УДК 579.22:541.183:661.183.2:543.9

МІКРОБНІ АМПЕРОМЕТРИЧНІ СЕНСОРИ ДЛЯ ДЕТЕКТУВАННЯ ЕТАНОЛУ ТА ГЛЮКОЗИ

Г.О. Каленюк, Ю.О. Тарасенко, І.І. Геращенко

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України, вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна

Експериментально підтверджено доцільність використання бактерій роду Gluconobacter у біосенсорах для визначення органічних субстратів. Досліджено закономірності електрокаталітичного окиснення етанолу та глюкози іммобілізованими на вуглецевих матеріалах клітинами G. oxydans у присутності медіаторів електронного переносу та проведено оцінку функціональних характеристик створених моделей біосенсорів.

Вступ

Останнім часом інтенсивно вивчаються фізико-хімічні характеристики та можливості практичного використання біосенсорних систем [1–5]. Насамперед, це пов'язано з потребами різних галузей біотехнології та екології, де необхідні прості у використанні, високочутливі методи, а також прилади для виявлення речовин у рідких середовищах. Цим вимогам відповідає біосенсорний аналіз, переваги якого (оперативність, специфічність, низька вартість) зумовлюють перспективи подальшого розвитку даного напряму.

Функціонування більшості біосенсорів ґрунтується на використанні ферментів біологічного окиснення [6, 7]. Інколи їх можливо замінити бактеріальними клітинами та хімічними медіаторами, що відповідають за транспорт електронів [8]. Присутність медіатора в складі сенсора забезпечує перенесення електронів на вимірювальний електрод при окисненні субстратів іммобілізованим біоматеріалом. У каталітичному циклі медіатор реагує з відновленим ферментом та дифундує до електрода, на якому відбуваються електрохімічні процеси з переносом заряду [9].

Необхідним критеріям придатності, зокрема зворотному окисненню та відновленню на електроді, реагуванню з певним ферментом і тривалому зберіганню, відповідають похідні фероцену, наприклад, 1,1'-диметилфероцен [10]. Перенос електронів між фероцен-іоном та ферментом відбувається швидко, завдяки низькій розчинності у водному середовищі медіатора, який локалізується на поверхні електрода.

Разом з тим, мікробні медіаторні сенсори (ММС) є більш складними системами порівняно з ферментними аналогами, оскільки наперед невідомо, які саме мікроорганізми та медіатори слід застосовувати для клітинного біоелектрода [8, 11, 12]. Оптимальне поєднання медіатора з певним типом мікробних клітин є запорукою отримання ефективних аналітичних систем.

Створення біоелектродів передбачає ефективну та довготривалу роботу рецепторного елементу з іммобілізованими мікроорганізмами. Серед відомих методів іммобілізації простим і розповсюдженим є фізична адсорбція, що базується на притаманній бактеріям здатності прикріплюватися до поверхні різних субстратів, або розташовуватися в порах носіїв [13, 14]. Ефективність адсорбції визначається природою мікроорганізмів і хімічними властивостями матеріалів, до яких відносять питому поверхню, наявність функціональних груп, заряд. З цього погляду перспективними є вуглецеві матеріали, які мають достатню сорбційну ємність щодо бактеріальних клітин та надійно їх утримують; іммобілізовані мікроорганізми при цьому зберігають життєдіяльність [15–18].

При іммобілізації клітин у рецепторному елементі біосенсора носій може по-різному (як позитивно, так і негативно) впливати на фізіологічну активність

мікроорганізмів [19]. Результатом такого впливу є зміна основних параметрів – чутливості, стабільності роботи та субстратної специфічності сенсора [20, 21]. Тому вимоги, які висуваються до методів іммобілізації, включають оптимальне співвідношення кількості біологічного матеріалу та товщини біорецептора і збереження високої біохімічної активності клітин.

Перспективними для створення біоелектродів є бактерії *Gluconobacter oxydans*, які мають унікальну метаболічну систему, що характеризується редукцією основних дисиміляційних шляхів та поверхневою локалізацією деяких ферментів (наприклад, алкогольдегідрогенази, яка є мембранозв'язаним комплексом). Завдяки їх наявності і прискореного електронного транспорту клітини здатні швидко окиснювати різноманітні органічні сполуки з утворенням та накопиченням у середовищі їхніх частково окиснених метаболітів [22, 23]. Це дозволяє ефективно використовувати неушкоджені клітини при створенні біосенсорів.

Широкий спектр субстратів зумовлює можливість аналізу сполук, які не окиснюються іншими мікроорганізмами (у деяких випадках подібна «неселективність» може розглядається навіть як певна перевага [24, 25]). Низький "коефіцієнт корисної дії" процесів окиснення компенсується їхньою високою інтенсивністю, що є необхідною умовою для отримання прийнятного рівня аналітичного сигналу сенсора [26, 27]. Зазначені особливості є підґрунтям при створенні біосенсорів безмедіаторного й медіаторного типів для визначення концентрації цукрів, альдоз, спиртів [28–30].

У роботі узагальнені результати власних досліджень закономірностей бактеріальної сорбції та розглянуті можливості використання іммобілізованих на вуглецевих матеріалах клітин *G. oxydans* у біосенсорах для визначення деяких органічних субстратів, зокрема глюкози та етанолу.

Матеріали і методи

У дослідженнях були використані бактерії *Gluconobacter oxydans, Escherihia coli, Pseudomonas rathonis*. Культивування їх проводили на рідких поживних середовищах при температурі 28–30 °С. Клітини відокремлювали від культуральної рідини центрифугуванням; осад ресуспендували в калій-фосфатному буфері (pH 6,5 – 7,0).

Модифіковані вуглецеві носії (активовані та окиснені тканини) отримували загальноприйнятими методами: термолізом вихідних матеріалів при 900–1000 °С та рідкофазною обробкою окиснюючими агентами [16]. Основні характеристики матеріалів наведені в табл. 1.

Для приготування рецепторних елементів сенсорів використовували синтетичне (СКН, СКС) та технічне активне вугілля (КАУ) у порошкоподібному стані. Вихідні розчини субстратів (етанолу та глюкози) для калібрувальних залежностей готували на дистильованій воді в діапазоні концентрацій 0,1 – 10 мМ.

Сорбцію та десорбцію бактерій вивчали в статичних умовах методом окремих наважок при 20 °С. Кількість іммобілізованих бактерій визначали за оптичною густиною та перераховували на 1 мг сухої ваги клітин на 1 г носія. Величини сорбції бактерій представлені як середні значення трьох–п'яти вимірювань; похибка складає 5 – 15 %.

Рецепторні елементи біосенсора формували нанесенням бактеріальної суспензії на поверхню вуглецевих носіїв. При довготривалих експериментах зразки зберігали в буферному розчині при температурі +4 °С.

Медіаторні електроди формували шляхом заповнення пластикових циліндрів графітовою пастою або вуглецевими матеріалами. Пасту отримували змішуванням графітової пудри (Fluka 50870) або подрібненого вугілля та парафінової олії (Fluka 76235). Медіатор 1,1'-диметилферoцен вносили безпосередньо в електродну матрицю, а 2,6-дихлорфеноліндофенол (DCPIP) додавали до розчинів, що досліджувалися.

Таблиця 1. Основні характеристики вуглецевих матеріаів.

Вуглецеві носії	V_s (за C_6H_6) $см^3/г$	$S_{пит}$, $м^2/г$	Обмінна ємність	
			0,1 н. NaOH, м-екв/г	0,1 н. HCl, м-екв/г
Вуглецева тканина (активована)	0,55	1240,0	0,2	0,5
Вуглецева тканина (окиснена 1)	0,31	260	1,8	0,1
Вуглецева тканина (окиснена 2)	0,34	300	2,4	0,0

Як перетворювач сигналів біосенсорів, що працюють на основі кисневого електрода Кларка, використовували амперометричну систему "Ingold" 5313/010 (Швейцарія). Робочими параметрами біосенсорів були максимальна величина та швидкість змінення вихідного сигналу при додаванні субстратів. Для реєстрування вольтамперних характеристик та величин відгуків медіаторних електродів використовували потенціостат IPC2L (Кронас, Росія) та полярограф IPC2000. При паралельних вимірюваннях вольтамперограми відтворюються у своїх основних показниках (положення та максимум граничних піків).

Результати та їх обговорення

Сорбція мікроорганізмів на вуглецевих носіях

Досліджено адсорбцію та закріплення бактерій *Gluconobacter oxydans, Escherihia coli, Pseudomonas rathonis* на вуглецевих матеріалах, та проведено оцінку їхньої життєдіяльності. Дані щодо співвідношення показників сорбції мікроорганізмів на вуглецевих носіях та їх десорбції наведені в табл. 2. Як видно, найвища здатність сорбувати та утримувати бактерії характерна для окисненої та активованої вуглецевих тканин.

Таблиця 2. Сорбція та фіксування бактерій *G. oxydans, E. coli, P. rathonis* на модифікованих вуглецевих матеріалах

Вуглецеві носії	Кількість сорбованих клітин, мг/г			Десорбція клітин, %		
	P. rathonis	*E. coli*	*G. oxydans*	*P. rathonis*	*E. coli*	*G. oxydans*
Активована тканина	28.8	28.5	48.5	0.7	5.2	2.0
Окиснена тканина 1	24.9	30.4	29.3	4.8	1.6	4.4
Окиснена тканина 2	21,7	29,4	30,7	4,6	4,8	2,3
Тканина (карбонизат)	12.5	14.1	24.5	13.6	8.5	4.9
Повсть	16.3	23.9	21.3	7.4	5.9	3.8

Оскільки активовані волокна мають позитивний заряд поверхні, а окиснені – негативний [12], то пояснити високу кількість сорбованих негативно заряджених клітин на обох типах матеріалів лише за рахунок електростатики неможливо. У даному випадку, ймовірно, має місце зв’язування аміно- та карбоксильних груп, або інших центрів адгезії клітинної стінки, з поверхневими групами носіїв (–OH, –COOH).

Кінетичні дослідження сорбції бактерій свідчать, що клітини сорбуються на зовнішній поверхні, або в міжволоконному просторі носіїв. Зокрема, адсорбційна рівновага встановлюється після години контакту матеріалу з бактеріальною суспензією.

Це є закономірним, оскільки за стеричними причинами розвинутий поруватий простір вуглецевих матеріалів недоступний для бактерій, розмір яких перевищує розмір пор.

Таким чином, дослідження сорбції клітин *G. oxydans* на різних типах вуглецевих тканин дозволяє вибрати більш ефективні для подальшого використання в мікробних сенсорах [31, 32].

Сенсор на основі клітин G. oxydans та електрода Кларка

На основі отриманих результатів сконструйовано амперметричний сенсор з використанням електрода Кларка та бактерій *G. oxydans,* які іммобілізовані на вуглецевих носіях, для визначення глюкози, етанолу тощо. На рис. 1 наведені калібрувальні залежності відгуку біосенсора з використанням різних вуглецевих матеріалів. Так, більш чутливим щодо глюкози й етанолу є сенсор на основі окисненої вуглецевої тканини [33].

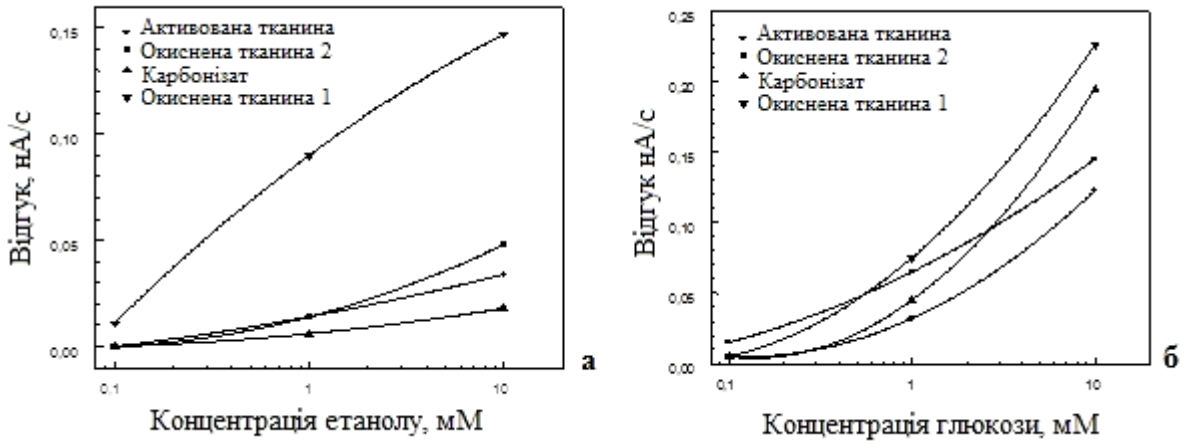


Рис. 1. Калібрувальні залежності відгуку біосенсора на глюкозу (*а*) та етанол (*б*).

При визначенні субстратної специфічності створеного сенсора встановлено, що при іммобілізації бактерій на вуглецевих носіях спостерігається значне зниження чутливості електрода до пропанолу, бутанолу та гліцерину, що підвищує селективність його дії.

Важливим показником роботи біосенсора є його стабільність – залежність величини відгуку на субстрат від кількості вимірювань. Дослідження показали, що цей показник зберігається на високому рівні протягом 24 год, забезпечуючи швидке відновлення рецепторного елементу після виміру.

Мікробні медіаторні сенсори

Розглянута можливість створення біосенсорів на основі клітин *G. oxydans* з використанням 1,1'-диметилферoцену та DCPIP. Для цього формували ММС на основі *G. oxydans*. Оцінку фізіологічного стану іммобілізованих клітин проводили на основі реєстрації їхньої дихальної активності в присутності субстратів (глюкози або етанолу).

Результати вимірювання вольтамперних характеристик (ВАХ) створених електродів, що досліджувалися, наведені на рис. 2. Аналіз отриманих ВАХ свідчить, що іммобілізація бактерій на електроді супроводжується зростанням анодної напівхвилі, а додавання до вимірювальної кювети глюкози приводить до подальшого зростання струму. Саме цей ефект визначає інтенсивність аналітичного відгуку сенсора [34].

Можливо припустити, що механізм генерації сенсорних сигналів при введенні в середовище органічних речовин, що окиснюються, відповідає моделі, яка описує проникнення субстрату крізь зовнішню мембрану клітини та надходження його в зону локалізації інтактної альдозо- чи алкогольдегідрогенази [22]. Відновлений фермент

передає електрони безпосередньо на медіатор. За його відсутності ферментна реакція пов'язана з активністю інших складових дихального ланцюга, які використовують кисень як кінцевий акцептор електронів.

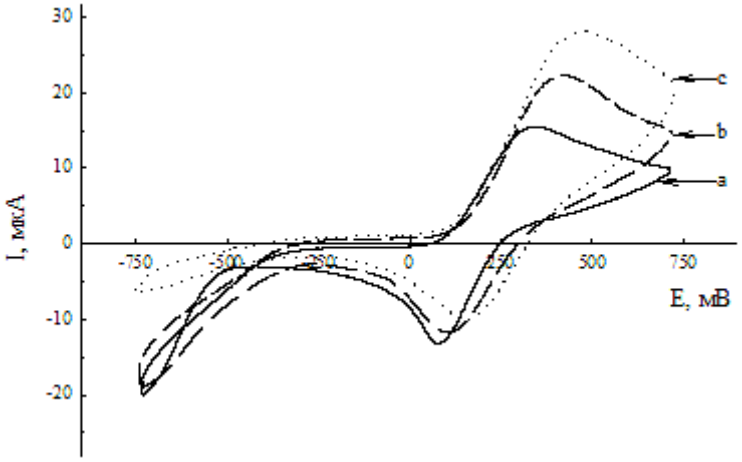
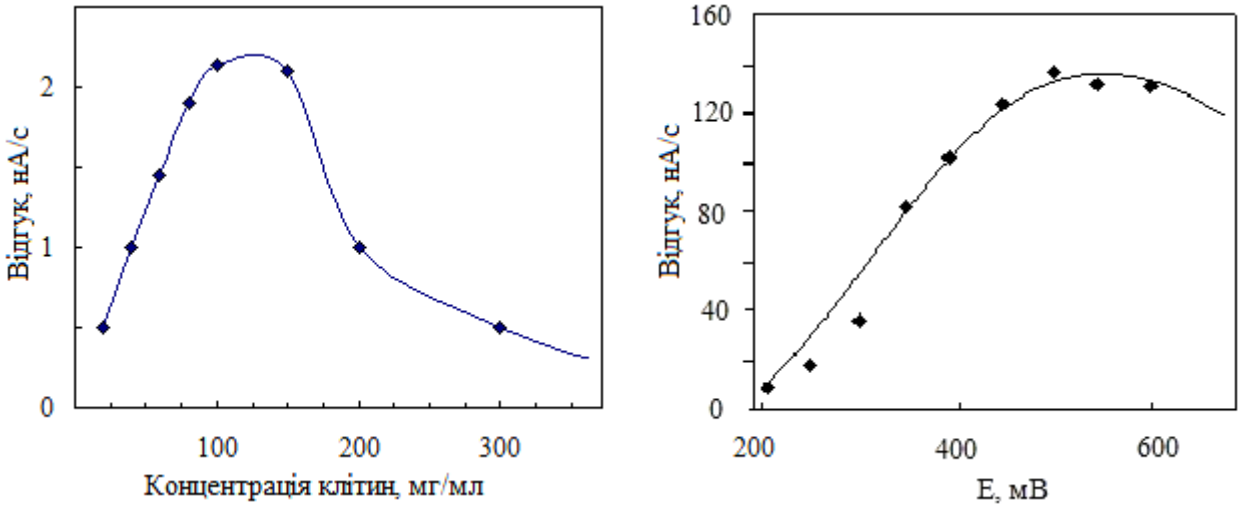


Рис. 2. Вольтамперні характеристики графітового електрода: a) з 1,1'-диметилфероценом; b) при нанесенні на поверхню електроду суспензії клітин; c) при додаванні 10 мМ глюкози.

На рис. 3 наведені залежності величини відгуку сенсора від вмісту іммобілізованих на його поверхні бактерій *G. oxydans* (а) та від потенціалу робочого електрода (б). Як видно, оптимального значення відгук сягає при кількості клітин в суспензії ~100–150 мг/мл. Подальше збільшення концентрації мікроорганізмів пригнічує їх дихальну активність та дифузію субстрату, що призводить до зниження величини відгуків. Крім того, великий прошарок клітин гірше утримується на поверхні електрода.



а *б*

Рис. 3. Залежність відгуку сенсора від концентрації клітин (*а*) в суспензії та від потенціалу робочого електрода (*б*) (концентрація глюкози 5 мМ).

Незважаючи на те, що найвищі значення аналітичних сигналів отримані в діапазоні 500–600 мВ, більшу частину вимірів проводили на лінійній ділянці залежності (при потенціалі 250 мВ), оскільки при збільшенні потенціалу зростає нестабільність роботи електрода.

Визначення субстратної специфічності сенсора виявило його високу чутливість відносно глюкози та етанолу. Залежності сигналів від концентрацій субстратів (глюкози та етанолу) відображені на рис. 4. Як видно, в діапазоні концентрацій 10 мкМ – 1 мМ відгуки сенсора на глюкозу перевищують відгуки на етанол.

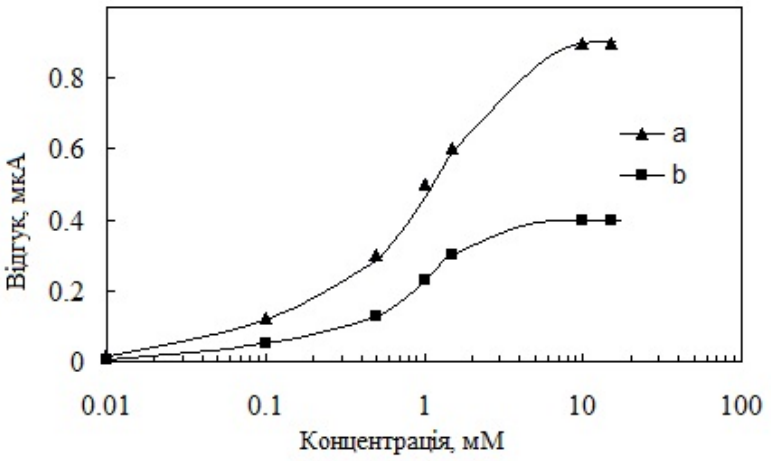


Рис. 4. Залежність відгуків сенсора від концентрації субстратів:
a – глюкоза;
b – етанол.

Максимальні відгуки сенсора спостерігаються при значеннях pH 6,0–6,8, що відповідає каталітичній активності альдозодегідрогенази *G. oxydans* [23], та при концентрації фосфатного буферу в діапазоні 6.0–6.8 мМ, оскільки це є типовим проявом поведінки клітин багатьох видів і визначається залежністю метаболічної активності бактеріальних штамів від концентрації солей у розчині [26, 27].

Встановлено, що максимальні сигнали сенсора реєструються за умови вмісту медіатора 0,5 – 1,0 мг на 100 мг носія. Дані щодо впливу кількості медіатора на роботу біосенсора оцінювали за величиною піку струму на ВАХ. Отримані результати представлені на рис. 5. Вивчення стабільності роботи сенсора показує, що ММС з 1,1'-диметилфероценом в процесі роботи мають тенденцію до зменшення величини відгуку на глюкозу: впродовж 20–25 вимірювань спостерігається зниження інтенсивності сигналів на 60–70%.

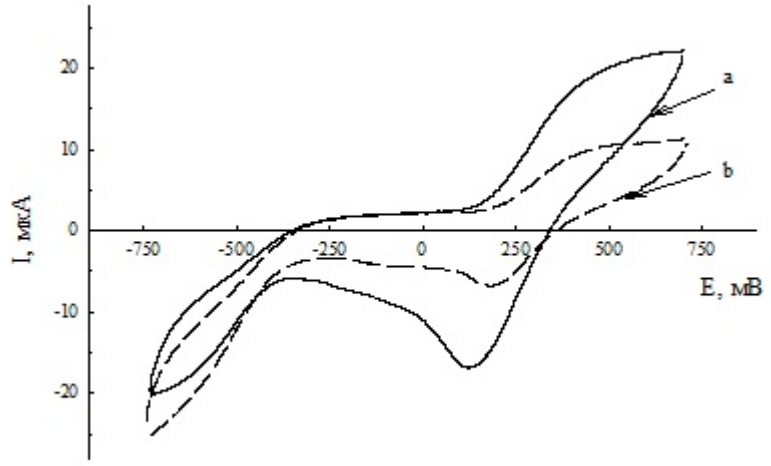


Рис. 5. Вольтамперні характеристики електрода перед вимірюванням (a) та після (b) 25 циклів.

Автори роботи [20] припускають, що під час довготривалих вимірювань сигнали ферментного альдозодегідрогеназного електрода, модифікованого 1,1'-диметилфероценом, знижуються внаслідок десорбції з поверхні електрода частини окисненої форми медіатора, яка має більшу розчинність, ніж відновлена. На нашу думку, причинами зниження стабільності сенсора можуть бути також недостатньо надійна іммобілізація та десорбція клітин у процесі вимірювання, інгібуючий вплив електрохімічних процесів на фізіологічну активність іммобілізованих клітин. Про негативний вплив режиму електрокаталітичного окиснення на активність бактерій свідчить, що сигнал знову збільшується, коли після 30–40 неперервних вимірювань електрод залишається на деякий час у буферному розчині в безтоковому режимі.

Отже, отримані результати, як вже зазначалось, дозволяють зробити припущення про наявність декількох складових, що викликають зниження сигналів бактеріального медіаторного електрода. Так, стабільність сенсора вдається збільшити шляхом безпосереднього змішування вуглецевого матеріалу з суспензією бактерій, що дозволяє їм надійно утримуватися на поверхні електрода в процесі роботи.

Підвищити чутливість й стабільність роботи сенсора з 1,1'- диметилфероценом вдається застосуванням активного вугілля (СКН, СКС, КАУ). Операційна стабільність створених електродів виявляється досить низькою, але вуглецеві носії забезпечують більш високі відгуки, аніж електроди на основі графітової пасти (рис. 6).

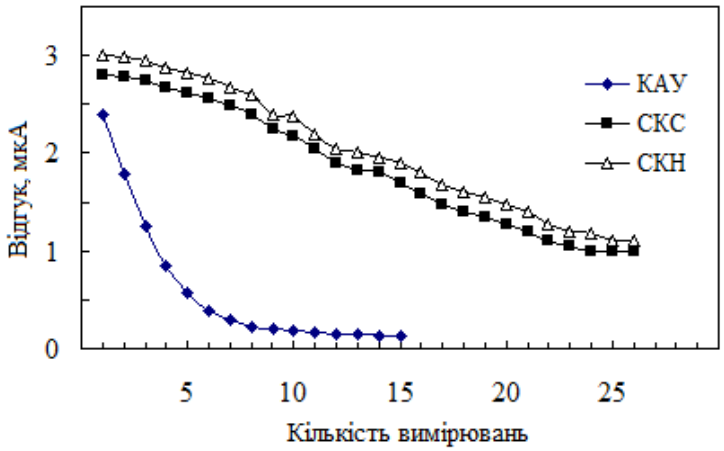


Рис. 6. Операційна стабільність електродів на основі вуглецевих носіїв.

При дослідженні субстратної специфічності ММС виявлено, що на активованому вугіллі вона змінюється (рис. 7). Так, відгуки електродів з СКН, СКС на етанол і глюкозу майже однакові за величинами, тобто відбувається інверсія чутливості на речовини, що аналізуються.

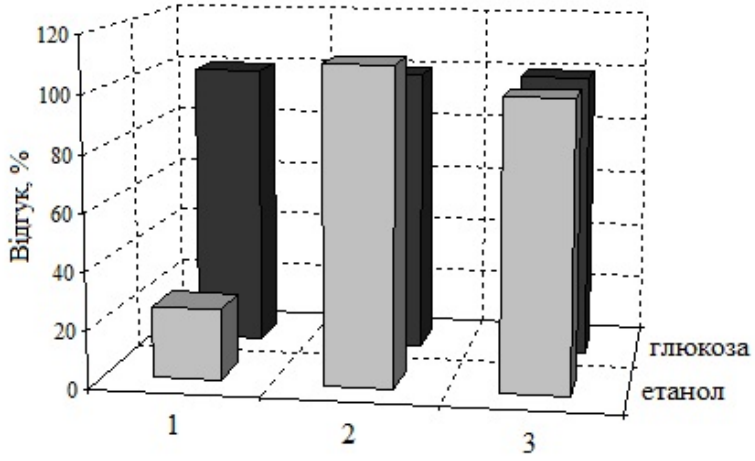


Рис. 7. Співвідношення відгуків сенсорів на основі різних вуглецевих матеріалів:
1 – графітова паста;
2 – СКН;
3 – СКС.

Можливість використання DCPIP як ефективного медіатора електронного транспорту підтверджують вольтамперні характеристики електродів (рис. 8). Як і в разі використання 1,1'-диметилфероцену, іммобілізація клітин приводить до зростання анодної напівхвилі (b), а додавання глюкози – до подальшого зростання струму (c).

При дослідженні pH-залежності інтенсивності сигналів сенсора на глюкозу (0,5 мМ) встановлено, що їхні максимальні значення спостерігаються при pH 6,0. Це майже співпадає з оптимумом pH для сенсора на основі клітин *G. oxydans* з медіатором феріціанiду [35] та наближається до оптимуму pH для сенсора з 1,1'-диметилфероценом. Даний факт підтверджує, що застосування медіаторів різних типів не викликає значної зміни каталітичних властивостей ферментів бактерій, які

складають основу сенсорів. Залежності сигналів сенсора від концентрацій етанолу та глюкози наведені на рис. 9: сенсор виявляється більш чутливим до етанолу, аніж до глюкози.

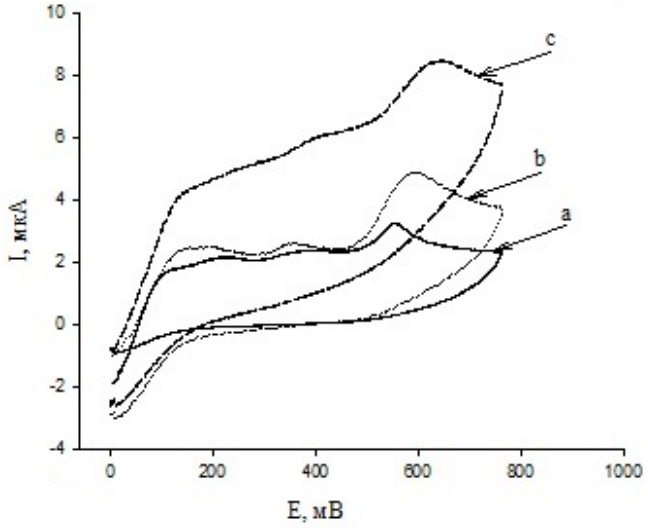


Рис. 8. Вольтамперні характеристики електродів:
a – у присутності DCPIP;
b – при нанесенні на поверхню електрода суспензії клітин;
c – при додаванні 10 мМ глюкози.

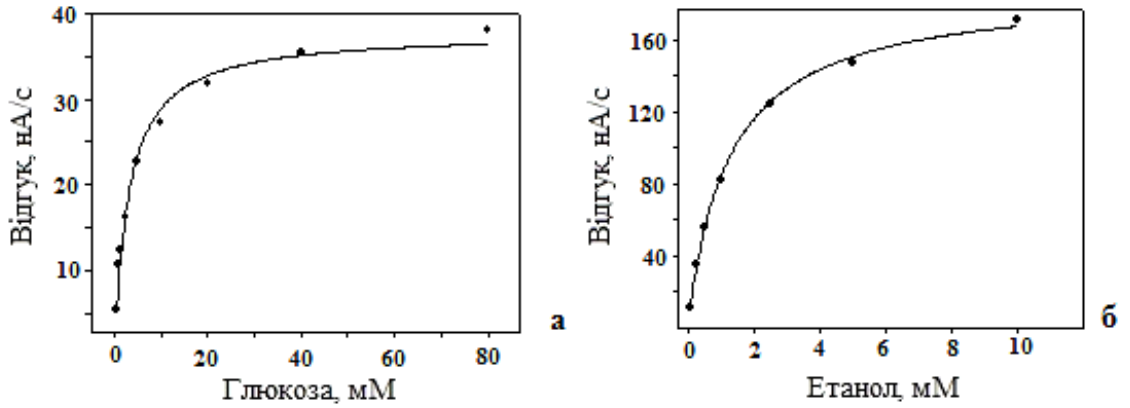


Рис. 9. Калібрувальні залежності медіаторного електрода на глюкозу (*а*) та етанол (*б*).

Типові криві операційної стабільності сенсора на глюкозу й етанол наведені на рис. 10. Як правило, перші 20–25 введень субстрату супроводжуються збільшенням відгуків сенсора. Імовірно, це обумовлено відновленням фізіологічної активності клітин. Впродовж наступних 50–70 вимірювань відгуки стабілізуються (відносне стандартне відхилення для 60 вимірювань складає 6,3 %).

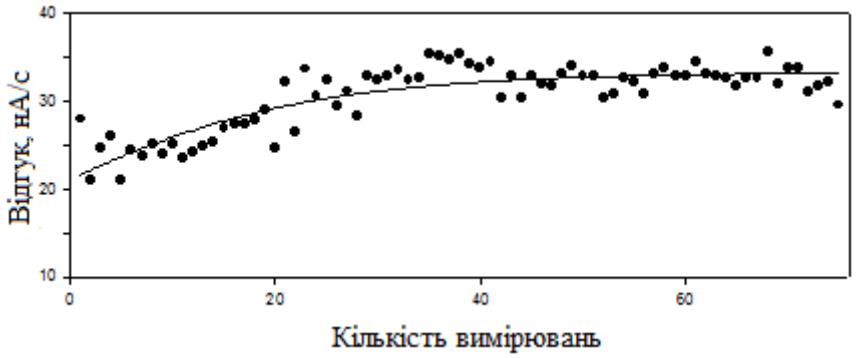


Рис. 10. Операційна стабільність сенсора на основі DCPIP (конц. глюкози 0,5 мМ).

Дослідження довготривалості роботи сенсора показали, що. впродовж 10 діб зниження відгуків сенсора в середньому складає ~ 30%. Таким чином, сенсор, в якому використано DCPIP, своєю стабільністю перевершує аналогічний пристрій на основі 1,1'-диметилфероцену.

Насамкінець варто зазначити, що можливості теоретичного передбачення ефективності використання того чи іншого типу медіатора в поєднанні з різними бактеріями обмежені. Це пов'язано з відсутністю моделей взаємодії в системах "медіатор–фермент". Для побудови таких моделей необхідна інформація про особливості структурно-функціональної організації ферментних систем мікроорганізмів. Тому важливим є подальший пошук ефективних сенсорних композицій "медіатор–клітина–носій".

Висновки

Отримані дані свідчать про високу здатність вуглецевих матеріалів до адгезії бактеріальних клітин. Незначний ступінь десорбції бактерій підтверджує, що після сорбції відбувається надійне утримання клітин бактерій на розвиненій поверхні вуглецевих носіїв. Іммобілізовані мікроорганізми зберігають життєздатність та високу біохімічну активність, що вказує на принципову можливість використання цих матеріалів для створення рецепторних елементів біосенсорів. На прикладі двох медіаторів (1,1'-диметилфероцен, 2,6-дихлорфеноліндофенол) продемонстровано можливість створення біосенсорів на основі іммобілізованого *G. oxydans* для визначення глюкози та етанолу. Застосування різних модифікацій активованого вугілля для іммобілізації бактерій підвищує чутливість сенсора щодо глюкози та етанолу. Результати досліджень корисні для скринінгу мікроорганізмів та сорбентів при реалізації біотехнологічних процесів з використанням іммобілізованих клітин.

Література

1. Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Microbial Biosensors // Analytica Chimica Acta. – 2006. – V. 568, №. 1-2. – P. 200-210.
2. Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E. Biosensors Detection of Pathogenic Bacteria // Biosensors and Bioelectronics. – V. 14, №. 7. – P. 599- 624.
3. Shin H. J. Genetically Engineered Microbial Biosensors for in Situ Monitoring of Environmental Pollution // Applied Microbiology and Biotechnology. 2011. – V. 89, №. 4. – P. 867-877.
4. Ding L., Du D., Zhang X. J., Ju H. X. Trends in Cell-Based Electrochemical Biosensors // Current Medicinal Chemistry. – 2008. – V. 15, №. 30. – P. 3160-3170.
5. Rogers K. R. Recent Advances in Biosensor Techniques for Environmental Monitoring // Analytica Chimica Acta. – 2006. – V. 568, №. 1-2. – P. 222-231.
6. Стародуб М.Ф., Канюк М.І., Шмирєва О.М. Мікроелектронні мультипараметричні біосенсори // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 61–73.
7. Дзядевич С.В. Амперометричні ферментні біосенсори // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 46–60.
8. Gorton L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells // Electroanalysis. – 1995. – V. 7, № 1. – P. 23–45.
9. Ксенжек О.С., Петрова С.А. Электрохимические свойства обратимых биологических редокс-систем. – Москва: Наука, 1986. – 150 с.
10. Каленюк А.А. Особенности функционирования медиаторного сенсора на основе *Gluconobacter oxydans.* // IV съезд Укр. Биофиз. общ. (Дек. 19–21, 2006, Донецк). – Тез. докл. С. 28.
11. Kalcher K., Kaufmann J.-M., Wang J., Svancara I., Vytras K., Neuhold C., Yang Z.. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis ob the period 1990-1993 // Electroanalysis – 1995. – V. 7, № 1. – P. 5–22.

12. Kano K., Ikeda T. Fundamentals and Practices of Mediated Bioelectrocatalysis. Reviews // Analitical Sciences. – 2000. –V.16. – P. 1013–1021.
13. Назаров Н.М. Иммобилизованные биокатализаторы в биотехнологических процессах // Авиакосм. и экологическая медицина. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 3–10.
14. Bar-Or Y. The effect of adhesion on survival and growth of microorganisms // Experienta. – 1990. – V.46, № 8. – P. 823–826.
15. Ермоленко И. Н., Люблинер И. П., Гулько Н. В. Элементосодержащие угольные волокнистые материалы. – Минск: Наука и техника, 1982. – 272 с.
16. Тарковская И. А. Окисленный уголь. – Киев: Наук. думка, 1981. – 196 с.
17. Коваленко Г.А., Комова О.В., Симаков А.В., Рудина Н.А., Хомов В.В. Углеродсорежащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов // Биотехнология. – 2002. – № 3. – С. 55–66.
18. Zhang S., Wright G., Yang Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction // Biosens. and Bioelectron. – 2000. – V.15, № 5-6. – P. 273–282.
19. Семенчук И.Н., Таранова Л.А., Каленюк А.А., Ильясов П.В., Решетилов А.Н. Влияние различных способов иммобилизации на стабильность микробного сенсора на основе Pseudomonas rathonis T при детекции поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36, №1. – С. 80–84.
20. Smolander M., Livio H.-L. Mediated amperometric determination of xylose and glucose with an immobilized aldose dehydrogenase electrode // Biosensors & Bioelectronics. – 1992. – V. 7. – P. 637 – 643.
21. Reshetilov A.N., Trotsenko Yu.A., Morozova N.O., Iliasov P.V., Ashin V.V. Characteristics of *Gluconobacter oxydans* B-1280 and Pichia methanolica MN4 cell based biosensors for detection of ethanol // Process Biochemistry. – 2001. – V.36. – P. 1015–1020.
22. Ameyama M., Adachi O. D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* // Methods Enzymol. – 1982. – V.89. – P. 450–457.
23. Ameyama M, Matsushita K, Ohno Y, Shinagawa E, Adachi O. Existence of a novel prosthetic group, PQQ, in membrane-bound, electron transport chain-linked, primary dehydrogenases of oxidative bacteria // FEBS Lett. – 1982. – V.139, № 2. – P.255–263.
24. Gopel W., Ziegler C., Breer H. et al. // Bioelectronic noses: a status report. Part I. Biosenors&Bioelectronics. – 1998. – V. 13, № 3-4. – P. 479–493.
25. Ziegler C., Gopel W.Hammerle H. et al. // Bioelectronic noses: a status report. Part II. Biosensors&Bioelectronics. – 1998. – V. 13, № 5. – P. 539–571.
26. Луста К.А., Решетилов А.Н. Физиолого-биохимические особенности *Gluconobacter oxydans* и перспективы использования в биотехнологии и биосенсорных системах // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т.34, № 4. – С. 339–353.
27. Донова М. В., Борман Е. А., Кощеенко К. А., Красильникова Т. Н., Поморцева Н. В. Окисление D-сорбита в L-сорбозу иммобилизованными клетками *Gluconobacter oxydans*, инкубированными в ростовой бреде // Прикл. биохимия и микробиология. – 1988. – Т. 24. – С. 368–374.
28. D'Souza S. Microbial biosensors // Biosensors & Bioelectronics. – 2001. – V.16. – P. 337–353.
29. Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Donova M.V., Dovbnya D.V., Boronin A.M., Leathers T.D. and Greene R.V. Evaluation of a Gluconobacter oxydans Whole Cell Biosensor for Amperometric Detection of Xylose // Biosensors & Bioelectronics. – 1997. – V.12, № 3. – P. 241–247.
30. Karube I., Tamia E., Sode K., Yokoyama K. Application of microbiological sensors in fermentation processes // Analytica Chimica Acta. – 1988. – V.213. №. 1. – P.69–77.

31. Kalenyuk A.A., Taranova L.A., Tarasenko Yu.A., Strelko V.V.Sorption of bacteria on carbon materials and their application in biosensor monitoring // Transboundary pollution (November 23–26, 2000, Bucharest, Romania). – Abstract. P.224–226.
32. Kalenyuk A.A., Semenchuk I.N., Reshetilov A.N., Taranova L.A. Investigation of different carriers for immobilization of microorganisms in amperometric biosensors // ”Cereco ‘97” (June 1–4, Miskols – Lillafured, Hungary)). – Abstract. P.112.
33. Каленюк А.А., Таранова Л.А., Решетилов А.Н., Тарасенко Ю.А., Стрелко В.В. Иммобилизация бактерий на модифицированных углеродных волокнах для применения в биосенсорах // Биотехнология. – 1999. – №5. – С. 71–78.
34. Racek J. Cell-based biosensors. – Lancaster. Technomic Publishing Company, 1995. – 307 p.
35. Решетилов А.Н. Биосенсоры потенциометрического и амперометрического типов на основе микробных клеток и ферментов для использования в медицине, биотехнологии и экологическом контроле // Сенсорные системы. – 1997. – Т.11, №4. – С.465–482.

МИКРОБНЫЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЭТАНОЛА И ГЛЮКОЗЫ

А.А. Каленюк, Ю.А. Тарасенко, И.И. Геращенко

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина

Экспериментально подтверждена целесообразность использования бактерий рода Gluconobacter в биосенсорах для определения органических субстратов. Изучены закономерности электрокаталитического окисления этанола и глюкозы иммобилизованными на углеродных материалах клетками G. oxydans в присутствии медиаторов электронного переноса, а также проведена оценка функциональных характеристик созданной модели биосенсора.

MICROBIAL AMPEROMETRIC SENSORS FOR DETECTION OF ETHANOL AND GLUCOSE

A.A. Kaleniuk, Yu.A. Tarasenko, I.I. Gerashchenko

Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, 17 General Naumov Str. Kyiv, 03164, Ukraine

The possibility of application of genus Gluconobacter bacteria in biosensors for detection of organic substances was experimentally proved. Regularities electrocatalytic oxidation of ethanol and glucose immobilized on carbon materials G. oxydans cells in the presence of electron transfer mediators were investigated and evaluation of the functional characteristics of the model created biosensor was carried out.