восстановительным потенциалом (E^o) медиаторной пары. Чем меньше значение E^o, тем меньше вероятность протекания побочных реакций.

3) если в процессе окисления восстановленного медиатора не участвуют протоны, то ферментный электрод может быть относительно нечувствительным к изменениям pH (очевидно, что прибор нельзя

эксплуатировать при очень низких или высоких pH, где имеет место денатурация фермента).

В настоящее время известно множество веществ, используемых в качестве медиаторов в биологических системах. Медиаторы могут принадлежать к самым разным классам соединений, и тем самым демонстрировать разнообразные свойства. Медиаторы подразделяют на медиаторы природного (цитохромы, убихинон, флавопротеины, ферредоксины, витамины (например, витамин K_3)) и синтетического происхождения (многие красители и индикаторы (например, метиленовый голубой, нейтральный красный), хиноны, ферроцены, комплексные ионы металлов (например, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, $[Co(NH_3)_6]^{2+/3+}$, и др)).

Аналитические и метрологические характеристики биосенсоров

1. Градуировочная зависимость ответа биосенсора (R) от концентрации определяемого вещества (C) является важнейшей метрологической характеристикой сенсора. В научной литературе по биосенсорике чаще используют термин «калибровочная зависимость». Это обусловлено тем, что свойства биорецептора могут изменяться в ходе функционирования биосенсора. Поэтому для получения воспроизводимых результатов необходимо периодически получать новые градуировочные графики, т.е. калибровать биосенсор.

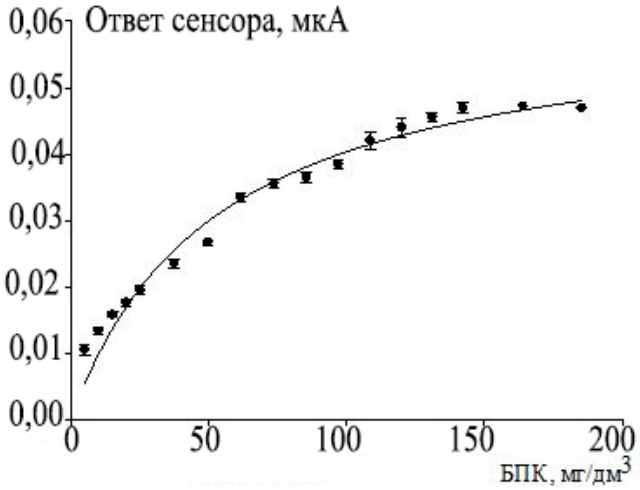


Рисунок 12.2. *Зависимость ответа медиаторного биосенсора от БПК*

Биорецепторы на основе целых клеток микроорганизмов являются биорецепторами каталитического типа, т.е. биологический ответ в таких системах обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов. Поэтому зависимость, приведенная на **рисунке 12.2,** хорошо описывается уравнением типа Михаэлиса-Ментен:

$$R = \frac{R_{\max}[S]}{K_M + [S]}, \text{ где}$$

R_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции, при которой все молекулы фермента участвуют в образовании фермент-субстратного комплекса. Достигается при [S]→∞;

К′$_M$ – кажущаяся константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции достигает половины максимального значения ($R=R_{max}/2$).

Расчет и построение градуировочной зависимости ответа сенсора от концентрации субстрата выполненный с помощью программы Sigma Plot.

Equation: Hyperbola; Single Rectangular, 2 Parameter		f=a*x/(b+x)
R	**Rsqr**	
0,9938	0,9877	
Coefficient	**Std. Error**	
a 2,9774	0,0629	
b 0,0222	0,0018	

Доверительный интервал для коэффициентов a и b дополнительно рассчитывают по формуле:

$$\delta = \frac{s \cdot t(P, f)}{\sqrt{n}} = \frac{St.Er. \cdot \sqrt{n} \cdot t(P, f)}{\sqrt{n}} = St.Er. \cdot t(P, f)$$

где s - стандартное отклонение; t(P,f) - коэффициент Стюдента; P=0,95 - доверительная вероятность; f - число степеней свободы (f=n-2); n - число

измерений; St.Er. - стандартная ошибка, определяемая отношением стандартного отклонения к $\sqrt{n}$.

Таблица 12.1. Пример представления параметров уравнения Михаэлиса – Ментен для полученной градуировочной зависимости

Кажущаяся константа Михаэлиса К´$_М$, мг/дм^3	Максимальная скорость ферментативной реакции R_{max}, мкА	Коэффициент смешанной корреляции R
53± 5	0,062 ± 0,002	0,9852

Согласно уравнению Михаэлиса – Ментен концентрация субстрата будет пропорциональна отклику биосенсора только при концентрациях, гораздо меньших $K_{M.}$ Тогда уравнение приобретает следующий вид:

$$R = \frac{R_{\max}[S]}{K_M}$$

Исходя из этого численное значение верхней границы определяемых концентраций линейного диапазона равно константе Михаэлеса, К´$_м$.

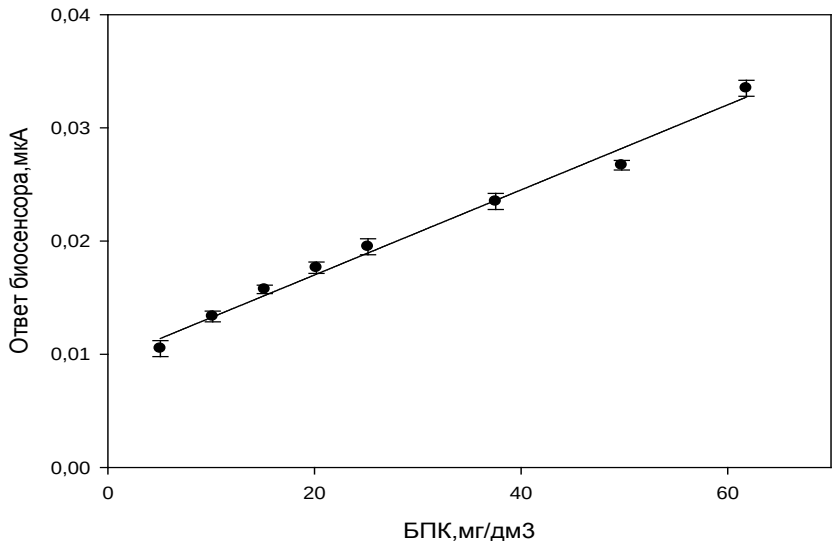


Рисунок 12.3. *Зависимость ответа биосенсора от БПК на линейном участке градуировочной прямой.*

Таблица 12.2. Пример представления параметров уравнения прямой, аппроксимирующей линейный участок калибровочной зависимости: I = a×C + b

Параметры	Значения
a, коэффициент чувствительности, мкА *дм^3/мг	0,0004±0,0001
Коэффициент b, мкА	0,0095±0,0004
Коэффициент корреляции R	0,9852

Для характеристики чувствительности анализа находят коэффициент чувствительности, предел обнаружения и нижнюю границу определяемых концентраций.

Коэффициент чувствительности

Простейшей численной характеристикой чувствительности служит коэффициент чувствительности. Он определяется как производная аналитического сигнала по концентрации определяемого компонента:

$$a = \frac{dR}{dC}$$

Если градуировочная функция линейна (R=a×C+b), то коэффициент чувствительности - это тангенс угла наклона градуировочной прямой a. Чем выше коэффициент чувствительности, тем меньшие количества компонента можно обнаруживать и определять, получая один и тот же аналитический сигнал, тем точнее можно определить одно и то же количество вещества.

В случае амперометрических биосенсоров повысить чувствительность датчика оказывается возможно путем увеличения количества иммобилизованного фермента либо за счет увеличения истинной поверхности индикаторного электрода на микро уровне (увеличение фактора шероховатости).

Предел обнаружения и нижняя граница определяемых содержаний

Предел обнаружения (C_{min}) - это наименьшее содержание вещества которое может быть обнаружено данной методикой с заданной степенью

достоверности. Таким образом, предел обнаружения характеризует методику с точки зрения возможностей качественного анализа.

Предел обнаружения соответствует наименьшей концентрации, которая дает сигнал, отличимый от значения холостого опыта. При доверительной вероятности P = 0,95 данный параметр можно определить по формуле:

$$C_{\min} = \frac{3 \cdot S_0}{a}, \text{ где}$$

S_0 – стандартное отклонение холостого опыта, а – коэффициент чувствительности

Из этой формулы следует, что предел обнаружения зависит не только от коэффициента чувствительности а, но и от S_0, т.е. точности измерения аналитических сигналов. Чем она выше коэффициента чувствительности, тем меньше C_{min}. Также величина предела обнаружения имеет одну и ту же размерность - концентрации - независимо от природы аналитического сигнала. Стандартное отклонение холостого опыта обычно рассчитывают для 7 последовательных измерений.

Для характеристики возможностей методики с точки зрения количественного анализа используют величину, называемую нижней границей определяемых содержаний ($C_н$). Это минимальное содержание компонента, которое можно определить с заданной степенью точности, характеризуемой предельно допустимой величиной относительного стандартного отклонения. Очевидно, что $C_н > C_{min}$.

Для нахождения $C_н$ определяют ряд значений стандартного отклонения при различных концентрациях $S_r(C)$, по формулам $S(C) = \frac{S(y)}{a}$ и $Sr(C) = \frac{S(C)}{C}$

По полученным значениям строят экспериментальную зависимость относительного стандартного отклонения от концентрации (имеющую вид убывающей кривой - обычно близкой к гиперболе) и находят концентрацию, начиная с которой величины $S_r(C)$ становятся меньше, чем заданное предельное значение $S_r(C)_{max} = 0,33$.

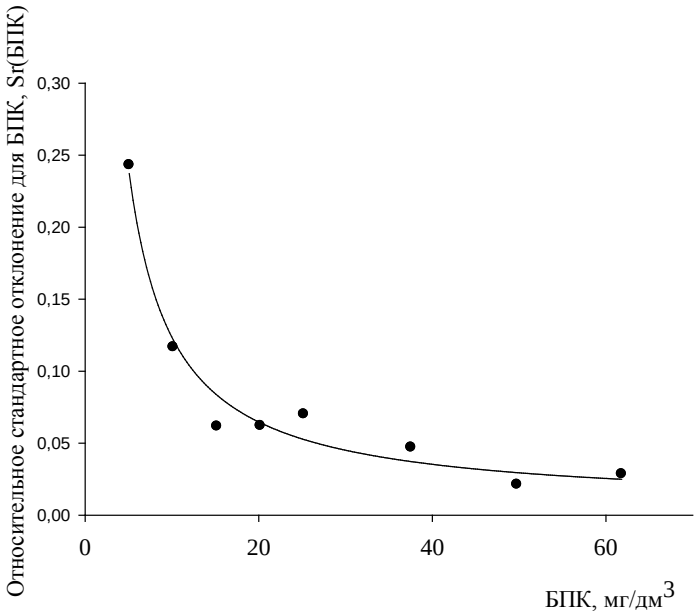


Рисунок 12.3. *Экспериментальная зависимость относительного стандартного отклонения ответа биосенсора от БПК (нижняя граница определяемых значений БПК = 5,1 мг/дм^3).*

Операционная стабильность

Операционная стабильность является одной из важнейших характеристик биосенсора. Она показывает устойчивость ответа сенсора на одну и ту же концентрацию субстрата при проведении большого числа (не менее 15) последовательных измерений и тесно связана с метрологической характеристикой сходимостью (повторяемостью). Операционная стабильность сенсоров характеризуется относительным стандартным отклонением и остаточной активностью (% от исходной). Типичный вид графического отображения операционной стабильности ответов биосенсора представлен на **рисунке 12.4.** После построения соответствующей зависимости необходимо рассчитать среднее значение для 15 последовательных измерений и представить результат вычисления с доверительным интервалом.

Прежде чем обрабатывать экспериментальные данные с применением методов математической статистики, необходимо выявить промахи и исключить их из числа рассматриваемых результатов выборочной совокупности.

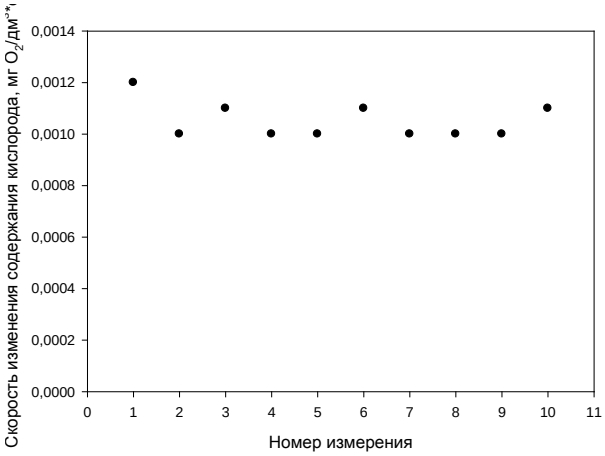


Рисунок 12.4. *Операционная стабильность ответов биосенсора, полученная для 15 последовательных измерений*

Цель работы: познакомиться с принципом работы и определить рабочие параметры медиаторного биосенсора.

Объекты и средства исследования.

Потенциостат IPC-micro, интегрированный с персональным компьютером, хлорсеребрянный электрод сравнения, графитовый рабочий электрод, кювета 5 мл, магнитная мешалка, лабораторный штатив, автоматические пипетки-дозаторы переменного объема от 1 мкл до 5000 мкл, графитовая пудра, парафиновое масло, биологический материал (ферменты или целые клетки микроорганизмов).

Ход работы

1. Формирование рабочего электрода

Пластиковую трубку содержащую платиновую проволоку, заполняют графитовой пастой (100 мг графитовой пудры и 40 мкл парафинового масла). Если это необходимо поверхность электрода модифицируют графитовой пастой с медиатором.

Биологический компонент (клетки или ферменты) наносят на поверхность электрода в объеме 5 мкл и подсушивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Закрепление биологического материала на электроде проводят с помощью диализной мембраны и пластикового кольца.

2. Проведение измерений

Измерения проводят с помощью потенциастата IPC-Micro, интегрированного с персональным компьютером. В качестве рабочего электрода используется угольно-пастовый электрод с иммобилизованным биокатализатором, электрод сравнения – хлорсеребряный электрод. Электролитическую ячейку заполняют 4 мл фосфатного буфера (pH=6,8). Зависимость силы тока от времени снимают при постоянном потенциале (250 мВ (потенциал медиатора) или другом рабочем потенциале). Измерения ведутся при непрерывном перемешивании раствора, находящегося в кювете. Общий вид биосенсорной установки представлен на **рисунке 12.5**

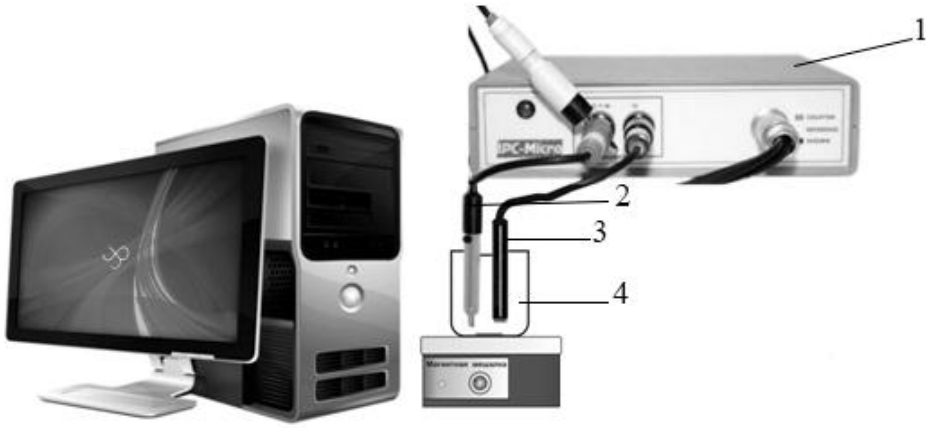


Рисунок 12.5. *Схема биосенсора медиаторного типа.*

1)-потенциостат IPC-micro; 2) – хлоридсеребряный электрод; 3) – рабочий электрод; 4)-кювета

После установления постоянного уровня тока в ячейку добавляют различные объемы субстрата и наблюдают увеличение силы тока. После каждого добавления субстрата производят промывку ячейки (3 × 4 мл фосфатного буфера).

Основное окно программы IPC-Micro: **«Прибор» → «Ручной режим».**

Окно «Ручной режим»: движковым переключателем "Потенциостат/Гальваностат" выбать режим **«Потенциостат»**; требуемое значение потенциала (**250 мВ**) внести в окно над кнопкой «Установить» и затем нажать кнопку **«Установить»;** нажать кнопку «Ячейка»; движковый переключатель «Ячейка/Эквивалент» поставить в положение «Ячейка»; переключателем «Предел Тока» выбрать диапазона тока **«10 uA»**

(переключение осуществляется щелчком мыши по метке диапазона).

После установления постоянного значения тока включить движковый переключатель «Запись/Выкл.» в положение **«Запись»,** после чего происходит регистрация данных в памяти прибора. Запись продолжать до выхода значений тока на стационар **(рисунок 12.6)**.

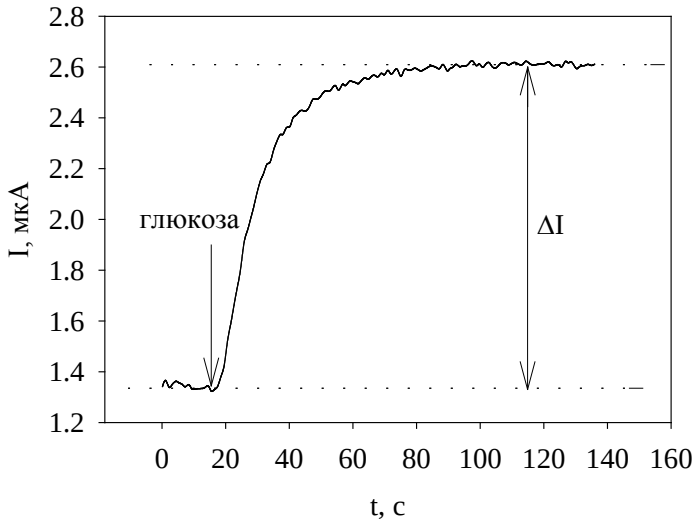


Рисунок 12.6. *Пример ответа сенсора на введение субстрата*

Для полученной зависимости тока от времени (**рисунок 12.6**), отобразившейся в главном окне приложения, определить амплитуду силы тока ΔI в нА (разность между начальным и стационарным значениями тока) или тангенс угла наклона (ΔI/t в мкА/мин).

Таким же образом зарегистрировать и обработать ответы на все концентрации субстрата для получения градуировочной зависимости. Полученные данные занести в **таблицу 12.3.**

Таблица 12.3. Экспериментальные данные

Объем вводимого в ячейку раствора субстрата, мкл	Концентрация вводимого в ячейку раствора субстрата, моль/л или мг/дм^3	Концентрация субстрата в ячейке, ммоль/л или мг/дм^3	Ответ биосенсора (tg α (мкА/мин) или ΔI (мкА/мин))

Провести 15 последовательных измерений на одну и ту же концентрацию субстрата для определения операционной стабильности биосенсора.

Оформление лабораторной работы

1. Нарисовать схему биосенсорной установки, описать формирование рецепторного элемента на основе выбранного биоматериала (уточнить у преподавателя).

2.Заполнить **таблицу 12.3**. По данным **таблицы 12.3** построить график в координатах: ответ биосенсора – концентрация субстрата с помощью программы обработки данных SigmaPlot. Привести результаты статистической обработки полученной гиперболической зависимости: параметры уравнения с доверительными интервалами (*R_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции, K'_M – кажущаяся константа Михаэлиса), коэффициент смешанной корреляции R.

3. Определить верхнюю границу линейного диапазона и построить линейный участок градуировочной прямой. Определить коэффициент чувствительности.

4. Рассчитать нижнюю границу определяемых концентраций.

5. Провести статистическую проверку (исключить грубые промахи) данных полученных для построения операционной стабильности. Построить график операционной стабильности и рассчитать относительное стандартное отклонение.

6. Сделать вывод по работе с указанием параметров биосенсора.

Вопросы для самопроверки:

1. *Дайте определение понятию «биосенсор».*
2. *Дайте определение понятия «коэффициент чувствительности», «предел обнаружения», «диапазон определяемых концентраций».*
3. *Перечислите аналитические характеристики биосенсора.*
4. *Перечислите метрологические характеристики биосенсора.*
5. *Какие медиаторы использовали в работе?*
6. *Перечислите преимущества использования медиаторных электродов.*
7. *Приведите примеры водорастворимых и водонерастворимых, природных и синтетических медиаторов.*
8. *Принцип работы медиаторного электрода.*
9. *Уравнение ферментативной кинетики.*

Лабораторная работа №13 Биосенсор на основе печатных электродов для определения содержания глюкозы в растворе

Печатные электроды – это устройства, которые получают путем нанесения паст различного состава методом трафаретной печати на пластиковые или керамические подложки. В аналитических целях для печати шаблонов обычно используются полиэфирные матрицы. Состав чернил, используемых при печати электродов, может менять их селективность и чувствительность под нужды конкретного анализа.

Технология трафаретной печати пришла в электрохимию из микроэлектронной промышленности, где применялась для производства печатных плат микроконтроллеров. Она дала начало массовому производству недорогих, воспроизводимых по свойствам и надежных одноразовых сенсоров, что открыло новые возможности для прямого мониторинга объектов. Благодаря небольшим размерам и компактному дизайну печатные электроды являются идеальной основой для создания разнообразных химических и биохимических сенсоров. Возможны одно-, двух- или трехэлектродные конфигурации, в зависимости от целей использования. Использование трехэлектродной схемы позволяет проводить электрохимические измерения как в обычных режимах измерения: в объеме, проточно-инжекционном, так и в режиме одной "капли" (т. е., без разбавления пробы и в минимальном объеме).

Для использования печатных электродов в биосенсорном анализе, необходимо иммобилизовать на их поверхность биоматериал. Наиболее часто при разработке подобных устройств в качестве биоматериала применяются ферменты. Они могут использоваться как в виде очищенной субстанции (ферментые сенсоры), так и в составе микроорганизмов (микробные сенсоры).

Биосенсоры на основе печатных электродов относятся к биосенсорам второго поколения. Для переноса электронов от активного центра фермента к

поверхности рабочего электрода необходим медиатор – низкомолекулярное соединение, способное обратимо окисляться/восстанавливаться. Фермент вступает в окислительно-восстановительную реакцию с субстратом и после восстановления субстратом окисляется медиатором, а не кислородом. Медиатор, в свою очередь, окисляется на электроде.

В данной работе в роли медиатора выступает берлинская лазурь ($KFe[Fe(CN)_6]$), которая проявляет характерные для медиаторов свойства: имеет низкий окислительно-восстановительный потенциал, не зависящий от pH среды, нерастворима в водных средах. Берлинская лазурь является неорганическим катализатором разложения пероксида водорода (потенциал 0 В). Пероксид водорода образуется в результате протекания реакции, катализируемой глюкозооксидазой.

$$\text{глюкоза} + O_2 \xrightarrow{\text{глюкозоксидаза}} \text{глюконовая кислота} + H_2O_2$$

Таким образом, берлинская лазурь и глюкозооксидаза, иммобилизованные на поверхности печатного электрода, представляют собой компактную недорогую аналитическую систему, обладающую высокой чувствительностью и большим потенциалом в области массового производства.

Цель работы

Освоить методы работы с ферментными биосенсорами на основе модифицированных графитопастовых печатных электродов и ознакомиться с принципами биосенсорного определения глюкозы.

Объекты и средства исследования:

1) Портативный вольтамперометрический анализатор EmStat
2) Персональный компьютер
3) Магнитная мешалка
4) Автоматические пипетки переменного объема
5) Модифицированные медиатором (берлинская лазурь) и глюкозоксидазой электроды, изготовленные методом трафаретной печати
6) Непроточная кювета объемом 4мл

7) Натрий фосфатный буферный раствор pH=6.8

8) Стандартный раствор глюкозы (1М)

Ход работы

Портативный вольтамперометрический анализатор EmStat представляет собой устройство для регистрации и обработки аналитических сигналов. На **рисунке 13.1** и **рисунке 13.2** представлены внешний вид и принципиальная схема учебно-научной установки и показаны ее основные узлы.

Основные узлы и их назначение

Блок вольтамперометрического анализатора (позиция 4 на **рисунке 13.1**) предназначен для усиления, преобразования и передачи сигнала электрода на компьютер, и для получения и выполнения команд от компьютера. На передней стенке прибора находится разъем для подключения проводов от измерительного электрода, на задней стенке расположен разъем mini USB для подключения к компьютеру (позиция 5 на **рисунке 13.1**).

Измерительный электрод, изготовленный методом трафаретной печати (позиция 1 на **рисунке 13.1**), модифицирован берлинской лазурью, его схема представлена на **рисунке 13.2**. Электрод предназначен для измерения пероксида водорода в жидких средах.

Измерения проводятся в непроточной кювете (позиция 3 на **рисунке 13.1**), объемом 4 мл, снабженной якорем магнитной мешалки (позиция 2 на **рисунке 13.1**). В нее помещают буферный раствор и анализируемую пробу.

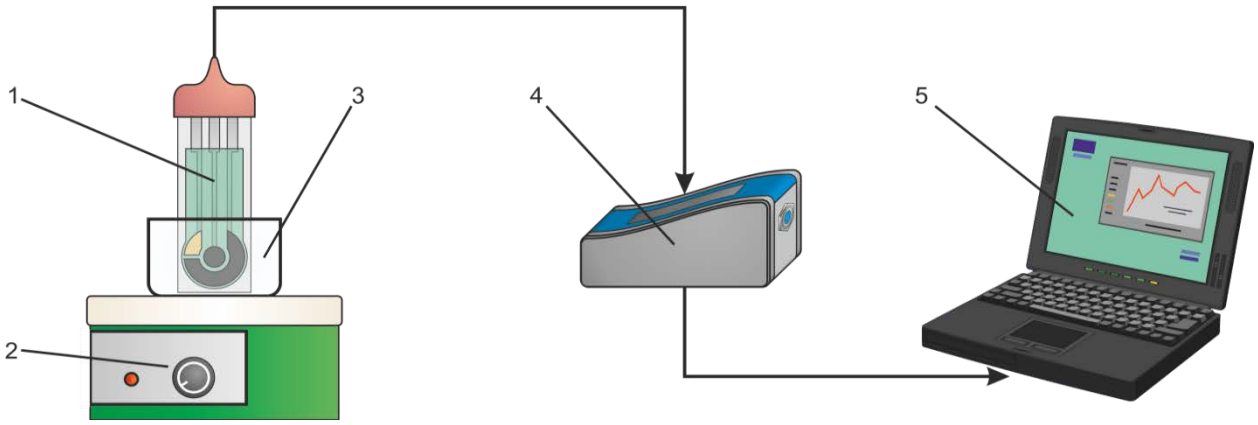


Рисунок 13.1. *Принципиальная схема учебно-научной установки (1 – печатный электрод; 2 – магнитная мешалка; 3 – измерительная кювета; 4 – потенциостат EmStat; 5 – компьютер)*

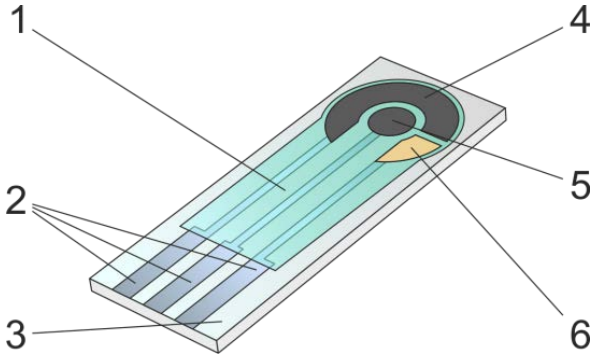


Рисунок 13.2. *Устройство печатного электрода (1 – изолятор; 2 – серебряные контакты; 3 – подложка; 4 – графитопастовый вспомогательный электрод; 5 – графитопастовый рабочий электрод; 6 – хлоридсеребряный электрод сравнения)*

Программа управления прибором PSTrace

Управление прибором и обработка результатов осуществляется с помощью программы PSTrace. Программа может работать на операционной системе Windows 2000, XP, Vista или Windows 7.

Возможности программы включают:

- Диапазон потенциала, прилагаемого к рабочему электроду ±2В с погрешностью ±0,001 мВ;

- Шесть диапазонов рабочих токов – от 1 нА до 100 мкА для регулирования чувствительности прибора, с минимальным разрешением 1 мкА, минимальный интервал измерений 100 мс.

- Графическое отображение зависимости силы тока от времени измерения в реальном времени и определение параметров линейного уравнения, описывающего касательную к выделенному участку кривой отклика;

- Сохранение нескольких кривых отклика в одном файле с комментарием к измерению. Копирование всех данных получаемых зависимостей в буфер обмена для экспорта в сторонние программы для последующей обработки **(рисунок 13.3)**.

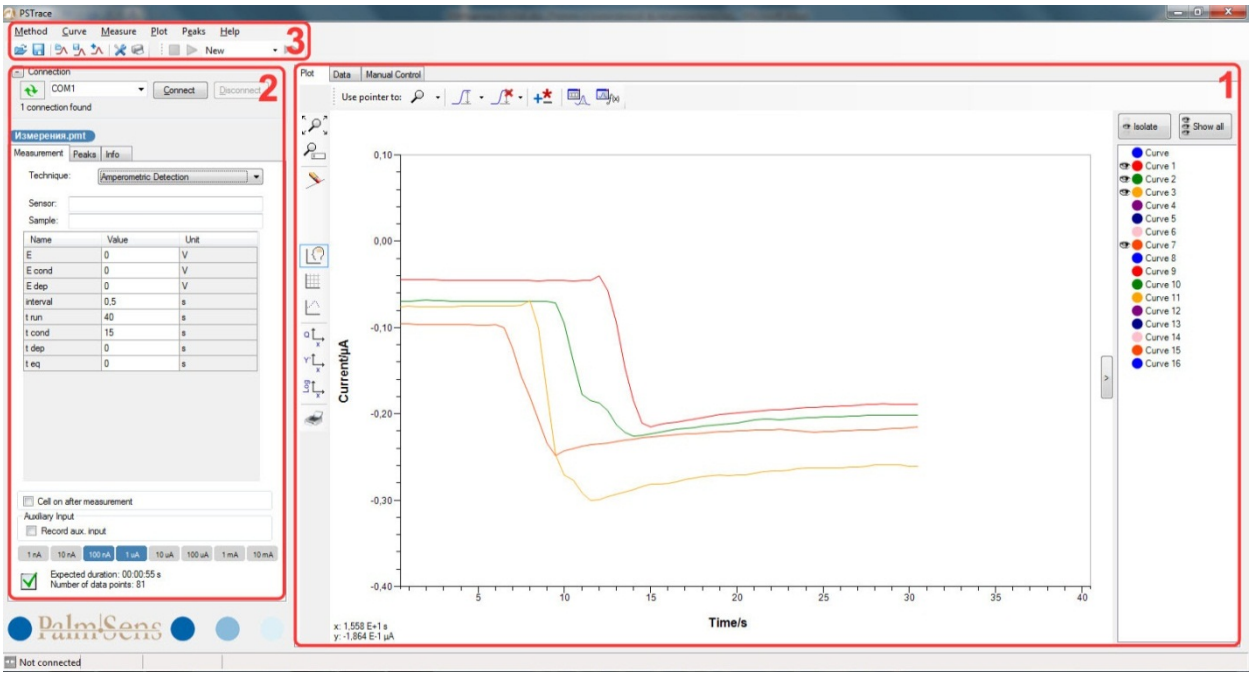


Рисунок 13.3. *Окно программы*

В центре окна программы (позиция 1 на **рисунке 13.3**) располагается область вывода информации о проводимом измерении. На вкладке «**Plot**» отображаются графики измерений. На этой вкладке слева от области вывода кривых расположены кнопки масштабирования и изменением вида графиков, справа – панель управления отображением кривых, которая позволяет скрывать/показывать и изолировать отдельные кривые. В верхней части вкладки располагаются инструменты работы с графиком. Вкладка «**Data**»

содержит числовые данные всех точек проведенных измерений. Она позволяет выбрать кривую, данные которой требуется просмотреть и содержит кнопку копирования всех данных кривой в буфер обмена. Вкладка «**Manual Control**» служит для отладки прибора и промывки электрода в ручном режиме.

Левую часть окна (позиция 2 на **рисунке 13.3**) занимает панель управления параметрами измерения. В ней содержатся элементы, позволяющие подключить прибор к компьютеру, выбрать метод измерения, установить параметры измерения и выбрать диапазон измеряемых токов.

В верхней части окна (позиция 3 на **рисунке 13.2**) находится главное меню и кнопки управления, с помощью которых можно сохранять/загружать методики измерений и кривые измерений. Там же находится блок запуска измерения.

Проведение измерений

Для начала работы необходимо при помощи программы PSTrace установить связь между компьютером и прибором. Для этого в выпадающем списке в левой верхней части окна (**рисунке 13.4**) нужно выбрать COM или USB порт, к которому подключен прибор. Если прибор подключен после запуска программы, нажать кнопку . После этого нажать кнопку «**Connect**».

Рисунок 13.4. *Панель подключения прибора к компьютеру*

После установления связи с прибором необходимо определить параметры, при которых будет проводиться измерения. На левой панели окна программы в выпадающем списке «**Technique**» выбрать метод измерения «**Amperometric Detection**» (амперометрическое измерение). Под выпадающим списком располагается таблица параметров метода. Значения параметров привести в соответствие с **таблицей 13.1.**

Таблица 13.1. Параметры измерения

Пункт программы	Описание параметра	Значение параметра
E	Потенциал, прилагаемый к рабочему электроду в течение всего времени измерения	0 В
E cond	Потенциал, при котором проводится промывка электрода после измерения	0 В
E dep	Потенциал стадии осаждения до начала измерения	0 В
interval	Временной интервал между двумя точками	0,5 с
t run	Продолжительность измерения	600 с
t cond	Продолжительность промывки после измерения	0 с
t dep	Продолжительность стадии осаждения до начала измерения	0 с
t eq	Время, в течение которого перед началом измерения будет стабилизироваться потенциал E	0 с

Во избежание перегрузок при проведении измерений нужно выбрать диапазон измеряемых токов. Для этого в левой нижней части окна в списке диапазонов токов выделить диапазоны 100 nA, 1 µA, 10 µA (**рисунок 13.5**).

Рисунок 13.5. *Диапазоны измеряемых токов*

Для получения аналитического сигнала необходимо погрузить электрод в буферный раствор, включить мешалку. Установить параметры измерения согласно **таблице 13.1**, в выпадающем списке на панели управления ходом измерения (**рисунок 13.5**) выбрать позицию «**New**» и нажать кнопку ▶. **Внимание:** при последующих измерениях в выпадающем

списке выбирать позицию «**Overlay**», чтобы сохранить в памяти программы уже снятые кривые.

***Рисунок 13.6**. Панель управления ходом измерения*

После получения постоянного сигнала силы тока в ячейке, сохраняющегося в течение 10-20 с, ввести в измерительную кювету с помощью автоматической микропипетки анализируемую пробу. Анализ проводится в течение времени, установленного на панели параметров (позиция 2 на **рисунке 13.1**) перед началом измерения. Для экстренного завершения анализа нажать кнопку «**Стоп**» на панели управления ходом измерения (**рисунок 13.4**).

Внимание!!! При внеплановой остановке измерения уже имеющиеся данные могут стереться из памяти программы.

Для измерения полученного аналитического сигнала в выпадающем списке «**Use pointer to**:» в верхней части окна выбрать позицию «**Select point**», затем выбрать точку на графике, соответствующую моменту до прибавления анализируемой пробы. Рядом с точкой отобразятся ее координаты на графике. Координата Y соответствует уровню тока до прибавления пробы. Аналогичные действия проделать с точкой, находящейся на линейном участке кривой после падения уровня тока, вызванного добавлением пробы. Разница между начальным и конечным уровнем тока является амплитудой изменения силы тока и используется в качестве аналитического сигнала.

Приготовление биорецепторного элемента

Для определения концентрации глюкозы использовали биорецепторный элемент на основе фермента глюкозооксидазы (оформляют студенты с указанием метода иммобилизации).

Построение градуировочной зависимости биосенсора

Измерения выполняют в натрий-калиевом фосфатном буфере pH = 6.8, концентрация солей 33 мМ; перемешивание осуществляют на магнитной мешалке (200 об/мин); ввод пробы выполняют автоматическими микропипетками переменного объема (объем аликвоты 5-100 мкл). В качестве модельного раствора используют стандартный раствор глюкозы (0.1 М). Измеряемым параметром является амплитуда изменения выходного сигнала биосенсора при добавлении субстрата. Построение графика градуировочной зависимости выполняют в координатах: отклик сенсора (нА) от концентрации глюкозы в кювете (моль/л) с отображением доверительных интервалов.

Определение концентрации глюкозы в неизвестной пробе

1) Обработать график градуировочной зависимости по уравнению Михаэлиса-Ментен, получить значение константы Михаэлиса (K_M).

2) Ответ сенсора на добавление неизвестной пробы должен лежать в диапазоне от 0 М до K_M. Если ответ больше K_M, пробу необходимо разбавить.

3) Точки градуировочной зависимости, соответствующие диапазону концентраций от 0 М до K_M обработать по линейной зависимости и получить уравнение вида: $\Delta I = aC_{глюкозы} + b$

4) Подставить значение ответа сенсора на добавление неизвестной пробы в полученное уравнение и рассчитать концентрацию глюкозы в кювете.

5) Пересчитать концентрацию глюкозы в кювете на концентрацию в пробе.

Оформление работы

1). Нарисовать схему биосенсорной установки, описать формирование рецепторного элемента.

2). Заполнить таблицу для построения градуировочной зависимости, которая содержит столбец с расчетом концентрации глюкозы в кювете.

3). Вставить график зависимости в координатах: отклик сенсора (нА) от концентрации глюкозы в кювете (моль/л), полученный путем компьютерной обработки данных.

4). Привести результаты статистической обработки полученной зависимости: параметры уравнений со стандартным отклонением, коэффициент смешанной корреляции R^2.

5). Привести алгоритм определения концентрации глюкозы в неизвестной пробе.

Вопросы для самопроверки:

1. *Принцип работы амперометрического биосенсора?*
2. *Преимущества использования медиаторных биосенсоров.*
3. *Сколькиэлектродная система используется в работе и почему?*
4. *Уравнение ферментативной кинетики.*
5. *Примеры медиаторов (природные, синтетические)*
6. *Специфичность ферментов.*
7. *Какие способы подачи пробы вы знаете?*

Лабораторная работа №14 Экспресс-определение глюкозы в крови с использованием глюкометра

Глюкометры применяют для количественного определения содержания глюкозы в крови слюдьми, страдающими сахарным диабетом, в домашних условиях, медицинским персоналом в медучреждениях в качестве средства отслеживания уровня глюкозы в крови. Для людей, страдающих сахарным диабетом, определение содержания глюкозы в крови — необходимый ежедневный анализ.

Содержание глюкозы в крови для людей, не страдающих сахарным диабетом, зависит от времени прошедшего после последнего приема пищи:

Время после приема пищи	До завтрака (12 ч после приема пищи)	До обеда или ужина (8-4 ч после приема пищи)	Через 1 час после приема пищи	Через 2 часа после приема пищи
Диапазон, ммоль/л	3,9-5,9	3,9-6,1	Менее 8,9	Менее 6,7

Рекомендации по суточному графику измерения сахара для людей, страдающих сахарным диабетом:

определение сахара в крови глюкометром в случае диагностирования 1-го типа диабета нужно производить 4 раза в сутки, до приема пищи и перед сном;

при диабете 2 типа — один или два теста в сутки.

В России наибольшее распространение получили глюкометры One Touch (Johnson and Jonson, США), Accu-Chec (Roche, Франция), Elite (Байер, Германия), Сателлит (ЭЛТА, Россия). Глюкометры представляют собой биосенсор. Биосенсор — это аналитический прибор, в котором для определения химических соединений используются реакции этих соединений, катализируемые ферментами, иммунохимические реакции или реакции, проходящие в органеллах, клетках или тканях. Принцип детекции, реализованный в биосенсорах, основан на том, что биоматериал,

иммобилизованный на физическом датчике (преобразователе), при взаимодействии с определяемым соединением генерирует зависимый от его концентрации сигнал, который регистрируется преобразователем того или иного типа и после обработки данных представляется в численном виде (**рисунок 14.1**).

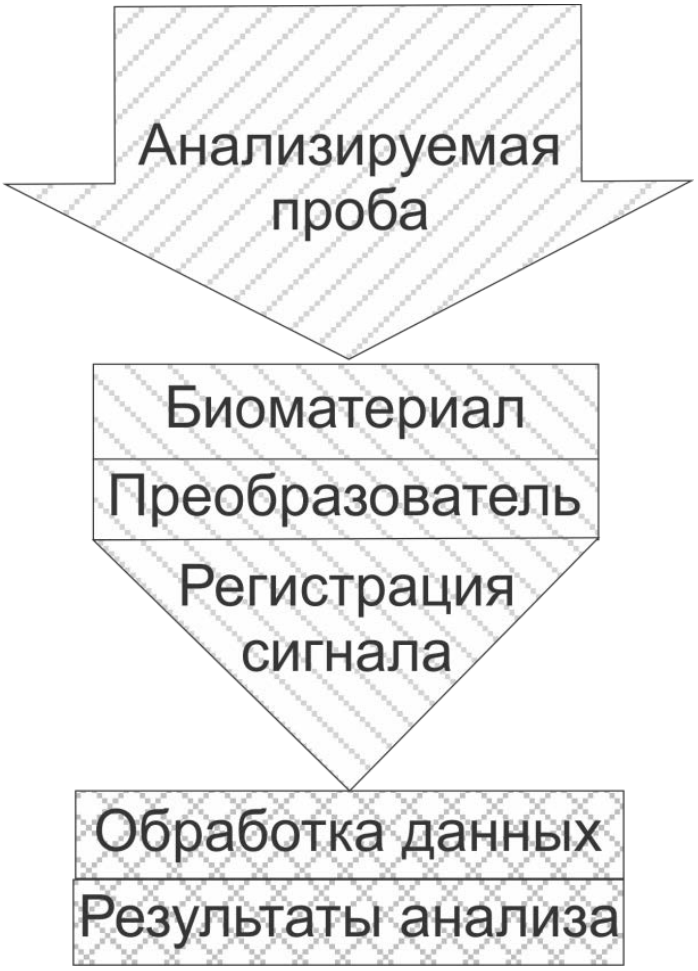


Рисунок 14.1. *Схематическое представление биосенсора*

Принцип работы глюкометра

Самые распространенные глюкометры — это фотометрические и электрохимические устройства. Принцип работы глюкометра первого типа основан на анализе изменения цвета тестовой полоски при нанесении на нее капли крови. Прибор, используя оптический блок и контрольные образцы, проводит сравнение и выводит результаты.

Важно! Показания глюкометра фотометрического типа отличаются низкой точностью. В ходе эксплуатации линзы оптики прибора могут загрязниться, потерять фокус из-за смещения от ударов или вибрации.

Поэтому сегодня мерить сахар в крови диабетики предпочитают электрохимическими измерителями, которые представляют собой миниатюрные амперометрические биосенсоры с обноразовыми электродами (тест-полосками), изготовленными методом трафаретной печати. На полимерной подложке тест-полоски расположены три электрода (**рисунок 14.2**):

Электрод сравнения в виде серебряной нити с лобавление хлорида калия на поверхности нити (хлорсеребряный электрод);

Вспомогательный графитовый электрод;

Рабочий графитовый электрод.

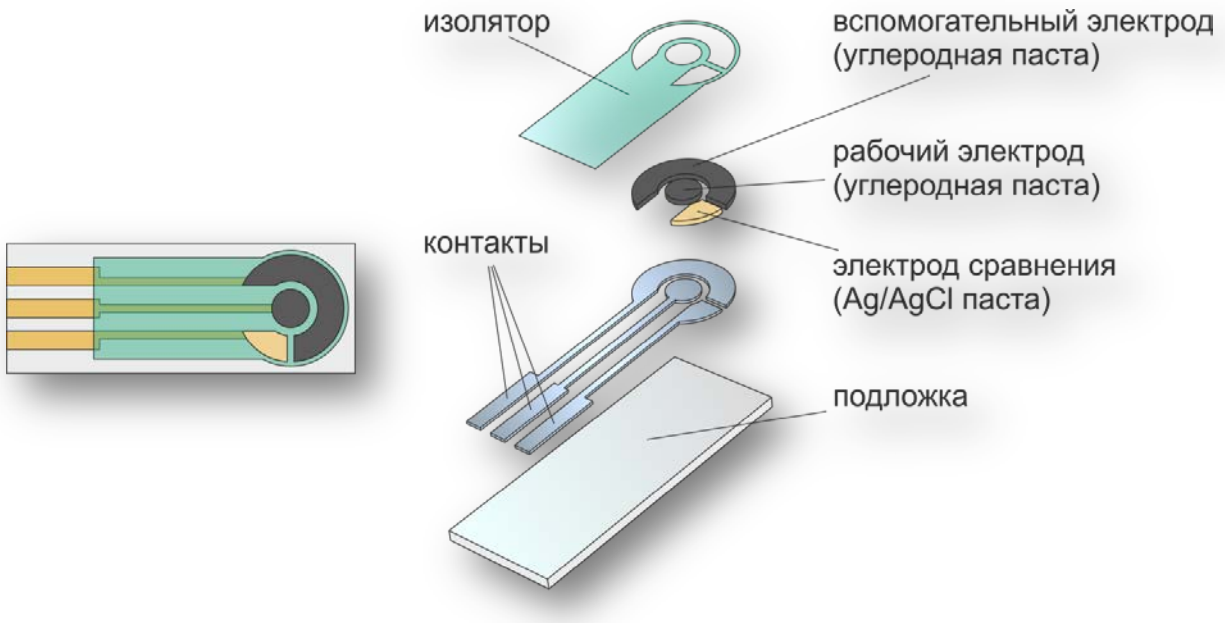
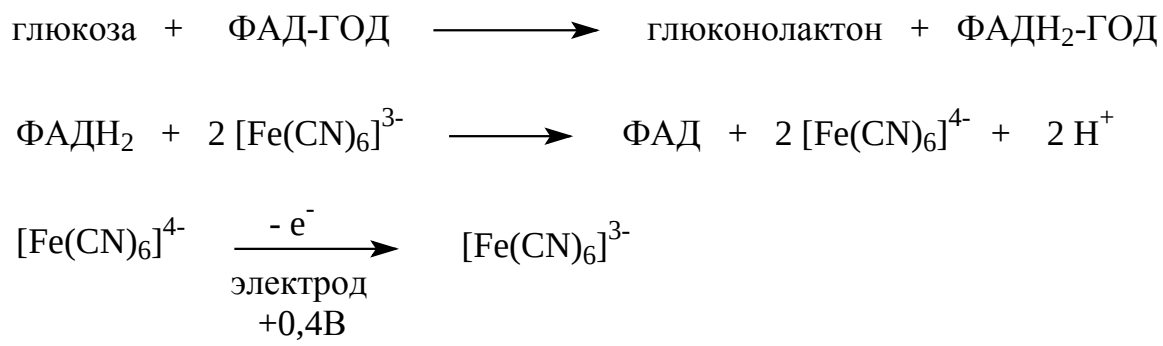


Рисунок 14.2 *Одноразовый электрод, полученный методом трафаретной печати*

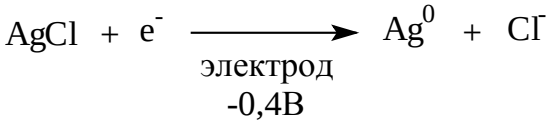
На поверхность рабочего графитового электрода иммобилизован фермент глюкозоксидаза, медиатор электронного транспорта – гексацианоферрат (III) калия и соли для создания буферной системы. Полупроницаемая мембрана ограничивает доступ форменных элементов крови и белков плазмы к поверхности электрода, что позволяет проводить анализ без пробоподготовки. Высокая чувствительность метода позволяет минимизировать объем пробы крови до 1-2 мкл (капля).

Принцип биосенсорной детекции глюкозы в крови с помощью медиаторного глюкозооксидазного электрода представлен на схеме:

Анод (подается потенциал +0,4 В относительно электрода сравнения):



Катод:



Ток окисления медиатора пропорционален содержанию глюкозы в анализируемом образце крови.

Глюкометры One Touch (Johnson and Jonson, США) имеют диапазон измерений 1,1-33,3 ммоль/л.

Материалы исследования: глюкоментр, инструкция по пользованию, стерильный ланцет, тест-полоска, вата, химический стакан, этиловый спирт, пинцет.

Ход работы (для глюкометра One Touch (Johnson and Jonson, США).

Для глюкометров других производителей и моделей ход анализа может отличаться! Смотреть инструкцию!

1. Устройство биосенсора (**рисунок 14.3**):

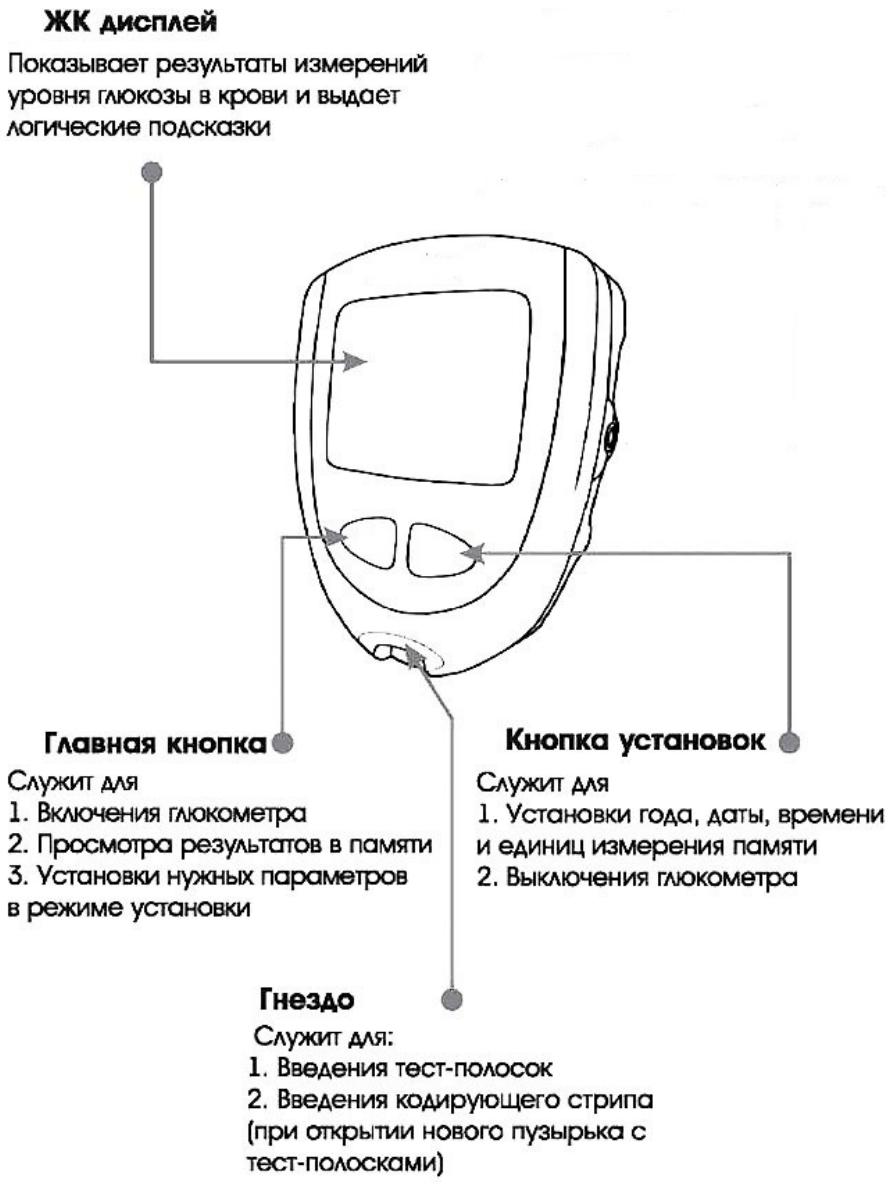


Рисунок 14.3 *Устройство глюкометра*

Перед первым использованием нужно проверить код полоски для калибровки глюкометра. Для этого прибор выключают. Контейнер с полосками открывают, берут одну и сразу же закрывают крышку. После этого:

полоску вставляют в гнездо прибора;

убеждаются, что начался процесс включения;

при отображении знаков «—» на экране, действуя кнопками управления вверх и вниз, устанавливают правильный код.

2. Взятие пробы крови.

Каплю крови можно получить как из кончика пальца, так и из предплечья. Вымойте руки и место прокола теплой водой с мылом и тщательно просушите. Продезинфицируйте место будущего прокола этиловым спиртом. Проколите палец ланцетом. Объем полученной крови должен составлять не менее 1 мкл, иначе получится неправильный результат.

3. Введение тест-полоски.

Возьмите тест-полоску из флакона пинцетом. Прежде, чем вводить тест-полоску, проверьте номер кода на флаконе с тест-полосками. Немедленно закройте флакон крышкой. Введите тест-полоску контактными полосами и лицевой стороной вверх. Тест-полоска должна войти до упора. Прибор включится и на короткий промежуток времени возникнет изображение контрольного экрана. Убедитесь, что номер кода на экране соответствует номеру кода на флаконе с тест полосками.

4. Нанесите каплю крови.

Когда на экране глюкометра появится мигающий символ капли крови, поднесите палец с приколом к узкому каналу у верхнего края тест-полоски и удерживайте тест-полоску у края капли крови, пока контрольное поле не заполнится целиком и прибор начнет обратный отчет.

5. Получение результата.

Результат определения глюкозы в крови появится по окончании отсчета прибором от 5 до 1 секунд.

Оформление работы. Опишите принцип метода, ход работы, практическое значение работы и занесите полученные значения содержания глюкозы в крови в лабораторную работу. Сделайте вывод об уровне глюкозы в крови у испытуемого.

Вопросы для самопроверки:

1. *Из какого пальца необходимо отбирать пробу крови и почему?*
2. *Принцип работы амперометрического биосенсора?*
3. *Преимущества использования медиаторных биосенсоров.*

4. *Сколькиэлектродная система используется в глюкометрах и почему?*
5. *Уравнение ферментативной кинетики.*
6. *Примеры медиаторов (природные, синтетические)*
7. *Почему в глюкометрах используют в качетсве биокомпонента фермент глюкозооксидазу?*
8. *Специфичность ферментов.*
9. *Какие способы подачи пробы вы знаете?*
10. *Практическое значение работы.*

Лабораторная работа № 15 Ферментативная кинетика. Выявление лимитирующих стадий биоэлектрокаталитического окисления субстрата иммобилизованными ферментами (клетками)

Ферментативные реакции, лежащие в основе биосенсорного анализа, чаще всего подчиняются общим законам катализа, но вследствие сложности состава и строения ферментов, являются многостадийными процессами. На процесс протекания ферментативных реакций влияют разные факторы, такие как: ингибирование и активация субстратом, pH среды, температура, процессы диффузии и т.п.

Для нахождения кинетических параметров ферментативных реакций используют разнообразные методы. Простейшим из них является анализ начальных скоростей, в основу которого положено уравнение Михаэлиса – Ментен. Простейшей схемой для описания кинетики ферментативных реакций является так называемая двухстадийная схема Михаэлиса:

$$E + S \xleftarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

в которой E — фермент; S субстрат;

k_1 и k_{-1} - константа скорости образования и распада фермент-субстратного комплекса ES, соответственно.

k_2 – константа скорости первого порядка распада фермент-субстратного комплекса ES с образованием продуктов реакции P и регенерацией фермента

Данная кинетическая схема описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$v = \frac{k_{кат}[E]_0[S]_0}{K_{m(каж)} + [S]_0} = \frac{V_{\max}[S]_0}{K_{m(каж)} + [S]_0}$$

$K_{m(каж)}$ – **кажущаяся** (т.к. зависит от pH среды, присутствия в системе ингибиторов или активаторов, наличия дополнительных стадий в схеме)

константа Михаэлиса - равна концентрации субстрата при скорости ферментативной реакции, равной половине максимальной скорости и характеризует сродство данного фермента к тому или иному субстрату.

V_{max} - максимальная скорость реакции при данной концентрации фермента в оптимальных условиях проведения реакции.

Общий вид зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата представлен на **рисунке 15.1**

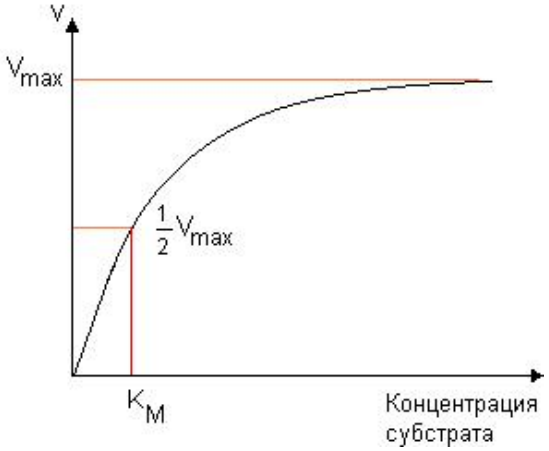


Рисунок 15.1. *Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата S*

Для выявления скоростьопределяющих стадий процессов, протекающих на ферментных электродах, используется подход, разработанный Элбери и Бартлетом, в котором биоэлектрокаталитическое окисление субстрата на электроде представляют в виде модели, учитывающей различные стадии: перенос субстрата через электродную мембрану к ферментным системам бактериальных клеток, реакцию его с ферментом, регенерацию фермента окисленным медиатором и окисление восстановленного медиатора на электроде (**рисунок 15.2**).

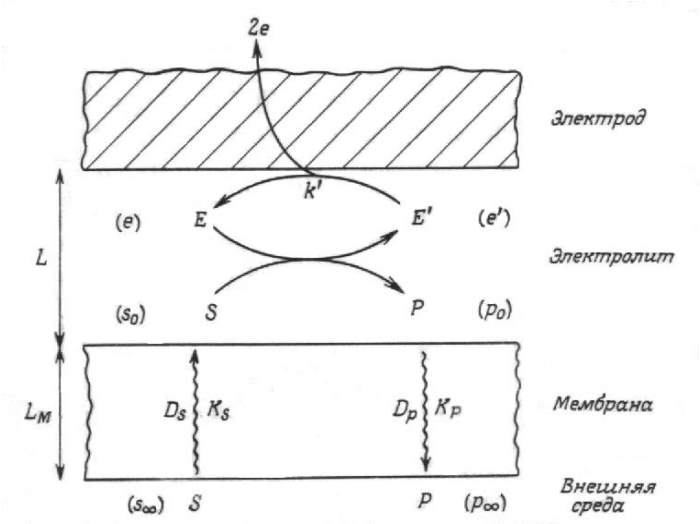


Рисунок 15.2. *Схема процессов и реакций, протекающих у поверхности ферментного электрода*

Математический анализ модели ферментного электрода, проведенный Элбери У. Дж. и Крестоном Д. Х., основанный на равенстве потоков веществ через каждую стадию процесса в стационарном состоянии и при условии, что ферментативная реакция протекает в рамках кинетики Михаэлиса-Ментен, приводит к уравнению зависимости потока генерируемых в электрокаталитическом процессе электронов от концентрации субстрата, аналогичному уравнению Хэйнеса :

$$\frac{S_\infty}{j} = \frac{1}{k'_{ME}}\left[1 + \frac{S_\infty}{K_{ME}}\left(1 - \frac{j}{k'_S S_\infty}\right)\right] \qquad (1)$$

где j – поток, рассчитываемый по формуле:

$$j = \frac{I}{nFA} \qquad (2)$$

I – сила тока, протекающего через электрод; n – число электронов; F – постоянная Фарадея; A – площадь электрода; S – концентрация субстрата в кювете; k'_{ME} – эффективная константа скорости электрохимической реакции на микробном электроде; K_{ME} – константа, эквивалентная константе Михаэлиса для ферментного электрода; k'_S – константа скорости массопереноса субстрата.

По смыслу K_{ME} аналогична константе Михаэлиса для кинетики гомогенной ферментативной реакции. При концентрациях меньше K_{ME} система является ненасыщенной. В этом случае ток пропорционален концентрации субстрата и определяется константой скорости $K_{ME.}$ При концентрациях выше K_{ME} система становится насыщенной и поток j достигает максимального значения j_{max}.

Первая стадия нахождения лимитирующих стадий процессов, протекающих на ферментом электроде заключается в нахождении k'_{ME} по графику зависимости S_∞ / j от S_∞. Из уравнения (1) следует при $S_\infty \rightarrow 0$ данная зависимость имеет предельное значение:

$$\left(\frac{S_\infty}{j}\right)_0 = \frac{1}{k'_{ME}} \qquad (3)$$

Далее для значений S_∞ / j, значительно больших, чем $(S_\infty / j)_0$, рассчитываем значения ρ, где

$$\rho = \frac{j / S_\infty}{(j / S_\infty)_0} \le 1$$

Параметры ρ и y, которые не имеют конкретного физического смысла, но позволяют представить экспериментальные данные в необходимом для анализа виде.

$$\rho = \frac{(j/S)}{(j/S)_O} = \frac{j}{S \;\; k'_{ME}} \qquad (4)$$

Из уравнений (3) и (4) следует:

$$\frac{j}{S} = \rho k'_{ME} \qquad (5)$$

С учетом (3)-(5) выражение (1) можно преобразовать к виду:

$$\frac{S}{j} = \left(\frac{S}{j}\right)_0 \left[1 + \frac{S}{K_{ME}}\left(1 - \frac{\rho k'_{ME}}{k'_S}\right)\right] \qquad (6)$$

Принимая, что:

$$y = \frac{1}{K_{ME}}\left(1 - \frac{\rho k'_{ME}}{k'_S}\right) \qquad (7)$$

и учитывая уравнение (4), выражение (7) можно привести к виду:

$$y = \frac{\rho^{-1} - 1}{S} \qquad (8)$$

Уравнение (8) предсказывает, что зависимость y от ρ должна быть прямолинейной (**рисунок 15.3**).

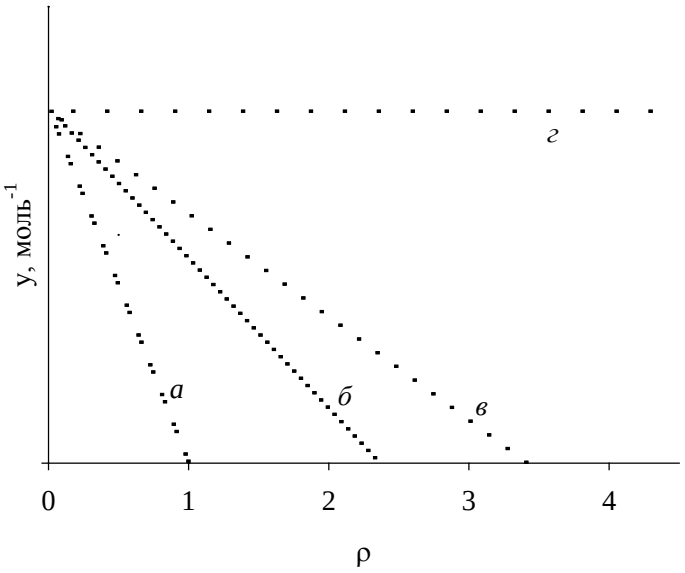


Рисунок 15.3. *Теоретические зависимости y от ρ для случаев, когда протекающие в микробных медиаторных биосенсорах процессы: а – лимитирует диффузия субстрата через мембрану; б, в – определяются в равной степени диффузией субстрата и ферментативной реакцией; г – лимитирует кинетика ферментативной реакции*

Положение прямой на графике y от ρ позволяет оценить относительный вклад кинетики ферментативной реакции и транспорта через мембрану в наблюдаемое значение k'_{ME}. Для этого рассмотрим два случая:

1. скорость процессов, протекающих в ферментом биосенсоре лимитирует диффузия субстрата.

Если на графике y от ρ значение ρ_0 (отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс) равен единице (**рисунок 15.3 - *а*)**, то соблюдается условие: при y = 0 $\rho_0=1$. Подставляя значения y=0 в выражение (7), имеем:

$$\rho_0 = \frac{k'_S}{k'_{ME}} \qquad (9)$$

При $\rho_0 = 1$, получаем, что эффективная константа скорости микробного электрода k'_{ME} определяется константой скорости массопереноса k'_S, следовательно, протекающие в биосенсоре процессы лимитируются диффузией субстрата к активным центрам ферментов.

2. скорость процессов, протекающих в ферментном биосенсоре лимитируют ферментативные процессы.

$$\frac{\rho_0 - 1}{\rho_0 k'_{ME}} = \frac{K_M}{k_{kat} e_\Sigma L} \qquad (10)$$

Если на графике y от ρ получается горизонтальная линия, соответствующая $\rho_0 = \infty$ (**рисунок 15.3 - *г***), то уравнение (10) преобразуется к виду:

$$\frac{1}{k'_{ME}} = \frac{K_M}{k_{kat} e_\Sigma L} \qquad (11)$$

Можно заключить, что при $\rho_0 = \infty$, значение эффективной константы скорости ферментного электрода k'_{ME} определяется кинетикой ферментативной реакции.

Если прямая на графике y от ρ пересекает ось абсцисс в любой другой точке, кроме $\rho_0 = 1$ (**рисунок 15.3 - б, в**), то с учетом уравнения (9) имеем $\rho_0 = \frac{k'_S}{k'_{ME}} \neq 1$, это означает, что в протекающие в ферментном электроде процессы вносят соизмеримый вклад и диффузия субстрата, и ферментативные реакции.

Таким образом, анализ характера зависимости y от ρ является удобным методом для оценки стадий, лимитирующих скорость процессов протекающих в биосенсорах.

В случае, когда лимитирует электрохимическая реакция регенерации медиатора, ответы сенсора не будут зависеть от концентрации субстрата (зависимость генерируемого биосенсором тока I от концентрации субстрата S будет иметь вид прямой линии, параллельной оси абсцисс).

Цель работы

Выявить лимитирующие стадии процесса биоэлектрокаталитического окисления субстрата иммобилизованными ферментами (клетками)

Объекты и средства исследования

Автоматические пипетки переменного объема, магнитная мешалка ПЭ-6100 (диапазон частоты вращения якоря не менее 1000 об/мин), гальванопотенциостат IPC-micro, персональный компьютер.

Ход работы

1. Принцип метода

Для расчета лимитирующих стадий требуется предварительное определение зависимости ответа биосенсора от концентрации субстрата (лабораторная работа №10). Далее выявление лимитирующих стадий ведется расчетными методами с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и Sigma Plot.

2. Расчет лимитирующих стадий

2.1. Математическая модель

Для определения лимитирующих стадий биолектрокаталитического окисления глюкозы иммобилизованными ферментами (клетками) принимаем во внимание следующую модель: процесс диффузии состоит из диффузии субстрата через подложку, в которую иммобилизован фермент (клетка). Таким образом, скорость процессов, протекающих в биосенсоре, лимитируется либо процессами диффузии субстрата через мембрану к активным центрам ферментов (скорость определяется константой скорости массопереноса k'_s), либо ферментативной реакцией (эффективная константа скорости ферментного электрода k'_{ME} определяется кинетикой ферментативной реакции). Ферментативная реакция протекает в рамках кинетики Михаэлиса-Ментен.

2.2. Основные этапы определения лимитирующих стадий.

1. Построение зависимости ответа сенсора от концентрации субстрата. Аппроксимация по уравнению Михаэлиса-Ментен.

2. Расчет константы Михаэлиса и максимальной скорости ферментативной реакции по построенной зависимости ответса биосенсора от концентрации субстрата (построение и расчет в программе Sigma Plot)

3. Расчет скоростей по уравнению Михаэлиса-Ментен

$$v = \frac{v_{\max}[S]_0}{K_{m(каж)} + [S]_0}$$

4. Определение эффективной константы скорости электрохимической реакции биосенсора (K_{ME}) производится построением графика в координатах $[S]_0 / v$ от $[S]_0$. График обрабатывается линейной функцией, в которой константа скорости электрохимической реакции биосенсора (K_{ME}) является обратной величиной свободного члена уравнения.

$$\left(\frac{[S]_0}{v}\right)_0 = \frac{1}{K_{ME}}$$

5. Для определения лимитирующей стадии процесса строят график зависимости y от ρ. Эти величины не имеют конкретного физического смысла, но позволяют представить экспериментальные данные в необходимом для анализа виде.

$$\rho = \frac{v}{[S]_0 K_{ME}}$$

$$y = \frac{\rho^{-1} - 1}{[S]_0}$$

6. Анализируют построенный график:

6.1. Если на графике y от ρ значение ρ_0 (отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс) равен единице, то соблюдается условие: при y = 0 ρ_0 = 1. При этом эффективная константа скорости микробного электрода k'_{ME} определяется константой скорости массопереноса k'_S, следовательно, протекающие в биосенсоре процессы лимитируются диффузией субстрата к активным центрам ферментов.

$$y_0 = \frac{1}{k`_{ME}}, \qquad k_S = \frac{k`_{ME}}{\rho_0}$$

6.2. Если на графике y от ρ получается горизонтальная линия, соответствующая $\rho_0 = \infty$. То можно заключить, что при $\rho_0 = \infty$, значение эффективной константы скорости ферментного электрода k'_{ME} определяется кинетикой ферментативной реакции.

$$y_0 = \frac{1}{k`_{ME}}$$

6.3. Если прямая на графике y от ρ пересекает ось абсцисс в точке $\rho_0 \neq 1$. В этом случае $\rho_0 = \frac{k'_S}{k'_{ME}} \neq 1$, это означает, что в протекающие в ферментном электроде процессы вносят соизмеримый вклад и диффузия субстрата, и ферментативные реакции.

Оформление работы

1) Нарисовать схему биосенсорной установки, описать формирование рецепторного элемента.

2) Построить график зависимости ответа биосенсора от концентрации субстрата: ответ сенсора – концентрация субстрата (ммоль/ дм^3) и обработать зависимость с помощью программы SigmaPlot. Найти параметры гиперболической зависимости (V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции (параметр a) и $K_{m(каж)}$ – кажущаяся константа Михаэлиса (параметр b)).

3) Заполнить таблицу для построения градуировочной зависимости и определения лимитирующих стадий

$[S]_0$	$V = \frac{V_{max}[S]_0}{K_{m(каж)} + [S]_0}$	$\rho = \frac{V}{[S]_0 K_{ME}}$	ρ^{-1}	$y = \frac{\rho^{-1} - 1}{[S]_0}$	$[S]_0/V$

$[S]_0$ – начальная концентрация субстрата в кювете, ммоль/ дм^3

V- скорость ферментативной реакции (ответ биосенсора)

V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции

$K_{m(каж)}$ – кажущаяся константа Михаэлиса, ммоль/ дм^3

4) Построить график в координатах $[S]_0/v$ от $[S]_0$ и рассчитать эффективную константу скорости электрохимической реакции биосенсора (K_{ME})

5) Построить график зависимости у от ρ и определить лимитирующие стадии процесса

6) Сделать вывод по работе

Вопросы для самопроверки:

1. *Дайте определение биосенсора*
2. *Чем отличаются биосенсоры первого, второго и третьего типа.*
3. *Уравнение фермментативной кинетики.*
4. *Дайте определение константе Михаэлиса.*
5. *От чего зависит скорость ферменттивной кинетики.*
6. *Как определить лимитирующий стадии ферментативного процесса.*

Лабораторная работа № 16 Оценка токсичности товаров народного потребления с помощью микробного сенсора

Токсичность - это свойство химических веществ, действуя на биологические системы немеханическим путем, вызывать их повреждение или гибель. Интенсивное производство одежды, обуви, посуды, игрушек, а также товаров народного потребления из полимерных и других материалов, привело к тому, что в настоящее время ощущается острая потребность во всесторонней гигиенической оценке данной группы товаров по показателям безопасности для здоровья населения.

Существующие методы оценки токсичности и определения токсикантов имеют недостатки. Так, в экологическом мониторинге активно используются аналитические (химические, физические, физико-химические) и биологические (традиционные и альтернативные токсилогические) методы анализа. Аналитические методы анализа позволяют с высокой точностью и селективностью определять индивидуальные вещества, однако требуют дорогостоящего оборудования, квалифицированного персонала и специализированных лабораторий. Также, аналитические методы не дают прямой информации о биологической опасности ксенобиотиков.

Традиционные методы определения токсичности (эксперименты на млекопитающих) являются трудоемкими, длительными, дорогостоящими и требуют использования лабораторных животных. Поэтому в токсикологии наряду с традиционными методами контроля применяют альтернативные методы. Разработка и внедрение в практику альтернативных методов является актуальной проблемой.

Потребность в доступных системах и приборах для экологического контроля инициировала развитие новых технологий и методов, которые способны обеспечить определение различных химических соединений в водных средах быстро и недорого в условиях полевого эксперимента. Одним из примеров создания таких приборов являются приборы для экологического

контроля серии «Биотокс», основанные на измерении изменения интенсивности свечения люминесцентных бактерий «Эколюм» при их взаимодействии с веществами в исследуемой пробе.

Действие ксенобиотиков-токсикантов на микроорганизмы непосредственно связано с потреблением ими кислорода. В зависимости от типа микроорганизмов может наблюдаться увеличение дыхательной активности в присутствии некоторых органических ксенобиотиков, которые микроорганизмы способны окислять, или снижение дыхания за счет ингибирующего действия токсикантов. Использование комбинации "иммобилизованные микроорганизмы – кислородный электрод типа Кларка" позволяет избежать ряда ограничений, свойственных другим методам биотестирования. При использовании биосенсоров на основе иммобилизованных микроорганизмов значительно снижется потребность в биомассе и уменьшается время проведения анализа, используются микроорганизмы, которые можно культивировать в условиях любой микробиологической лаборатории. Создание устройств данного типа является перспективным направлением в развитии методов определения токсичности продукции производственного или бытового назначения.

Цель работы: познакомиться с методом оценки токсичности товаров народного потребления с помощью микробного сенсора на основе иммобилизованных целых клеток микроорганизмов.

Объекты и средства исследования

1) Весы лабораторные электронные с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

2) Пробирки на 1,5 $см^3$ типа «Эппендорф»

3) Автоматические пипетки переменного объема: 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл, 1-5 мл.

4) Магнитная мешалка.

5) pH-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 (научно-производственная фирма «Эконикс-эксперт», Москва)

6) Персональный компьютер

7) Измерительный датчик (кислородный электрод типа Кларка)

8) Программное обеспечение Exp2pr

9) Центрифуга

10) Термостат (40°С)

11) Нож канцелярский

12) Измерительная ячейка (кювета) объемом 5 мл.

13) Калий фосфорнокислый двузамещенный

14) Натрий фосфорнокислый однозамещенный

15) Сульфит натрия безводный (Na_2SO_3)

16) Глюкоза(1М)

17) Стандартный раствор фенола (1М)

18) Стандартный раствор формальдегида (1М)

19) Суспензия бактерий *Escherichia coli* К-802.

20) Пористый стекловолоконный фильтр.

21) Вода дистиллированная.

22) Реальные образцы товаров народного потребления (токсичные и нетоксичные).

Ход работы

Для проведения экспериментов используют модифицированный микробный кислородный электрод и анализатор pH-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1, который позволяет регистрировать содержание растворенного кислорода в кювете (**рисунок 10.2**).

Подключение к персональному компьютеру позволяет управлять прибором, измерительный датчик представляет собой кислородный электрод типа Кларка, модифицированный биорецепторным элементом на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов. Измерения проводятся в кювете объемом 5 $см^3$, снабженной якорем магнитной мешалки.

В кювету помещают буферный раствор (pH=7.0) и анализируемую пробу. При введении анализируемого вещества в измерительную ячейку в

приэлектродном пространстве снижается концентрация кислорода, что регистрируется с помощью датчика растворенного кислорода, подключенного к анализатору «Эксперт – 001». На монитор компьютера, интегрированного с биосенсорной системой, выводится графическое отображение изменения содержания растворенного кислорода от времени. По полученному графику с помощью программы Microsoft Excel вычисляется ответ сенсора (R) как максимальная скорость изменения содержания кислорода от времени.

Подготовка проб товаров народного потребления к биосенсорному анализу.

Подготовку проб к оценке токсичности с помощью биосенсора проводят согласно действующим нормативным документам **(рисунок 16.1)**.

Рисунок 16.1. *Схема пробоподготовки*

Образцы проб измельчают, взвешивают, образцы одежды подвергают процедуре «стирки» согласно МУК 4.1/4.3.1485-03. Затем пробы помещают в емкости с дистиллированной водой и термостатируют при 37°С в течение 1 ч. При этом содержащиеся в образцах токсичные вещества мигрируют в

водную среду. В качестве образца для холостого опыта используют дистиллированную воду, которую готовят аналогично вытяжкам из образцов.

Подготовка к измерению

Если прибор перед работой хранился или транспортировался при температуре ниже 10°С, необходимо выдержать его при комнатной температуре в течение не менее 3 часов.

Включение прибора «Эксперт – 001» осуществляют нажатием кнопки **«ВКЛ»** на рабочей панели анализатора. Выбирают режим работы – термооксиметр. На компьютере запускают программу «Exp2pr».

Проверяют работу электрода. Для подготовки датчика к работе заполняют внутреннее пространство электрода раствором электролита хлорида калия (прилагается в комплекте к датчику). Помещают электрод в свежеприготовленный перемешиваемый 2 % раствор сульфита натрия. В случае нормальной работы электрода по истечении 1-2 мин величина растворенного кислорода изменится до 0 мг/дм^3. Фиксируют на поверхности кислородного электрода рецепторный элемент и опускают его в электрохимическую ячейку, содержащую буферный раствор (pH=7.0).

Подготовка рецепторного элемента.

Для формирования рецепторного элемента используют штамм бактерий *Escherichia coli* K-802, которые иммобилизуют методом капсулирования. Выращенные клетки микроорганизмов, промытые фосфатным буферным раствором (pH=7.0), взвешивают и разбавляют раствором буфера в соотношении клетки-буфер 1:1. 5 мкл полученной суспензии наносят на диализную мембрану и фиксируют на электроде с помощью резинового кольца.

Проведение эксперимента.

1. Изучения влияние ингибитора на биорецепторный элемент

Для изучения угнетающего действия токсикантов необходимо исследовать зависимость окислительной способности бактерий *Escherichia*

coli К-802 от присутствия в растворе токсиканта. Для получения аналитического сигнала (отклика биосенсора) погружают электрод с биорецепторным элементом в буферный раствор, включают мешалку. В программе Exp2pr выбирают номер порта и подтверждают выбор клавишей <··, затем выбирают интервал значений оси концентраций кислорода и нажимают кнопку **«Start».**

Для проверки работоспособности рецепторного элемента измеряют ответ сенсора на добавление 100мкл 1М раствора глюкозы. Для каждого раствора получают не менее двух результатов измерений, расхождение между которыми не должно превышать 10%. Между измерениями кювету и электрод промывают тремя порциями фосфатного буферного раствора. Затем в кювету поочередно добавляют разные объемы формальдегида (5мкл, 20мкл, 50мкл, 100мкл, 150мкл, 200мкл). Время экспозиции – 2 минуты. Затем начинают запись данных нажатием кнопки «Записать интервал» и вводят с помощью автоматической микропипетки 100мкл 1М раствора глюкозы. По полученным данным строят график зависимости концентрация-индекс токсичности, описывающий процент ингибирования в зависимости от концентрации в программе Sigma Plot. Индекс токсичности рассчитывают по формуле:

$T = \frac{R_{\text{глюкоза}} - R_{\text{токсикант+глюкоза}}}{R_{\text{глюкоза}}} \times 100\%$, где

Т- индекс токсичности,%;

$R_{\text{глюкоза}}$ - ответ биосенсора на добавление глюкозы, мг O_2/дм^{3}с;

$R_{\text{токсикант+глюкоза}}$ - ответ биосенсора на глюкозу в присутствии токсиканта.

На **рисунке 16.2** представлен вид градуировочной зависимости индекса токсичности от концентрации формальдегида в измерительной кювете.

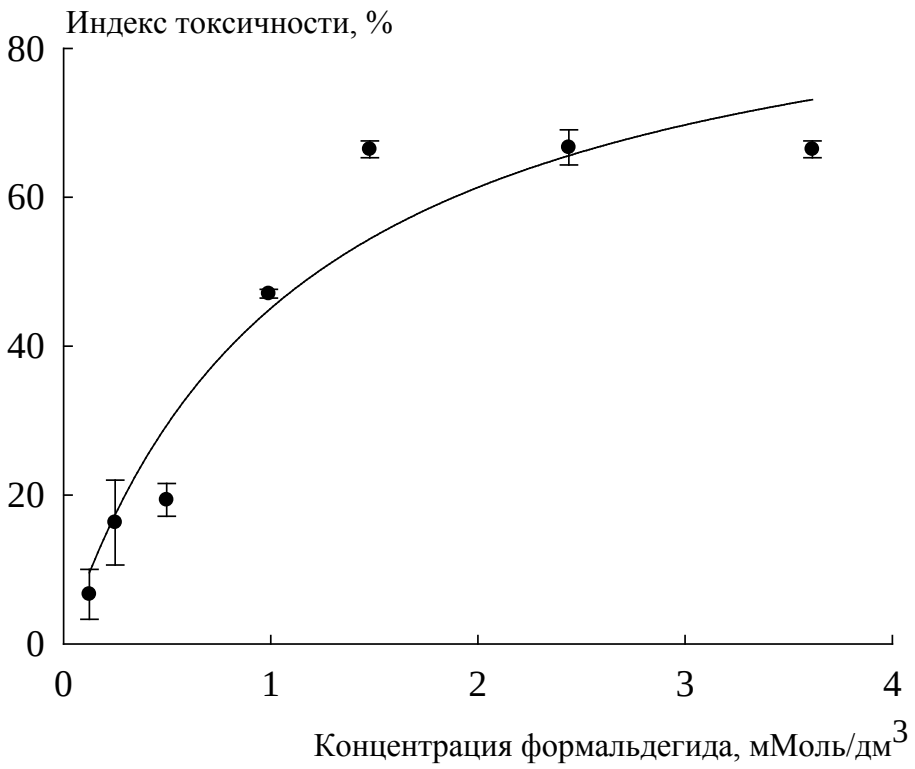


Рисунок 16.2 Градуировочная зависимость биосенсора при оценке индекса токсичности. Анализируемый ингибитор - формальдегид

Для количественной оценки эффектов концентрацию, вызывающую % ингибирования (например, 50%), определяют как ECx (например, EC_{50}). EC_{50} рассчитывают из уравнения кривой.

Аналогично проводят анализ влияния угнетающего действия фенола.

2. **Измерение токсичности товаров народного потребления**

Для проверки работоспособности рецепторного элемента измеряют ответ сенсора на добавление 100мкл 1М раствора глюкозы. Для каждого раствора получают не менее двух результатов измерений, расхождение между которыми не должно превышать 10%. Между измерениями кювету и электрод промывают тремя порциями фосфатного буферного раствора.

После получения стационарной концентрации кислорода в кювете, сохраняющейся в течение 1-2 минут, вводят с помощью автоматической пипетки 1мл анализируемой пробы. Затем начинают запись данных нажатием кнопки **«Записать интервал»** и вводят с помощью автоматической микропипетки 100мкл 1М раствора глюкозы. Анализ проводят в течение 2-3

минут, считая от начала снижения концентрации кислорода на кривой отклика (концентрация кислорода функция времени).

Для завершения анализа снимают галочку в разделе **«Записать интервал»** и сохраняют таблицу в файл. Открывают сохраненный файл в программе Microsoft Excel, строят точечную диаграмму зависимости изменения концентрации кислорода от времени. На построенной диаграмме выбирают нисходящий прямолинейный участок и рассчитывают для него тангенс угла наклона. Тангенс угла наклона соответствует коэффициенту “a” в уравнении прямой, полученном при аппроксимации прямолинейного участка.

Между измерениями проводят промывание кюветы и электрода раствором буфера по 5 $см^3$ до выхода содержания кислорода в кювете на начальный уровень.

Оформление работы

Оценка токсичности пробы проводится по индексу токсичности, который рассчитывают по формуле:

$T = \frac{R_{\text{глюкоза}} - R_{\text{вытяжка+глюкоза}}}{R_{\text{глюкоза}}} \times 100\%$, где

T- индекс токсичности, %;

$R_{глюкоза}$- ответ биосенсора на добавление глюкозы, мг $O_2/дм^3с$;

$R_{вытяжка+глюкоза}$- ответ биосенсора на глюкозу в присутствии вытяжки.

Обработку результатов измерений индекса токсичности выполняют путем расчета среднеарифметического значения величины индекса токсичности «Т» по формуле:

$T = (T_1+T_2+T_3)/3$ (4),

где T_1-T_3 - повторности (три параллельных измерения ответа биосенсора) анализируемой пробы.

Индекс токсичности (Т),%	Степень токсичности образца
менее 50	нетоксичен
50-100	токсичен

Сделать вывод по проделанной работе.

Вопросы для самопроверки:

1. *Дайте определение биосенсора*
2. *Чем отличаются биосенсоры первого, второго и третьего типа.*
3. *Уравнение ферментативной кинетики.*
4. *Дайте определение константе Михаэлиса.*
5. *От чего зависит скорость ферменттивной кинетики.*
6. *Дайте определение токсичности.*
7. *Практическая значимость работы.*

Лабораторная работа № 17 Принцип функционирования медиаторного микробного биотопливного элемента

Микробный биотопливный элемент является примером биологической системы, в которой микроорганизмы транспортируют образуемые ими в результате катаболизма электроны на анод, с которого они по внешней цепи попадают на катод. Таким образом, химическая энергия, заключенная в субстрате (топливе), с помощью каталитических систем микроорганизмов превращается в электрическую.

Биотопливные элементы обычно состоят из двух инертных электродов — анода и катода, выполненных из платины, золота или углерода и погруженных в буферный раствор. Электроды разделены ионообменной мембраной; анодное отделение продувают азотом, катодное – воздухом (или кислородом). Мембрана позволяет пространственно разделить реакции, протекающие в электродных отделениях элемента, и в то же время обеспечивает обмен протонами между ними. Наиболее подходящими для биотопливных элементов являются мембраны “Nafion”, выпускаемые рядом компаний (BDH Ltd., DuPont (UK) Ltd). В России аналогом мембраны Nafion являются мембраны МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург). Принцип работы биологического топливного элемента представлен на **рисунке 17.1**.

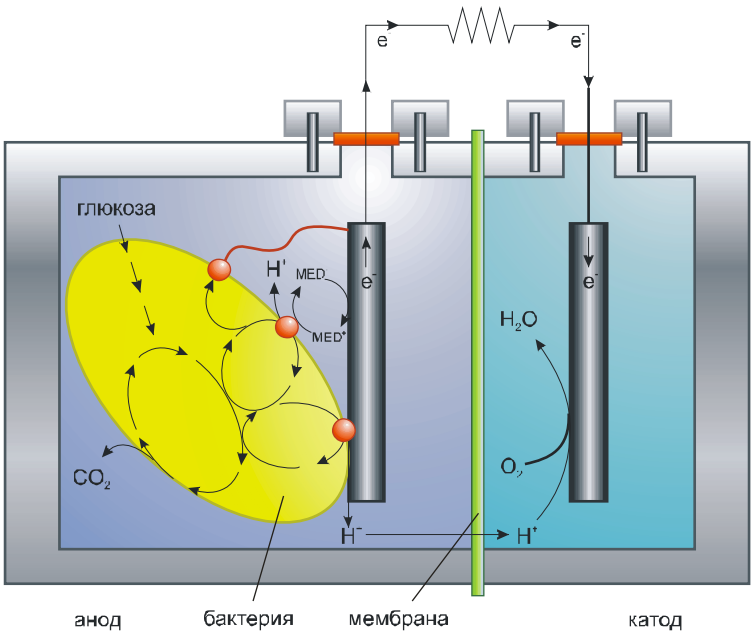


Рисунок 17.1. *Принцип работы микробного медиаторного БТЭ*

Введение субстрата в биотопливный элемент, содержащий клетки или иммобилизованный фермент, приводит к возникновению потока электронов на восстановительные эквиваленты клетки, и, в конечном итоге - на анод. Эта серия переносов электронов происходит потому, что восстановительный потенциал каждого следующего участника выше, чем у предыдущего. При этом через мембрану в катодное пространство перемещаются протоны. Процесс передачи электронов от дыхательной цепи микроорганизма к электродам является критическим для работы микробных БТЭ. В данном случае электроны должны транспортироваться на твердый субстрат вне клетки. Этот транспорт может осуществляться либо при прямом контакте поверхности клетки с твердым субстратом, либо на расстоянии, опосредовано с помощью эндогенных или экзогенных медиаторов.

$$\mathbf{S_{red} \rightarrow E_{ox/red} \rightarrow M_{ox/red} \rightarrow A_{ox/red} \rightarrow C_{ox/red} \rightarrow Acc_{ox/red}}$$

Схема пути электрона в микробном биотопливном элементе.

S -биологически окисляемый субстрат, E- ферменты клетки, M - искусственный переносчик электронов - медиатор, A - анод, C - катод, Acc - конечный акцептор электронов соответственно в окисленной (ox) или восстановленной (red) форме.

С анода электроны по внешней цепи передаются на катод за счет того, что с катодом соединена система, обладающая еще более высоким стандартным электрическим потенциалом. В идеальных условиях в присутствии протонов и кислорода в катодном отделении образуется вода:

$$4H^+ + O_2 + 4e^- \rightarrow 2H_2O$$

Результирующий ток пропорционален добавке скорость-определяющего компонента, пока не достигнуто насыщение.

Цель работы: Познакомиться с работой микробного биотопливного элемента на основе клеток *G. oxydans* и медиаторов 2,6-дихлорфенолиндофенола и гексацианоферрата калия.

Объекты и средства исследования

1) Двухкамерная ячейка биотопливного элемента
2) Клеточная суспензия или мембранная фракция бактерий *G.oxydans*
3) Растворы медиаторов 2,6-дихлорфенолиндофенола и гексацианоферрата калия (ГЦФ)
4) Гальванопотенциостата IPC Micro ("Кронас", Россия)
5) Графитовые электроды диаметром 8мм
6) Натрий-фосфатный буфер (pH 6.0, 30мМ)
7) Магнитная мешалка
8) Стандартный раствор глюкозы (1М)
9) Персональный компьютер
10) Автоматические пипетки переменного объема

Ход работы:

1. Формирование ячейки биотопливного элемента

Основой модели БТЭ является двухкамерная ячейка (**рисунок 17.2**). Эквивалентная электрическая схема ячейки биотопливного элемента приведена на **рисунке 17.3**

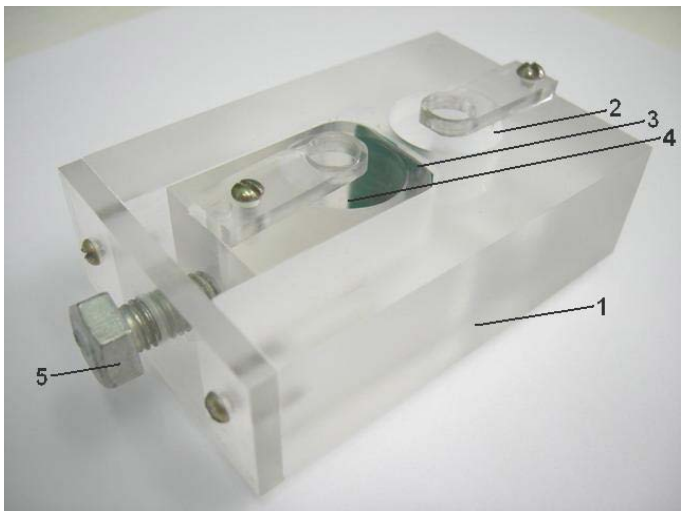


Рисунок 17.2 *Ячейка биотопливного элемента*

1 – корпус; 2 – неподвижная кювета; 3 – мембрана; 4 – подвижная кювета; 5 – прижимной винт.

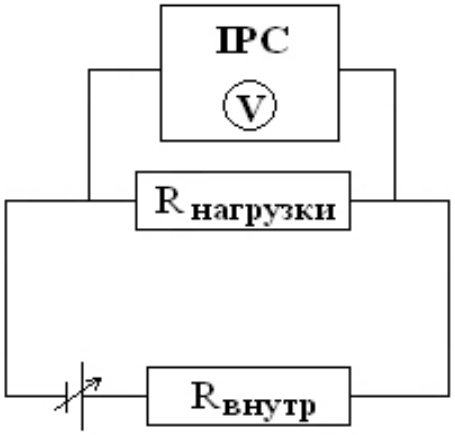


Рисунок 17.3 *Эквивалентная электрическая схема ячейки БТЭ.*

Объём анодного отделения равен объему катодного и составляет 5 мл. Электродами служат графитовые стержни диаметром 8 мм. Высота погружения электродов в раствор – 10 мм. Связь кювет осуществляется через отверстие в стенке диаметром 6 мм. Камеры разделены протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия), являющейся аналогом мембраны Nafion 117 в протонированной форме.

2. Подготовка анодного отделения

Клетки *G. oxydans* перед проведением эксперимента размораживают при комнатной температуре и добавляют к ним объем буфера, необходимый для получения концентрации клеток в суспензии, равной **300 мг** сырого

веса/мл. Требуемые объемы клеточной суспензии вносят в анолит для получения конечной концентрации 3 мг сырого веса/мл. В качестве медиатора в анодном отделении используют 2,6-дихлорфенолиндофенол с различными концентрациями в кювете (от 10 до 100 мкМ) и ГЦФ в катодном пространстве — 3 мМ. После каждого измерения ячейку тщательно промывают натрий-фосфатным буфером. Электролитом в обеих камерах служил натрий-фосфатный буфер (pH 6.0, 30мМ).

3. Электрохимические измерения

Измерения потенциала в макете БТЭ проводят с помощью гальванопотенциостата IPC Micro ("Кронас", Россия), входное сопротивление которого составляло 10^{13} Ом. Для этой цели графитовые стержни погружают в электролитическую ячейку. Измерения проводят в натрий-фосфатном буфере (pH 6.0) при постоянном перемешивании раствора магнитной мешалкой. Скорость перемешивания составляет 400 об/мин. Регистрацию ответов на добавление субстрата в измерительную ячейку начинают после установления стационарного состояния. Оценку электрических характеристик производят после достижения стационарного значения генерируемого потенциала. Общая схема установки представлена на **рисунке 17.4**.

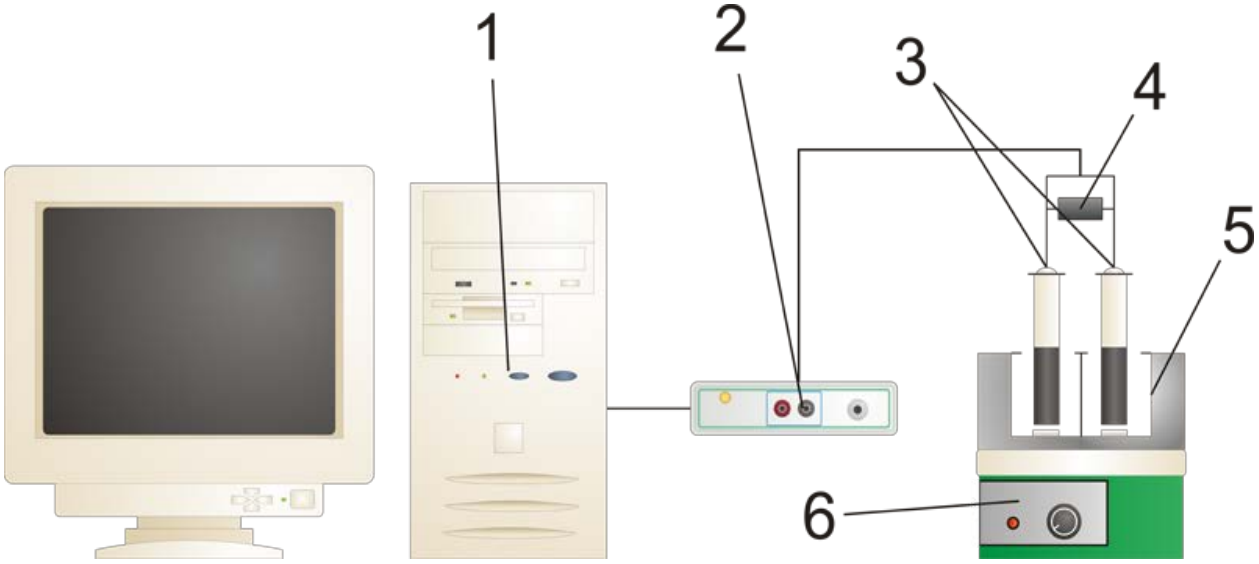


Рисунок 17.4*. Схема установки медиаторного микробного биотопливного элемента*

1 – Персональный компьютер; 2 – гальванопотенциостат IPC Micro; 3 – графитовые электроды; 4 – внешнее сопротивление; 5 – электолитическая ячейка биотопливного элемента; 6 – магнитная мешалка.

Измеряемым параметром в процессе биокаталитического окисления субстрата в режиме генерации потенциала являляется амплитуда сигнала. Для определения энергетических характеристик макета БТЭ после достижения максимального значения потенциала между анодом и катодом подключают внешнее сопротивление нагрузки R=270кОм при использовании только 2,6-ДХФИФ в анодном отделении и 50 кОм при использовании второго медиатора ГЦФ в катодном отделении. Измеряемым параметром для определения тока и мощности элемента является стационарное значение потенциала после подключения сопротивления нагрузки.

Для управления всей работой прибора, регистрации, обработки и хранения результатов используется специализированное программное обеспечение.

Проведение измерений

Для получения сигнала (генерация потенциала) необходимо погрузить электроды в буферный раствор, включить мешалку, позицию “**ячейка**” необходимо оставить в выключенном состоянии, выбрать режим "**начать запись**" на панели управления в программе. После получения постоянного сигнала потенциала в ячейке, сохраняющегося в течение 1-2 минут, ввести с помощью автоматической микропипетки медиатор 2,6-дихлорофенолиндофенол. После установления постоянного значения потенциала внести суспензию клеток и раствор глюкозы. Классический вид генерации потенциала представлен на **рисунке 17.5**

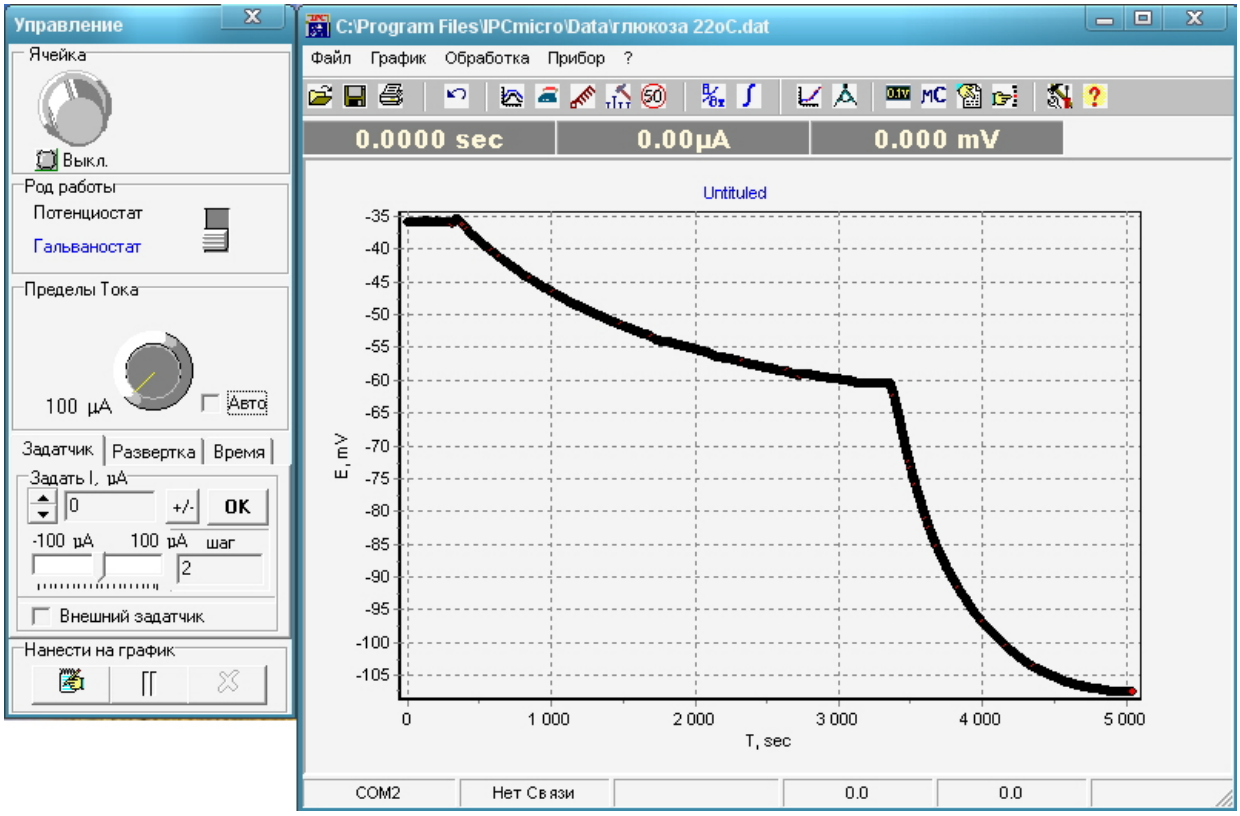


***Рисунок 17.5**. Базовое окно программы. Общий вид генерации потенциала*

Величиной генерируемого потенциала является амплитуда сигнала, рассчитанная от 0 мВ. В рассмотренном примере величина генерируемого потенциала составляет 107 мВ.

Провести определение потенциала с использованием стандартного раствора глюкозы и сделать вывод по проделанной работе.

Вопросы для самопроверки:

1. *Дайте определение «биотопливный элемент (БТЭ)».*
2. *Принцип работы БТЭ.*
3. *Какие медиаторы использовали в работе?*
4. *Приведите примеры водорастворимый и водонерастворимых медиаторов.*
5. *Приведите примеры природных и синтетических медиаторов.*

6. *Приведите примеры водорастворимых и водонерастворимых, природных и синтетических медиаторов.*
7. *Перечислите преимущества использования микробных топливных элементов по сравнению с ферментными.*

Лабораторная работа №18. Определение микрофлоры воздуха

Индикаторные микроорганизмы санитарного состояния воздуха. К санитарно-показательным микроорганизмам воздуха относят золотистый стафилококк, стрептококки, грамотрицательные бактерии и грибы. В воздухе больничных помещений доминируют золотистый стафилококк и стрептококки. Соотношение микроорганизмов составляет в среднем 70 и 30 % соответственно. При этом в 1 $м^3$ воздуха операционных залов, послеоперационных палат, перевязочных, отделениях реанимации, родильных залов они должны отсутствовать. Особый случай – воздух аптечных помещений, где из-за наличия антимикробных препаратов могут быстро погибать бактерии, но сохраняться грибы, поэтому их обязательно необходимо выявлять при исследовании воздуха аптек.

Дополнительные критерии. Как показатель запыленности и отсутствия влажной уборки расценивают присутствие спорообразующих палочек, а показателем повышенной влажности – плесневых грибов. Показатель плохой освещенности – отсутствие пигментообразующих форм бактерий. Значительное содержание микробов в воздухе свидетельствует о низком санитарном состоянии помещения. При наличии до 500 микробных клеток в 1 $м^3$ воздуха жилых или производственных помещений воздух считают чистым.

Таблица 18.1 Нормы микробного числа по санитарно-микробиологическому показателю общему количеству микроорганизмов в 1м^3 воздуха

Наименование помещения	Общее число микроорганизмов в 1м^3 воздуха, КОЕ/м^3	
	До начала работы	во время работы
Операционные для трансплантации и высокотехнологичных хирургических операций	Не более 10	Не более 50
Другие операционные, асептические палаты для пациентов с ожогами; стерильные зоны в оперблоке и стерилизационном отделении	Не более 200	Не более 500
Предоперационные, наркозные, родильные залы, перевязочные, процедурные, прививочные кабинеты, хирургические кабинеты, залы реанимации, палаты для новорожденных	Не более 500	Не более 750
Палаты в хирургии, палаты родильниц с новорожденными, коридоры, примыкающие к операционным и смотровым, смотровые, помещение для чистого белья	Не более 750	Не более 1000
Чистая и стерильная зона контроля комплектования и упаковки чистых инструментов, помещения для подготовки перевязочных и операционных материалов и белья, стерилизации	Не более 500	Не более 750
Воздух производственных помещений	Не более 1500	
Воздух жилых помещений по А.И. Шарифу	Летом: не более 1500 Зимой: не более 4500	

Цель работы:

1.Изучить микрофлору окружающей среды, санитарно-показательные микроорганизмы.

2.Изучить влияние факторов окружающей среды на микроорганизмы.

3.Исследовать микрофлору воздуха в выбранных аудиториях седиментационным методом, определить КОЕ, морфологию микроорганизмов.

Ход работы

1. Приготовить твердую агаризованную среду LB состава 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, агар 2%.
2. Простерилизовать среду и чашки Петри. Разлить по чашкам среду в стерильных условиях и дать остыть.
3. Провести посев микроорганизмов в чашку Петри на питательную среду седиментационным методом. Продолжительность экспозиции составляет 20 минут.
4. После посева чашки Петри подписать (фамилия студента, группа, аудитория или место посева).
5. Закрыть чашки и поставить для культивирования на 3-5 дней при температуре 28ºС в термостат.
6. Подсчитать общее количество выросших колоний микроорганизмов на питательной среде в чашке Петри.
7. Провести пересчет количества колоний в 1 м^3 воздуха по формуле Омелянского

$$X = \frac{A \times 100 \times 1000 \times 5}{B \times 10 \times t}$$

где X — количество микробов в 1 м^3,

A — количество колоний на агаре в чашке, КОЕ

B — площадь чашки (d=8 см → 50 см^2, d=9 см → 63 см^2, d=10 см → 78,5 см^2), см^2

t — время экспозиции, мин

5 — время Омелянского, мин

10 — объем воздуха, из которого происходит оседание микроорганизмов за 5 мин, л

100 — площадь, на которой происходит оседание, $см^2$,

1000 — искомый объем воздуха, л

8. Результаты занести в **таблицу 18.2**. Сравнить полученные результаты с показателями в **таблице 18.1**.

   Таблица 18.2. Результаты исследования микрофлоры воздуха

Помещение	Количество микроорганизмов в $1м^3$ воздуха, КОЕ/$м^3$

9. Сделать вывод о санитарном состоянии помещения

Вопросы для самопроверки:

1. *Принцип метода определения микрофлоры воздуха.*
2. *Что такое санитарно-показательные микроорганизмы?*
3. *Как определяют коли-титр воды?*
4. *. Какие методы применяют для определения микробного числа воздуха.*
5. *Что такое санитарно-показательные микробы воздуха и как их определяют.*
6. *Что учитывают при исследовании бакттериальной загрязненности воздуха?*
7. *Какие питательные среды используют при анализе микрофлары воздуха.*
8. *Какие методы используют для микробиологического исследования воздуха.*

Лабораторная работа №19. Определение микрофлоры почвы

Почва — естественная среда микроорганизмов, принимающих участие в круговороте веществ в природе. Микробы из почвы попадают в воздух и воду. В 1 г почвы находится несколько миллиардов самых разнообразных микроорганизмов: гнилостные аэробные и анаэробные бактерии, азотфиксирующие, нитрофицирующие и другие бактерии, актиномицеты, грибы, простейшие. Особенно длительно в почве находятся споры бактерий и грибов. Наибольшее количество микробов содержится на глубине 5-10 см. Почвенные микроорганизмы осуществляют процесс минерализации органических отходов с образованием гумуса, обеспечивающего плодородие почвы.

Болезнетворные микроорганизмы попадают в почву с выделениями больных людей и животных, с отбросами, с трупами крыс и других животных. Возбудители кишечных инфекций могут находиться в почве от нескольких дней до месяца, иногда дольше. Споры сибирской язвы, ботулизма, столбняка и газовой гангрены могут сохраняться в почве десятки лет. Загрязнение продуктов болезнетворными микробами из почвы представляет большую опасность заболевания людей.

Цель работы. Освоить метод посева проб почвы на питательные среды, метод определения количества микроорганизмов в почве и выделения чистых культур бактерий из проб почвы.

Материалы и оборудование.

1. Весы
2. Ступка
3. резиновые перчатки
4. колба со стерильной дистиллированной водой
5. пипетки на 10 мл и 1 мл
6. стерильные пробирки
7. колба вместимостью 250 мл

8. чашки Петри с МПА
9. среда Эшби,
10. среда Чапека.

Ход работы

1. Приготовьте суспензию почвы. Для этого отвесьте 10 г почвы и перенесите навеску в стерильную ступку, добавьте 2 - 3 мл стерильной воды и разотрите до пастообразного состояния.
2. Полученную пробу почвы (10 г) перенесите в стерильную колбу, содержащую 90 мл стерильной воды, размешайте в течение 5 мин и дайте отстояться 30 мин. Это первое разведение исследуемой пробы почвы.
3. Приготовьте ряд последующих 10-кратных разведений этой пробы в пробирках в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов в пробе. Для приготовления каждого последующего разведения используйте новую пипетку.
4. Полученные разведения в объеме 0,1 мл посейте (на каждое разведение по 2- 3 чашки): а) на МПА для определения общего числа бактерий; б) на среду Чапека для учета и выделения актиномицетов; в) на среду Эшби для учета и выделения азотобактера.
5. Равномерно распределите каплю инокулята на поверхности агара, покачивая чашку, и оставьте на 30 мин для адсорбции при комнатной температуре.
6. Засеянные чашки Петри через 30 минут переверните вверх дном и поместите в термостат при температуре 28 - 37°С для выращивания мезофильной микрофлоры. Количество бактерий на МПА учитывайте через 1 - 5 сут, актиномицетов и азотобактера - через 5 - 7 сут.
7. Учитывайте количество колоний следующим образом: дно чашки Петри маркером разделите на равные секторы, учтенные колонии отмечайте точками на стекле.

8. После посева чашки Петри подписать (фамилия студента, группа).
9. Закрыть чашки и поставить для культивирования на 3-5 дней при температуре 28ºС в термостат.
10. Подсчитайте среднее число колоний на чашке и далее пересчитайте количество микроорганизмов на 1 г воздушно-сухой почвы.

Вопросы для самопроверки:

1. *Принцип метода определения микрофлоры почвы.*
2. *Что такое санитарно-показательные микробы воздуха и как их определяют.*
3. *Как определяют микробное число почвы?*
4. *Какие питательные среды используют при анализе микрофлоры почвы.*
5. *Какие методы используют для микробиологического исследования почвы.*

Лабораторная работа №20 Микробиологическое состояние природных вод

Многочисленные реки России из-за поступления в них с поверхностным стоком и сточными водами больших количеств загрязняющих веществ, нарушения режима хозяйственной деятельности в водоохранных зонах и попадания органических и минеральных загрязнений, а также смыва грунта в результате водной эрозии, находятся в экологически угнетенном состоянии. Основными источниками загрязнения водных объектов России являются коммунальное хозяйство и промышленные предприятия, которые сбрасывают соответственно 58% и 31% загрязненных сточных вод от их общего объема. Наиболее резко реагируют на изменение качества водной среды микроорганизмы, поэтому микробная индикация широко используется для контроля за состоянием водных экосистем.

Цель работы: определение общего микробного числа в водоеме, расположенном в рекреационной зоне города.

В ходе проведения работы необходимо **о**знакомиться с основными методами микробиологических исследований, освоить метод взятия пробводы, освоить метод подсчета общего числа колониеобразующихбактерий.

Материалы и оборудование:

1. Стерильные чашки Петри;
2. Стерильные мембранные фильтры (d=0,45мкм);
3. Фильтровальный прибор Зейтца;
4. Водоструйный насос;
5. Мясопептонный агар (МПА);
6. Стерильный пинцет;
7. 70%-ный спирт;
8. Спиртовка;
9. Термостат;
10. Стерильные колбы.

Ход работы

1. Сделать серию последовательных разведений (10^2 – 10^6) воды из водоема. По 10 мл воды из каждого разведения пропустить через мембранные фильтры, наложенные на предварительно профламбированную поверхность фильтровального прибора, используя водоструйный насос. Каждую пробу анализировать в 3 – 5-кратнойповторности.
2. Разлить по 20 мл МПА в чашки Петри и остудить.
3. Мембранные фильтры стерильным пинцетом поместить фильтратом на поверхность питательной среды в чашки Петри на 24 ч. Чашки перевернуть и инкубировать при температуре 30 – 37 °С в термостате.
4. По истечении времени инкубации подсчитать количество колоний микроорганизмов на поверхности питательного агара. Подсчет следует провести на всех параллельных чашках и найти среднее значение.
5. Численность клеток гетеротрофных микроорганизмов в 1 мл воды рассчитать поформуле:

$$\mathrm{A} = \frac{N \times R}{10}$$

где N – число колоний на чашке, шт;

R – разведение, из которого произведен посев;

10 – пересчет на 1 мл.

6. По **таблице 20.1** определить, к какому классу качества относится вода из тестируемого водоема.

Таблица 20.1.Классы качества воды природных водоемов по бактериальным показателям

Показатель	Классы качества воды				
	предельно чистая	чистая	удовлетворительно чистая	загрязненная	грязная
Численность бактерий планктона, млнкл/мл	< 0,3	0,3 – 1,5	1,6 – 5,0	5,1 – 11,0	> 11,0
Численность гетеротрофных бактерий, тыс.кл/мл	< 0,1	0,1 – 1,0	1,1 – 5,0	5,1 – 10,0	> 10,0
Численность бактерий группы кишечной палочки, тыс. кл/мл	< 0,003	0,003 – 2,0	2,1 – 10,0	11,0 – 100,0	> 100,0

*Вопросы для самопроверки***.**

1. *Понятие общего микробного числа.*
2. *Гетеротрофы и сапрфиты.*
3. *Методы отбора проб воды.*
4. *Микробиологические питательные среды.*
5. *Метод фильтрации через мембрану и глубинный посев.*
6. *Принципы стерилизации, способы стерилизации.*

Приложение 1

Значения t-критерия Стьюдента при разной доверительной вероятности

Число степеней свободы f	Доверительная вероятность			
	0,90	**0,95**	**0,99**	**0,999**
1	6,31	12,7	63,6	636
2	2,92	4,30	9,93	31,6
3	2,35	3,18	5,84	12,9
4	2,13	2,78	4,60	8,61
5	2,02	2,57	4,03	6,86
6	1,94	2,45	3,71	5,96
7	1,90	2,37	3,50	5,41
8	1,86	2,31	3,36	5,04
9	1,83	2,26	3,25	4,78
10	1,81	2,23	3,17	4,59
11	1,80	2,20	3,11	4,44
12	1,78	2,18	3,06	4,32
13	1,77	2,16	3,01	4,22
14	1,76	2,15	2,98	4,14
15	1,75	2,13	2,95	4,07
20	1,73	2,09	2,85	3,85
30	1,70	2,04	2,75	3,65
40	1,68	2,02	2,70	3,55
60	1,67	2,00	2,66	3,46
∞	1,66	1,96	2,58	3,29

Приложение 2

Значения Q – критерия при разной доверительной вероятности

n	Доверительная вероятность		
	0,90	**0,95**	**0,99**
3	0,94	0,98	0,99
4	0,76	0,85	0,93
5	0,64	0,73	0,82
6	0,56	0,64	0,74
7	0,51	0,59	0,68
8	0,47	0,54	0,63
9	0,44	0,51	0,60
10	0,41	0,48	0,57

Рекомендуемая литература:

1. Ляшенко О.А, Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учебное пособие / СПб ГТУРП. - СПб., 2012. – 67 с.
2. Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И., Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие / Академия Москва, 2007 – 288 с.
3. Арляпов В.А., Зайцев М.Г., Каманина О.А., Юдина Н.Ю., Понаморева О.Н., Биоиндикация, биотестирование, биосенсоры: теоретические основы методов и их практическое применение: учебное пособие / Издательство ТулГУ 2016 - 232 с.
4. Биосенсоры: основы и приложения Под ред Тернера Э., Карубе У., Уилсона Дж. 1992
5. Химический анализ в медицинской диагностике (Проблемы аналитической химии. Т. 11) Под ред. Будникова Г.К. М.: Наука, 2010.
6. Химическая безопасность и мониторинг живых систем на принципах биомиметики: [Электронный ресурс] Учебное пособие / Г.К. Будников, С.Ю. Гармонов и др. - М.: НИЦ ИНФРА-16 М, 2013. - 320 с.
7. Основы биосенсорики : учеб. пособие / Г. А. Евтюгин, Г. К. Будников, Е. Е. Стойкова ; Казан. гос. ун-т, Хим. ин-т им. А. М. Бутлерова .— Казань, 2007 .— 80 с.
8. Биосенсоры и биотопливные элементы : учеб. пособие / О. Н. Понаморева [и др.] ; ТулГУ, НОЦ "Экобиотехнология" .— Тула : Изд-во ТулГУ, 2012 .— 202 с. – 12 экз.
9. Понаморева О.Н. Биосенсоры. Принципы функционирования и практическое применение : учеб. пособие / О. Н. Пономарева, А. Н. Решетилов, В. А. Алферов ; ТулГУ; НОЦ "Экобиотехнология" .— Тула : Изд-во ТулГУ, 2007 .— 255 с. : ил. – 21 экз.
10. Эггинс, Б. Химические и биологические сенсоры / Б.Эггинс;пер.с англ.М.А.Слинкина с доп.Т.М.Зиминой,В.В.Лучинина .— М. : Техносфера, 2005 .— 336с. : ил. — (Мир электроники) – 13 экз..

11. Основы функционирования биосенсоров : учеб. пособие / О. Н. Понаморева [и др.] ; ТулГУ; Науч.-образоват. центр "Экобиотехнология" .— Тула : Изд-во ТулГУ, 2011 .— 205 с. : ил. – 5 экз.

12. Отто, М. Современные методы аналитической химии : [учебник]:в 2 т. Т.II / М.Отто;пер.с

13. Биосенсоры в России : монография / А. Н. Решетилов [и др.] ; ТулГУ .— Тула : Изд-во ТулГУ, 2007 .— 111 с. : ил.

14. Будников, Г. К. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине / Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин, В. Н. Майстренко .— М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2009 .— 416 с. : ил., табл

15. Биохимические методы анализа / Г. К. Будников [и др.] ; сост. Б. Б. Дзантиев ; под ред. Б. Б. Дзантиева ; РАН , Отд-ние химии и наук о материалах, Науч. совет по аналит. химии .— М : Наука, 2010 .— 392 с. : ил., табл .— (Проблемы аналитической химии ; Т. 12) .— Авт. указаны в конце кн
.