



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12M 1/42 (2024.01); C12Q 1/02 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2024112689, 10.05.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.05.2024

Дата регистрации:
18.07.2024

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 10.05.2024

(45) Опубликовано: 18.07.2024 Бюл. № 20

Адрес для переписки:
109377, Москва, а/я 23, Саленко Александр
Михайлович

(72) Автор(ы):
Арляпов Вячеслав Алексеевич (RU),
Перчиков Роман Николаевич (RU),
Салтанов Иван Викторович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Общество с ограниченной ответственностью
"ИННОБИОСИСТЕМС" (RU)

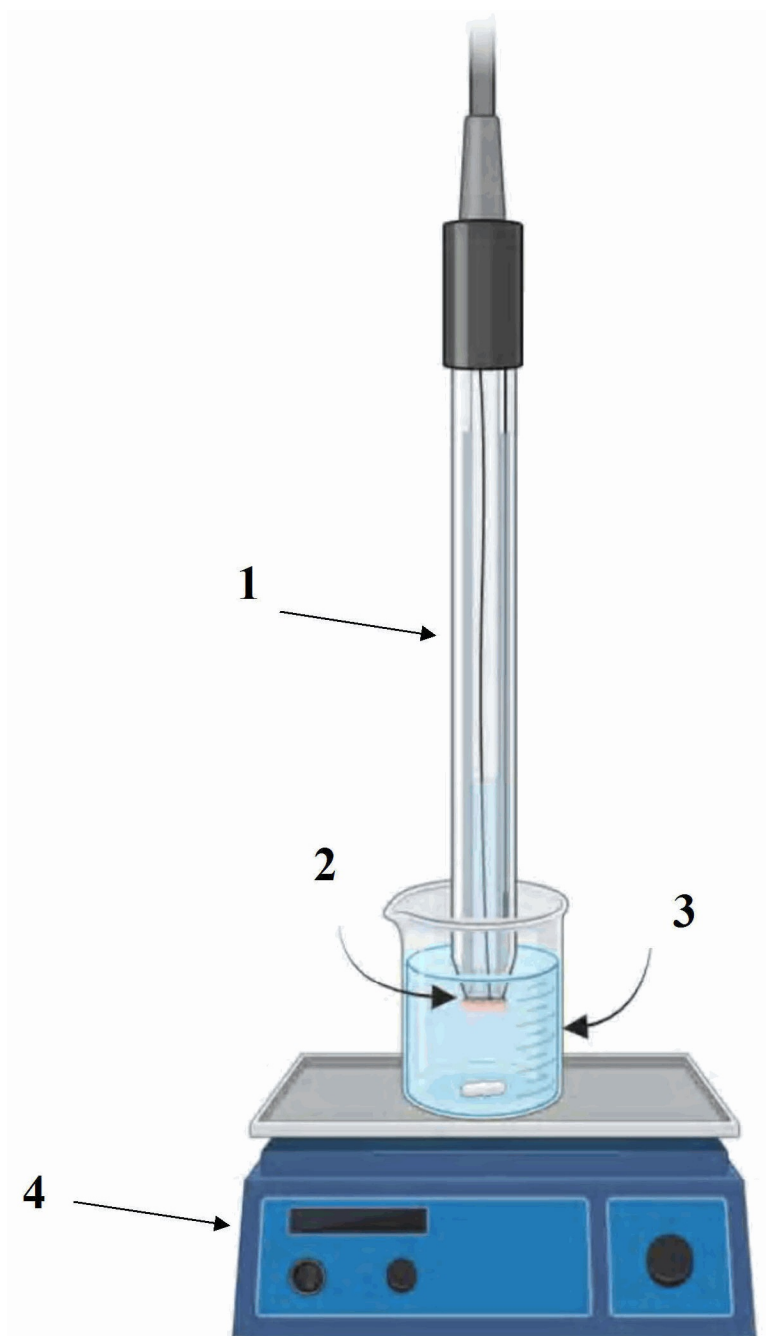
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 117918 U1, 10.07.2012. RU 129930
U1, 10.07.2013. КУРБАНАЛИЕВА С.К.,
ХАРЬКОВА А.С., АРЛЯПОВ В.А.
Разработка биосенсора на основе бактерий
Paracoccus uuei, иммобилизованных в
электропроводящий гель БСА с нейтральным
красным // Известия ТулГУ. Естественные
науки. 2019. Вып. 1. С. 11-20. DE 19547655 A1,
26.06.1997.

(54) Биосенсорное аналитическое устройство для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями

(57) Реферат:

Изобретение относится к области экологии, а именно к биосенсорным аналитическим устройствам. Заявленное устройство может быть использовано для детекции (определения) уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями на основе измерения биохимического потребления кислорода в образцах воды различного происхождения, в том числе поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. Биосенсорное аналитическое устройство для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями содержит измерительную кювету (3) с буферным раствором, магнитную мешалку (4) и биосенсорную систему, включающую кислородный электрод (1), выполненный с возможностью подключения к регистрирующему

ответ биосенсорной системы прибору, и размещенный на кислородном электроде (1) рецепторный элемент (2), включающий ассоциацию микроорганизмов, иммобилизованных на носителе. В качестве микроорганизмов использованы Paracoccus uuei ВКМ В-3302, Pseudomonas veronii ВКМ В-3835 и Rhodococcus fascians ВКМ Ас-2996 в массовом соотношении 1:1:1, иммобилизованные на нитроцеллюлозной мембране и обработанные сверху раствором хитозана, образующим после высыхания гидрогель. Техническим результатом изобретения является увеличение верхней границы диапазона определяемых значений биохимического потребления кислорода (БПК) до 200 мг/дм³, повышение операционной стабильности ответа биосенсорной системы, а также увеличение времени стабильной работы биосенсорной системы. 3 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл.



Фиг. 1

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12M 1/42 (2024.01); *C12Q 1/02* (2024.01)(21)(22) Application: **2024112689, 10.05.2024**(24) Effective date for property rights:
10.05.2024Registration date:
18.07.2024

Priority:

(22) Date of filing: **10.05.2024**(45) Date of publication: **18.07.2024** Bull. № 20

Mail address:

**109377, Moskva, a/ya 23, Salenko Aleksandr
Mikhajlovich**

(72) Inventor(s):

**Arliapov Viacheslav Alekseevich (RU),
Perchikov Roman Nikolaevich (RU),
Saltanov Ivan Viktorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**LIMITED LIABILITY COMPANY
"INNOBIOSYSTEMS" (RU)**(54) **BIOSENSOR ANALYTICAL DEVICE FOR DETECTING LEVEL OF WATER CONTAMINATION WITH BIODEGRADABLE ORGANIC COMPOUNDS**

(57) Abstract:

FIELD: ecology; measurement; biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to ecology, specifically to biosensor analytical devices. Claimed device can be used to detect (determine) the level of water contamination with biodegradable organic compounds based on measuring biochemical oxygen consumption in water samples of various origins, including surface fresh, underground (ground), drinking, waste and treated waste water. Biosensor analytical device for detecting the level of contamination of water with biodegradable organic compounds comprises measuring cell (3) with a buffer solution, magnetic stirrer (4) and a biosensor system comprising oxygen electrode (1) configured to be connected to a device recording the response of the biosensor system, and receptor element (2) placed on oxygen electrode (1),

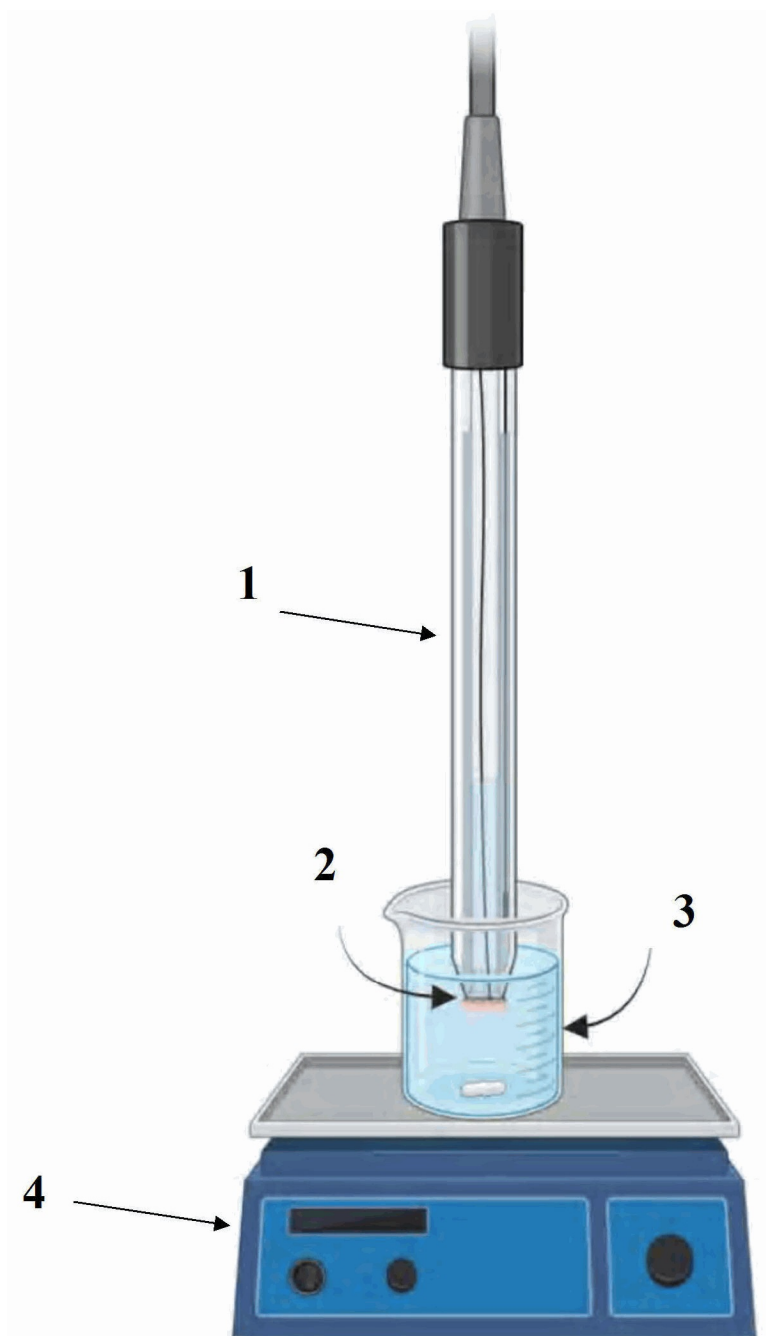
comprising an association of microorganisms immobilized on a carrier. Microorganisms used are *Paracoccus yeei* VKM B-3302, *Pseudomonas veronii* VKM B-3835 and *Rhodococcus fascians* VKM Ac-2996 in weight ratio of 1:1:1, immobilized on nitrocellulose membrane and treated from above with a solution of chitosan, which forms a hydrogel after drying.

EFFECT: increasing the upper limit of the range of determined values of biochemical oxygen consumption (BOC) to 200 mg/dm³, increasing the operational stability of the response of the biosensor system, as well as increasing the time of stable operation of the biosensor system.

4 cl, 4 dwg, 1 tbl

RU 2 823 128 C1

RU 2 823 128 C1



Фиг. 1

[01] Область техники

[02] Изобретение относится к области экологии, а именно, к биосенсорным аналитическим устройствам. Заявленное устройство может быть использовано для детекции (определения) уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями на основе измерения биохимического потребления кислорода в образцах воды различного происхождения, в том числе поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах.

[03] Уровень техники

[04] В настоящее время для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями применяют такой показатель, как биохимическое потребление кислорода (БПК), то есть количество кислорода (в мг), требуемое для окисления находящихся в 1 дм³ воды органических веществ в аэробных условиях, в частности БПК₅ - это количество кислорода, использованное микроорганизмами для окисления всех растворенных органических веществ в изолированном сосуде с образцом в течение 5 суток, БПК₂₀ - соответственно до 20 суток. Таким образом, существующий стандартный способ определения БПК, широко используемый производственными предприятиями, санитарными службами и водоочистными сооружениями, основан на тестах, минимальная продолжительность которых составляет не менее 5-ти суток [ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПК_{ПОЛН}) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. -М.: 1997. 25 с]. При этом указанная длительность стандартного способа определения БПК может стать причиной экологически опасных ситуаций вследствие поступления на водоочистные сооружения загрязненных вод или их недоочистки в процессе регенерации.

[05] Для оперативного определения уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями применяют метод оценки БПК с использованием биосенсорных аналитических устройств (БПК-биосенсоров). В указанных устройствах в качестве распознающих элементов использованы микроорганизмы, способные окислять определенный спектр органических соединений.

[06] Наиболее близким аналогом заявленного изобретения является биосенсорное аналитическое устройство для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями, описанное в работе [Arlyapov V.A., Alferov V. A., Yudina N. Yu., Asulyan L. D., Kamanina O.A., Alferov S. V., Shumsky A. N., Machulin A. V., Reshetilov A. N. Registration of BOD using Paracoccus yeei bacteria isolated from activated sludge. // 3 Biotech, 2020, V 10, №207]. Указанное устройство содержит кислородный электрод с иммобилизованными микроорганизмами Paracoccus yeei ВКМ В-3302. Иммобилизацию указанных микроорганизмов проводят в поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном. Данное устройство позволяет определить БПК₅ в диапазоне от 0,05 до 5,0 мг/дм³ (без разбавления пробы), при этом длительность одного измерения составляет до 6-ти минут, время стабильной работы устройства - 45 суток, а операционная стабильность ответа биосенсорной системы составляет 7%.

[07] Недостатком указанного устройства является ограниченный верхний диапазон определяемых значений БПК, который составляет 5,0 мг/дм³ (без разбавления пробы) с операционной стабильностью измерений в количестве 7% при том, что в большинстве случаев значения БПК в сточных водах составляют более 5,0 мг/дм³. Также устройство

в соответствии с ближайшим аналогом не обладает чувствительностью по отношению к таким распространенным биоразлагаемым органическим соединениям, как пропанол, метаналь, аргинин.

[08] Таким образом, технической проблемой, на решение которой направлено заявленное изобретение, является недостаточно высокие рабочие характеристики известных биосенсорных аналитических устройств для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями, которые в том числе не позволяют определить весь спектр наиболее распространенных опасных веществ, содержащихся в воде различного происхождения.

[09] Раскрытие сущности изобретения

[010] Техническим результатом изобретения является увеличение верхней границы диапазона определяемых значений биохимического потребления кислорода (БПК) до 200 мг/дм³, повышение операционной стабильности ответа биосенсорной системы, увеличение времени стабильной работы биосенсорной системы, а также расширение спектра определяемых биоразлагаемых органических соединений.

[011] Под операционной стабильностью ответа биосенсорной системы следует понимать устойчивость ответа биосенсорной системы на одну и ту же концентрацию субстрата при проведении большого числа (не менее 15) последовательных измерений.

[012] Указанный технический результат достигается в биосенсорном аналитическом устройстве для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями за счет того, что оно содержит измерительную кювету с буферным раствором, магнитную мешалку и биосенсорную систему, включающую кислородный электрод, выполненный с возможностью подключения к регистрирующему устройству биосенсорной системы прибору, и размещенный на кислородном электроде рецепторный элемент, включающий ассоциацию микроорганизмов *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996 в массовом соотношении 1:1:1, иммобилизованных на носителе в виде нитроцеллюлозной мембраны и обработанных сверху раствором хитозана.

[013] Кроме того, согласно частным случаям реализации изобретения:

[014] - используют раствор хитозана концентрацией 8,0 - 12,0 г/л в 1 мас. % растворе уксусной кислоты,

[015] - используют хитозан с молекулярной массой от 50 до 190 кДа,

[016] - в качестве буферного раствора используют фосфатный буферный раствор с рН 6,8.

[017] Ассоциация микроорганизмов *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996, используемая в биосенсорной системе, способна окислять широкий спектр органических соединений различных классов (35 соединений), которые могут находиться в образцах воды различного происхождения (промышленные и бытовые стоки, поверхностные воды), что дает возможность получить высокую степень корреляции между показаниями заявленного устройства и наиболее распространенным стандартным методом определения БПК в соответствии с ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97.

[018] Использование нитроцеллюлозной мембраны в качестве носителя для иммобилизации ассоциации микроорганизмов *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996 обеспечивает высокую адсорбцию указанных клеток микроорганизмов, что препятствует их вымыванию из рецепторного элемента в процессе работы заявленного устройства. Также нитроцеллюлозная мембрана обладает повышенной механической прочностью и низкой

степенью набухания, что способствует длительному функционированию рецепторного элемента. Кроме того, нитроцеллюлозная мембрана обладает высокой проницаемостью для низкомолекулярных соединений, что также способствует высокой чувствительности устройства.

5 [019] Использование раствора хитозана для покрытия иммобилизованной на нитроцеллюлозной мембране ассоциации микроорганизмов *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996, который после высыхания образует гидрогель, обеспечивает легкую диффузию исходных веществ и продуктов реакции. При этом образующийся после высыхания гидрогель хитозана
10 обладает механической прочностью и нерастворим в воде за счет своей сетчатой структуры.

[020] Краткое описание чертежей

[021] Изобретение поясняется фигурами, где:

15 [022] На фиг. 1 показан общий схематический вид заявленного биосенсорного аналитического устройства для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями.

[023] На фиг. 2 показана диаграмма субстратной специфичности (чувствительности) биосенсорной системы, используемой в заявленном устройстве.

20 [024] На фиг. 3 представлен пример типичного ответа заявленного биосенсорного аналитического устройства, регистрируемого при анализе образца загрязненной воды, представляющий собой график зависимости содержания кислорода от времени.

[025] На фиг. 4 показана градуировочная зависимость заявленного биосенсорного аналитического устройства.

[026] Элементы обозначены на фигурах следующими позициями:

25 1 - кислородный электрод
2 - биорецепторный элемент,
3 - измерительная кювета,
4 - магнитная мешалка.

[027] Осуществление изобретения

30 [028] Заявленное биосенсорное аналитическое устройство включает биосенсорную систему, состоящую из преобразователя в виде кислородного электрода (1), выполненного с возможностью подключения к регистрирующему ответ биосенсорной системы прибору, размещенный на кислородном электроде (1) рецепторный элемент (2), включающий ассоциацию бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii*
35 ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996 в массовом соотношении 1:1:1, помещенную на носителе в виде нитроцеллюлозной мембраны и обработанную сверху раствором хитозана.

[029] Бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996, используемые в рецепторном элементе (2) заявленного
40 устройства, культивировали на богатой минеральной среде (жидкая глюкозо-пептонная питательная среда). Состав жидкой среды: глюкоза - 10 г/дм³, пептон - 5 г/дм³, дрожжевой экстракт - 0,5 г/дм³. Среду для культивирования клеток стерилизовали автоклавированием при атмосферном давлении в течение 45 минут. Клетки

45 культивировали аэробно 18-20 часов в качалочных колбах объемом 750 см³ при температуре 29°C. Затем полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре при 10 000 об/мин в течение 10 минут при помощи центрифуги TG16WS (Поликом LTD, Россия). Далее полученный центрифугат промывали 20 мМ фосфатным

буферным раствором с pH 6,8. Осевшие клетки промывали буферным раствором, распределяли в микропробирках типа Eppendorf и центрифугировали на центрифуге «Eppendorf» в течение 5 минут при 10 000 об/мин. Промытую биомассу хранили при температуре минус 25°C в микропробирках.

5 [030] Для формирования биорецепторного элемента (2) на носитель в виде нитроцеллюлозной мембраны площадью, к примеру, 10 мм² микропипеткой наносят иммобилизованную ассоциацию микроорганизмов *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996 в фосфатном
10 буферном растворе с pH 6,8 объемом 5 мл с титром 150 г/дм³. После естественной сушки в течение 1-го часа сверху наносят раствор хитозана концентрацией 8,0 - 12,0 г/л в 1 мас. % растворе уксусной кислоты, при этом используют низкомолекулярный хитозан средней молекулярной массы 50-190 кДа (например, производства Sigma-Aldrich, Германия). Преимущественно используют раствор хитозана массовой концентрацией
15 10 г/л, для этого навеску хитозана массой 1 грамм переносят в 100 мл приготовленного раствора уксусной кислоты и перемешивают в течении 1-го часа при температуре 35°C. Полученный рецепторный элемент (2) высушивают на воздухе в течение 1 -го часа, при этом после высыхания раствора хитозана образуется гидрогель хитозана. После указанных выше действия рецепторный элемент (2) наносят на кислородный электрод (1).

20 [031] Кислородный электрод (1) (электрод Кларка) представляет собой электрохимический датчик, на поверхности которого происходит восстановление кислорода с образованием иона гидроксила OH⁻. Выбирают такие условия, при которых сила тока в цепи пропорциональна количеству кислорода в растворе, т.е. величине его
25 парциального давления (P_{O2}). Если нет никаких реакций с участием кислорода, его концентрация постоянна. Однако, если в растворе идет химическая реакция, в которой потребляется кислород, его парциальное давление растет, что и улавливает прибор.

[032] Анализ образца воды с помощью заявленного устройства осуществляют путем помещения кислородного электрода (1) с биорецепторным элементом (2) в
30 измерительную кювету (3), содержащую буферный раствор, поддерживающий постоянный уровень pH. Далее осуществляют перемешивание раствора в измерительной кювете (3) с помощью магнитной мешалки (4). Для регистрации ответа (сигнала) биосенсорной системы используют соответствующий и регистрирующий прибор, определяющий зависимость содержания растворенного кислорода от времени, например,
35 анализатор растворенного кислорода Эксперт-009 производства ООО «Эконикс-Эксперт», подключаемый к кислородному электроду (1) и электронному устройству, например, персональному компьютеру, отображающему результаты измерений пользователю.

[033] Указанное устройство обладает чувствительностью к широкому спектру
40 биоразлагаемых органических соединений, таких как метанол, этанол, пропанол-1, бутанол-1, 2-метилпропанол-1, 2-метилпропанол-2, 3-метилбутанол-1, пропантриол-1,2,3, сорбит, ксилоза, глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза, сахароза, лактоза, метаналь, метановая кислота, этановая кислота, этандиовая кислота, пропандиовая кислота, лимонная кислота, ЭДТА, бензоат калия, 4-нитрофенол, 2,4-динитрофенол,
45 глицин, серин, глутамин, тирозин, аспаргиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, ДДС натрия, ДДБС натрия.

[034] Ниже описан конкретный пример определения БПК образца воды с помощью заявленного устройства, отображающий принцип его работы.

[035] Кислородный электрод (1) с размещенным на нем рецепторным элементом (2), содержащим иммобилизованную ассоциацию микроорганизмов *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996 в массовом соотношении 1:1:1, погружают в измерительную кювету (3) объемом 5 мл с 30 мМ фосфатным буферным раствором с рН 6,8 и регистрируют уровень растворенного кислорода, отражающего фоновое содержание кислорода в среде. Затем вносят пробу, содержащую биоразлагаемые органические вещества, объемом 100 мкл. Измерения проводят при непрерывном перемешивании с помощью магнитной мешалки (4) при комнатной температуре. После регистрации ответа биосенсорной системы, который представляет собой график зависимости содержания кислорода от времени (фиг. 3), измерительную кювету (3) промывают буферным раствором. Далее рассчитывают величину максимальной скорости потребления кислорода и определяют значение БПК₅ по предварительно построенной градуировочной зависимости (фиг. 4).

[036] Градуировочная зависимость строится по раствору глюкозо-глутаматной смеси (ГГС), приготовленному согласно требованиям ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97. В соответствии с указанным нормативным документом принимают, что БПК₅, равное 205 мг/дм³, соответствует раствору, содержащему суммарно 300 мг/дм³ глюкозы и глутаминовой кислоты.

[037] Линейный диапазон зависимости ответа биосенсорной системы от БПК₅ лежит в диапазоне 0,1 - 200 мг/дм³ (без разбавления пробы). Длительность единичного измерения не превышает 6 минут. Время стабильной работы биосенсорной системы, на протяжении которого падение активности микроорганизмов в количестве не более 25%, составляет не менее 60-ти суток.

[038] В таблице 1 представлены сравнительные характеристики заявленного устройства для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями и ближайшего аналога.

Таблица 1.

Характеристика	Ближайший аналог	Заявленное устройство
Операционная стабильность, %	7	3
Время стабильной работы биосенсорной системы, суток	45	60
Длительность одиночного измерения, мин	4 - 6	4 - 6
Линейный диапазон зависимости ответа биосенсорной системы от БПК ₅ , мг/дм ³	0,05 - 5,0	0,1 - 200

[039] Таким образом, заявленное устройство дает возможность существенно увеличить верхнюю границу диапазона определяемого значения БПК, при этом увеличив операционную стабильность измерений и повысив длительность стабильной работы биосенсорной системы.

(57) Формула изобретения

1. Биосенсорное аналитическое устройство для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями, содержащее измерительную кювету (3) с буферным раствором, магнитную мешалку (4) и биосенсорную систему, включающую кислородный электрод (1), выполненный с возможностью подключения

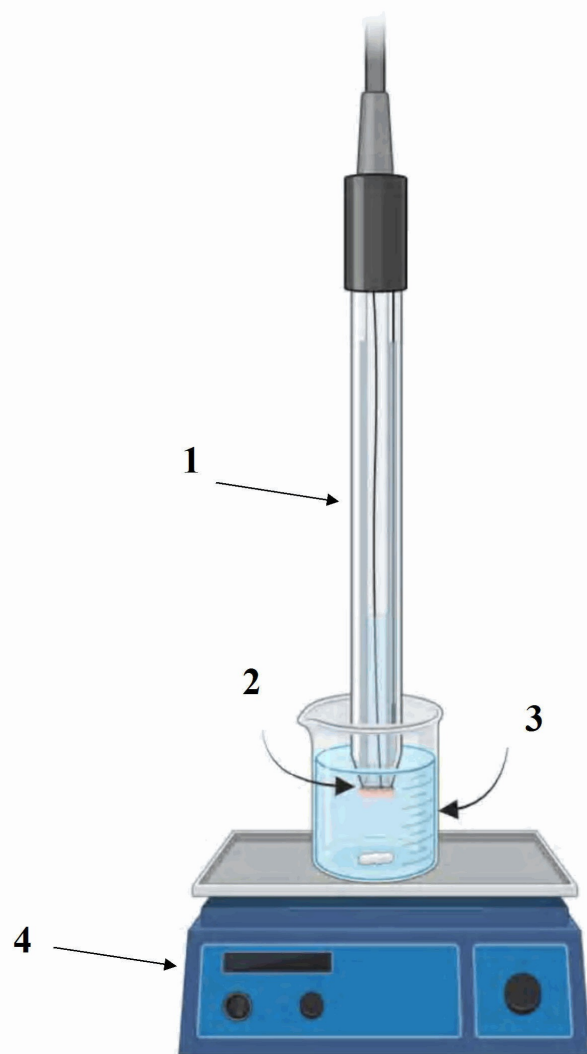
к регистрирующему ответ биосенсорной системы прибору, и размещенный на кислородном электроде (1) рецепторный элемент (2), включающий ассоциацию микроорганизмов, иммобилизованных на носителе, отличающееся тем, что в качестве микроорганизмов использованы *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835 и *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-2996 в массовом соотношении 1:1:1, иммобилизованные на нитроцеллюлозной мембране и обработанные сверху раствором хитозана, образующим после высыхания гидрогель.

2. Биосенсорное аналитическое устройство для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями по п. 1, отличающееся тем, что используют раствор хитозана концентрацией 8,0-12,0 г/л в 1 мас.% растворе уксусной кислоты.

3. Биосенсорное аналитическое устройство для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями по пп. 1 и 2, отличающееся тем, что использован хитозан с молекулярной массой от 50 до 190 кДа.

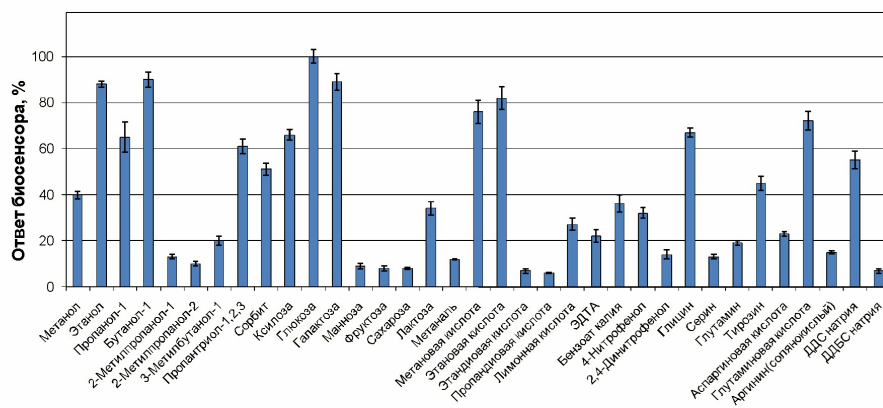
4. Биосенсорное аналитическое устройство для детекции уровня загрязнения воды биоразлагаемыми органическими соединениями по п. 1, отличающееся тем, что в качестве буферного раствора используют фосфатный буферный раствор с рН 6,8.

1

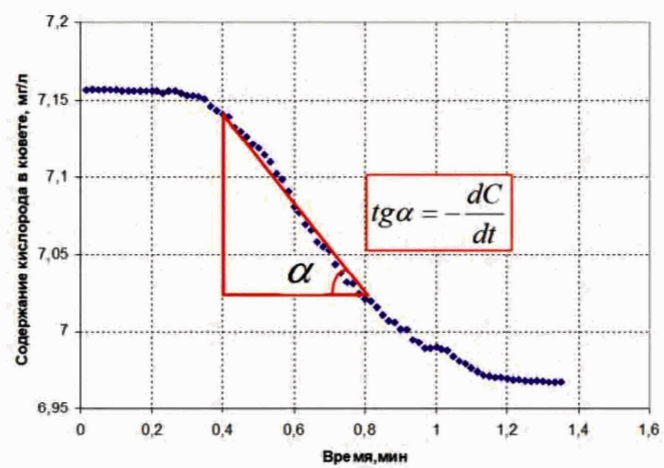


Фиг. 1

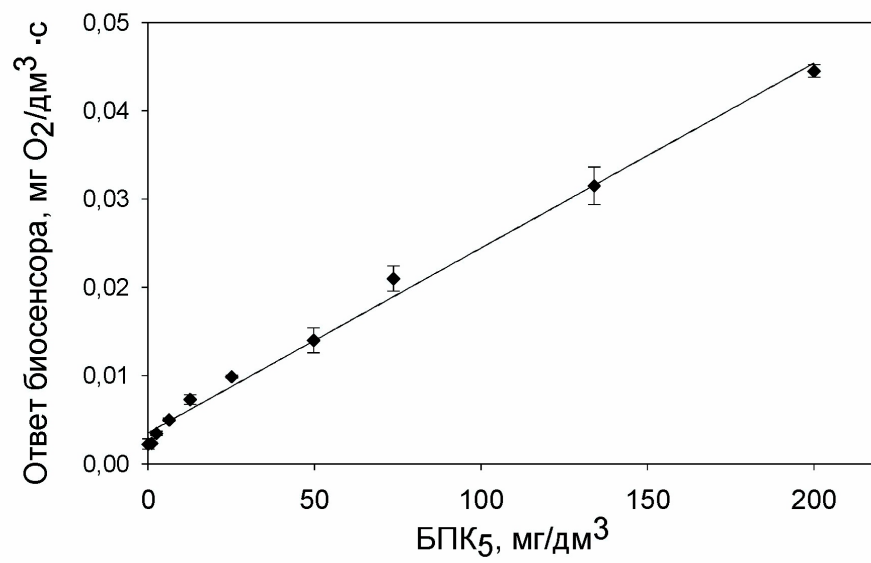
2



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4