



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C12N 1/12 (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009141878/10, 13.11.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.11.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.11.2009

(45) Опубликовано: 20.08.2011 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SCHREIBER et. al. Rapid exposure assesment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll fluorescence imaging assay. SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT. 2008, v.401, p.51-59. ХОЛСТОВ А.В. и др. Доклад. "Разработка биосенсора на основе иммобилизованных клеток Photobacterium phosphoreum для обнаружения экотоксикантов в водных средах". (см. прод.)

Адрес для переписки:

105215, Москва, ул. 9-я Парковая, 57, к.1,
кв.39, Е.Н.Ефременко

(72) Автор(ы):

Ефременко Елена Николаевна (RU),
Холстов Александр Викторович (RU),
Воронова Елена Николаевна (RU),
Конюхов Иван Владимирович (RU),
Погосян Сергей Иосифович (RU),
Рубин Андрей Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки Российской Федерации (RU), Государственное учебно-научное учреждение Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (RU)

(54) БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ГЕРБИЦИДОВ В ВОДНЫХ СИСТЕМАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и экологии. Биосенсор содержит клетки фотоавтотрофных микроводорослей, флуоресцентные характеристики фотосинтетической системы которых изменяются при появлении в их окружении химических соединений с цитотоксичным действием: ионов тяжелых металлов и гербицидов. Клетки зеленых и диатомовых микроводорослей иммобилизуют в криогеле поливинилового спирта: наносят клеточную суспензию на поверхность, затем вводят клетки в макропоры полимерного носителя под действием центробежных сил (5000-14000 g) в

течение 1-10 мин. Получают высокочувствительный и стабильный биосенсор на основе компонентов, взятых в следующем соотношении, мас. %: клетки микроводорослей 0,015-1,1; поливиниловый спирт 7-15; водная фаза - до 100. По изменению величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла клеток, входящих в состав биосенсора, определяют низкие концентрации тяжелых металлов и гербицидов в водных системах при скоростях протока до 360 мл/ч. Максимальное время использования биосенсора составляет 60 суток. 2 ил.

(56) (продолжение):

6-я Международная конференция "Сотрудничество для решения проблемы отходов." 08.04.2009. Харьков [<http://waste.com.ua/cooperation/2009/theses/kholstov.html>, - найдено в Интернет 20.10.2010 г]. DE 19710287 A1, 27.08.1998. RU 2354958 C2, 10.05.2009. RU 2138041 C1, 20.09.1999. US 7333195, 19.02.2008. РУБИН А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге. Соросовский образовательный журнал. 2000, т.6, N4, с.7-13. С.DURRIEU et. al. Algal biosensors for aquatic ecosystems monitoring. The european physical jornal. 2006, v.36(11), p.205-209. NGUYEN H., NGOC et. al. Synchronous; scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides. Ecotoxical and environmen. SAFETY. 2008, v.24, p.299.

RU 2426779 C1

RU 2426779 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009141878/10, 13.11.2009**

(24) Effective date for property rights:
13.11.2009

Priority:

(22) Date of filing: **13.11.2009**

(45) Date of publication: **20.08.2011 Bull. 23**

Mail address:

**105215, Moskva, ul. 9-ja Parkovaja, 57, k.1,
kv.39, E.N.Efremenko**

(72) Inventor(s):

**Efremenko Elena Nikolaevna (RU),
Kholstov Aleksandr Viktorovich (RU),
Voronova Elena Nikolaevna (RU),
Konjukhov Ivan Vladimirovich (RU),
Pogosjan Sergej Iosifovich (RU),
Rubin Andrej Borisovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Rossijskaja Federatsija, ot imeni kotoroj
vystupaet Ministerstvo obrazovanija i nauki
Rossijskoj Federatsii (RU),
Gosudarstvennoe ucebno-nauchnoe uchrezhdenie
Biologicheskij fakul'tet Moskovskogo
gosudarstvennogo universiteta imeni
M.V.Lomonosova (RU)**

(54) BIOSENSOR BASED ON MICROALGAE CELLS FOR DETECTING HEAVY METALS AND HERBICIDES IN AQUEOUS SYSTEMS

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: biosensor contains photo-autotrophic microalgae cells, the fluorescent characteristics of the photosynthesis system of which vary in the presence of cytotoxic chemical compounds in their surroundings: heavy metal ions and herbicides. Cells of green and diatomic microalgae are immobilised in cryogenic gel of polyvinyl alcohol: a cell suspension is deposited on a surface and the cells enter macropores of the polymer carrier under the effect of centrifugal force

(5000-14000 g) for 1-10 minutes. A highly sensitive and stable biosensor is obtained based on components taken in the following ratio in wt %: microalgae cells 0.015-1.1; polyvinyl alcohol 7-15; aqueous phase - up to 100. Low concentrations of heavy metals and herbicides in aqueous systems are determined at flow rate of up to 360 ml/h based on the change in the value of relative variable fluorescence chlorophyll cells in the biosensor. The biosensor can be used for a maximum of 60 days.

EFFECT: high sensitivity of the biosensor.

2 dwg, 5 ex

Изобретение относится к экологическому биомониторингу, конкретно к биосенсорам на основе клеток фотоавтотрофных микроводорослей, обладающих флуоресценцией, чувствительной к присутствию тяжелых металлов и гербицидов в водной среде. Действие биосенсора основано на том, что флуоресцентные характеристики фотосинтетической системы клеток микроводорослей изменяются при появлении в их окружении химических соединений с цитотоксичным действием, а именно ионов тяжелых металлов и гербицидов.

Проблемой первостепенной важности является необходимость проведения постоянного мониторинга качества воды в различных водоемах, загрязнение которых возможно промышленными отходами или гербицидами, применяемыми в сельском хозяйстве. При этом требуется получение информации в режиме реального времени, так как визуализация наличия загрязнения наступает при концентрациях, значительно превышающих предельно допустимые нормы. Своевременное получение информации возможно при использовании методов, позволяющих определять наличие в воде экотоксикантов оперативно и дистанционно, поэтому актуальной является разработка подходов к экспресс-анализу токсичности водных образцов в проточных системах.

Известны биосенсоры, действие которых основано на использовании суспензионных клеток зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Chlorella sp.*, флуоресцентные характеристики хлорофилла фотосистемы II фотосинтетического аппарата которых изменяются в присутствии экотоксикантов [Патент США 7333195 (2008). Method of detecting photosynthesis inhibition.; Durrieu C., TranMinh C., Chovelon J.M., Barthet L., Chouteau C., Vedrine C., Algal biosensors for aquatic ecosystems monitoring. // Eur. Phys. J. Appl. Phys., 2006, V.36(11), p.205-209; Podola B., Nowack E.C.M, Melkonian M. The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds. // Biosens. Bioelectr., 2004, V.19, p.1253-1260; Nguyen-Ngoc H., Tran-Minh C. Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. // Anal Chim Acta, 2007, V.583(1), p.161-165; Nguen-Ngoc H., Durrieu C., Tran-Minh C. Synchronous-scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides. // Ecotoxicol. and Environmen. Safety, 2008, V.24, p.199-129]. При этом регистрируется уровень флуоресценции микроводорослей с помощью оптических приборов (флуориметров) при длине волны 680 нм, что соответствует флуоресценции хлорофилла клеток с открытыми реакционными центрами (F_0). По изменению этой величины по отношению к ее исходному значению (до воздействия на клетки токсиканта) судят о наличии той или иной концентрации экотоксиканта в водной среде.

К числу недостатков таких биосенсоров относится следующее:

- применение биосенсора возможно только для дискретного анализа экотоксикантов, но не в проточной системе,
- механизм воздействия различных классов экотоксикантов на клетки автотрофных микроводорослей зависит от самого экотоксиканта. Следствием этого является то, что воздействие экотоксиканта на клетки может приводить как к снижению, так и к увеличению измеряемой величины флуоресценции хлорофилла относительно исходного уровня флуоресценции клеток в отсутствии токсиканта. Данная особенность регистрируемого параметра затрудняет или делает невозможной адекватную интерпретацию результатов. В связи с этим биосенсоры, действие которых основано на указанном подходе, не получили широкого применения на практике.

Иммобилизация клеток микроводорослей позволяет придать клеткам существенную стабильность при хранении и использовать их не только для

дискретного анализа экотоксикантов в водных образцах, отобранных из водоемов, но и проводить анализ присутствия токсикантов непосредственно *in situ* в проточных системах.

5 Основной характеристикой любого биосенсора на основе иммобилизованных клеток микроводорослей, используемых для определения токсикантов, является минимальная концентрация токсиканта, которую позволяет определить биосенсор, и стабильность его флуоресценции во времени, выражаемая через максимальную продолжительность его возможного использования для достоверного определения экотоксикантов. Возможность длительного экспонирования биосенсора в проточной системе без снижения его функциональной активности до появления в протоке токсиканта существенно увеличивает экономическую привлекательность его применения.

15 Известен ряд биосенсоров на основе иммобилизованных клеток микроводорослей для определения экотоксикантов в протоке. При этом в качестве носителей для иммобилизованных клеток микроводорослей в них используются пористое стекло [Vedrine C., Leclerc J-C., Durrieu C., Tran-Minh C. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. // Biosensor and Bioelectronics, 2008, 181, p.457-463], силикагель [Nguyen-Ngoc H., Tran-Minh C. Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. // Anal Chim Acta, 2007, Volume 583, Issue 1, p.161-165], фильтровальная бумага, покрытая для упрочнения Са-альгинатным гелем [Frense D, Muller A, Beckmann D. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. // Sens Actuators B-Chem, 1998, 51, p.256-260]. При этом иммобилизация клеток микроводорослей во всех биосенсорах осуществляется с использованием метода адсорбции на пористом носителе (соответственно стекле, силикагеле, фильтровальной бумаге).

30 Данные биосенсоры могут быть использованы для определения тяжелых металлов и гербицидов при скоростях протока от 60 мл/ч [Nguyen-Ngoc H., Durrieu C., Tran-Minh C. Synchronous-scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides. // Ecotoxicol. and Environmen. Safety, 2008, V.24, p.199-129] до 120 мл/ч [Vedrine C., Leclerc J-C., Durrieu C., Tran-Minh C. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. // Biosensor and Bioelectronics, 2008, 181, p.457-463].

35 Несмотря на то что биосенсоры обеспечивают определение гербицида диурона в минимальной концентрации 6×10^{-7} М, что меньше, чем ПДК для данного вещества в 7 раз ($4,3 \times 10^{-6}$ М), а также определение минимальной концентрации ионов тяжелых металлов, равной 3×10^{-6} М [Nguyen-Ngoc H., Tran-Minh C. Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. // Anal Chim Acta, 2007, Volume 583, Issue 1, p.161-165], однако все эти биосенсоры не отличаются удовлетворительной либо механической (силикагель), либо химической (бумага, покрытая слоем альгинатного геля) стабильностью при экспонировании образцов биосенсоров в проточных системах.

45 Биосенсоры характеризуются десорбцией клеток с поверхности носителей, что приводит к снижению концентрации клеток в составе биосенсоров и изменению регистрируемого флуоресцентного сигнала. Работа всех этих биосенсоров основана, как и в случае вышеописанных биосенсоров на основе суспензионных клеток, на определении уровня флуоресценции (F_0), которая, как указано выше, сама еще и изменяется в зависимости от определяемого токсиканта. Параметр F_0 также зависит от концентрации клеток в аналитической ячейке, где идет определение экотоксиканта,

поэтому такие биосенсоры характеризуются нестабильностью сигнала в протоке и не всегда позволяют адекватно различать причину снижения уровня флуоресценции, поскольку снижение может быть связано как с присутствием экотоксиканта, вызывающего гибель клеток, так и просто с вымыванием клеток из носителя.

5 Таким образом, известны биосенсоры на основе иммобилизованных клеток микроводорослей, предназначенные для биондикации токсикантов в протоке, но они характеризуются невысокой стабильностью сигнала (не более 35 сут) из-за вымывания клеток из носителя, куда иммобилизованы абсорбционно, а данные, получаемые при
10 их использовании по изменению величины F_0 , характеризуются неадекватностью интерпретации.

Известен флуоресцентный биосенсор, действие которого основано на применении суспензионных клеток автотрофных микроводорослей, а регистрация присутствия экотоксикантов основана на определении такого флуоресцентного параметра
15 фотосинтетического аппарата клеток, как относительная переменная флуоресценции [Schreiber U., Quayle P., Schmidt S., Escher B.I., Mueller J.F. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence measurement. // Biosensor & Bioelectronics, 2007, V.22, p.2554-2563; Schreiber
20 U., Mueller R., Escher B.I., Bengtson Nash S.M., Mueller J.F. Rapid exposure assesment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll a fluorecence imaging assay. // Science of the total environment, 2008, V.401, p.51-59]. Биосенсор представляет собой суспензию клеток зеленых или диатомовых микроводорослей в питательной среде, характерной для каждого вида микроводорослей. Клетки микроводорослей, для
25 получения их суспензий, предварительно выращивают в тех же питательных средах, в частности диатомовые микроводоросли в среде f/2, рекомендованной для этих микроводорослей [Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea Cleve. // Can. J. Microbiol., 1962, V.8, p.229-
30 239], а зеленые - в среде MBL [Bengtson Nash, S.M., Quayle, P. Schreiber, U., Mueller, J.F. The Selection of a Model Microalgal Species as Biomaterial for a Novel Aquatic Phytotoxicity Assay. // Aquat. Toxicol., 2005, 72, p.315-326] или среде Прата [Prat S. Algarum, Hepaticarum, Muscorumque in Culturis Collectio. Prague, Preslia, 1948. XXII-XXIII, p.1-12].

35 Величина относительной переменной флуоресценции рассчитывается по формуле $(F_m - F_0)/F_m$ с использованием величин, определяемых прямым измерением интенсивностей флуоресценции хлорофилла клеток с открытыми (F_0) и закрытыми (F_m) реакционными центрами. Открытые реакционные центры - такое рабочее состояние хлорофилла, при котором в процессе активного фотосинтеза и в условиях
40 слабого освещения почти вся (96-98%) поглощенная энергия света используется в процессе фотосинтеза, а не вызывает флуоресценцию (F_0).

При закрытых реакционных центрах вследствие повреждения фотосинтетического аппарата поглощенная энергия света уже не может использоваться в фотосинтезе, и это приводит к тому, что вся поглощенная энергия света вызывает флуоресценцию
45 хлорофилла (F_m).

Относительная переменная флуоресценция характеризует состояние фотосинтетического аппарата каждой из клеток микроводорослей и не зависит от концентрации клеток, используемых для проведения анализа, поэтому относительная
50 переменная флуоресценция является универсальным индикатором воздействия экотоксикантов на клетки микроводорослей [Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге. // Соросовский образовательный журнал, том 6, №4, 2000, с.7-13]. Уменьшение данной величины относительно ее исходного значения

является свидетельством наличия в среде экотоксикантов. Относительная переменная флуоресценция хлорофилла служит количественным индикатором общей и специфичной токсичности анализируемого образца, при этом ответ клеток на присутствие токсикантов отличается высокой экспрессностью. Величина относительной переменной флуоресценции под воздействием экотоксикантов всегда изменяется одинаково - снижается, в отличие от флуоресценции хлорофилла клеток с открытыми реакционными центрами (F_0), которая, как было указано выше, может как снижаться, так и увеличиваться. Таким образом, можно сделать адекватный вывод по проценту снижения величины относительной переменной флуоресценции о концентрации экотоксиканта, присутствующего в среде с клетками микроводорослей.

К очевидным недостаткам этого биосенсора следует отнести использование суспензионных клеток микроводорослей, что делает невозможным проведение анализа экотоксикантов в проточных водных системах, поскольку данный биосенсор позволяет проводить только дискретный анализ. Также следует отметить, что не известна продолжительность хранения и эксплуатации данной системы на основе суспензии клеток. Это, по всей видимости, обусловлено непродолжительным периодом жизнеспособности и стабильной флуоресценции свободных клеток автотрофных микроводорослей.

Данный биосенсор можно считать прототипом заявляемого технического решения (аналогом, наиболее близким к заявляемому изобретению) ввиду того, что этот биосенсор представляет собой клетки зеленых и диатомовых микроводорослей, используемых для проведения анализа присутствия гербицидов в водных системах по величине относительной переменной флуоресценции.

Задачей предлагаемого технического решения является получение высокочувствительного и стабильного биосенсора на основе клеток микроводорослей, иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта, для биоиндикации тяжелых металлов и гербицидов в водных проточных системах путем определения величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла клеток.

Поставленная задача решается тем, что клетки зеленых и диатомовых микроводорослей иммобилизуют в криогеле поливинилового спирта путем нанесения клеточной суспензии на поверхность носителя с последующим введением клеток в макропоры полимерного носителя под действием центробежных сил (5000-14000 g) в течение 1-10 мин и использованием их для определения присутствия экотоксикантов в водных проточных системах путем регистрации флуоресцентных параметров фотосинтетического аппарата клеток и расчета величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла клеток. Максимальная продолжительность стабильного использования заявляемого биосенсора для определения токсикантов без изменения уровня флуоресцентных параметров составляет 60 суток. Биосенсор позволяет определять присутствие ионов тяжелых металлов и гербицидов в проточных водных средах при скоростях потока до 360 мл/ч.

В качестве носителя для иммобилизации клеток используется криогель поливинилового спирта, поскольку поливиниловый спирт (ПВС), являясь синтетическим полимером тоннажного производства, характеризуется нетоксичностью, высокой химической и микробиологической стабильностью, высокой пористостью, обеспечивающей благоприятные условия для массообменных процессов [В.И.Лозинский. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. // Успехи химии, 71, (6) 559-585 (2002); Lozinsky V.I., Plieva F.M. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for

cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme Microb. Technol.* 23 (3-4), 227-242 (1998)].

5 Формирование криогеля ПВС как носителя происходит при замораживании и последующем оттаивании водного раствора полимера. Порообразователем служат кристаллы замораживаемой воды. Отсутствие в среде формирования носителя каких-либо реагентов, токсичных для клеток микроводорослей, позитивно сказывается на жизнеспособности клеток, далее вводимых в сформированный пористый матрикс криогеля ПВС.

10 Применение криогеля поливинилового спирта в качестве носителя для иммобилизации клеток обусловлено высокой пористостью полимерной матрицы, обеспечивающей незатрудненную диффузию субстратов и продуктов соответственно к и от иммобилизованных клеток, а также хорошими эксплуатационными характеристиками материала такого криогеля.

15 Размер пор носителя предопределяется размерами вводимых в его поры клеток микроводорослей и может варьироваться путем изменения концентрации замораживаемого водного раствора полимера, а также температурой его замораживания [Лозинский В.И., Дамшкалн Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии. // Колоидн. журн. 69 (6) 798-816 (2007)].

25 Использование для формирования носителя синтетического полимера, характеризующегося хорошо известной химической структурой мономерных групп, обеспечивает получение механически прочных носителей с регулярной пористостью, то есть с одинаковым размером и распределением пор по всему объему матрицы.

30 Нижний предел концентрации раствора ПВС, используемого для формирования носителя, определяется тем, что при меньшей чем 7 мас.% концентрации этого гелеобразующего полимера заметно снижается устойчивость формирующегося носителя к деформационным нагрузкам в проточных системах, для которых предназначен биосенсор на основе микроводорослей, из-за увеличения размера пор в формирующейся матрице.

35 Существенное уменьшение размера пор при концентрации ПВС выше 15 мас.% приводит к тому, что образуется прочная матрица криогеля с мелкопористой структурой, которая создает заметные диффузионные проблемы для протока через нее водной среды, что приводит к снижению скорости протока и увеличению длительности проводимого экспресс-анализа.

40 Получение клеток микроводорослей каждой культуры перед их иммобилизацией для приготовления биосенсора проводится с применением известных биотехнологических приемов в соответствии с частными характеристиками культур зеленых и диатомовых микроводорослей.

45 В ходе криогенной обработки раствора ПВС носителю для иммобилизации клеток микроводорослей придается форма перевернутого конуса за счет проведения криогенной структуризации ПВС в объеме 0,5-1 мл в центрифужных микропробирках. Такой подход позволяет сформировать матрицу носителя, на верхний слой которого без извлечения носителя из микропробирок наносится суспензия клеток 50 микроводорослей с концентрацией клеток $5 \times 10^5 \div 5 \times 10^7$ клеток/мл. Этот диапазон концентраций клеток, используемый для получения биосенсора, позволяет при указанной нижней концентрации получить высокочувствительный биосенсор, а превышение верхней концентрации оказывается нецелесообразным, так как они

создают в матрице носителя диффузионные проблемы для потока.

Осуществляется иммобилизация клеток путем их введения в поры матрицы под действием центробежных сил при использовании следующих режимов центрифугирования микропробирок с их содержимым: 5000-14000 g, длительность - 1-10 мин. В ходе этой процедуры клетки вдавливаются центробежными силами в поры носителя, размеры которых подбираются экспериментально при варьировании температуры замораживания раствора ПВС и его концентрации под размер вводимых в поры клеток: 1-10 мкм - для клеток зеленых микроводорослей, 15-25 мкм - для клеток диатомовых микроводорослей. Правильный подбор соотношения размера пор носителя и размера клеток обеспечивает их прочное удерживание в носителе при использовании полученного биосенсора для биоиндикации экотоксикантов в проточных системах.

Регистрацию флуоресцентных параметров функционирования иммобилизованных клеток микроводорослей в проточных системах путем определения величины относительной переменной флуоресценции осуществляют стандартно с использованием известной биосенсорной системы, которая представляет собой прибор для регистрации флуоресцентных характеристик хлорофилла микроводорослей с проточной аналитической ячейкой [Патент РФ № 2354958 (2009). Способ флуориметрического определения параметров фотосинтеза фотоавтотрофных микроорганизмов, устройство для его осуществления и измерительная камера]. Для этого в проточную ячейку, имеющую форму, аналогичную сформированному носителю, помещается образец криогеля ПВС с иммобилизованными в нем клетками микроводорослей диатомовых или зеленых микроводорослей. Прибор, регистрирующий флуоресцентные параметры хлорофилла иммобилизованных клеток в водных средах, содержащих и не содержащих экотоксикантов и протекающих через аналитическую ячейку в результате работы перистальтического насоса, представляет собой флуориметр, оснащенный высокочувствительным сенсором флуоресценции, дополненным фотоэлектронным умножителем. Прибор улавливает крайне малые изменения в флуоресценции иммобилизованных клеток микроводорослей при появлении в среде экотоксиканта. Система работает под управлением компьютера.

Концентрацию экотоксиканта определяют по калибровочным графикам, устанавливающим зависимость процента снижения величины относительной переменной флуоресценции от концентрации присутствующего в среде с иммобилизованными клетками экотоксиканта. Стандартное отклонение при определении ионов тяжелых металлов и гербицидов с помощью биосенсора не превышает 5%. Снижение значения относительной переменной флуоресценции более чем на три величины стандартного отклонения, то есть на 15% и более от исходного значения, свидетельствует о наличии в водной среде экотоксикантов и используется, как и в прототипе [Schreiber U., Mueller R., Escher B.I., Bengtson Nash S.M., Mueller J.F. Rapid exposure assessment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll a fluorescence imaging assay. // Science of the total environment, 2008, V.401, p.51-59], для установления минимальной достоверно определяемой концентрации токсиканта. Концентрацию экотоксиканта определяют с использованием калибровочных графиков, построенных для индивидуальных соединений с применением биосенсора.

Заявляемый биосенсор, предназначенный для биоиндикации экотоксикантов (тяжелых металлов и гербицидов) в водных проточных системах путем определения изменения величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла клеток микроводорослей и представляющий собой иммобилизованные фотоавтотрофные

клетки зеленых или диатомовых микроводорослей, иммобилизованных в поры сформированного криогеля поливинилового спирта при определенных условиях, а именно при определенном режиме введения, позволяющем сохранить жизнеспособность и фотосинтетическую активность микроводорослей, а также при определенном размере пор, соответствующем размеру клеток и варьируемом путем изменения концентрации раствора полимера и температуры его замораживания, ранее известен не был и является новым.

В сравнении с прототипом и известными аналогами заявляемое изобретение обеспечивает достижение следующего технического результата:

- в сравнении с прототипом позволяет осуществлять анализ присутствия тяжелых металлов и гербицидов в потоке;

- в сравнении с аналогами, известными для проточных систем, заявляемый биосенсор позволяет обнаруживать более низкие концентрации гербицидов (в 6 раз) и ионов тяжелых металлов (в 5 раз) в проточных системах;

- заявляемый биосенсор обладает увеличенной почти в 2 раза в сравнении с аналогами функциональной стабильностью и сохраняет неизменный уровень флуоресценции хлорофилла иммобилизованных клеток до 60 суток;

- в сравнении с аналогами заявляемый биосенсор обладает высокой механической и химической стабильностью макропористого носителя, а также позволяет использовать его в проточных системах с различными скоростями протока, вплоть до 360 мл/ч, которая в 3 раза превышает максимальную скорость протока, известную для аналогов.

Ниже приводятся конкретные примеры реализации заявляемого технического решения.

Пример 1. Биосенсор на основе иммобилизованных клеток диатомовых микроводорослей *Thalassiosira weissflogii* ССМР 1048 (коллекция Национального центра культур морского фитопланктона им. Провасоли-Джилларда, США) для определения ионов тяжелых металлов и гербицидов в водной проточной системе.

Для получения матрицы носителя готовят водный 7%-ный раствор поливинилового спирта, который разливают по 0,5 мл в центрифужные полипропиленовые микропробирки и в вертикальном положении замораживают при температуре -12°C , выдерживают в замороженном состоянии в течение 24 ч для формирования прочного геля и размораживают. В результате процедуры «замораживания-размораживания» раствора ПВС происходит формирование прочной пористой матрицы с размером пор 20-25 мкм.

Клетки фотоавтотрофных микроводорослей выращивают на среде F/2, рекомендованной для диатомовых микроводорослей [Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. // Can. J. Microbiol., 1962, V.8, p.229-239], до концентрации 5×10^5 кл/мл, что соответствует концентрации биомассы 150 мг/л, и используют полученную среду с клетками для их иммобилизации.

Не извлекая из микропробирок сформировавшийся в результате процедуры «замораживания-размораживания» криогель ПВС, на его поверхность наносят 1 мл суспензии клеток микроводорослей в среде культивирования и центрифугируют при 5000 g в течение 10 мин. В результате получается биосенсор в виде клеток микроводорослей, иммобилизованных в поры криогеля ПВС, следующего состава (мас.%): клетки микроводорослей - 0,03, поливиниловый спирт - 7, вода - до 100, который далее помещают в аналитическую проточную ячейку и используют для

определения экотоксикантов в проточной морской воде при скорости протока 360 мл/ч.

Варьируя концентрации ионов меди (А) и гербицида диурона (Б), строят калибровочные графики, устанавливающие зависимость процента снижения величины относительной переменной флуоресценции от концентрации присутствующего в среде с иммобилизованными клетками экотоксиканта (см. чертеж).

Полученный биосенсор позволяет определить минимальные концентрации следующих токсикантов: ионов Cu^{2+} - 1×10^{-6} М, гербицида диурона - 1×10^{-7} М.

Максимальная продолжительность сохранения биосенсором его флуоресцентных характеристик без изменения составляет 45 суток.

Пример 2. Биосенсор на основе иммобилизованных клеток зеленых микроводорослей *Chlorella* sp. К (DMMSU - Коллекция кафедры микробиологии МГУ) для определения ионов тяжелых металлов и гербицидов в водной проточной системе.

Для получения матрицы носителя готовят водный раствор 15%-ный поливинилового спирта, который разливают по 1 мл в центрифужные микропробирки и в вертикальном положении замораживают при температуре -20°C , выдерживают в замороженном состоянии в течение 20 ч для формирования прочного геля и размораживают. В результате процедуры «замораживания-размораживания» раствора ПВС происходит формирование прочной пористой матрицы с размером пор 1-5 мкм.

Клетки фотоавтотрофных микроводорослей выращивают на среде Прата [Prat S. *Algarum, Hepaticarum, Muscorumque in Culturis Collectio*. Prague, Preslia, 1948. XXII-XXIII. p.1-12] до концентрации 5×10^7 кл./мл, что соответствует концентрации биомассы 11000 мг/л, и используют полученную среду с клетками для их иммобилизации.

Не извлекая из микропробирок сформировавшийся в результате процедуры «замораживания-размораживания» криогель ПВС, на его поверхность наносят 1 мл суспензии клеток микроводорослей в среде культивирования и центрифугируют при 10000 g в течение 5 мин. В результате получается биосенсор в виде клеток микроводорослей, иммобилизованных в поры криогеля ПВС, следующего состава (мас. %): клетки микроводорослей - 1,1, поливиниловый спирт - 15, вода - до 100, который далее помещают в аналитическую проточную ячейку и используют для определения экотоксикантов в проточной пресной воде при скорости протока 150 мл/ч.

Варьируя концентрации ионов ртути и гербицида диурона, строят калибровочные графики, устанавливающие зависимость процента снижения величины относительной переменной флуоресценции от концентрации присутствующего в среде с иммобилизованными клетками экотоксиканта по аналогии с тем, как это показано в Примере 1.

Полученный биосенсор позволяет определить минимальные концентрации следующих токсикантов: ионов Hg^{2+} - 6×10^{-7} М, гербицида диурона - 5×10^{-7} М.

Максимальная продолжительность сохранения биосенсором его флуоресцентных характеристик без изменения составляет 60 суток.

Пример 3. Биосенсор на основе иммобилизованных клеток зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* LARG-87 (коллекция Института медико-биологических проблем) для определения ионов тяжелых металлов и гербицидов в водной проточной системе.

Для получения матрицы носителя готовят водный раствор 13%-ный поливинилового спирта, который разливают по 0,75 мл в центрифужные микропробирки и в вертикальном положении замораживают при температуре -80°C ,

выдерживают в замороженном состоянии в течение 16 ч для формирования прочного геля и размораживают. В результате процедуры «замораживания-размораживания» раствора ПВС происходит формирование прочной пористой матрицы с размером пор 5-10 мкм.

5 Клетки фотоавтотрофных микроводорослей выращивают на среде Прата, указанной в Примере 2, до концентрации 5×10^6 кл./мл, что соответствует концентрации биомассы 1100 мг/л, и используют полученную среду с клетками для их иммобилизации.

10 Не извлекая из микропробирок сформировавшийся в результате процедуры «замораживания-размораживания» криогель ПВС, на его поверхность наносят 0,75 мл суспензии клеток микроводорослей в среде культивирования и центрифугируют при 14000 g в течение 1 мин. В результате получается биосенсор в виде клеток микроводорослей, иммобилизованных в поры криогеля ПВС, следующего состава
15 (мас.%): клетки микроводорослей - 0,11, поливиниловый спирт - 13, вода - до 100, который далее помещают в аналитическую проточную ячейку и используют для определения экотоксикантов в проточной пресной воде при скорости протока 100 мл/ч.

20 Варьируя концентрации ионов цинка и гербицида атразина, строят калибровочные графики, устанавливающие зависимость процента снижения величины относительной переменной флуоресценции от концентрации присутствующего в среде с иммобилизованными клетками экотоксиканта по аналогии с тем, как это показано в
Примере 1.

25 Полученный биосенсор позволяет определить минимальные концентрации следующих токсикантов: ионов Zn^{2+} - 5×10^{-6} М, гербицида атразина - 3×10^{-6} М.

Максимальная продолжительность сохранения биосенсором его флуоресцентных характеристик без изменения составляет 50 суток.

30 Пример 4. Биосенсор на основе иммобилизованных клеток зеленых микроводорослей *Chlorella pyrenoidosa* 82-n (DMMSU - Коллекция кафедры микробиологии МГУ) для определения ионов тяжелых металлов и гербицидов в водной проточной системе.

35 Для получения матрицы носителя готовят водный раствор 11%-ный поливинилового спирта, который разливают по 1 мл в центрифужные микропробирки и в вертикальном положении замораживают при температуре -25°C , выдерживают в замороженном состоянии в течение 20 ч для формирования прочного геля и размораживают. В результате процедуры «замораживания-размораживания» раствора
40 ПВС происходит формирование прочной пористой матрицы с размером пор 5-10 мкм.

Клетки фотоавтотрофных микроводорослей выращивают на среде Прата, как в Примере 2, до концентрации 1×10^7 кл./мл, что соответствует концентрации биомассы 2200 мг/л, и используют полученную среду с клетками для их
45 иммобилизации.

Не извлекая из микропробирок сформировавшийся в результате процедуры «замораживания-размораживания» криогель ПВС, на его поверхность наносят 1 мл суспензии клеток микроводорослей в среде культивирования и центрифугируют при 12000 g в течение 2 мин. В результате получается биосенсор в виде клеток микроводорослей, иммобилизованных в поры криогеля ПВС, следующего состава
50 (мас.%): клетки микроводорослей - 0,22, поливиниловый спирт - 11, вода - до 100, который далее помещают в аналитическую проточную ячейку и используют для определения экотоксикантов в проточной пресной воде при скорости протока 50 мл/ч.

Варьируя концентрации ионов меди и гербицида диурона, строят калибровочные графики, устанавливающие зависимость процента снижения величины относительной переменной флуоресценции от концентрации присутствующего в среде с иммобилизованными клетками экотоксиканта по аналогии с тем, как это показано в Примере 1.

Полученный биосенсор позволяет определить минимальные концентрации следующих токсикантов: ионов Cu^{2+} - 1×10^{-6} М, гербицида диурона - 1×10^{-7} М.

Максимальная продолжительность сохранения биосенсором его флуоресцентных характеристик без изменения составляет 55 суток.

Пример 5. Биосенсор на основе иммобилизованных клеток диатомовых микроводорослей *Thalassiosira weissflogii* ССМР 1336 (коллекция Национального центра культур морского фитопланктона им. Провасоли-Джилларда, США) для определения ионов тяжелых металлов и гербицидов в водной проточной системе.

Для получения матрицы носителя готовят водный раствор 9%-ный поливинилового спирта, который разливают по 1 мл в центрифужные микропробирки и в вертикальном положении замораживают при температуре -15°C , выдерживают в замороженном состоянии в течение 20 ч для формирования прочного геля и размораживают. В результате процедуры «замораживания-размораживания» раствора ПВС происходит формирование прочной пористой матрицы с размером пор 15-20 мкм.

Клетки фотоавтотрофных микроводорослей выращивают на среде, указанной в Примере 1, до концентрации 1×10^6 кл/мл, что соответствует концентрации биомассы 300 мг/л, и используют полученную среду с клетками для их иммобилизации.

Не извлекая из микропробирок сформировавшийся в результате процедуры «замораживания-размораживания» криогель ПВС, на его поверхность наносят 1 мл суспензии клеток микроводорослей в среде культивирования и центрифугируют при 8000 g в течение 8 мин. В результате получается биосенсор в виде клеток микроводорослей, иммобилизованных в поры криогеля ПВС, следующего состава (мас.%): клетки микроводорослей - 0,015, поливиниловый спирт - 9, вода - до 100, который далее помещают в аналитическую проточную ячейку и используют для определения экотоксикантов в проточной морской воде при скорости потока 250 мл/ч.

Варьируя концентрации ионов меди и гербицида диурона, строят калибровочные графики, устанавливающие зависимость процента снижения величины относительной переменной флуоресценции от концентрации присутствующего в среде с иммобилизованными клетками экотоксиканта по аналогии с тем, как это показано в Примере 1.

Полученный биосенсор позволяет определить минимальные концентрации следующих токсикантов: ионов Cu^{2+} - 1×10^{-6} М, гербицида диурона - 1×10^{-7} М.

Максимальная продолжительность сохранения биосенсором его флуоресцентных характеристик без изменения составляет 45 суток.

Формула изобретения

Биосенсор для определения присутствия ионов тяжелых металлов и гербицидов в водных системах по изменению величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла клеток зеленых и диатомовых фотоавтотрофных микроводорослей, отличающийся тем, что клетки иммобилизованы в криогель поливинилового спирта при следующем соотношении исходных компонентов, мас.%:

клетки микроводорослей 0,015-1,1
поливиниловый спирт 7-15
водная фаза до 100

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

