

Я. І. Корпан, М. В. Гончар, М. Ф. Стародуб, Г. В. Ёльська

**БІОСЕНСОРИ НА ОСНОВІ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ**

*Зроблено спробу узагальнити літературні дані щодо створення лабораторних та комерційних варіантів біологічних сенсорів на основі клітин мікроорганізмів. Обговорено досягнення, проблеми та перспективи розвитку цієї області аналітичної біотехнології.*

Поєднання досягнень у сфері біології, біохімії, фізики та мікроелектроніки призвело до створення нового класу аналітичних систем — біологічних сенсорів, які у найзагальнішому вигляді являють собою пристрій, що складається із чутливого шару біоматеріалу та фізичного перетворювача, генеруючого електричний чи оптичний сигнал у відповідь на зміну фізико-хімічних властивостей біоматриці. Роботи в цьому напрямку було започатковано у 1962 р., коли Кларк та Ліон [1, 2] створили перший ферментний кисневий електрод для визначення концентрації глюкози у кардіоваскулярних м'язах. Ранніх комерційних успіхів стосовно цього було досягнуто в основному при розробці ферментних електродів, призначених для охорони здоров'я. Вони були пов'язані з визначенням концентрації метаболітів у живому організмі, зокрема, глюкози, лактату, пірувату, сечовини, білірубину, амінокислот і т. д. [3].

За останніх 15—20 рр. набули широкого розвитку дослідження по створенню біосенсорів, чутливим елементом яких є клітини мікроорганізмів [4—9]. На сьогоднішній день вже розроблено близько сотні мікробних сенсорів (табл. 1 та 2) для визначення концентрації органічних речовин (цукри, органічні кислоти, спирти, альдегіди, вітаміни, антибіотики, пептиди); активності ферментів та неорганічних сполук (аміак, нітрати, нітриди, сульфіді, сульфати, фосфати). Слід зазначити, що мікробні датчики придатні також і для вивчення комплексних метаболічних процесів, таких як біологічне споживання кисню (БСК), фотосинтез та мутагенез [6].

**Мікробіологічна та біохімічна основа клітинних сенсорів.** У порівнянні із ферментами та іншими біологічними агентами живі клітини як біокатализатори мають ряд суттєвих переваг [5]. Вони а) володіють досить високим рівнем стабільності, оскільки являють собою єдине ціле, у якому всі метаболічні системи знаходяться в захищеному, природно-оптимізованому стані; б) порівняно легко підтримуються у чистій культурі при незначних витратах; в) легко піддаються генетичним маніпуляціям, що дає можливість отримувати мутантні мікроорганізми із строго детермінованими біокаталітичними властивостями; г) дешеві порівняно з ферментами чи імуноглобулінами та не потребують трудомістких процесів очистки; д) здатні здійснювати багатостадійні перетворення, не потребуючи введення додаткових екзогенних факторів.

Метаболічні процеси мікроорганізмів у складі біосенсора характеризуються станом гострого субстратного дефіциту. У таких умовах відбувається детермінування як стабільності, так і чутливості біосенсорів. Остання, в свою чергу, визначається метаболічним станом клітин. Рівень метаболізму у мікроорганізмів залежить, в основному, від енергетичного статусу клітин. Було проведено порівняльний аналіз

Таблиця 1  
Амперометричні мікробні сенсори

Мікроорганізм	Електрохімічно активна речовина	Межі визачення, ммоль/л	Час відгуку, хв	Стабільність, дні	Посилання
<i>Nitrifying bacteria</i>	O <sub>2</sub>	Аміак, 0,005—2,5	4 (с)	10	10
<i>Bacillus subtilis</i>	»	Амілаза, 0—35 U/cm <sup>3</sup>	0,1 (к)	30	11
<i>B. subtilis</i>	»	Ангіотензин та аспартам, 0,07—0,6	0,1 (к)	56	12
<i>Enterobacter agglomerans</i>	»	Аскорбінова кислота, 0,004—0,7	2,5—3 (к)	11	13
<i>Nocardia erythropolis</i>	Дихлорфеноліндофенол	Андростендіон, 0,025—0,1	2—5 (с)	Не визначали	14
<i>Trichosporon cutaneum</i>	O <sub>2</sub>	Біологічне споживання кисню: 5—100 мг/л	0,2—0,5	40	15, 16
<i>Hansenula anomala</i>	»	0,01—0,4	15—20	7	17
<i>Pseudomonas A4</i>	»	1—20 мг/л	15	28	18
<i>Synechococcus</i>	[Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup>	Гербіциди, >20 мкл/л	15 (с)	7	19
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	»	Глюкоза: 0,0125—0,125	10 (с)	14	20
<i>B. subtilis</i>	»	0,05—0,6	0,1 (к)	Не визначали	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	»	0,01—1,0	5—10 (с)	15	21
<i>Brevibacterium lactoferm.</i>	»	0,01—1,0	10 (с)	10	22
<i>B. subtilis</i>	»	Глутамінова кислота, 0,01—0,15	0,1 (к)	14	23
<i>Candida maltosa</i>	»	Гексадекан, 2—25	0,1—0,2 (к)	1	24
<i>B. subtilis</i>	»	Гонадотролін, (2—15) · 10 <sup>-3</sup>	0,1 (к)	56	25
<i>Acetobacter xylinum</i>	»	Етанол: <0,4	2 (с)	10	26
<i>Trichosporon brassicae</i>	»	0,05—0,5	10 (с)	21	27
<i>Nitromonas europiae</i>	»	Катіони амонію: 0,002—0,02	8 (с)	2	28
<i>N. bacteria</i>	»	0,002—0,08	8 (с)	14	28
<i>N. bacteria</i>	»	0,45—10	7 (с)	10	29
<i>B. subtilis</i>	»	0,01—0,15	0,1 (к)	12	30
<i>Nitrobacter sp.</i>	»	Креатинін, 0,4—8,8	3 (с)	21	31
<i>H. anomala</i>	[Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup>	Лактат, 1—11	2 (с)	28	32
<i>B. subtilis</i>	O <sub>2</sub>	Мальтоза, 0,05—0,5	0,1 (к)	Не визначали	11
<i>Methylomonas flagellata</i>	»	Метан, 0,013—6,6	1—2	20	27, 33
<i>Неідентифіковані бактерії</i>	»	Метанол, 0,06—0,7	10 (с)	21	10
<i>B. subtilis</i>	»	Мутагени, 2—20 мг/л	60 (с)	Не визначали	34, 35
<i>N. bacteria</i>	»	Нітрати, 0,15—5	3 (с)	24	26
<i>S. cerevisiae</i>	»	Ністатин, 0—54 од/см <sup>3</sup>	60 (с)	20	37
<i>T. brassicae</i>	»	Оцтова кислота, 0,08—1,2	8—9 (с)	21	10
<i>B. subtilis</i>	»	Протеаза, 0,3—1,4 U/мл	0,1 (к)	56	25
<i>N. bacteria + уреаза</i>	»	Сечовина, 2—200	7 (с)	10	38
<i>Alternaria tennis</i>	»	Сечова кислота, 0,025—0,5	5—10 (с)	50	36
<i>Pseudomonas aminovarans</i>	»	Триметиламін, 0,005—0,026	10 (с)	20	39
<i>P. fluorescens</i>	»	Триптофан, 0,0004—0,7	335	Не визначали	40

Мікроорганізм	Електрохімічно активна речовина	Межі визначення, ммоль/л	Час відгуку, хв	Стабільність, дні	Посилання
<i>T. cutaneum</i>	O <sub>2</sub>	Февол, 0,02—0,15	0,25 (к)	8—10	41, 4
<i>Chorella vulgaris</i>	»	Фосфат, 8—70	1 (с)	60	43
<i>N. erythropolis</i>	»	Холестерин, 0,015—0,13	0,5—0,75 (к)	28	44

Примітка. Тут і в табл. 2 у четвертій колонці в дужках вказано режим визначення: с — стаціонарний; к — кінетичний.

співвідношення АТР/АДР та концентрації суми нуклеотидів у вільних та іммобілізованих клітин *Saccharomyces cerevisiae*, що знаходилися в умовах субстратного дефіциту. При голодуванні вільних клітин концентрація АТР, АДР і АМР залишається незмінною протягом 6 діб, а потім спостерігається зниження рівня АТР та підвищення вмісту АДР і АМР. При голодуванні інкорпорованих у гель клітин рівень аденілатів залишається незмінним протягом 12 діб. Довший період збереження енергетичного статусу у іммобілізованих клітин пов'язаний, очевидно, з їх особливим фізіологічним станом (зміна молекулярно-проникаючої здатності біологічних мембран клітини, «замороження» метаболічних процесів) [74].

У найзагальнішому вигляді клітина представляє собою так званий «чорний ящик». Субстрат, який нас цікавить, піддається за допомогою клітин процесам обміну, в результаті котрих формуються продукти метаболізму чи поглинається кисень в аеробних умовах. Сама стінка мікроорганізмів служить дифузійним бар'єром, через який речовини проникають або з використанням специфічних транслокаційних систем, або за рахунок полегшеної дифузії і дуже рідко — шляхом пасивного транспорту. Активний транспорт речовини передбачає її акумуляцію проти градієнту концентрації і потребує наявності високоспецифічних білків-переносників та значних затрат енергії. Експресія головних транспортних систем регулюється на рівні транскрипції генів, що кодують ці системи. Полегшена дифузія не потребує затрат енергії, а тому перетворення того чи іншого субстрату відбувається за допомогою специфічних метаболічних ланцюгів [6].

Мікроорганізми, що їх вибирають для створення біосенсорних систем, повинні відповідати певним критеріям: а) аеробне споживання кисню за асиміляції субстрату (у даному випадку мікробні сенсори створюються на основі амперометричних перетворювачів); б) генерація електродно-активних продуктів внаслідок процесів метаболізму, зокрема протонів, іонів амонію, H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub> чи H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, які можуть визначатися за допомогою амперометричних, потенціометричних та оптичних трансдукторів [6].

**Фізична основа мікробних сенсорів.** Як зазначалося вище, вибір трансдуктора надзвичайно залежить від особливостей взаємодії між біологічним каталізатором (клітина у нашому випадку) та аналізованою речовиною. Коло трансдукторних систем, створених на сьогоднішній день, включає у себе:

- електрохімічні перетворювачі — амперометричні (визначення змін струму при постійному потенціалі); потенціометричні (реєстрація змін потенціалу при підтримці постійного струму) чи кондуктометричні (вимірювання змін провідності між парою електродів);
- оптичні (визначення зміни оптичних властивостей);
- калориметричні (реєстрація незначних температурних змін);
- акустичні (вимірювання змін акустичних властивостей сенсора) [75].

Таблиця 2

## Потенціометричні мікробні сенсори

Мікроорганізм	Електрохімічно активна речовина	Межі визначення, ммоль/л	Час відгуку, хв	Стабільність, дні	Посвячення
<i>Escherichia coli</i>	CO <sub>2</sub>	Антибіотики, 0,017—16,67 г/л	—	10	45
<i>Streptococcus faecium</i>	NH <sub>3</sub>	Аргінін, 0,05—1,0	20 (с)	40	46, 47
<i>Serratia marcescens</i>	»	Аспарагін, 1,0—9,3	Не визначали	21	48
<i>Bacterium cadaveris</i>	»	Аспарагінова кислота: 0,3—7,0	5 (с)	2	49
<i>Pseudomonas dacunhae</i>	CO <sub>2</sub>	0,1—1,0	3 (с)	30	6
<i>E. coli</i>	»	Глутамінова кислота, 0,7—5,5	1—3 (с)	21	50
<i>Sarcina flava</i>	NH <sub>2</sub>	Глутамін, 0,1—10	5 (с)	14	51
<i>Pseudomonas sp.</i>	»	Гістидин, 0,1—3	6—12 (с)	21	52
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	CO <sub>2</sub>	Глюкоза: 1—15	10 (с)	Не визначали	22
<i>Zygomonas mobilis</i>	H <sup>+</sup>	0,03—0,3	30 (к)	Те саме	53
<i>Acetobacter aceti</i>	»	Етанол, 3—70	25 (с)	»	54
<i>Hansenula anomala</i>	»	Лактат, 0,04—2	7—10 (с)	»	55
<i>E. coli</i>	CO <sub>2</sub>	Лізин, 0,07—0,7	5 (с)	14	56
<i>Hyphomicrobium</i>	H <sup>+</sup>	Монометилсульфат, 25—630	5—30 (с)	8	57
<i>Clostridium butyricum</i>	»	Мурашина кислота: 0,22—22	20 (с)	20	58
<i>Pseudomonas oxalaticus</i>	CO <sub>2</sub>	0,1—2,0	10—20 (с)	7	59
<i>E. coli</i>	NH <sub>3</sub>	NAD <sup>+</sup> , 0,25—2,5	5—10 (с)	7	60
<i>Lactobacillus arabinosa</i>	H <sup>+</sup>	Нікотинова кислота, (0,4—40) · 10 <sup>-3</sup>	60 (с)	30	61
<i>E. coli</i>	NH <sub>3</sub>	Нікотинамід, 0,28—20,0	10—20 (с)	10	62
<i>Azotobacter vinelandii</i>	»	Нітрати, 0,01—0,8	7—8 (с)	14	63
<i>Pseudomonas sp.</i>	»	Нітрлотриацетат, 0,1—0,7	5 (с)	30	64
<i>S. faecium</i>	CO <sub>2</sub>	П'єват, 0,22—32,0	6—9 (с)	14	65
<i>Pichia membranaefaciens</i>	»	Сечова кислота, 0,1—2,5	5—10 (с)	50	66
<i>Proteus mirabilis + ureasa</i>	NH <sub>3</sub>	Сечовина, 0,5—50,0	5—9 (с)	21	67
<i>Clostridium aciditrici</i>	»	Серин, 0,018—16,0	3—5 (с)	3	68
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	H <sub>2</sub> S	Сульфат, 0,04—0,7	8—16 (с)	10	69
<i>Clostridium sp.</i>	H <sub>2</sub>	Сульфід, 0,1—3,5	5—10 (с)	Не визначали	70
<i>Aeromonas fenologenes</i>	NH <sub>3</sub>	Тиронин, 0,08—1,0	4—6 (с)	7	71
<i>Citrobacter freundii</i>	H <sup>+</sup>	Цефалоспоровин, 50—100 мкг/см <sup>3</sup>	10 (с)	7	72
<i>Proteus morgani</i>	H <sub>2</sub> S	Піастетин, 0,05—0,9	5—8 (с)	6	73

Таблиця 3

## Порівняльна характеристика різних типів трансдукторів

Тип перетворювача	Переваги	Недоліки
Електрохімічні амперометричні O <sub>2</sub> -електроди H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -електроди потенціометричні іон-селективні електро- ди (включаючи газочутливі)	Прості, високоселективні Прості, високочутливі	Низька чутливість Низька селективність
pH-чутливі польові транзистори	Прості, надійні	Повільний відгук, потреба у високостабільному елект- роді порівняння, чутливість до електрошумів
кондуктометричні	Низька вартість за масово- го виробництва, стабільність відгуку, можливість створен- ня мультифункціональних чипів та мініатюризації, ви- користання малих об'ємів аналіту	Чутливість до температур- них коливань, недоскона- лість виготовлення різних шарів на затворі, фото- чутливість
Оптичні	Порівняно дешеві, легко конструюються, мініатюрні	Чутливі до коливань тем- ператури, pH, іонної сили
Акустичні	Висока чутливість, низька вартість, можливість мініа- туризації, не залежать від електричних наведень, не вимагають фізичного контак- ту іммобілізованого мате- ріалу із волокнами	Вимагають застосування високоенергетичних джерел струму, вузький динаміч- ний діапазон визначення, сигнал залежить від об'є- му реагента
Калориметричні	Швидкий відгук, простота, стабільний сигнал, низька вартість реєструючих при- строїв, зразки застосовують без передобробки	Низька чутливість у рідн- нах, інтерференція, пов'я- зана із неспецифічним зв'я- зуванням
	Не залежать від оптичної інтерференції (колір та мут- ність), багатогранність	Дорогі, вимагають значних витрат біоматеріалу, гром- іздки

Порівняльний аналіз різних типів перетворювачів, які застосовуються у біосенсорних пристроях, наведено у табл. 3.

**Амперометричні перетворювачі.** Під час амперометричного перетворення до електрода порівняння прикладається постійний потенціал і вимірюється струм, що генерується внаслідок окислення чи відновлення електрохімічно-активних речовин на поверхні робочого індикаторного електрода. Потенціал індикаторного електрода вибирають таким чином, щоб невеликі зміни в ньому не призводили до зміни швидкості окисно-відновних процесів на поверхні електрода. Сигнал, що генерується, майже повністю обумовлений масопереносом електроактивних речовин до поверхні робочого електрода, в результаті чого відбувається адсорбція деяких з них, що викликає втрату чутливості [75].

На сьогоднішній день відомо три основних типи амперометричних датчиків. Функціонування першого з них базується на реєстрації концентрації кисню або пероксиду водню (запатентований фірмою Yellow Springs Instrument, OH, США) [105]. У той час, як головним недоліком кисневих датчиків є висока чутливість до механічної дії, найбільшим недоліком перекисно-водневих датчиків є виникнення на них високих анодних потенціалів (0,5—1,0 В), при яких стає можливим окислення інших компонентів (сечова кислота, аскорбінова кислота, глутатіон та ін.), що призводить до завищення результатів. Впливу цих субстратів на величину сигналу можна позбутися шляхом нанесення на електродну поверхню додаткових мембран із заданою молекулярно-проникаючою здатністю. До другої групи відносяться так звані Medi-Sense електроди [104], чутливі елементи котрих включають молекули медіаторів, що акцентують електрони замість кисню і можуть бути повторно окислені при нижчих потенціалах, ніж перекис водню. Завдяки

цьому відповідає необхідність у застосуванні захисних мембран і зменшується залежність відгуку електрода від концентрації кисню. Третій, альтернативний, тип перетворювачів передбачає повторне окислення відновленої молекули ферменту з прямим перенесенням електронів від молекули ензиму до поверхні електродів.

**Потенціометричні перетворювачі.** У пристроях із потенціометричним принципом індикації вимірюється різниця потенціалу між робочим та референтним електродами в умовах, коли струм дорівнює нулю. За таких умов не відбувається адсорбції субстратів на поверхні електродів, а тому такі перетворювачі відносяться до пристроїв «недеструктивного» типу. Найчастіше у біосенсорних пристроях застосовуються три типи потенціометричних перетворювачів: іоноселективні електроди; газочутливі електроди та польові транзистори. Результатом виникнення логарифмічної залежності між потенціалом, що генерується на електродній поверхні, та активністю іона, який нас цікавить, є можливість створення аналітичних пристроїв із широким динамічним діапазоном. Проте основним недоліком при використанні таких систем є потреба у високостабільному електроді порівняння [7].

**Кондуктометричні перетворювачі.** Провідність аналізованого зразка визначається шляхом пропускання змінного струму через пару електродів, які знаходяться у розчині. Зміна провідності розчинів відбувається за рахунок генерації заряджених продуктів внаслідок протікання біохімічних реакцій. Не дивлячись на те, що кондуктометрія не дуже широко застосовувалася до сьогодні у біосенсорній практиці, плідним може виявитися використання сенсорів на основі мультичастотної техніки [75].

**Оптичні перетворювачі.** Дія оптичних датчиків базується на реєстрації зміни спектральних характеристик індикатора за допомогою оптоелектронних пристроїв. Пристрої, які містять шар іммобілізованого реагента на кінці окремого оптичного волокна чи комплексу оптичних волокон, були названі оптродами. Взаємодія аналіту із фазою іммобілізованого реагента обумовлює зміну оптичних властивостей реагента і реєструється за допомогою оптичних волокон. На цей час випрацьовано оптроди, чутливі до  $O_2$ ,  $CO_2$  чи рН. Так, наприклад, визначення  $O_2$  може базуватися на пригніченні  $O_2$ -індукованої флуоресценції іммобілізованого піренбутирату, а аналіз рН — на застосуванні кислотно-основних індикаторів. Розроблено також амоній- та NADH-специфічні оптроди, створено високочутливу сенсорну систему для визначення концентрації глюкози, амінокислот токсинів та іонів важких металів, яка базується на врахуванні зміни інтенсивності люмінесценції у фотобактерій [4]. Слід зазначити, що аналіз інтенсивності люмінесценції для оцінки метаболічної активності клітин мікроорганізмів є чутливішим показником, аніж біологічне споживання кисню чи генерація тепла.

**Калориметричні перетворювачі.** Калориметрію можна вважати ще одним типом трансдукції, оскільки більшість біологічних реакцій протікає із виділенням або поглинанням тепла. Однією з головних переваг цього типу перетворювачів є незалежність їх функціонування від хімічних властивостей аналізованого розчину. Проте лише зовсім недавно було відкрито шлях до практичного застосування даного типу трансдукторів [7].

**Акустичні перетворювачі.** П'єзоелектричні кристали можуть бути застосовані як трансдуктори у сенсорах у зв'язку з їх здатністю генерувати та передавати акустичні хвилі у частотно-залежному режимі. Оптимальна резонансна частота для трансмісії акустичних хвиль сильно залежить від фізичних властивостей та розмірів п'єзокристала. Зміна маси матеріалу на поверхні кристала спричиняє кількісну зміну його резонансної частоти. Відомо два класи акустичних трансдукторів: такі, які передають акустичну хвилю з одного боку кристала на інший (bulk-wave, загально-хвильові пристрої), і такі, що передають акустичну хвилю по одній грані кристала з одного місця локації в інше

(surface acoustic wave, поверхневі акустичні хвилі). Роботу таких пристроїв добре вивчено у газових середовищах, а що стосується рідин, то тут ще багато не зовсім зрозумілого.

**Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів.** Відомо, що функціонування біосенсора забезпечується структурною організацією біоселективних мембран, які щільно контактують із поверхнею трансдуктора. При формуванні біоселективного покриття спостерігається підвищення робочої стабільності, що визначає відтворюваність результатів. Крім того, іммобілізація дає можливість багаторазово використовувати одну і ту ж мембрану.

Існує велика кількість варіантів іммобілізації клітин, і вибір найпридатнішого визначається тими умовами, в яких доведеться працювати біоматеріалу. Найчастіше сьогодні застосовуються методи адсорбції та включення клітин мікроорганізмів в гелі як природного, так і синтетичного походження. В даний час пошук ефективних методів отримання біоселективних мембран спрямований не стільки на створення нових, скільки на модифікацію вже існуючих. Дані про носії, які найчастіше застосовуються в аналітичній практиці, представлено у табл. 4.

Таблиця 4

Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів

Носій	Посилання
Ковалентна іммобілізація на носії	
Активованій силікагель	77
Поліфеніленоксид	74
Адсорбція на носієві	
Пористий титан з природним цеолітом	78
Пориста ацетицелюлоза	4,5
Полібензил-4-вінілпіридиній галід	79
Скло або целюлоза, активовані поліетиленіміном	80
Стінки водорості <i>Wolffia arhita</i>	81
Включення клітин у гелі	
Поліакриламідний гель	82
Кріо-поліакриламідний гель	83
Модифікований ПААГ	84
Полівініловий спирт	30
Кріо-полівініловий спирт	85
Полівініловий спирт+борат	86
Са-альгінатний гель	54,87
SiO <sub>2</sub> +альгінат	88,89
Кріо-SiO <sub>2</sub>	90
κ-каррагінан	91
Хітозан	92
Зоостерин	93
Пектат	87
Полівінілбутират	4
Поліуретанові смоли	94
Карбоксиметилцелюлоза (іонотропне желювання Al <sup>3+</sup> )	95

Методи іммобілізації можна розділити на фізичні (адсорбція на поверхні датчика або на інертній мембрані, фізичне включення на поверхні датчика під мембрану або полімерну сітку, включення в полімерну мембрану) та хімічні (шляхом зшивання біфункціональними агентами та ковалентне пришивання до поверхні). Слід зазначити, однак, що хімічні методи малоприсадні для іммобілізації мікроорганізмів, оскільки клітини втрачають значну частину активності. Найпростішим та широкоживаним методом іммобілізації є центрифугування або фільтрування мікробної суспензії на мембрані чи поверхні ацетицелюлози [58], фільтрувального паперу [58] або нейлону [17]. Мікроорганізми, адсорбовані на фільтрувальному папері, більш чутливі у порівнянні з клітинами, включеними у гелеподібні мембрани. У випадку адсорбції сама матриця служить лише механічною підкладкою, в якій

пори заповнені живими клітинами. У результаті такої іммобілізації не виникає хімічних зв'язків, а тому клітини не пошкоджуються в процесі іммобілізації. Мікроби у порах утримуються в основному за рахунок слабких адсорбційних сил (водневі зв'язки, сольові мостики, сили Ван-дер-Ваальса).

Мікроорганізми також можуть бути іммобілізовані шляхом включення у гелеподібні мембрани біологічного походження — агар [30], желатин [96], колаген [61], альгінат кальцію [54, 87],  $\kappa$ -каррагінан [91] чи хімічні полімери — поліакриламід [61], полівініловий спирт [30]. Полімерні гелі запобігають вимиванню мікроорганізмів і дають доступ субстратам та кисню. У більшості випадків застосування мембран такого типу призводить до підвищення дифузійної резистентності, що спричиняє сповільнення відгуку сенсорних пристроїв.

Багатобічним напрямком іммобілізації є використання преполімерів ЕНТ/ЕНТП типу та модифікованих полівінілових спиртів [97]. ЕНТ/ЕНТП преполімери готуються із поліетиленгліколю і гідрофобного поліпропіленгліколю відповідно, а скелетною основою служать гідроксетилакрилат і ізофорон діізоціанат. Клітини, змішані з цими преполімерними системами, опромінують ультрафіолетом для здійснення процесу полімеризації. Такий метод включення клітин має ряд суттєвих переваг: процедура іммобілізації дуже проста і відбувається у м'яких умовах; преполімери не містять мономерів із токсичною дією на біокатализатори, структура гелю та його фізико-хімічні властивості (гідрофобно-гідрофільний баланс та іонна природа) можуть контролюватися внаслідок застосування преполімерів із заданою довжиною ланцюга та типом молекул. Гелі із полівінілового спирту утворюються при денному освітленні. Недоліком даних методів є те, що в результаті УФ-опромінення з fotocутливих груп преполімерів формуються вільні радикали, які надзвичайно швидко рекомбінують з іншими радикалами. Це може негативно впливати на мікроорганізми. Слід зазначити, що обом типам гелів притаманний високий ступінь проникнення по відношенню до молекул кисню, субстратів та продуктів біохімічних реакцій [98].

Порівнюючи описані методи іммобілізації — адсорбцію та включення у гелі — можна зробити наступний висновок: для створення аналітичних систем з високим рівнем функціональної стабільності та стабільності при зберіганні перевагу слід віддати методу включення у гелі. Перспективним, на наш погляд, видається також застосування полімерів латексного типу на основі акрилових та метакрилових кислот.

**Принципи функціонування клітинних біосенсорів.** Як і у випадку ферментних біосенсорів, мікробні датчики можуть працювати у двох режимах: стаціонарному та кінетичному. Перший частіше застосовується у біосенсорних пристроях на основі клітин. Висока концентрація клітин та товщина самих біомембран приводять до підвищення дифузійної резистентності сенсорів. Такі дифузійно лімітовані системи не залежать від активності біоматеріалу і можуть успішно використовуватися для стабільного визначення концентрації субстратів.

Коли йде мова про час відгуку мікробних сенсорів, який можна співставити з таким же параметром для ферментних електродів, то він досягається лише у випадку кінетично контрольованих аналізаторів. Чутливість таких систем в основному, забезпечується активністю біокатализатора, але не залежить від процесів дифузії у матриці, а це означає, що транспорт субстратів до клітини та їх асиміляція є лімітованими за швидкістю процесами [99]. Таким чином, кінетично контрольовані датчики можна успішно використовувати при вивченні процесів поглинання та асиміляції субстратів, для характеристики метаболічного статусу клітин, у експериментах з дослідження механізмів пригнічення та індукції клітинних систем. Вагомим фактором для досягнення максимального відгуку є створення біоселективних матриць, товщина яких не перевищувала б розміру клітини. Отримання таких моношарових мембран є суттєвим моментом, оскільки запобігає виникненню



лаг-періодів та значно скорочує час відгуку сенсора (бар'єрні ефекти для проникнення субстратів та продуктів реакції зведені до мінімуму) [19].

#### **Застосування клітинних датчиків: комерціалізація та проблеми.**

Якщо розглядати області застосування клітинних сенсорів, то вони можуть бути такими: а) контроль процесів ферментації; б) аналіз якості харчових продуктів; в) моніторинг навколишнього середовища; г) діагностика.

Сенсори першого скерування застосовуються для визначення ключових параметрів процесів ферментації: концентрація клітин; поглинання джерел вуглецю, в основному, глюкози; наявність джерел азоту, зокрема, солей амонію і амінокислот; визначення кінцевих продуктів процесів ферментації. Методи, що застосовуються для визначення динаміки зміни мікробної популяції, базуються або на визначенні АТФ за допомогою люциферазної системи (варіант, комерціалізований у Нідерландах, Lumac BV) [17], або на визначенні NADH-залежної флюоресценції (комерційний варіант випрацювано у Швейцарії, Ingold AG) [17]. Сенсорна система на основі детекції змінних акустичних хвиль, які генеруються внаслідок прикладання змінного потенціалу до пари гребінчастих електродів, що знаходяться на п'єзокристалі, комерціалізована у Великобританії (Bugmeter, Dulas Engineering Ltd.) [100, 101]. Зменшення амплітуди та фази вихідної хвилі, пов'язане з осіданням мікроорганізмів на поверхню кристала, служить мірою концентрації клітин. Розроблено також електрохімічний сенсорний пристрій для визначення концентрації аеробних та факультативно анаеробних клітин мікроорганізмів у водних суспензіях. Даний сенсор являє собою проточну комірку, яка містить кисневий електрод, покритий нетканним волокном із N-бензил-4-вінілпіридиній хлориду та стиролом. Акумуляція мікроорганізмів на поверхні електрода призводить до сповільнення дихання клітин. Швидкість зменшення електричного струму пропорційна концентрації клітин. Мінімальна концентрація клітин (*Escherichia coli* у даному випадку), яка може бути визначена, складає  $3,7 \cdot 10^5$  клітин у 1 мл [103].

До другого напрямку відносяться амперометричні системи для визначення забруднення харчових продуктів патогенними організмами, які базуються на переносі електронів від клітин до кисневого електрода через молекули медіатора (фериціанід, фероцен чи бензохінон). Створено комерційний прототип біосенсору на цій основі — «Biochec», здатний детектувати до  $10^6$  клітин у 1 мл менш ніж за 2 хв. [17]. Розроблено також кілька комерційних варіантів оптичних біосенсорів для визначення забрудненості харчових продуктів клітинами *Salmonella*, *Listeria* і *Staphylococcus* з використанням системи антиген/антитіло [103].

Третій тип мікробних сенсорів призначений для аналізу хімікатів (нітрати, сульфати [63, 69], монометилсульфат [57]), визначення процесів біологічного споживання кисню (БСК) [15—18] та детекції токсинів [104] і мутагенів [34, 35, 56]. Один із пристроїв для вимірювання БСК на основі клітин *Trichosporon cutaneum* комерціалізовано у Японії (Nissan Denki).

Починаючи із 1975 р., коли Divies створив перший клітинний біосенсор для реєстрації концентрації етанолу на базі *Acetobacter xylinum* [26], і до сьогодні описано велику кількість біосенсорних пристроїв, в яких як біокатализатор використовують цілі клітини мікроорганізмів. Але, не зважаючи на це, розробленим біосенсорам притаманні деякі вади [5]: а) низька специфічність — найважливіший, найвагоміший недолік клітинних біосенсорів; б) значний час відгуку та релаксації; в) проблема збереження активності при довгостроковому зберіганні.

Як відомо, тільки декілька описаних мікробних сенсорів відрізняються високим ступенем стабільності та селективності. Показовим у цьому відношенні може бути бактерійний сенсор на основі клітин *Sar-*

*cina flava* для визначення концентрації глутаміну. Вплив інших амінокислот та деяких біологічних компонентів, зокрема, сечовини та креатиніну на величину відгуку сенсора зведений до мінімуму [51]. Описаний датчик володіє також значно вищим рівнем стабільності (20 днів) у порівнянні з аналогічним ензимним сенсором на основі ізольованої деамінази (1 день). Це, без сумніву, зумовлено тим, що клітина знаходиться в «еволюційно оптимізованому оточенні».

Існує декілька підходів, що застосовуються для підвищення чутливості та селективності мікробних датчиків [36]:

1) індукція певних транспортних і/або метаболічних систем;

2) пригнічення небажаних транспортних і/або метаболічних шляхів;

3) коїмобілізація клітин з ферментами, тобто створення гібридних сенсорів для позбавлення від інтерференції окремих субстратів чи утворення специфічних продуктів.

Так, механізм індукції був успішно застосований для розробки біосенсорів, специфічних до гістидину на основі *Pseudomonas* spp. [53]; до фенолів на базі *Trichosporon cutaneum* [41, 42]; до аскорбінової кислоти з використанням *Enterobacter agglomerans* [13], до тирозину на основі *Aeromonas phenologenes* [71] і лактату на базі *Bacillus subtilis* [32]. Встановлено, що при вирощуванні клітини *B. subtilis* на середовищі з мальтозою відбувається індукція систем її транспорту та асиміляції.

Автори роботи [65] використали інший підхід для підвищення селективності потенціометричного сенсора на піруват із застосуванням клітин *Streptococcus faecium*, оброблених йодацетамідом (для інгібування процесу гліколізу) та тираміном (для інгібування позаклітинної тирозиндекарбоксілази). Чутливість аргінінового сенсора була підвищена внаслідок внесення азиду натрію для зняття інтерференції з боку глутаміну та аспарагіну [105].

Третій підхід полягав у розробці гібридних амперометричних біосенсорів для визначення  $\text{NAD}^+$  на основі клітин *E. coli* та  $\text{NAD}$ ази [60]; сечовини та креатиніну — на базі уреази чи креатинінази та нітрифікуючих бактерій [31, 38].

Нами було запропоновано ще один спосіб підвищення селективності клітинних сенсорів — конструювання штамів мікроорганізмів з генетичним пошкодженням заданих метаболічних систем. Так, було отримано штами метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* та *Pichia pinus* шляхом введення блоків окислення метанолу, етанолу та формальдегіду на стадії подальшого окислення органічних кислот і на їх основі створено лабораторні моделі високоселективних клітинних біосенсорних пристроїв, чутливих до метанолу, етанолу та формальдегіду із застосуванням напівпровідникових перетворювачів [106—109].

Виходячи з вищевикладеного, можна зробити наступні висновки:

1) подальший прогрес у сфері створення та аналітичного застосування мікробних сенсорних систем пов'язаний, очевидно, із новими досягненнями у молекулярній генетиці, біохімії мікроорганізмів, мембранній та мікроелектронній технологіях;

2) розвиток комерційних варіантів мікробних сенсорів буде, насамперед, базуватись на застосуванні амперометричних та оптичних трансдукторів (у сфері аналізу речовин) та п'єзокристалів (в області контролю мікробних популяцій);

3) буде продовжено пошук високотехнологічних та простих шляхів іммобілізації мікроорганізмів на поверхні перетворювачів із забезпеченням максимального рівня їх життєздатності та стабільності;

4) значна частина досліджень сконцентрується, вірогідно, на розробці високоселективних систем для моніторингу навколишнього середовища.

BIOSENSORS BASED ON MICROORGANISM CELLS

Summary

This review summarizes the data from literature in the design of laboratory and commercial prototypes of biosensors based on living cells of microorganisms. The potential benefits and problems of the development of this field of analytical biotechnology are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Clark L. C., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1962.—102.— P. 29—45.
2. Lowe C. R. An introduction to the concepts and technology of biosensors // Biosensors.—1985.—1, N 1.— P. 3—16.
3. Schramm W., Yang T., Midgley A. R. The commercialization of biosensors // Med. Dev. and Diagnostics Ind.—1987.—Nov.— P. 52—57.
4. Karube I., Tamiya E., Sode K. Current trends in microbiobiosensor development // Swiss Biotech.—1989.—7, N 4.— P. 25—26, 28—32.
5. Rawson D. M. Whole cell biosensors // Int. Ind. Biotechnol.—1988.—8, N 2.— P. 18—22.
6. Rieuel K., Renneberg R., Wollenberger U. et al. Microbial sensors: fundamentals and application for process control // J. Chem. Tech. Biotechnol.—1989.—44.— P. 85—106.
7. Schmid R. D., Karube I. Biosensors and «bioelectronics» // Biotechnology / Eds. H. J. Rehm, G. Reed.—Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1988.— P. 317—365.
8. Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S. Biosensors. Fundamentals and application.—Oxford: Univ. press, 1987.— P. 13—29.
9. Hall E. A. H. Biosensors.—Melksham: Redwood press Ltd., 1990.— P. 193—215.
10. Karube I., Suzuki S., Okada T., Hikuma M. Microbial sensors for volatile compound // Biochimie.—1980.—62.— P. 567—574.
11. Renneberg R., Riedel K., Liebs P., Scheller F. Microbial and hybrid sensors for determination of alpha-amylase activity // Anal. Lett.—1984.—17.— P. 349—358.
12. Renneberg R., Riedel K., Scheller F. Microbial sensor for aspartame // Appl. Microbiol. Biotechnol.—1985.—21.— P. 180—181.
13. Vincke B. J., Bevelschoouwer H. J., Patriarche G. J. Determination of L-ascorbic acid with bacterial, tissue and enzyme electrodes // Anal. Lett.—1985.—18.— P. 1593—1606.
14. Wollenberger U., Scheller F., Atrat P. Microbial membrane electrode for steroid assay // Ibid.—1980.—13.— P. 1201—1210.
15. Riedel K., Renneberg R., Kuhn M., Scheller F. A fast estimation of BOD with microbial sensors // Appl. Microbiol. Biotechn.—1988.—28.— P. 316—318.
16. Riedel K., Renneberg R., Liebs P., Kaiser G. Microbial sensors // Stud. Biophys.—1986.—119.— P. 163—166.
17. Kuisys J., Kadziauskiene K. Yeast BOD sensor // Biotechn. Bioeng.—1980.—22.— P. 221—226.
18. Zhang X., Wang Z., Jian H. Microbial sensor for the BOD estimation // Chem. Abstr.—1986.—105.— P. 158—286.
19. Rawson D. M., Willmer A. J., Turner A. P. F. Whole-cell biosensors for environmental monitoring // Biosensors.—1988.—4.— P. 299—311.
20. Karube I., Mitsuda S., Suzuki S. Glucose sensor using whole cells of *Pseudomonas fluorescens* // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechn.—1979.—7.— P. 343—350.
21. Mascini M., Memoli A. Comparison of microbial sensors based on amperometric and potentiometric electrodes // Anal. Chim. Acta.—1986.—182.— P. 113—122.
22. Hikuma M., Ohana H., Yasuda T. Amperometric determination of total assimilable sugars in fermentation broths with use of immobilized whole cells // Enzyme Microbiol. Techn.—1980.—2.— P. 234—238.
23. Riedel K., Scheler F. Inhibitor-treated microbial sensor for the selective determination of glutamic acid // Analyst.—1987.—112.— P. 341—342.
24. Pat. N 228.826 (Germany) Verfahren zur bestimmung von langkettigen n-alkanen, fettsäuren und alkoholen / R. Renneberg, P. Riege, K. Schwandt et al.—1985.
25. Riedel K., Renneberg R., Kleine R. et al. Microbial sensor for peptides // Appl. Microbiol. Biotechn.—1988.—28.— P. 272—275.
26. Divies C. Ethanol oxidation by an *Acetobacter xylinum* microbial electrode // Ann. Microbiol. (Paris)—1975.—126.— P. 175—186.
27. Hikuma M., Kubo T., Yasuda T. et al. Microbial electrode sensor for alcohols // Biotechn. Bioeng.—1979.—21.— P. 1845—1853.
28. Hikuma M., Kubo T., Yasuda T. et al. Ammonia electrode with immobilized nitrifying bacteria // Anal. Chem.—1980.—52.— P. 1020—1024.
29. Okada T., Karube I., Suzuki S. Ammonium ion sensor based on immobilized nitrifying bacteria and a cation exchange membrane // Anal. Chim. Acta.—1982.—135.— P. 159.

30. Riedel K., Huth J., Kuehn H., Liebs P. Amperometric determination of ammonium ions with a microbial sensor // J. Chem. Techn. and Biotechn.—1990.—47.— P. 109—116.
31. Kubo I., Karube I., Suzuki S. Amperometric determination of creatinine with a biosensor based on immobilized creatininase and nitrifying bacteria // Anal. Chim. Acta.—1983.—151.— P. 371—376.
32. Racek J., Musil J. Biosensors for lactate determination in biological fluids I. Construction and properties of biosensor // Clin. Chim. Acta.—1987.—162.— P. 129—139.
33. Okada T., Karube I., Suzuki S. Microbial sensor system which uses *Methylomonas* sp. for the determination of methane // Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechn.—1981.—12.— P. 102—106.
34. Karube I., Nakahara T., Matsunaga T., Suzuki S. *Salmonella* electrode for screening mutagens // Anal. Chem.—1982.—54.— P. 1725—1727.
35. Karube I., Nakahara T., Matsunaga T., Suzuki S. Measurements of mutagens by microbial sensor // Chem. Abstr.—1983.—99.— P. 33955.
36. Okada T., Karube I., Suzuki S. NO<sub>2</sub> sensor which uses immobilized nitrate oxidizing bacteria // Biotechn. Bioeng.—1983.—25.— P. 1641—1651.
37. Karube I., Matsunaga T., Suzuki S. Microbioassay of nistatin using yeast electrode // Anal. Chim. Acta.—1979.—109.— P. 39—44.
38. Okada T., Karube I., Suzuki S. Hybrid urea sensor using nitrifying bacteria // Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechn.—1982.—14.— P. 149—154.
39. Gamati S., Luong J. H. T., Mulchandani A. A microbial biosensor for trimethylamine using *Pseudomonas aminovarans* cells // Biosensors and Bioelectronics.—1991.—6.— P. 125—131.
40. Vincke B. J., Devleeschouwer M. J., Patriarche G. J. Bacterial electrode for the analytical use of the L-tryptophan oxidative metabolism of *Pseudomonas fluorescens* // J. Pharm. Belg.—1985.—40.— P. 357—365.
41. Neujahr H. Y., Kjellen K. G. Bioprobe electrode for phenol // Biotechn. Bioeng.—1979.—21.— P. 671—678.
42. Neujahr H. Y. Determination of phenol and catechol concentrations with oxygen probes coated with immobilized enzymes or immobilized cells // Appl. Biochem. Biotechn.—1982.—7.— P. 107—111.
43. Matsunaga T., Suzuki S., Tomoda R. Photomicrobial sensors for selective determination of phosphate // Enzyme Microbiol. Techn.—1984.—6.— P. 355—357.
44. Wollenberger U., Scheller F., Atrat P. Microbial membrane electrode for the determination of cholesterol // Anal. Lett.—1981.—13.— P. 825—836.
45. Simpson D. L., Kobos R. H. Potentiometric microbiological assay of gentamicin, streptomycin and neomycin with a carbon dioxide gas-sensing electrode // Anal. Chem.—1983.—55, N 12.— P. 1974—1977.
46. Riedel K., Scheller R. K. Selectivity enhancement of *e* bacterial arginine electrode // Analyst.—1987.—112.— P. 341—342.
47. Rechnitz G. A., Kobos R. K., Riechel T. L., Gebauer G. R. A bio-selective membrane electrode prepared with living cells // Anal. Chim. Acta.—1977.—94.— P. 357—365.
48. Vincke B. J., Devleeschouwer M. J., Patriarche G. J. Dosage de l'asparagine à l'aide d'une electrode bacterienne // J. Pharm. Belg.—1983.—38.— P. 225—229.
49. Kobos R. K., Rechnitz G. A. Regenerable bacterial electrode for L-aspartate // Anal. Lett.—1977.—10.— P. 751—758.
50. Hikuma M., Obana H., Yasuda T. et al. A potentiometric microbial sensor based on immobilized *Escherichia coli* for glutamic acid // Anal. Chim. Acta.—1980.—116.— P. 61—67.
51. Rechnitz G. A., Riechel T. L., Kobos R. K., Meyerhoff M. Glutamine-selective membrane electrode that uses living bacterial cells // Science.—1978.—199.— P. 440—441.
52. Walters R. R., Morarty B. E., Buck R. P. *Pseudomonas* bacterial electrode for determination of L-histidine // Anal. Chem.—1980.—52.— P. 1680—1684.
53. Park J. A., Kim H. S. A new biosensor for specific determination of glucose or fructose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* // Biotechn. and Bioeng.—1990.—36.— P. 744—749.
54. Kitagawa Y., Tamiya E., Karube I. Microbial-FET alcohol biosensor // Anal. Lett.—1987.—20, N 1.— P. 81—96.
55. Vincke B. J., Devleeschouwer M. J., Patriarche G. J. Electrodes potentiométriques et amperométriques à levures perméabilisées: détermination du L-lactate // Ibid.—1985.—18.— P. 593—607.
56. Karube I., Suzuki S. Amperometric and potentiometric determinations with immobilized enzymes and microorganisms // Ion Selec. Elec. Rev.—1984.—6.— P. 15—59.
57. Schar H. P., Ghisalba P. *Hyphomicrobium* bacterial electrode for determination of monomethyl sulfate // Biotechn. Bioeng.—1985.—27.— P. 897—901.
58. Matsunaga T., Karube I., Suzuki S. A specific microbial sensor for formic acid // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechn.—1980.—10.— P. 235—243.
59. Ho M. Y. K., Rechnitz G. A. Potentiometric system for selective formate measurement and improvement of response characteristics by permeation of cells // Biotechn. Bioeng.—1985.—27.— P. 1634—1639.
60. Riechel C., Rechnitz G. A. Hybrid bacterial and enzyme membrane electrode with nicotinamide adenine dinucleotide response // J. Membr. Sci.—1978.—4.— P. 243—250.

61. Matsunaga T., Karube I., Suzuki S. Rapid determination of nicotinic acid by immobilized *Lactobacillus arabinosus* // Anal. Chim. Acta.—1978.—99.— P. 233—239.
62. Vincke B. J., Devleeschouwer M. J., Dony J., Patriarche G. J. Analytical determination of nicotinamide using bacterial electrodes // Int. J. Pharmaceutics.—1984.—21.— P. 265—275.
63. Kobos R. K., Rice D. J., Flournay D. S. Bacterial membrane electrode for the determination of nitrate // Anal. Chem.—1979.—51.— P. 1122—1125.
64. Kobos R. K., Pyon H. Y. Application of microbial cells as multistep catalysts in potentiometric biosensing electrodes // Biotechn. Bioeng.—1981.—23.— P. 627—634.
65. Di Paolantonio C. L., Rechnitz G. A. Stability of bacterial based potentiometric electrode for pyruvate // Anal. Chim. Acta.—1983.—148.— P. 1—12.
66. Kawashima T., Tomida K., Tominaga N. et al. A microbial sensor for uric acid // Chem. Lett.—1984.—5.— P. 653—656.
67. Vincke B. J., Devleeschouwer M. J., Patriarche G. J. Contribution en developpement d'un nouveau modele d'electrode: L'electrode bacterienne // Anal. Lett.—1983.—16.— P. 673—684.
68. Di Paolantonio C. L., Arnold M. A., Rechnitz G. A. Serine-selective membrane probe based on immobilized anaerobic bacteria and a potentiometric ammonia gas sensor // Anal. Chim. Acta.—1981.—128.— P. 121—127.
69. Kobos R. K. Preliminary studies of a bacterial sulfate electrode // Anal. Lett.—1986.—19.— P. 353—362.
70. Matsunaga T., Tomoda R., Matsuda H. Photomicrobial electrode for selective determination of sulphide // Appl. Microbiol. Biotechn.—1984.—19.— P. 404—408.
71. Di Paolantonio C. L., Rechnitz G. A. Induced bacterial electrode for the potentiometric measurement of tyrosine // Anal. Chim. Acta.—1982.—141.— P. 1—13.
72. Matsumoto K., Seijo H., Watanabe T. et al. Immobilized whole cell based flow type sensor for cephalosporins // Ibid.—1979.—105.— P. 429—432.
73. Jensen M. A., Rechnitz G. A. Bacterial membrane electrode for L-cysteine // Ibid.—1978.—101.— P. 125—130.
74. Jirku V. Energy status of starving yeast cells immobilized by covalent linkage // Biotechnol. Lett.—1989.—11, N 12.— P. 881—884.
75. Griffiths D., Hall G. Biosensors—what real progress is being made? // Tibtech.—11, N 4.— P. 122—130.
76. Yellow Spring Instrument. Instruction manual Y. S. I. model 23 A, 1975.
77. Аринбасарова А. Ю., Коцценко К. А. Ковалентное связывание клеток с активированным силикагелем // Прикл. биохимия и микробиология.—1980.—16, № 6.— С. 864—857.
78. А. с. N 1594216 (СССР). Способ получения иммобилизованных клеток, обладающих бродильной активностью / Н. А. Кудряшов, Н. М. Агеева, Э. М. Соболев, В. А. Толмачев.— Бюлл. 35, 1990.
79. Kawabata N., Nishimura S., Yushimura T. New method of immobilization of microbial cells by capture on the surface of insoluble pyridinium type resin // Biotechnol. and Bioeng.—1990.—95, N 10.— P. 1000—1005.
80. D'Sousa S. F. Surface immobilization of food relevant microbial cells through adhesion // Food Biotechnol.—1990.—4, N 1.— P. 373—382.
81. Baulina O. I., Lobacova E. S., Korzenevskaya T. C., Ehvald R. Electron microscopic study of yeast immobilization on the framework of *Wolffia arhia* cell walls // Abstr. of 15-th Int. Spec. Symp. on Yeasts.—Riga, Sept 30—Oct. 6.—1991.— P. 18.
82. Starostina N. G., Lusta K. A., Fikhte B. A. Morphological and physiological changes in bacterial cells treated with acrylamide // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.—1983.—18, N 5.— P. 264—270.
83. Луста К. А., Старостина Н. Г., Горкина Н. Б. и др. Иммобилизация клеток *E. coli* в макропористые гели на основе полиакриламида // Прикл. биохимия и микробиология.—1988.—24, № 4.— С. 504—514.
84. Чупов В. В., Усова А. В., Яковенко Н. И. Ковалентная иммобилизация клеток в полимерных гидрогелях // Иммобилизованные клетки в биотехнологии.— Пушкино, 1987.— С. 4—15.
85. Лозинский В. И., Вайнерман Е. С., Zubov A. И. и др. Применение криогелей поливинилсвого спирта в биотехнологии. II. Изменение реологических характеристик гелевой матрицы в результате включения в нее клеток дрожжей // Биотехнология.—1990.— № 1.— С. 32—36.
86. Hashimoto S., Furukawa K. Immobilization of activated sludge by PVA-Boric acid method // Biotechnol. Bioeng.—1987.—30.— P. 52—59.
87. Toth D., Tomasovicova D., Gemeluer P., Kurilova L. Metabolite characteristics of bacterial cell entrapped in beaded calcium alginate and pectinate gels // Folia Microbiol.—1989.—34, N 6.— P. 515—524.
88. Pat. N 4797358 (USA). Microorganism or enzyme immobilization with a mixture of alginate and silica sol / J. Motai et al.—1988.
89. Yachi F., Hirochi M. Continuous conversion of glutamine to glutamate by immobilized glutaminase producing yeast // J. Ferment. Technol.—1990.—69, N 3.— P. 189—192.
90. Савбова О. Н., Цикитин Д. И., Лозинский В. И. и др. Окисление водорода иммобилизованными в силикагель и криосиликагель клетками лиготрофных бактерий // Микробиология.—1988.—57, № 6.— С. 940—944.

91. *Веревкин А. Н., Зуева Н. Н., Яковлева В. И. и др.* Энзиматический синтез L-яблочной кислоты из фумаровой с помощью иммобилизованных клеток *Escherichia coli* // Прикл. биохимия и микробиология.—1988.—24, № 1.—С. 35—41.
92. *Cell immobilization possible with chitosan gels* // Food Eng.—1988.—60, N 11.—P. 72.
93. *А. с. № 1567626 (СССР).* Способ получения иммобилизованных клеток, обладающих сорбитолдегидрогеназной активностью / К. А. Кощенко, М. В. Дюнова, В. В. Ковалев, А. А. Артюков, Р. Т. Овсова // БИ.—№ 20.—1989.
94. *Fukui S. et al.* // Meth, Enzymol.—1987.—137B.—P. 230—251.
95. *Popens N., Laukevics J.* Inversion of highly concentrated sucrose solutions by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells // Abstr. of 15-th Int. Spec. Symp. on Yeasts. (Riga, Sept 30—Oct. 6).—Riga, 1991.—P. 106.
96. *De-Alterilis E., Parascandola P., Pecorella M. A., Scardi V.* // Biotechnol. Techn.—1988.—2, N 3.—P. 205—210.
97. *Fukui S., Tanaka A.* Application of biocatalysts immobilized by prepolymer methods // Adv. Biochem. Eng. Biotechn.—1984.—29.—P. 2—33.
98. *Renneberg R., Sonomoto K., Katoh S., Tanaka A.* Oxygen diffusivity of synthetic gels derived from prepolymers // Appl. Microbiol. Biotechn.—1988.—28.—P. 1—7.
99. *Riedel K., Renneberg R., Liebs P.* Biochemical basis of kinetically controlled microbial sensors // Bioelectrochem. Bioeng.—1988.—19.—P. 137—144.
100. *Clarke D. J., Calder M. R., Carr R. J. G. et al.* The development and application of biosensing devices for bioreactor monitoring and control // Biosensors.—1985.—1.—P. 213—320.
101. *Ebersole R. S., Foss R. P., Ward M. D.* Piezoelectric cell growth sensor // Bio/Technology.—1991.—9.—P. 50—54.
102. *Kawabata N., Teramoto K.* Electrochemical sensor for viable microbial cell concentration based on a functional polymer that captures microorganisms alive // Sensors and Actuators B.—1993.—13—14.—P. 309—311.
103. *Luong J. H. T., Groom C. A., Male K. B.* The potential role of biosensors in the food and drink industries // Biosensors, Bioelectronics.—1991.—6.—P. 547—554.
104. *Rawson D. M., Willmer A. J., Cardosi M.* The development of whole cell biosensors for on line screening of herbicide pollution of surface waters // Toxicity Assessment: An Int. Quarterly.—1987.—2.—P. 325—340.
105. *Corcoran C. A., Kobos R. K.* Selectivity enhancement of a bacterial arginine electrode // Anal. Lett.—1983.—16.—P. 1291—1302.
106. *Корпан Я. Й., Гончар М. В., Солдаткин А. П., Стародуб Н. Ф. и др.* Клеточные микробиосенсоры на основе pH-чувствительных полевых транзисторов для определения метанола и этанола // Укр. биохим. журн.—1992.—64, № 3.—С. 95—100.
107. *Gonchar M. V., Korpan Y. I., Starodub N. F., Sibirny A. A.* Formaldehyde-induced acidification of the medium by methylotrophic yeast cells and elaboration of cell biosensor based on this phenomenon // Proc. of 3<sup>rd</sup> Int. conf. on role of formaldehyde in biological systems.—Sopron, 1992.—P. 203—208.
108. *Korpan Y. I., Gonchar M. V., Soldatkin A. T. et al.* Methylotrophic yeast microbiosensor based on ion-sensitive field effect transistors for methanol and ethanol determination // Anal. Chim. Acta.—1993.—271.—P. 203—208.
109. *Korpan Y. I., Gonchar M. V., Starodub N. F. et al.* A cell biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive transistors coupled to methylotrophic yeast cells with genetically adjusted metabolism // Anal. Biochem.—1993.—215, N 2.—P. 216—222.

Ин-т молекуляр. біології і генетики НАН України, Київ  
 Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ  
 Від-ня регулятор. систем клітини Ін-ту біохімії  
 ім. О. В. Палладіна НАН України, Львів

Одержано 17.10.94