

УДК 543.9:632.95

МИКРОБНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ

© 2019 г. Ю. В. Плеханова^{а, *}, А. Н. Решетилов^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
просп. Науки, 5, Пушкино, Московская обл., 149290 Россия

*e-mail: plekhanova@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 19.04.2018 г.

После доработки 05.06.2018 г.

Принята к публикации 21.03.2019 г.

Наряду с традиционными методами определения загрязнений объектов окружающей среды в последние годы широкое распространение получили биосенсоры. Представлен обзор современных микробных биосенсоров для определения остатков пестицидов в окружающей среде. Микробный биосенсор представляет собой сложное аналитическое устройство, в котором микроорганизм является чувствительным элементом, реагирующим на присутствие пестицида в анализируемом образце, при этом величина сигнала зависит от концентрации определяемого соединения. Описаны основные принципы формирования таких биосенсоров, их достоинства и недостатки. Представлены методы иммобилизации микроорганизмов в составе биосенсора и различные типы преобразователей сигнала. Рассматриваются перспективы развития данного направления исследований.

Ключевые слова: микробные биосенсоры, иммобилизация клеток, электрохимические и оптические преобразователи сигналов, пестициды.

DOI: 10.1134/S0044450219120090

В настоящее время при разработке биосенсоров для анализа объектов окружающей среды используют как традиционные методы анализа [1–3], так и новые развивающиеся направления – модификацию электродов наночастицами [4–6], методы геной инженерии для создания биорецепторов [7, 8] и т.д. Стандартные аналитические методы, как правило, требуют дорогостоящего оборудования, высококвалифицированного персонала и не могут использоваться для проведения анализа на месте отбора пробы. Эти методы не дают прямой информации о биологической опасности определяемого соединения [2]. Более того, многие металлы и органические соединения находятся в окружающей среде в нерастворимой форме, а в таком состоянии они только потенциально опасны для здоровья человека [8, 9]. Реальную опасность для организма могут выявить только биологические методы. В связи с этим широкое распространение получили биосенсоры на основе целых клеток, в том числе микробных [10, 11]. С помощью биосенсоров можно не только фиксировать наличие конкретного загрязняющего вещества, но также оценивать его токсическую активность, цитотоксичность, генотоксичность и биодоступность [12, 13]. Микробные биосенсоры имеют многочисленные преимущества при проведении экологического мониторинга; им посвящено значительное число обзоров [1–3, 6, 14–18].

К достоинствам биосенсоров относятся быстрота анализа в реальном времени, экономичность, портативность, возможность проведения анализа на месте отбора пробы, простота использования, высокая чувствительность, ограниченная пробоподготовка, многократное использование, минимальное потребление органического растворителя, специфичность. Однако основную массу разработанных биосенсоров используют в настоящее время в качестве лабораторных моделей; они находят ограниченное коммерческое применение. Традиционные методы анализа, такие как жидкостная и газовая хроматографии, газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, поверхностный плазмонный резонанс, обладают высокими чувствительностью и специфичностью, но в то же время трудоемки, их можно реализовать только в лабораторных условиях на дорогом высокотехнологичном оборудовании с участием специально обученного персонала. Кроме того, для осуществления таких анализов требуются большое количество органического растворителя и сложная пробоподготовка.

Микробный биосенсор представляет собой аналитический прибор, в котором для обнаружения соединений используют микроорганизмы, иммобилизованные на преобразователе сигнала. Особенностью микроорганизмов является их способность окислять широкий спектр субстра-

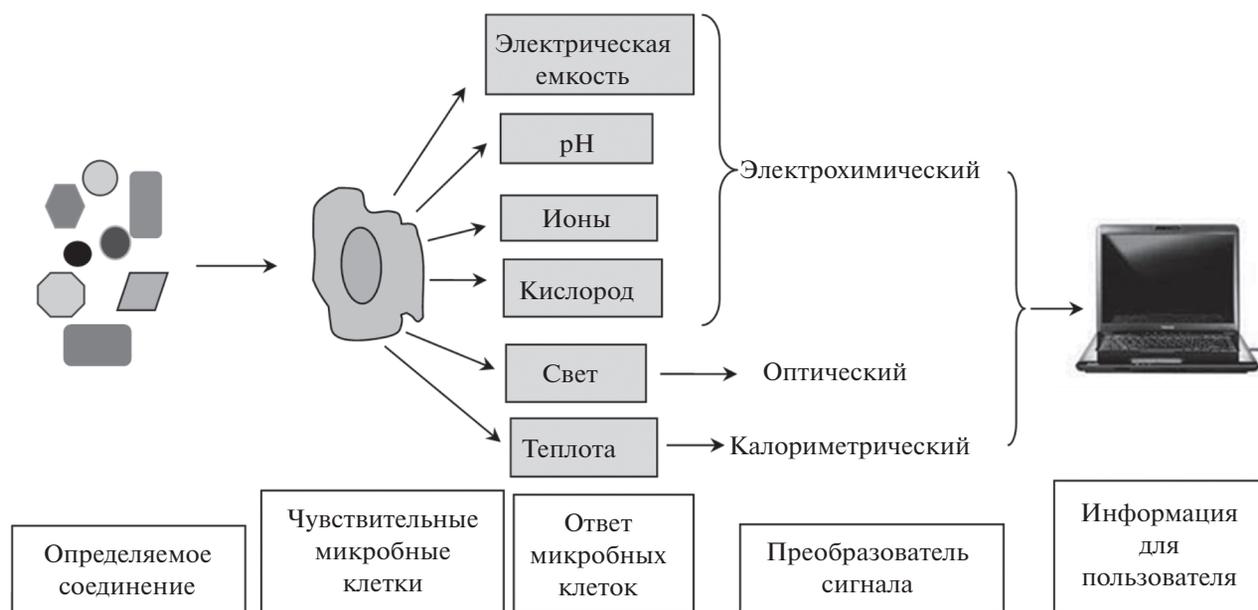


Рис. 1. Принцип работы микробных биосенсоров.

тов, в число которых входят и пестициды, поэтому микробные биосенсоры могут являться одним из инструментов мониторинга окружающей среды с целью обнаружения пестицидов [19]. Принцип работы микробного биосенсора представлен на рис. 1.

Период зарождения микробной биосенсорной теории и практики относится ко времени появления кислородного полярографического электрода в 1960 г., работ Кларка (Clark) и Лионса (Lyons) по созданию ферментного биосенсора на его основе, а затем первого микробного биосенсора Исао Карубе (Isao Kagube), успешно иммобилизовавшего бактерии на электроде типа Кларка для измерения биологического потребления кислорода в 1977 г. [20]. Это явилось началом развития не только в области микробных биосенсоров в целом, но и ее новой модификации – микробных биосенсоров, основанных на применении генетически модифицированных микроорганизмов. В 1982 г. две команды, одна во главе с Болдуином (Baldwin), другая во главе с Энгебрехтом (Engelbrecht), одновременно опубликовали работы по клонированию генов биолюминесценции из *Vibrio harveyi* и *Aliivibrio fischeri* в бактериальную клетку *Escherichia coli* [21]. С начала 1990-х годов это научное направление позволило изучать бактерии, которые реагируют на присутствие некоторых целевых материалов (металлов, органических и металлоорганических веществ) свечением за счет фермента люциферазы, обеспечивающего образование квантов света при окислении восстановленных соединений. Преимущество таких

микробных биосенсоров состоит в том, что удельные концентрации биодоступного загрязняющего вещества, находящегося в непосредственном контакте с микроорганизмом, можно определить дифференциально, в отличие от химического анализа, где определяют концентрацию загрязняющего вещества в целом. Таким образом, можно говорить о том, что в случае комплексного применения химических и биологических методов анализа результаты дополняют друг друга.

Создание микробных сенсоров явилось логическим продолжением разработки ферментных. Механизмы генерации аналитического сигнала в микробных и ферментных биосенсорах во многом аналогичны. В обоих случаях имеет место каталитическая реакция. Однако в ферментном биосенсоре в качестве биоматериала используется очищенный белковый препарат, а в микробном трансформация субстрата осуществляется ферментами, находящимися в составе клеток – в периплазме, в мембране или в цитоплазме [22–24].

Схема потоков веществ в микробной клетке в целом упрощенно изображена на рис. 2. Как видно, процессы клеточного метаболизма – это основа работы биосенсоров [25]. Определяемое соединение поступает в клетку и трансформируется в соответствии с наличием определенных ферментных систем, например, окисляется. В результате происходит поглощение кислорода и образуются продукты метаболизма. Значительное число биохимических реакций трансформации соединений микробными клетками сопровождается изменением внеклеточного pH (появление

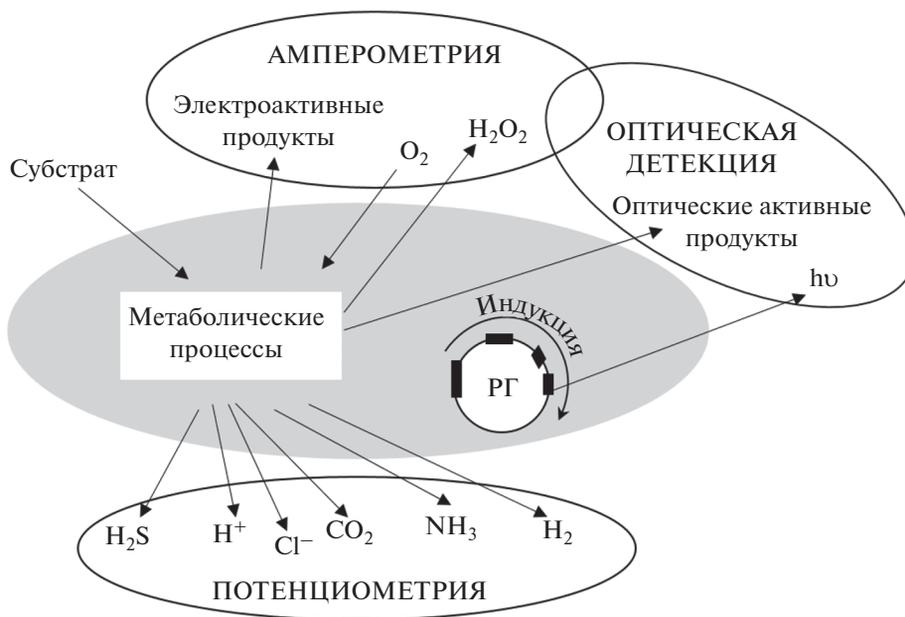


Рис. 2. Обобщенная модель потоков веществ в микробной клетке и возможные методы определения ее метаболизма (РГ — рецепторные гены).

кислого/щелочного продукта реакции и/или поддержание клетками рН-гомеостаза в процессе утилизации субстрата). Регистрация уровня кислорода в слое иммобилизованных клеток, ионного состава, редокс-потенциала являются эффективными индикаторами состояния метаболических систем клеток и основой для биосенсорного определения биологически активных соединений [26].

При анализе сложных образцов, содержащих несколько соединений, утилизируемых микроорганизмом, микробный биосенсор дает завышенные сигналы, поскольку в связи с наличием множества ферментов в микробной клетке они могут трансформировать одновременно несколько соединений образца и вносить свой вклад в генерацию сигнала, вызванного целевым соединением. Имеется также другая причина сниженной селективности. Различные метаболические пути утилизации субстрата в клетке могут быть источником побочных продуктов, регистрируемых преобразователем, что приводит к снижению селективности клеточного биосенсора [27]. В то же время реальные образцы пищи и воды могут содержать различные токсичные пестицидные остатки, и живые клетки, имеющие большое количество ферментов, могут быть использованы для определения общей токсичности образца [28].

Достоинства и недостатки микробных биосенсоров по сравнению с ферментными представлены в табл. 1. Можно утверждать, что клетка представляет собой наиболее комфортную среду для ферментов, поскольку они находятся в своем естественном состоянии и обладают наиболее

высокой стабильностью при функционировании в биосенсоре [23, 29].

Биосенсоры на основе микробных клеток имеют определенные недостатки. Два основных — это низкая скорость генерации аналитического сигнала и селективность. На поверхности микробного биосенсора биохимические реакции трансформации соединений протекают более медленно, поскольку субстраты прежде должны проникнуть в клетку через мембрану, кроме того, по такому же пути продукт реакции должен выйти из клетки. Это приводит к тому, что некоторые субстраты, в особенности макромолекулярные, не могут быть использованы для определения клеточными биосенсорами. Чтобы преодолеть этот недостаток, клетки могут быть, например, пермеабелизованы [30].

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК

Принципиальным вопросом при создании клеточных биосенсоров является метод иммобилизации клеток. Следует отметить особенность, связанную с иммобилизацией жизнеспособных и нежизнеспособных клеток (клеток с модифицированной жизнеспособностью). Принадлежность клеток к той или иной группе определяет требования к методу — условия реакции, в которых происходит иммобилизация, и применяемые реагенты должны быть безвредными для жизнеспособных клеток. Идеальной матрицей для иммобилизации клеток была бы матрица, которая функционировала бы при температуре окружаю-

Таблица 1. Достоинства и недостатки микробных биосенсоров по сравнению с ферментными

Достоинства	Недостатки
<p>Широкая субстратная специфичность микроорганизмов;</p> <p>Отсутствие трудоемких методик, таких как выделение, очистка, иммобилизация чистых ферментов;</p> <p>При нескольких стадиях окисления субстрата электрохимический сигнал целых клеток выше, чем в случае изолированного фермента;</p> <p>Некоторые ферменты теряют свою активность при выделении или иммобилизации, если эти процессы связаны с повреждением активного центра или с дезинтеграцией ферментного комплекса. При использовании целых клеток данная опасность сводится к минимуму;</p> <p>Ферменты в клетках находятся в своем естественном окружении, поэтому многие биосенсоры на основе клеток микроорганизмов характеризуются высокой стабильностью;</p> <p>В клетках присутствуют коферменты и активаторы биохимических процессов, вследствие чего нет необходимости в дополнительном внесении их в среду измерения;</p> <p>Многие микроорганизмы подробно охарактеризованы генетически;</p> <p>Использование мутаций позволяет дополнительно увеличить активность, селективность и специфичность микробного биосенсора;</p> <p>Для микробного биосенсора можно создавать условия, при которых происходит регенерация рецепторного элемента за счет роста; этот прием можно использовать для восстановления чувствительности биосенсора</p>	<p>Низкая скорость генерации аналитического сигнала;</p> <p>Низкая селективность;</p> <p>Высокая приспособляемость и изменчивость свойств;</p> <p>Проблема поддержания активности микроорганизмов неизменной в течение длительного времени</p>

шей среды, помогала сохранению высокой активности биоматериала, предотвращала вымывание клеток из матрицы и позволяла осуществляться притоку питательных веществ, кислорода и определяемых соединений через нее к клеткам, а также отводу полученных отходов от клетки и обеспечивала бы прохождение химического сигнала от клеток к преобразователю.

Первоначально для иммобилизации клеток с сохранением их активности использовали материалы природного происхождения: желатин, агар, альгинат кальция, каррагинан (табл. 2). В последние годы разработаны и развиты методы включения живых клеток в синтетические полимерные гели. Иммобилизирующие агенты могут быть загущены/желатинизированы в гидрофильные матрицы в мягких условиях, что позволяет захватывать клетки с минимальной потерей их жизнеспособности. Гелеобразование/загущение полисахаридов и белков обычно требует повышенной температуры и значения $pH < 7$ [22]. В то же время современные полимеры, например поли-2-гидроксиэтилметакрилат (pHEMA), могут образовывать матрицы для иммобилизации клеток при комнатной температуре и в нейтральной среде [31]. Перспективные результаты получены с использованием так называемого “метода криоиммобилизации клеток”. Процедура иммобили-

зации состоит из стадии получения суспензии клеток в растворе полимера, замораживания суспензии с получением криоструктурированных гелей, размораживания с образованием пористого, механически прочного материала, устойчивого до температур 70–80°C. Клетки, включенные в пористый материал такого типа, сохраняют активность и способны функционировать в течение нескольких месяцев [32].

Методы иммобилизации совершенствуются и изменяются в процессе создания новых вариантов биосенсоров [30, 33, 34]. Вместе с тем имеются некоторые классические методы, о которых следует кратко упомянуть. Они детально рассмотрены в работах [35, 36]. Иммобилизация может быть активной и пассивной. Способность микроорганизмов естественным образом “приклеиваться” к различным поверхностям и расти на них может быть использована для пассивного способа иммобилизации на поверхностях. С другой стороны, активная иммобилизация включает использование химических и физических способов фиксации и удерживания клеток [26]. Выбор наиболее эффективного способа иммобилизации определяется предполагаемым методом анализа и типом клеток [37]. В арсенал методов иммобилизации микроорганизмов входят практически те же самые подходы, которые применяются для

Таблица 2. Подложки и матрицы, используемые для иммобилизации клеток

Матрица	Класс соединений	Источник
Натуральные полимеры		
Альгинат	Соли альгиновой кислоты – альгинаты кальция или магния	Клеточные стенки водорослей
Хитозан	Аминосахар, производное линейного полисахарида	Панцири ракообразных
Хитин	Природное соединение из группы азотсодержащих полисахаридов	Панцири промысловых ракообразных
Коллаген	Белок, составляющий основу соединительной ткани многоклеточного организма	Соединительная ткань (кожа, кости) домашних и морских животных (крупный и мелкий скот, птица, рыба)
Каррагинан	Полисахарид, по составу и свойствам близкий к агару	Красные морские водоросли
Желатин	Частично гидролизованный коллаген, способный хорошо удерживать воду	Продукт переработки (денатурации) соединительной ткани животных (коллагена)
Целлюлоза	Полисахарид, главная составная часть клеточных оболочек всех высших растений. Самая дешевая доступная подложка	Варка щепы на целлюлозных заводах
Крахмал	Полисахариды амилоза и амилопектин, мономером которых является альфа-глюкоза, способные хорошо удерживать воду	Чаще всего получают из картофеля
Пектин	Полисахариды, образованные остатками главным образом галактуроновой кислоты, способные хорошо удерживать воду	Экстрагируют из растительного сырья (выжимки цитрусовых и яблок, жом сахарной свеклы и сердцевины корзинок подсолнечника)
Синтетические полимеры		
Диэтиламиноэтил-целлюлоза	Являются ионообменными смолами, нерастворимыми носителями с пористой поверхностью;	Химический синтез
Поливинилхлорид	пористая поверхность ловит и удерживает клетки	
Полиэтиленгликоль		
Поли(2-гидроксиэтил метакрилат)		
Неорганические материалы		
Цеолиты	Силикаты	Добыча полезных ископаемых на различных месторождениях
Керамика	Глина	
Кизельгур (торговое название целлит)	Осадочная горная порода, состоящая преимущественно из останков диатомовых водорослей	
Кремнезем	Полиморфные модификации диоксида кремния	
Стекло	Главная составная часть – диоксид кремния	Спекание различных солей металлов
Активированный уголь	Аморфный углерод без четкой структуры, практически лишенный примесей, пористое вещество, обладающее высокой адсорбционной способностью	Различные углеродосодержащие материалы органического происхождения
Древесный уголь	Микропористый высокоуглеродистый продукт	Образуется при пиролизе древесины без доступа воздуха

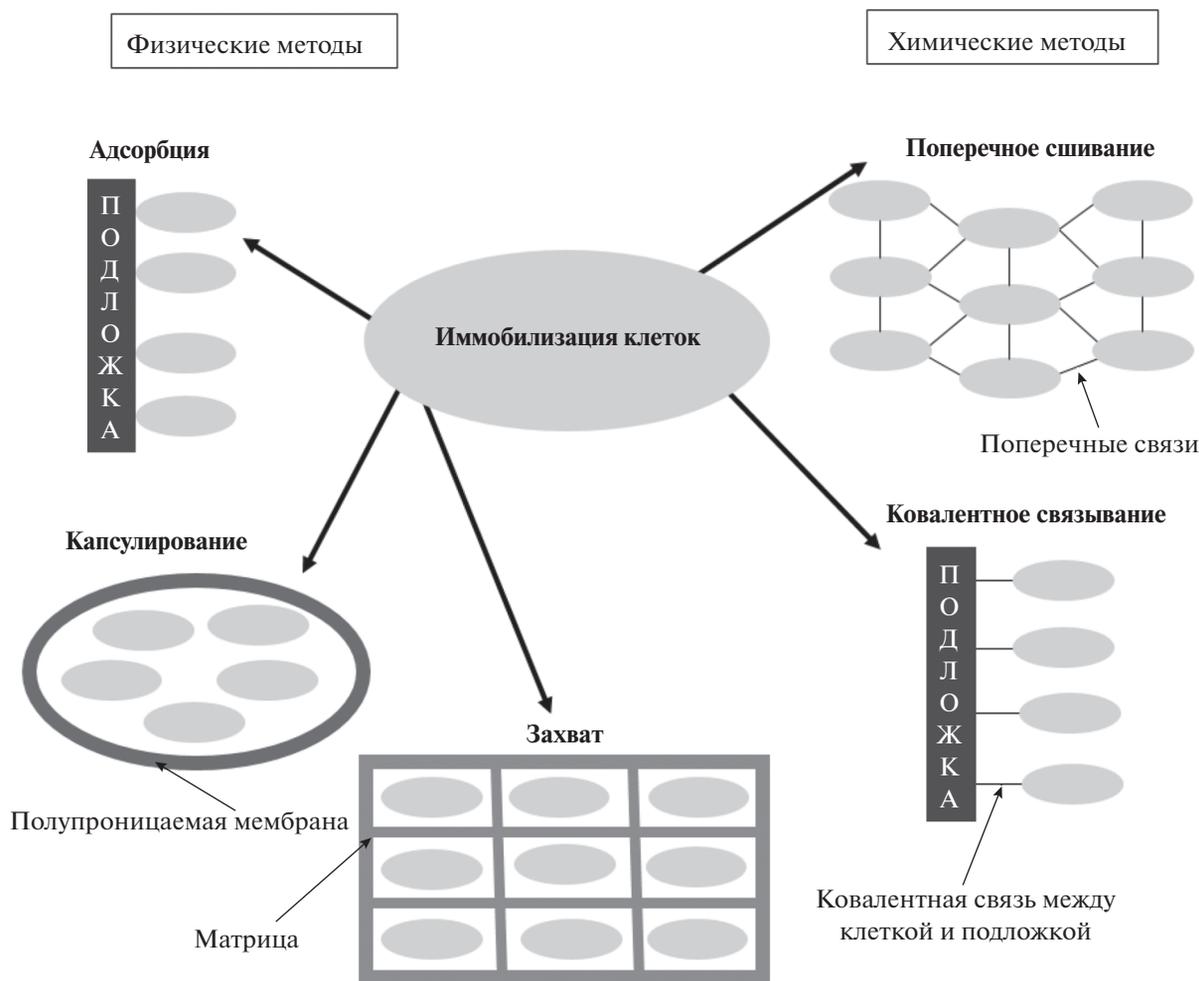


Рис. 3. Схематическое изображение основных методов иммобилизации клеток.

иммобилизации ферментов (белков) [38]. Схематически основные методы иммобилизации представлены на рис. 3.

Следует отметить, что в настоящее время поиск эффективных методов получения биорецепторных мембран направлен не столько на создание новых, сколько на модифицирование существующих методов иммобилизации [39]. Данные последних лет по иммобилизации микроорганизмов в альгинатные гели, полиуретановую пену, а также по использованию для иммобилизации металлов переходной группы представлены в книге [38]. Сравнивая различные методы иммобилизации – адсорбцию и включение в гели, становится ясно, что для создания аналитических систем с высокой стабильностью функционирования и возможностью длительного хранения предпочтительнее следует отдать методу включения в гели; перспективным является также применение полимеров латексного типа на основе акриловых и метакриловых кислот [30, 33].

ТИПЫ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ, ПАРАМЕТРЫ. ОСОБЕННОСТИ КАЖДОГО ТИПА БИОСЕНСОРОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПЕСТИЦИДОВ

Для создания клеточных биосенсоров, так же, как и для любых других биосенсоров, используют различные физические преобразователи: электрохимические, включая амперометрические (детекторы кислорода, пероксида водорода), потенциометрические (рН-чувствительные и ионселективные электроды, рН-чувствительные полевые транзисторы), кондуктометрические; оптические; акустические; калориметрические. При создании микробных биосенсоров можно использовать амперометрические преобразователи сигналов, основанные на измерении переноса электронов или на потреблении кислорода в процессе биотрансформации пестицидов клетками; потенциометрические, основанные на измерении количества образующихся протонов; оптические, основанные на измерении светопоглощения продукта биотрансформа-

ции пестицида клетками при определенной длине волны [24]. Таким образом, в зависимости от целей исследования, вида пестицида и продукта его трансформации клетками в процессе жизнедеятельности можно использовать практически любой преобразователь сигнала микробного биосенсора для получения информации о наличии и количестве в среде загрязняющего агента (рис. 2).

Биосенсоры электрохимического типа. *Амперометрия* является наиболее распространенным электрохимическим режимом, используемым в биосенсорах на основе целых клеток. Этот режим позволяет обнаруживать потребление кислорода или его выделение в процессе дыхания/фотосинтеза, потребление или производство определенных соединений в процессе метаболизма определяемого соединения или индукции активности специфического фермента у генетически модифицированных микроорганизмов [36, 40]. Различные штаммы микроорганизмов, демонстрирующие широкий спектр субстратной специфичности, в основном используют для определения биологического потребления кислорода (БПК), индекса количества разлагаемых органических соединений, присутствующих в образце [41, 42].

Биосенсоры для определения пестицидов создают путем иммобилизации бактерий, разлагающих именно эти группы загрязнителей как на классическом кислородном (типа Кларка), так и на других типах электродов — графитовом угольном или графитовом пастовом электродах, а также на углеродных электродах, полученных трафаретной печатью (табл. 3). Например, деградация такого пестицида, как *n*-нитрофенол клетками *Pseudomonas putida* происходит с потреблением кислорода, в связи с чем кислородный электрод типа Кларка использовали для регистрации изменения концентрации кислорода в процессе биодеградации *n*-нитрофенола [43, 46]. В работе [56] сообщается об использовании *E. coli* в амперометрическом биосенсоре. Токсичность пестицидов измеряли по их влиянию на метаболическую активность микроорганизмов, о которой судили по дыханию. Но для определения дыхания использовали не кислородный электрод, а золотой. Опосредованным показателем изменения дыхания микроорганизма служил медиатор феррицианид — количество окисленного медиатора соответствовало количеству внесенного токсичного реагента. Отношение амплитуд электрохимических сигналов, зарегистрированных в присутствии и в отсутствие токсина, позволило получить индекс ингибирования. Авторы исследовали три пестицида и показали, что наиболее сильным токсикантом оказался эндосульфат, а наиболее слабым — фенамифос (значения IC_{50} составили 6.5 мг/л для аметрина, 22 мг/л для фенамифоса и 5.7 мг/л для эндосульфата). Таким образом, при-

менение биосенсоров позволяет судить не только о наличии и количестве вещества, но и о степени токсичности отдельных пестицидов.

В работе [55] для создания электрохимического сенсора на основе *E. coli* использовали углеродную подложку из шелкового волокна в качестве электрода. Шелк является природным белковым волокном и содержит различные функциональные группы, например карбонильные, аминокислотные и т.д., которые могут действовать как электростатический якорь для осаждения отрицательно заряженных гибридных наноматериалов. Для иммобилизации клеток использовали волокно, модифицированное гибридными наноматериалами, содержащими золото и платину. Такая матрица обеспечивала биосовместимую среду для бактерий и обладала высокой проводимостью и электрокаталитической активностью, что позволило получить биосенсор с высокой чувствительностью (0.09 мг/л) к фенамифосу.

Применение генетически модифицированных организмов расширяет возможности биосенсоров. Так, использование генетически модифицированного штамма *E. coli* с поверхностно-экспрессированной органофосфатгидролазой (ОФН) позволило обнаруживать *n*-нитрофенилзамещенные фосфорорганические соединения (ФОС) с помощью стеклоуглеродного электрода [51]. Пределы определения пестицидов этим биосенсором составили (нМ): 9.0 для параоксона, 10 для паратиона и 15 для метилпаратиона.

Особое место среди амперометрических биосенсоров занимают биосенсоры, основанные на контроле процессов фотосинтеза. В качестве распознающего элемента в таких биосенсорах используют различные типы фотосинтезирующих объектов: целые клетки (например, микроводоросли), хлоропласты или тилакоиды и фотосистему II (ФС II) [58]. Последняя является супрамолекулярным комплексом пигмент—белок, локализованным в мембране тилакоидов. Она катализирует светиндуцированный перенос электронов из воды к пластохинону, в процессе чего выделяется кислород. Измерение выделения кислорода с помощью электрода Кларка является стандартной процедурой для определения фотосинтетической деятельности [59–61]. Имеются схемы регистрации процесса фотосинтеза, в которых не используют электрод Кларка. Для реализации биосенсоров данного вида одноклеточные микроводоросли *Chlorella vulgaris* иммобилизовали, например, на поверхности электрода, содержащего оксиды индия и олова [57]. Для иммобилизации использовали комплекс полиэлектролитов — полилизин в качестве поликатиона и полистиролсульфонат в качестве полианиона. Добавление пестицидов (атразин, диурон) в систему приводило к ингибированию про-

Таблица 3. Микробные биосенсоры для определения пестицидов

Тип преобразователя/ электрод	Микроорганизм	Определяемое вещество	Класс пестицида, основные химические группы	Предел(ы) определения	Литература
Амперометрические					
Кислородный электрод	<i>Pseudomonas putida</i> JS444	Параоксон	Инсектициды группы органических тиофосфатов с фенильными радикалами	55 ppb	[43]
		Метилпаратион		53 ppb	
		Паратион		58 ppb	
Кислородный электрод	<i>Moraxella</i> sp.	Параоксон		0.1 мкМ	[44]
Кислородный электрод	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>n</i> -Нитрофенол	Фунгицид, класс фенолов	10–50 мкМ	[45]
Кислородный электрод	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>n</i> -Нитрофенол		10 мкМ	[46]
Углеродный электрод	<i>Moraxella</i> sp.	<i>n</i> -Нитрофенол		20 нМ	[47]
Углеродный электрод	<i>Pseudomonas putida</i> JS444	Параоксон	Инсектициды группы органических тиофосфатов с фенильными радикалами	0.28 ppb	[48]
		Метилпаратион		0.26 ppb	
		Паратион		0.29 ppb	
Углеродный электрод	<i>Arthrobacter</i> sp. JS443	Параоксон		10 нМ	[49]
		Метилпаратион		20 нМ	
Углеродный электрод	<i>Pseudomonas putida</i> JS444	Фенилтротион		1.4 ppb	[50]
		ЭПН		1.6 ppb	
		Параоксон		9 нМ	
Стеклоуглеродный электрод	<i>Escherichia coli</i>	Паратион		10 нМ	[51]
		Метилпаратион		15 нМ	
		Атразин	Гербициды класса хлортриазинов	0.9–74 мкМ	
Пропазин	0.6–120 мкМ				
Матричные электроды	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Метилпаратион	Инсектицид группы органических тиофосфатов с фенильными радикалами	2–80 мкМ	[53]
		Линдан		Инсектицид, алициклические хлоруглеводороды	
Углеродная волокнистая подложка, модифицированная наночастицами	<i>Escherichia coli</i>	Фенамифос	Инсектицид группы фосфорамидатов	0.09 мг/л	[55]

Таблица 3. Продолжение

Тип преобразователя/электрод	Микроорганизм	Определяемое вещество	Класс пестицида, основные химические группы	Предел(ы) определения	Литература
Платиновый электрод	<i>Escherichia coli</i>	Аметрин	Гербицид, метилтриазины	6.5 мг/л	[56]
		Фенамифос	Инсектицид группы фосфорамидатов	22 мг/л	
		Эндосульфан	Инсектицид группы циклодиенов	5.7 мг/л	
Прозрачный электрод, содержащий оксиды индия и олова	<i>Chlorella vulgaris</i>	Агразин	Гербицид из класса хлортриазинов	2 мкМ/л	[57]
		Диурон	Гербицид группы фенил мочевины	0.05 мкМ/л	
Потенциометрические					
pH-электрод	Рекомбинантный штамм <i>E. coli</i>	Параоксон	Инсектициды группы органических тиофосфатов с фенильными радикалами	0.001–1.0 мМ	[62]
pH-электрод	<i>Flavobacterium</i> sp.	Параоксон		0.01–0.47 мМ	[63]
pH-электрод	Рекомбинантный штамм <i>E. coli</i>	Параоксон, паратион, метилпаратион, диазинон		3 мкМ	[64]
pH-электрод	<i>Escherichia coli</i>	Параоксон, паратион, метилпаратион, диазинон		2 мкМ	[65]
pH-электрод	<i>Lentinus sajor-caju</i>	Перметрин	Инсектицид группы сложных эфиров хризантемовой кислоты	1–100 мкМ	[66]
Хлорид-ион селективный электрод	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J1104	Трихлорэтилен	Промежуточный химический продукт или сырье в производстве пестицидов	0.03–2 мг/л	[67]
Кондуктометрические					
Платиновый рабочий электрод	<i>Rhodococcus ruber</i>	Акрилонитрил	Инсектицид группы фумигантов, цианистые соединения	2–50 мМ	[73]
Золотые встречноштыревые тонкопленочные электроды	<i>Pseudomonas putida F1</i>	Трихлорэтилен	Промежуточный химический продукт или сырье в производстве пестицидов	0.07–100 мкМ	[74]

Таблица 3. Продолжение

Тип преобразователя/электрод	Микроорганизм	Определяемое вещество	Класс пестицида, основные химические группы	Предел(ы) определения	Литература
Платиновые встречно-штыревые электроды	<i>Chlorella vulgaris</i>	Метилпараоксон	инсектицид группы органических тиофосфатов с фенольными радикалами	10 ppb	[75]
Импедансные					
Электроды из нержавеющей стали	Споры <i>Streptomyces</i>	Линдан	Инсектицид, алициклические хлоруглеводороды	120 мкг/л	[78]
Электроды из нержавеющей стали	<i>Streptomyces</i>	Хлорорганические пестициды	Инсектициды, фунгициды, хлорированные углеводороды	–	[79]
Золотые микроэлектроды	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Трихлорэтилен	Промежуточный химический продукт или сырье в производстве пестицидов	20 мкг/л	[80]
Оптические					
Флуоресцентный	<i>Escherichia coli</i>	Фениларсенит Метиларсенит	Инсектициды, содержащие мышьяк	10 ⁻⁷ М 5 × 10 ⁻⁶ М	[85]
Флуоресцентный	<i>Escherichia coli</i> DH5α pRSET::roGFP2	Нафталин	Инсектициды группы фумигантов, алифатические углеводороды, бензольные соединения	1 × 10 ⁻⁴ ppm	[86]
Флуоресцентный	<i>Escherichia coli</i> BL21	Парооксон	Инсектициды группы органических тиофосфатов с фенольными радикалами	5–320 мкМ	[87]
Флуоресцентный	<i>Anabaena torulosa</i>	2,4-Д Хлорпирифос	Гербицид из группы синтетических ауксинов, арилоксиалканкарбоновые кислоты	0.05 мкг/л 0.01 мкг/л	[31]
Флуоресцентный	<i>Dictyosphaerium chlorellaoides</i> , <i>Scenedesmus intermedius</i> и <i>Scenedesmus</i> sp.	Симазин	Гербициды класса хлортриазинов	3.6 мкг/л	[88]
Флуоресцентный	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> и <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Атразин		0.1 мкМ	[89]

Таблица 3. Окончание

Тип преобразователя/ электрод	Микроорганизм	Определяемое вещество	Класс пестицида, основные химические группы	Предел(ы) определения	Литература
Флуоресцентный	<i>Escherichia coli</i>	Арсенит	Инсектицид, содержащий мышьяк	1.0×10^{-3} мг/л	[90]
		Селенит	Гербицид группы циклогександионов	1.0×10^{-5} мг/л	
Флуоресцентный	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	N-Оксид 4-нитрохино- лина	Гербицид группы хинолинкарбоновых кислот	0.12 нг/мл	[91]
Флуоресцентный	<i>Chlorella vulgaris</i>	Диурон	Гербицид группы фенилмочевин	1 мкг/л	[92]
Флуоресцентный	<i>Chlorella vulgaris</i>	Атразин	Гербицид класса хлортриазинов	0.25 мкг/л	[93]
Флуоресцентный	<i>Sphingomonas</i> sp.	Метилпараион	Инсектицид группы органиче- ских тиофосфатов с фениль- ными радикалами	4–80 мМ	[94]
Спектрофотометриче- ский	<i>Pseudomonas</i> sp.	2,4,4'-Трихлорбифенил	Гербицид группы дифенилового эфира	0.2 мг/л	[95]
Люминесцентный	<i>Escherichia coli</i>	Метилвиологен (паракват)	Гербицид группы четвертич- ных аммониевых соединений	0.6 ppm	[96]
Люминесцентный	<i>Vibrio fischeri</i>	2,3,5,6-Тетрахлорфенол	Фунгицид, хлорированные ароматические углеводороды	4–30 мг/л	[97]
Люминесцентный	<i>Escherichia coli</i>	Атразин	Гербицид класса хлортриазинов	1.08–15 мкМ	[98]
Люминесцентный	<i>Synecocystis</i> sp.	3,5-Дихлорфенол	Антисептик, хлорированные ароматические углеводороды	23.39 мг/л	[99]
Люминесцентный	<i>Escherichia coli</i>	Паракват	Гербицид группы четвертич- ных аммониевых соединений	10^{-6} М	[100]
		Пентахлорфенол	Хлорорганический инсектицид, гербицид	15 мкг/мл	

Обозначения: ЭПН – этил-*n*-нитрофенолтиобензолфосфонат; 2,4-Д – дихлорфеноксиуксусная кислота.

цесса фотосинтеза, что отражалось на сигнале биосенсора (уменьшение тока восстановления кислорода). Показано, что по сравнению с обычным электродом Кларка предложенный датчик обладает рядом преимуществ: меньший размер, экономичность, меньшая продолжительность анализа (меньше 200 с).

Потенциометрические микробные биосенсоры разрабатывают с использованием ионселективных (чувствительных к изменению рН, аммоний, хлорид-ионам) или газочувствительных электродов (CO_2 , NH_3). Усвоение субстратов иммобилизованными микробами вызывает изменения потенциала из-за накопления или истощения соответствующих ионов [19, 22, 26]. Потенциометрические датчики измеряют разность потенциалов между рабочим электродом с иммобилизованным микроорганизмом и электродом сравнения, которая коррелирует с концентрацией определяемого соединения. Из-за логарифмической взаимосвязи между генерацией потенциала и концентрацией пестицида возможен широкий концентрационный диапазон их определения. Однако этот метод требует высокой электрохимической стабильности измерительных электродов. Кроме того, важной особенностью биосенсоров на основе ионселективных электродов, таких как рН-электроды, является сильная зависимость их отклика от буферной емкости образца и от его ионной силы [26, 40]. Микробных потенциометрических биосенсоров для определения пестицидов известно очень мало (табл. 3), в основном в потенциометрических биосенсорах используют ферменты [68], особенно ацетилхолинэстеразу и бутирилхолинэстеразу, которые ингибируются под действием ФОС [69, 70].

Потенциометрический биосенсор для обнаружения параоксона, представленный в работе [62], содержал криоиммобилизованные на стеклянном рН-электроде рекомбинантные клетки *E. coli*. Ферментативный гидролиз ФОС под действием фермента ОРН, содержащегося в клетках, приводил к расщеплению связей Р–О, Р–F, Р–S или Р–CN и появлению в среде протонов, количество которых соответствовало количеству гидролизованного ФОС, что и явилось основой создания потенциометрического биосенсора.

В работе [67] штамм бактерии *P. aeruginosa*, разлагающей хлорсодержащие соединения, использовали в биосенсоре для обнаружения трихлорэтилена. В 1997 г. практически повсеместно был введен запрет на использование трихлорэтилена в производстве, в том числе пестицидов, но его остатки все еще обнаруживаются в окружающей среде. В результате его деградации появляются ионы хлора, которые определяли с помощью соответствующего хлоридселективного электрода. Сигналы датчика прямо пропорцио-

нальны концентрации трихлорэтилена в диапазоне 0.03–2 мг/л.

Действие *кондуктометрических биосенсоров* основано на измерении электропроводности растворов. В результате ферментативной реакции ионная сила и, следовательно, проводимость раствора между двумя электродами изменяется. Таким образом, кондуктометрические устройства могут быть использованы для изучения ферментативных реакций, которые приводят к изменениям концентрации заряженных частиц в растворе [71]. Такие биосенсоры широко применяют для экологического мониторинга [72], в том числе и для определения пестицидов (табл. 3). Кондуктометрический биосенсор [73] для определения акрилонитрила в растворе основан на целых клетках *Rhodococcus ruber* NCIMB 40757, которые были иммобилизованы на диск из диметилсилоновой губки. При контакте с раствором акрилонитрила фермент нитрилаза, присутствующий в клетках, переводит неионный акрилонитрил в ион акрилата аммония с положительным зарядом, что приводит к пропорциональному увеличению проводимости и отражается на сигнале биосенсора. Биосенсор сохранял стабильность в течение, по меньшей мере, пяти дней; зависимость сигнала от концентрации определяемого соединения линейна в диапазоне от 2 до 50 мМ акрилонитрила.

Для создания кондуктометрических биосенсоров широко используют планктонные водоросли, например *Chlorella vulgaris* [75–77]. Кондуктометрический биосенсор с использованием иммобилизованных *C. vulgaris* в качестве биорецептора описан в работе [75]. Водоросли иммобилизовали в матрицу из бычьего сывороточного альбумина, выдержанную в парах глутарового альдегида. Измеряли локальные изменения проводимости, обусловленные активностью щелочной фосфатазы и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) водорослей. Эти два фермента, как известно, ингибируются в присутствии различных токсичных соединений: тяжелых металлов (щелочная фосфатаза), карбаматов и фосфорорганических пестицидов.

В последние 10–15 лет активно развивается метод *электрохимической импедансной спектроскопии*. С помощью этого метода изучают процессы переноса заряда, возникающие на поверхности электрод/электролит [36]. В случае биосенсоров измерения проводят с использованием трех электродов – рабочего, модифицированного биорецептором, электрода сравнения и вспомогательного электрода. Синусоидальное напряжение малой амплитуды прикладывают между электродом сравнения и рабочим электродом и измеряют результирующий ток, возникающий между рабочим и вспомогательным электродами. Приложенное напряжение по отношению к измерен-

ному току определяет импеданс системы. Импедиметрические данные могут быть описаны эквивалентной электрической схемой, из которой можно вывести электрические параметры, определяющие процессы переноса заряда. Микробные биосенсоры, основанные на таком принципе, применяют и для определения пестицидов (табл. 3). В работе [80] предложен импедиметрический клеточный биосенсор для определения трихлорэтилена. Биосенсор готовили путем иммобилизации бактерии *P. putida F1* на поверхности золотых микроэлектродов, функционализированных одностенными углеродными нанотрубками, ковалентно связанными с антителами против *Pseudomonas*. Сигналы биосенсора линейны в диапазоне концентраций трихлорэтилена 0.07–100 мкМ. Биосенсор использовали для исследования образцов природных вод.

Биосенсоры оптического типа. Оптические биосенсоры основаны на изменении оптических свойств клетки (УФ- и видимое поглощение, биофлуоресценция, отражение, флуоресценция) в результате взаимодействия с соединениями, присутствующими в образце. Большинство оптических биосенсоров основано на явлениях биолюминесценции или флуоресценции. Широко известны так называемые “light-off” системы измерения уменьшения клеточного светового излучения после воздействия загрязняющего вещества [81], которые используют в основном для оценки общей токсичности воды. Конкретные соединения или их группы выявляют с помощью биосенсоров типа “light-on”, где взаимодействие приводит к увеличению светового сигнала пропорционально концентрации определяемого вещества. “Light-on” микроорганизмы встречаются в природе, а также могут быть получены с помощью генной инженерии. Наиболее часто используют так называемые “lux ген”, кодирующий люминесцентную люциферазу, и “gfp ген”, кодирующий зеленый флуоресцентный белок [26]. Указанный подход реализован в методиках, включающих разнообразные изученные промоторы, которые доступны для генетических манипуляций и могут быть использованы для создания новых микроорганизмов, способных чувствовать различные классы загрязняющих веществ, в том числе и пестициды.

Оптические микробные биосенсоры позволяют определять такие загрязнители, как фенолы и тяжелые металлы [15, 36]. Известно относительно немного оптических микробных биосенсоров для определения пестицидов [82–84], но значительно больше, чем микробных биосенсоров, основанных на других типах преобразователей (табл. 3). Описан [101] одноразовый колориметрический микробный биосенсор для определения пестицида метилпаратиона. Целые клетки *Flavobacterium* sp. иммобилизовали на фильтре из стекловолокна. Клетки *Flavobac-*

terium sp. содержат ОРН, которая гидролизует метилпаратион в *n*-нитрофенол. Это – окрашенный продукт, который определяют, измеряя интенсивность светопоглощения при 410 нм. На этом же принципе (метилпаратион гидролизует в электрохимически или колориметрически обнаруживаемый продукт *n*-нитрофенол под действием ОРН) основан оптический микробный (*Sphingomonas* sp.) биосенсор для определения метилпаратиона [94].

Последние достижения в области генной инженерии открывают новые перспективы в области микробных биосенсоров. Примером является использование люциферазных генов *lux* из морской бактерии *Vibrio fischeri* и *lux* из светлячка *Photinus pyralis*. Эти гены выбраны потому, что существует корреляция между светоотдачей и метаболической активностью клетки, в результате чего биолюминесценция является быстрым индикатором здоровья клеток. Измерение биолюминесценции в ответ на воздействие определяемых соединений может быть использовано для оценки наличия различных загрязняющих веществ в режиме реального времени [102]. В работе [99] сообщается о создании биосенсора на основе цианобактерий *Synechocystis* sp. штамма PCC6803, меченных геном люциферазы *lux* из светлячка, для обнаружения широкого спектра гербицидов и загрязняющих веществ других классов, включая тяжелые металлы и летучие органические загрязняющие вещества. Цианобактерии являются необычными среди прокариотов из-за наличия двух различных мембранных систем: внутриклеточной тилакоидной мембраны, в которой происходят светозависимые реакции фотосинтеза, и более традиционной системы эубактериальной цитоплазматической мембраны, окружающей клетку. Для таких систем получены полезные аналитические сигналы и оценена токсичность следующих гербицидов: диурон, паракват, мекопроп, глифосат, атразин, пропазин, симазин. Различные типы гербицидов показали различную скорость ингибирования биолюминесценции, поэтому биосенсор может быть использован для выяснения типа гербицида и, возможно, потенциального способа действия. Такой биосенсор предоставляет новые возможности для быстрого скрининга проб из окружающей среды или для оценки возможного ущерба окружающей среде.

Оптические биосенсоры для контроля фотосинтеза основаны на флуоресценции, индуцированной хлорофиллом *a*. Гербициды ингибируют поток электронов путем блокирования сайтов связывания хинона ФС II, вызывая увеличение флуоресценции хлорофилла [103]. Этот принцип положен в основу гербицидных биосенсоров, измеряющих флуоресценцию хлорофилла водорослей при длине волны 682 нм (длина волны возбуждающего света 469 нм) [93, 104].

Комбинированные (гибридные) биосенсоры. К гибридным относятся биосенсоры, у которых в биорецепторе содержатся два или более биокатализатора различного типа. Например, биосенсоры, содержащие комбинацию “клетки-ферменты”. Оба биоматериала должны катализировать сопряженные реакции. Например, фермент трансформирует определяемое соединение в субстрат, метаболизируемый клеткой, или наоборот, продукт клеточного метаболизма является субстратом для фермента, который после ферментативной реакции регистрируется преобразователем как окончательный продукт сопряженной реакции.

Основным преимуществом гибридных биосенсоров является повышенная селективность анализа и возможность определять соединения, которые невозможно определить однокомпонентными биосенсорами. Трудоемкость разработки и эксплуатации гибридных биосенсоров выше, чем биосенсоров, содержащих один тип биоматериала. Возможно, это объясняет тот факт, что к настоящему времени описано относительно небольшое число гибридных сенсоров, включающих клетки микроорганизмов.

В работе [105] представлен электрохимический биосенсор для определения следовых количеств фосфорорганических пестицидов. Этот биосенсор объединяет гибридный биораспознающий элемент, состоящий из иммобилизованных *Arthrobacter globiformis* и свободной АХЭ с амперометрическим преобразователем – электродом Кларка. Бактерии превращают генерируемый АХЭ холин в бетаин с потреблением кислорода, уровень которого измеряется электродом Кларка. Изменение уровня кислорода, представляющего ответ датчика, коррелирует с концентрацией фосфорорганических пестицидов, ингибирующих фермент АХЭ, который катализует гидролиз ацетилхолина в холин. Предлагаемый подход сочетает преимущество бактериальных и ферментных датчиков: высокую чувствительность, воспроизводимые характеристики, долговременную стабильность при температуре окружающей среды из-за сохранения ферментной системы бактерий в своей естественной среде. Биосенсор можно использовать для определения как общей токсичности, так и концентрации отдельных фосфорорганических соединений. Подобная система описана в работе [49], где на углеродном электроде иммобилизованы фермент ОРН, который осуществляет гидролиз пестицидов параоксона и метилпаратиона, и бактерии *Arthrobacter* sp. J443, окисляющие выделяемый в результате гидролиза *n*-нитрофенол до диоксида углерода через электроактивные промежуточные продукты 4-нитрокатахин и 1,2,4-бензолтриол. Ток окисления промежуточных продуктов коррелирует с концентрацией ФОС, его определяют амперометрическим методом.

В работе [106] авторы объединили на одной биочувствительной площадке амперометрический и оптический преобразователи, а также несколько генетически модифицированных штаммов водорослей, обладающих различной степенью чувствительности и устойчивости к пестицидам. Комбинируя амперометрические и оптические сигналы можно определить общую токсичность образца, оценить ингибирование активности использованных микроорганизмов, а также определить концентрацию гербицида, присутствующего в образце. Система позволила обнаруживать различные подклассы пестицидов в диапазоне от 0.1 до 10 нМ. Она может быть полезным инструментом для предварительного скрининга питьевой воды на содержание пестицидов.

Циануровую кислоту и атразин можно обнаружить, используя одновременно несколько штаммов микроорганизмов. Путь биodeградации атразина кодируется через гены *atz* и их можно разделить на две группы: (I) конститутивные *atzA*, *atzB* и *atzC* гены, ответственные за деградацию атразина в циануровую кислоту и (II) индуцибельный *atzDEF* оперон, что приводит к минерализации циануровой кислоты в NH_3 и CO_2 [103]. Гены деградации атразина в циануровую кислоту являются конститутивно экспрессированными; их промоторы не могут быть использованы в качестве биорецептора. Таким образом, биоопределение атразина возможно только после его первоначальной биodeградации в циануровую кислоту. В работе [100] разработана двухэтапная стратегия, состоящая в применении двух взаимодополняющих штаммов *E. coli*: один служил для обнаружения только циануровой кислоты, в то время как второй был предназначен для определения атразина после его биodeградации в циануровую кислоту. Содержание загрязняющих веществ определяли путем измерения люминесценции. Диапазон определяемых концентраций циануровой кислоты составил 0.22–15 мкМ (по рекомендации ВОЗ ПДК данного соединения равно 0.5 мг/см³), а атразина 1.08–15 мкМ.

ПЕРСПЕКТИВЫ НОВЫХ РАЗРАБОТОК

Таким образом, микробные биосенсоры занимают особое место среди других видов биосенсоров. Во многом свойства микробных биосенсоров аналогичны свойствам ферментных. В первую очередь это относится к диапазонам определяемых соединений, которые не могут значительно отличаться для ферментных и микробных биосенсоров, так как в конечном итоге они обусловлены величиной константы Михаэлиса иммобилизованного биоматериала. В связи с этим для большинства микробных биосенсоров диапазон определяемых содержаний лежит в пределах 10^{-6} – 10^{-2} М. Микробные биосенсоры менее

селективны, так как содержат набор ферментов. Вместе с тем данное свойство может быть эффективно использовано для оценки общей токсичности окружающей среды.

Одним из недостатков микробных биосенсоров является увеличенное по сравнению с ферментными время отклика и, следовательно, длительность анализа, а также низкая селективность. Эти проблемы, особенно низкая селективность, можно преодолеть с помощью молекулярных рекомбинантных методов, которые все чаще используют для улучшения ферментных свойств, или введением новых ферментов в клетки, а также применяя системы многоканального определения и математические методы обработки сигнала с выделением из общего отклика сигнал на конкретное вещество.

В настоящее время при конструировании микробных биосенсоров для определения пестицидов в качестве преобразователей в основном используют электрод Кларка, позволяющий измерять клеточное дыхание, и преобразователи оптического типа для измерения биолюминесценции.

На сегодня по числу промышленно выпускаемых биосенсоров анализаторы на основе микробных клеток уступают ферментным. Основная масса микробных коммерческих биосенсоров находит применение в экологическом мониторинге, в частности, в оценке индекса БПК [107–109].

Существенное повышение селективности микробных биосенсоров в отношении некоторых соединений или их классов достигнуто при модификации микроорганизмов генами биолюминесценции. Данный подход обеспечил повышение селективности и чувствительности и позволил значительно понизить пределы определения соединения.

Разработанные к настоящему времени микробные биосенсоры на фосфорорганические пестициды содержат ОРН дикого типа. Использование генномодифицированных микроорганизмов, получение ОРН с помощью сайт-направленного мутагенеза и направленной эволюции повышают скорость гидролиза параоксона, метилпаратиона и хлорпирифоса и позволяют добиться более высокой чувствительности в отношении этих веществ [110].

Интеграция в биосенсоры наноматериалов (например, нанотрубок) [46, 74, 80], а также использование эффективных медиаторов позволяют обнаруживать различные классы пестицидов с помощью электрохимических устройств с чувствительностью, близкой к чувствительности химических методов анализа [111].

При рационально выбранной схеме анализа и типе определяемого соединения микробные биосенсоры могут представлять оптимальное реше-

ние аналитической задачи и являться методическим дополнением к сенсорам, основанным на биологических материалах другого типа. Например, для определения фосфорорганических соединений экономически более выгодно использование микробных биосенсоров, поскольку удается отказаться от трудоемких процессов производства и очистки фермента. Кроме того, таким образом изготовитель значительно понижает стоимость конечного анализатора.

Во многом успех широкого использования микробных сенсоров будет связан с разработкой высокотехнологичных и простых методов иммобилизации микроорганизмов на поверхности преобразователей, обеспечивающих максимальный уровень жизнеспособности и стабильности клеток.

Анализ свойств цельноклеточных сенсоров показал, что перечисленные выше достоинства и недостатки микробных биосенсоров являются движущей силой для дальнейшего их развития, исследований по совершенствованию их аналитических параметров и поиску новых способов повышения селективности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Badihi-Mossberg M., Buchner V., Rishpon J.* Electrochemical biosensors for pollutants in the environment // *Electroanalysis*. 2007. V. 19. № 19–20. P. 2015.
2. *Van Dorst B., Mehta J., Bekaert K., Rouah-Martin E., De Coen W., Blust R., Robbens J., Dubruel P.* Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. № 4. P. 1178.
3. *Hassani S., Momtaz S., Maghsoudi A.S., Abdollahi M., Vakhshiteh F., Ganjali M.R., Norouzi P.* Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment // *Arch. Toxicol.* 2017. V. 91. № 1. P. 109.
4. *Li Y.Y., Schluesener H.J., Xu S.Q.* Gold nanoparticle-based biosensors // *Gold Bulletin*. 2010. V. 43. P. 29. <https://doi.org/10.1007/bf03214964>
5. *Kochmann S., Hirsch T., Wolfbeis O.S.* Graphenes in chemical sensors and biosensors // *Trends Anal. Chem.* 2012. V. 39. P. 87.
6. *Šeřčovičová J., Tkac J.* Application of nano-materials in microbial-cell biosensor constructions // *Chem. Pap.* 2015. V. 69. № 1. P. 42.
7. *Han M.-J., Lee S.Y., Koh S.-T., Noh S.-G., Han W.H.* Biotechnological applications of microbial proteomes // *J. Biotechnol.* 2010. V. 145. P. 341.
8. *Apostoli P., Cornelis R., Duffus J., Hoet P., Lison D.* Elemental speciation in human health risk assessment. *Environmental Health Criteria* 234. World Health Organization, 2006 <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc234.pdf> (05.06.2018)
9. *Olaniran A.O., Balgobind A., Pillay B.* Bioavailability of heavy metals in soil: Impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improve-

- ment strategies // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14 (5). P. 10197.
10. Banerjee P., Kintzios S., Prabhakarandian B. Biotoxin detection using cell-based sensors // *Toxins*. 2013. V. 5. № 12. P. 2366.
 11. Gosset A., Ferro Y., Durrieu C. Methods for evaluating the pollution impact of urban wet weather discharges on biocenosis: A review // *Water Res.* 2016. V. 89. P. 330.
 12. Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barceló D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. № 4. P. 1025.
 13. Goradel N.H., Malekshahi Z.V., Negahdari B., Mirzaei H., Sahebkar A., Poursadeghiyan M., Masoudifar A. Biosensors for the detection of environmental and urban pollutions // *J. Cell. Biochem.* 2018. V. 119. № 1. P. 207.
 14. Xu X., Ying Y. Microbial biosensors for environmental monitoring and food analysis // *Food Rev. Int.* 2011. V. 27. № 3. P. 300.
 15. Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. Microbial biosensors: A review // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 26. № 5. P. 1788.
 16. Dai C., Choi S. Technology and applications of microbial biosensor // *Open J. Appl. Biosens.* 2013. V. 2. № 3. P. 83.
 17. Park M., Tsai S.-L., Chen W. Microbial biosensors: Engineered microorganisms as the sensing machinery // *Sensors*. 2013. V. 13. P. 5777.
 18. Gui Q., Lawson T., Shan S., Yan L., Liu Y. The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics // *Sensors*. 2017. V. 17. P. 1623.
 19. Sassolas A., Prieto-Simón B., Marty J.-L. Biosensors for pesticide detection: New trends // *Am. J. Anal. Chem.* 2012. V. 3. P. 210.
 20. Koyun A., Ahlatcioglu E., İpek Y.K. Biosensors and their principles / A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones / Ed. Kara S. InTech, 2012. 240 p.
 21. Thouand G. Microorganisms for analysis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. P. 893.
 22. Enzyme and microbial biosensors: Techniques and protocols / Eds. Mulchandani A., Rogers K.R. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 1998. 249 p.
 23. de Carvalho C. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. P. 75.
 24. Kim C.S., Seo J.H., Kang D.G., Cha H.J. Engineered whole-cell biocatalyst-based detoxification and detection of neurotoxic organophosphate compounds // *Biotechnol. Adv.* 2014. V. 32. P. 652.
 25. Корпан Я.И., Ельская А.В. Микробные сенсоры: достижения, проблемы, перспективы (обзор) // *Биохимия*. 1995. Т. 60. № 12. С. 1988.
 26. Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Microbial biosensors // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 568. № 1–2. P. 200.
 27. Racek J. Cell-based biosensors. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1995. 107 p.
 28. Wang Q., Xiong Y., Lou L. Review: Biosensor for detection of pesticide residue // *Am. J. Nano Res. Applicat.* 2015. V. 3. № 1–1. P. 18.
 29. Katrlík J., Voštár I., Šefčovičová J., Tkač J., Mastihuba V., Valach M., Štefjuca V., Gemeiner P. A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 388. P. 287.
 30. D'Souza S.F. Microbial biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2001. V. 16. P. 337.
 31. Shing W.L., Heng L.Y., Surif S. Performance of a cyanobacteria whole cell-based fluorescence biosensor for heavy metal and pesticide detection // *Sensors*. 2013. V. 13. P. 6394.
 32. Zaushitsyna O., Berillo D., Kirsebom H., Mattiasson B. Cryostructured and crosslinked viable cells forming monoliths suitable for bioreactor applications // *Top. Catal.* 2013. V. 57. № 5. P. 339.
 33. D'Souza S.F. Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001. V. 96. № 1–3. P. 225.
 34. Linares K.A. Evaluating strategies for integrating bacterial cells into a biosensor designed to detect electrophilic toxins / Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in Environmental Engineering. Blacksburg, Virginia, 2004. 110 p.
 35. Martins S., Martins C.M., Fiúza L.M., Santaella S.T. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater // *Afr. J. Biotechnol.* 2013. V. 12. № 28. P. 4412.
 36. Lagarde F., Jaffrezic-Renault N. New trends in biosensors for water monitoring // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. P. 947.
 37. Saxena S. Immobilisation and biosensors / Applied Microbiology. Springer, New Delhi, 2015. P. 179.
 38. Immobilization of enzymes and cells. 2nd ed. / Ed. Guisan J.M. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2006.
 39. Wang P., Liu Q. Cell-based biosensors: Principles and Applications. Norwood: Artech House, 2010. 271 p.
 40. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification // *Biosens. Bioelectron.* 2001. V. 16. № 1–2. P. 121.
 41. Nakamura H. Recent organic pollution and its biosensing methods // *Anal. Methods*. 2010. V. 2. № 5. P. 430.
 42. Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алфёров В.А., Решетиллов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор) // *Прикл. Биохим. Микробиол.* 2011. Т. 47. № 1. С. 5.
 43. Lei Y., Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A. Direct determination of p-nitrophenyl substituent organophosphorus nerve agents using a recombinant *Pseudomonas putida* JS444-modified Clark oxygen electrode // *J. Agric. Food. Chem.* 2005. V. 53. P. 524.
 44. Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A. Microbial biosensor for direct determination of nitrophenyl-sub-

- stituted organophosphate nerve agents using genetically engineered *Moraxella* sp. // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 568. № 1–2. P. 217.
45. Banik R.M., Mayank, Prakash R., Upadhyay S.N. Microbial biosensor based on whole cell of *Pseudomonas* sp. for online measurement of *p*-nitrophenol // *Sens. Actuators B.* 2008. V. 131. № 1. P. 295.
46. Timur S., Anik U., Odaci D., Gorton L. Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes // *Electrochem. Commun.* 2007. V. 9. № 7. P. 1810.
47. Mulchandani P., Hangarter C.M., Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Amperometric microbial biosensor for *p*-nitrophenol using *Moraxella* sp.-modified carbon paste electrode // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V. 21. P. 523.
48. Lei Y., Mulchandani P., Wang J., Chen W., Mulchandani A. Highly sensitive and selective amperometric microbial biosensor for direct determination of *p*-nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents // *Environ. Sci. Technol.* 2005. V. 39. № 22. P. 8853.
49. Lei Y., Mulchandani P., Chen W., Wang J., Mulchandani A. Whole cell-enzyme hybrid amperometric biosensor for direct determination of organophosphorous nerve agents with *p*-nitrophenyl substituent // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 85. № 7. P. 706.
50. Lei Y., Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A. Biosensor for direct determination of fenitrothion and EPN using recombinant *Pseudomonas putida* JS444 with surface-expressed organophosphorous hydrolase. 2. Modified carbon paste electrode // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007. V. 136. № 3. P. 243.
51. Tang X., Zhang T., Liang B., Han D., Zeng L., Zheng C., Li T., Wei M., Liu A. Sensitive electrochemical microbial biosensor for *p*-nitrophenylorganophosphates based on electrode modified with cell surface-displayed organophosphorus hydrolase and ordered mesopore carbons // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 60. P. 137.
52. Zamaleeva A.I., Sharipova I.R., Shamagsumova R.V., Ivanov A.N., Evtugyn G.A., Ishmucharmetova D.G., Fakhrullin R.F. A whole-cell amperometric herbicide biosensor based on magnetically functionalised microalgae and screen-printed electrodes // *Anal. Methods.* 2011. V. 3. P. 509.
53. Kumar J., D'Souza S.F. Microbial biosensor for detection of methyl parathion using screen printed carbon electrode and cyclic voltammetry // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 26. P. 4289.
54. Anu Prathap M.U., Chaurasia A.K., Sawant S.N., Apte S.K. Polyaniline-based highly sensitive microbial biosensor for selective detection of lindane // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 15. P. 6672.
55. Deng L., Guo Sh., Zhou M., Liu L., Liu Ch., Dong Sh. A silk derived carbon fiber mat modified with Au@Pt urchinlike nanoparticles: A new platform as electrochemical microbial biosensor // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. P. 2189.
56. Yong D., Liu Ch., Yu D., Dong Sh. A sensitive, rapid and inexpensive way to assay pesticide toxicity based on electrochemical biosensor // *Talanta.* 2011. V. 84. № 1. P. 7.
57. Shitanda I., Takada K., Sakai T., Tatsuma T. Compact amperometric algal biosensors for the evaluation of water toxicity // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 530. № 2. P. 191.
58. Rouillon R., Piletsky S.A., Piletska E.V., Euzet P., Carpentier R. Comparison of the immobilization techniques for photosystem II / *Biotechnological Applications of Photosynthesis Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices* / Eds. Giardi M.T., Piletska E.V. Georgetown: Landes Bioscience, 2006. P. 73.
59. Campas M., Carpentier R., Rouillon R. Plant-tissue- and photosynthesis-based biosensors // *Biotechnol. Adv.* 2008. V. 26. № 4. P. 370.
60. Rouillon R., Mestres J.-J., Marty J.L. Entrapment of chloroplasts and thylakoids in polyvinylalcohol-SbQ. Optimization of membrane preparation and storage conditions // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 311. P. 437.
61. Koblizek M., Masojidek J., Komenda J., Kucera T., Pilipton R., Mattoo A.K., Giardi M.T. A Sensitive photosystem II-based biosensor for detection of a class of herbicides // *Biotechnol. Bioeng.* 1998. V. 60. № 6. P. 664.
62. Rainina E.I., Efremenco E.N., Varfolomeyev S.D., Simonian A.L., Wild J.R. The development of a new biosensor based on recombinant *E. coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins // *Biosens. Bioelectron.* 1996. V. 11. № 10. P. 991.
63. Gaberlein S., Spener F., Zaborosch C. Microbial and cytoplasmic membrane-based potentiometric biosensors for direct determination of organophosphorus insecticides // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 54. P. 652.
64. Mulchandani A., Mulchandani P., Chauhan S., Kaneva I., Chen W. A potentiometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents // *Electroanalysis.* 1998. V. 10. № 11. P. 733.
65. Mulchandani A., Mulchandani P., Kaneva I., Chen W. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. 1. Potentiometric microbial electrode // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 4140.
66. Arip M.N.M., Heng L.Y., Ahmad M., Ujang S. A cell-based potentiometric biosensor using the fungus *Lentinus sajor-caju* for permethrin determination in treated wood // *Talanta.* 2013. V. 116. P. 776.
67. Han T.S., Sasaki S., Yano K., Ikebukuro K., Kitayama A., Nagamune T., Karube I. Flow injection microbial trichloroethylene sensor // *Talanta.* 2002. V. 57. P. 271.
68. Kaur N., Prabhakar N. Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors // *Trends Anal. Chem.* 2017. V. 92. P. 62.
69. Pundir C.S., Chauhan N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review // *Anal. Biochem.* 2012. V. 429. № 1. P. 19.
70. Songa E.A., Okonkwo J.O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review // *Talanta.* 2016. V. 155. P. 289.
71. Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E. Electrochemical biosensors – sensor principles and architectures // *Sensors.* 2008. V. 8. P. 1400.

72. Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych S.V. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring // *Sensors*. 2008. V. 8. P. 2569.
73. Roach P.C.J., Ramsden D.K., Hughes J., Williams P. Development of a conductometric biosensor using immobilised *Rhodococcus ruber* whole cells for the detection and quantification of acrylonitrile // *Biosens. Bioelectron.* 2003. V. 19. № 1. P. 73.
74. Hnaïen M., Lagarde F., Bausells J., Errachid A., Jaffrezic-Renault N. A new bacterial biosensor for trichloroethylene detection based on a three-dimensional carbon nanotube bioarchitecture // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. P. 1083.
75. Chouteau C., Dzyadevych S., Durrieu C., Chovelon J.-M. A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V. 21. P. 273.
76. Chouteau C., Dzyadevych S.V., Chovelon J.-M., Durrieu C. Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 19. № 9. P. 1089.
77. Guedri H., Durrieu C.A. A self-assembled monolayer based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring // *Microchim. Acta.* 2008. V. 163. № 3–4. P. 179.
78. Rodriguez M.L.L., Benimeli C., Madrid R.E., Giacomelli C.E. A simple *Streptomyces* spore-based impedimetric biosensor to detect lindane pesticide // *Sens. Actuators B.* 2015. V. 207. P. 447.
79. Rodriguez M.L.L., Madrid R.E., Giacomelli C.E. The optimization of the culture medium to design *Streptomyces* sp. M7 based impedimetric biosensors // *Sens. Actuators B.* 2014. V. 193. P. 230.
80. Hnaïen M., Bourigua S., Bessueille F., Bausells J., Errachid A., Lagarde F., Jaffrezic-Renault N. Impedimetric microbial biosensor based on single wall carbon nanotube modified microelectrodes for trichloroethylene detection // *Electrochim. Acta.* 2011. V. 56. № 28. P. 10353.
81. Gabriel G.V.M., Lopes P.S., Viviani V.R. Suitability of macrolampis firefly and pyrearinus click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor // *Anal. Biochem.* 2014. V. 445. P. 73.
82. Liu X., Germaine K.J., Ryan D., Dowling D.N. Whole-cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls // *Sensors*. 2010. V. 10. № 2. P. 1377.
83. Narsaiah K., Jha S.N., Bhardwaj R., Sharma R., Kumar R. Optical biosensors for food quality and safety assurance – a review // *J. Food Sci. Technol.* 2012. V. 49. № 4. P. 383.
84. Yan X., Li H., Su X. Review of optical sensors for pesticides // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 103. P. 1.
85. Chen J., Sun S., Li C.Z., Zhu Y.G., Rosen B.P. Biosensor for organoarsenical herbicides and growth promoters // *Environ. Sci. Technol.* 2014. V. 48. P. 1141.
86. Arias-Barreiro C.R., Okazaki K., Koutsaftis A., Inayat-Hussain S.H., Tani A., Katsuhara M., Kimbara K., Mor I.C. A bacterial biosensor for oxidative stress using the constitutively expressed redox-sensitive protein roGFP2 // *Sensors*. 2010. V. 10. № 7. P. 6290.
87. Pena-Vazquez C.S., Choi B.-H., Seo J.H., Lim G., Cha H.J. Mussel adhesive protein-based whole cell array biosensor for detection of organophosphorus compounds // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 41. P. 199.
88. Pena-Vazquez E., Maneiro E., Perez-Conde C., Moreno-Bondi M.C., Costas E. Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. № 12. P. 3538.
89. Ferro Y., Perullini M., Jobbagy M., Bilmes S.A., Durrieu C. Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels // *Sensors*. 2012. V. 12. № 12. P. 16879.
90. Ooi L., Heng L.Y., Mori I.C. A high-throughput oxidative stress biosensor based on *Escherichia coli* roGFP2 cells immobilized in a k-carrageenan matrix // *Sensors*. 2015. V. 15. № 2. P. 2354.
91. Wei T., Zhang C., Xu X., Hanna M., Zhang X., Wang Y., Dai H., Xiao W. Construction and evaluation of two biosensors based on yeast transcriptional response to genotoxic chemicals // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 44. P. 138.
92. 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.
93. Védrine C., Leclerc J.C., Durrieu C., Tran-Minh C. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides // *Biosens. Bioelectron.* 2003. V. 18. № 4. P. 457.
94. Kumar J., D'Souza S.F. An optical microbial biosensor for detection of methyl parathion using *Sphingomonas* sp. immobilized on microplate as a reusable biocomponent // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. № 4. P. 1292.
95. Gavlasova P., Kuncova G., Kochankova L., Mackova M. Whole cell biosensor for polychlorinated biphenyl analysis based on optical detection // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2008. V. 62. P. 304.
96. Niazi J.H., Kim B.C., Ahn J.-M., Gu M.B. A novel bioluminescent bacterial biosensor using the highly specific oxidative stress-inducible *pgi* gene // *Biosens. Bioelectron.* 2008. V. 24. P. 670.
97. Stolper P., Faber S., Weller M.G., Knopp D., Niessner R. Whole cell luminescence based flow through biodetector for toxicity testing // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 1181.
98. Hua A., Gueuné H., Cregut M., Thouand G., Durand M.-J. Development of a bacterial bioassay for atrazine and cyanuric acid detection // *Front Microbiol.* 2015. V. 6. P. 211.
99. Shao C.Y., Howe C.J., Porter A.J.R., Glove L.A. Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 10. P. 5026.
100. Kotova V.Y., Manukhov I.V., Zavlilgelskii G.B. Lux biosensors for detection of SOS_response, heat shock, and oxidative stress // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. № 8. P. 781.
101. Kumar J., Jha S.K., D'Souza S.F. Optical microbial biosensor for detection of methyl parathion pesticide using *Flavobacterium* sp. whole cells adsorbed on glass fiber filters as disposable biocomponent // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. № 11. P. 2100.

102. *Girotti S., Ferri E.N., Fumo M.G., Maiolini E.* Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 608. № 1. P. 2.
103. *Giardi M.T., Pace E.* Photosystem II-based biosensors for the detection of photosynthetic herbicides / *Biotechnological applications of photosynthetic proteins; biochips, biosensors and biodevices* / Eds. Giardi M., Piletska E.V. Georgetown: Landes Bioscience, 2006. P. 147.
104. *Ventrella A., Catucci L., Agostiano A.* Herbicides affect fluorescence and electron transfer activity of spinach chloroplasts, thylakoid membranes and isolated photosystem II // *Bioelectrochemistry.* 2010. V. 79. № 1. P. 43.
105. *Stoytcheva M., Zlatev R., Velkova Z., Valdez B., Ovalle M., Petkov L.* Hybrid electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides quantification // *Electrochim. Acta.* 2009. V. 54. № 6. P. 1721.
106. *Buonasera K., Pezzotti G., Scognamigli V., Tibuzzi A., Giardi M.T.* New platform of biosensors for prescreening of pesticide residues to support laboratory analyses // *J. Agric. Food. Chem.* 2010. V. 58. № 10. P. 5982.
107. *Chee G.-J.* Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers // *Talanta.* 2013. V. 117. P. 366.
108. *Ayyaru S., Dharmalingam S.* Enhanced response of microbial fuel cell using sulfonated poly ether ether ketone membrane as a biochemical oxygen demand sensor // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 818. P. 15.
109. *Di Lorenzo M., Thomson A.R., Schneider K., Cameron P.J., Ieropoulos I.A.* A small-scale air-cathode microbial fuel cell for on-line monitoring of water quality // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 62. P. 182.
110. *Mulchandani A., Rajesh.* Microbial biosensors for organophosphate pesticides // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011. V. 165. P. 687.
111. *Lagarde F., Jaffrezic-Renault N.* Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. P. 947.