

TARTU ÜLIKOOL
Füüsika-keemiateaduskond
Kolloid- ja keskkonnakeemia õppetool

Karita Raudkivi

**Bakterkultuuride sobivuse uurimine poolspetsiifilise BHT-
biosensori jaoks**

Magistritöö

Juhendajad: Timo Kikas, PhD
Ene Talpsep, MSc

Tartu, 2007

Sissejuhatus	3
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1. Biosensid	5
1.2. Mikroobsensid	6
1.3. Mikroorganismide immobiliseerimine	8
1.4. Biokeemiline hapnikutarve	10
1.5. BHT-mikroobsensor	11
1.6. BHT-mikroobsensori omadused	13
1.6.1. Vasteaeg ja taasteaeg	13
1.6.2. Stabiilsus	14
1.6.3. Lineaarsus	14
1.6.4. Traditsioonilise BHT ₇ testi ja mikroob- BHT-sensori vaste kokkulangevus	15
1.6.5. Mikroorganismide adapteerimine	16
1.6.6. Mikroobsensori kalibreerimine	16
1.7. Ensüümkinetika põhivõrrandid	17
1.8. Kasutatud bioloogilise materjali iseloomustus	19
2. Eksperimentaalne osa	21
2.1. Töös kasutatud reaktiivid ja kemikaalid	21
Fenoolsete heitvete kombineerimiseks kasutati OECD sünteetilist heitvett ja fenooli (Molecular Biology grade, IBI)	22
2.2. Kasutatud aparaat	23
Mikroorganismide mikromorfoloogiliste tunnuste hindamiseks vaadeldi tüvesid mikroskoobiga Olympus BH2-B130 (Olympus Europa Holding GmbH)	23
Mikroorganismide puhtuse kontrolliks vaadeldi mikroobide mikromorfoloogiliste tunnuste hindamiseks tüvesid mikroskoobiga Olympus BH2-B130 (Olympus Europa Holding GmbH)	23
2.3. Mikrobioloogiline materjal	23
2.3.1. Bakterkultuuride tüvede kasvatamine puhtuse kontrolliks ja immobiliseerimiseks	24
2.3.2. Mikroorganismide immobiliseerimine	25
2.3.3. Eksperimendi meetodika	25
3. Tulemused ja arutelu	28
3.1. <i>Ps. putida</i> P67.2 kasvukõver	29
3.2. Mikroobsensori iseloomustamine	31
3.2.1. Mikroobsensori signaali vaste	31
3.2.2. Mikroobsensori signaali taastumine	31
3.3. <i>Ps. p.</i> sensoriga mõõtmised erinevates heitvetes	33
3.4. <i>Ps. fl.</i> ja <i>Es. coli</i> sensorite võrdlus fenoolse heitvee korral	38
Kokkuvõtte	42
Summary	43
Kasutatud kirjandus	44

Sissejuhatus

Kirde-Eestis on põlevkivi töötlemine ja kasutamine põhjustanud ümberkaudse looduse saastumise fenoolsete ühenditega, mis on mürgised enamikule elusloodusele. Keskkonna puhtuse seisukohast on fenoolsete heitvete detekteerimiseks tarvis võimalikult kiireid meetodeid, et oleks võimalik nimetatud reostust likvideerida [1-2].

Biokeemiline hapnikutarve (BHT) on laialdaselt kasutatav parameeter iseloomustamaks erinevate heitvete orgaanilist reostust. BHT näitab ühes liitris vees sisalduvate orgaaniliste saasteainete biokeemiliseks lagundamiseks kulutatava hapniku kogust milligrammides. Standardne BHT analüüs on aga efektiivseks reageerimiseks liiga aeganõudev, kuna test kestab 5 või 7 päeva [3-5].

Operatiivsema informatsiooni saamise üheks võimaluseks on kasutada immobiliseeritud mikroobidel põhinevaid biosensoreid.

Kuna universaalsed biosensorid ei sobi üldjuhul spetsiifiliste heitvete analüüsiks, siis oleks vajad välja töötada biosensoreid, mis oleksid poolspetsiifiliste omadustega. Poolspetsiifilisus avaldub selles, et osa bakteritest on mingile kindlale substraadile spetsiifilised, kuid enamus substraadi spektrist on neil ühene. Kasutades kombineeritud mikroobide kogu, kus on teada nende substraadi tarbimine ja spetsiifilisus siis saaks laiendada substraadi valikut ning seeläbi saavutada kiiremat ja täpsemat BHT määramist..

Antud magistritöö eesmärgiks oli uurida bakterikultuuride sobivust poolspetsiifilise BHT-mikroobsensor bioloogiliseks äratundmissüsteemiks, et seeläbi laiendada substraatide vahemikku ning leida mikroobid, mis on just antud koostisega heitvee BHT analüüside jaoks sobilikud ja spetsiifilised. Selleks kasutatakse bakalaureusetöös konstrueeritud mikroob-BHT-otsaandurit, mis annab võimaluse kergesti vahetada ja uurida erinevate kultuuridga membraane.

Teoreetilises osas antakse kirjanduse põhjal ülevaade biosensoritest ja nende põhilistest karakteristikutest.

Töös uuriti kultuure *Pseudomonas putida* P67.2, *Pseudomonas fluorescens* ning *Escherichia coli* R17.1.3. Kultuuride poolspetsiifilisus väljendub selles, et neil on substraadi spektrist mingi osa ühine, kuid mingitele teatavatele ühenditele on nad spetsiifiliselt. Põhirõhk antud eksperimentaalsest osast pööratigi fenooli tundlikule *Pseudomonas putida* P67.2 kasvatamisele ja spetsiifilisusele ning temal põhineva mikroobsensori uurimisele. Teistel

kultuuridel põhinevaid mikroobsensoreid kasutati *Pseudomonas putida* sensoriga võrdlemiseks.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Biosensorid

Biosensor on analüütiline süsteem, mis koosneb kahest osast: bioloogilisest äratundmissüsteemist ja muundurist. Bioloogiline materjal on mistahes bioloogilise päritoluga materjal, mis interakteerub uuritava ainega. Muundur on seade, mis muudab bioloogilise materjali interaktsioonid mõõdetavaks signaaliks.

Bioloogilise äratundmissüsteemi peamine eesmärk on selektiivne interaktsioon uuritava analüüdiga [6]. Bioloogilise äratundmissüsteemina on kasutatud ensüüme, antikehasid, DNAd, organelle, mikroorganisme ja kudesid [7].

Eristatakse kahte gruppi bioloogilist materjali: [8]

- 1) Katalüütilised materjalid – siia kuuluvad ensüümid, mikroorganismid (seened, bakterid, vetikad), taimsed ja loomsed koed. Vastavates sensorites on signaal seotud aine degradatsiooniga bioloogilisel materjalil.
- 2) Mittekatalüütilised materjalid – antikehad, reptseptorid ja nukleiinhapped. Sensori signaal on seotud uuritava substraadi ja bioloogilise materjali seostumisega.

Muunduri ülesandeks sensoris on muuta bioloogilise äratundmissüsteemi poolt edastatud signaal mingisuguseks mõõdetavaks signaaliks [6]. Kasutatud on mitmeid erinevaid muundureid – elektrokeemilisi (amperomeetrilised, potentsiomeetrilised, konduktomeetrilised), optilisi, kalorimeetrilisi ja akustilisi [6; 8; 9].

Kõige rohkem on kasutatud bioloogilise materjalina puhtaid ensüüme just tänu nende kõrgele spetsiifilisusele, kuid nende kõrge hind ja kehv stabiilsus limiteerib nende kasutust [7].

Mikroobsensorite eelised ensüümsensorite ees on järgmised: [7; 10]

- Puudub ensüümide puhastamise ning eraldamise etapp
- Ei vaja kofaktoreid
- Lihtsus regenereerimisel – asetamine toitelahusesse
- Odavus

Puudused, mis piiravad mikroobsensorite kasutust on alljärgnevad: [7; 11-12]

- Pikem vasteaeg
- Madalam spetsiifilisus
- Madalam katalüütiline aktiivsus
- Pikem taasteaeg
- Selektiivsuse langus tänu rakkude võimele sünteesida erinevaid ensüüme

1.2. Mikroobsensorid

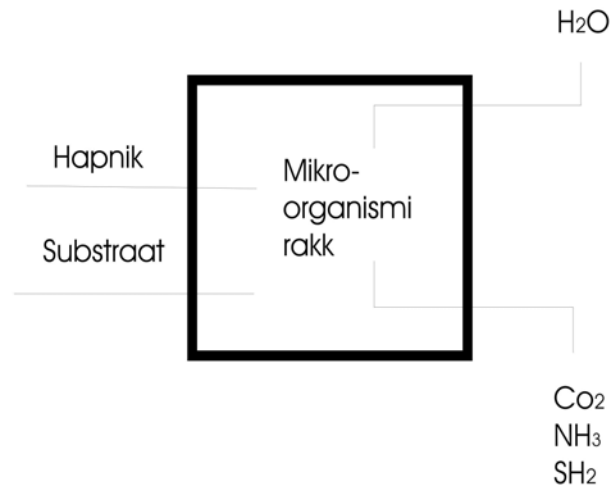
Esimese mikroobsensori valmistas prof. Dives 1975 aastal. Ta mõttis etanooli sisaldust erinevates lahustes, kasutades spetsiifilisi *Acetobacter xylinum* mikroobe. Mikroobsensor koosneb immobiliseeritud mikroorganismidest ja bioloogilise signaali muundurist, mis muudab biokeemilise signaali elektriliseks signaaliks [10].

Mikroobsensoreid on põhimõtteliselt kahte tüüpi: Esimese puhul mõõdetakse mikroorganismide hingamist ja sellest tulenevat hapniku kontsentratsiooni langust. Teise tüübi puhul mõõdetakse otse mikroorganismide elutegevuse tulemusena tekkinud elektrokeemiliselt aktiivseid ainevahetuse produkte. Sellest lähtuvalt peavad bioloogilise materjalina kõne alla tulevad mikroorganismid täitma vähemalt ühe kahest järgnevast tingimusest: [11]

1. Hapniku tarbimine hingamisprotsessis substraadi lagundamisel
2. Metaboolsetel reaktsioonidel vabanevad elektroaktiivsed saadused (nt. H^+ , NH_4^+ , CO_2 , H_2O_2), mis on määratavad erinevate (nt. potentsiomeetriliste, amperomeetriliste jne) elektrodidega.

Esimest tüüpi biosensorite korral kasutatakse aeroobseid mikroorganisme, teist tüüpi biosensorites tulevad kõne alla anaeroobseid mikroorganismid.

Mikroobsensorites kasutatavad mikroobid tarbivad orgaaniliste saasteainete lagundamiseks hapnikku. Metaboolsete protsesside käigus tekivad erinevad elektroaktiivsed ühendid. Näitlik raku mudel on toodud joonisel 1 [10].



Joonis 1. Mikroorganismi raku näitlik mudel (must kast) [10].

Biosensori väljundsignaali detekteerimismeetodeid on kaks: [10]

- 1) statsionaarse oleku ehk lõpp-punkti mõõtmismeetod (dünaamiline meetod). Meetod põhineb kahe mõõdetud statsionaarse väljundsignaali väärtuse erinevusel.
- 2) algkiirustemeetod (kineetiline meetod). Meetod põhineb biosensori väljundsignaali maksimaalse muutumise kiirust substraadi erinevatel kontsentratsioonidel.

Algkiiruse meetod on kiirem ja võimaldab paremaid kordusmõõtmisi, kuid tundliku anduri korral osutub statsionaarse voolutugevuse mõõtmine edukamaks. Mikroobsensorites ongi kasutatud rohkem esimest meetodit vaatamata oma suhtelisele aeglusele [13-14].

Mikroobsensoreid on käesolevaks ajaks kasutatud rohkem kui 50 erineva substraadi, ensüümi ning kompleksparameetrite (BHT) määramiseks [10].

1.3. Mikroorganismide immobiliseerimine

Immobiliseerimiseks nimetatakse mikroorganismide kinnitamist ja lokaliseerimist kandjamaterjali sisse või selle pinnale. Immobilisatsioon aitab kindlustada vajaliku läheduse muunduri ja bioloogilise materjali vahel, mis omakorda garanteerib hästi töötava biosensori. Immobiliseerimine peab tagama sensori ja bioloogilise materjali stabiilsuse pikema aja jooksul, sensori korduvkasutatavuse ning rakkude tõkestatud paljunemise. Bioloogilist materjali on võimalik immobiliseerida otse muunduri pinnale, kuid enamasti kasutatakse immobiliseerimist membraanile, mida on hiljem kerge muundurile asetada [7; 9-10].

Immobiliseerimiseks kasutatavad meetodid: [15-16]

1) Adsorptsioon - mehhanism põhineb erinevate molekulide adsorptsioonil erinevatele pindadele hüdrofoobsete, ioonsete või Van der Waalsi jõudude abil.

Adsorptsioon on lihtsaim immobiliseerimis viis, kuid kinnitumine kandjale on suhteliselt nõrk. Tavaliselt kasutatakse seda meetodit ühekordsete või ajaliselt lühikeste mõõtmiste korral.

2) Kovalentne sidumine - molekuli funktsionaalne rühm kinnitatakse kandjale või muunduri pinnale. Reaktsioonid peavad olema läbi viidud pehmetes tingimustes (madal temperatuur, sobiv pH). Meetodi eeliseks on lähedane kontakt muunduriga ja madal difusioonibarjäär, mis tagab kiire vastuse.

3) Ristseondamine – bioloogiline materjal on kandjaga seotud bifunktsionaalsete (omab rohkem kui ühte funktsionaalset rühma) rühmade kaudu keemilise sidemega. Meetodit kasutatakse adsorbeerunud bioloogilise materjali stabilisatsiooniks. Puudusteks on difusiooni takistus ja lisaks võib biomaterjal kahjustuda.

4) Mikrokapseldamine – bioloogiline materjal on membraani taga, andes lähedase kontakti bioloogilise materjali ja muunduri vahel. Tekib mitmekihiline süsteem, mis võib vähendada sensori signaali intensiivsust. Meetodi eeliseks on stabiilsus temperatuuri, pH, keemilise koostise jne muutustele. Leidis laialdast kasutamist esimestes biosensorites.

5) Füüsiline „kinnistamine” – bioloogiline materjal seotakse polümeerse geeli maatriksisse või poolläbilaskvale membraanile, kust väikse molekulmassiga molekulid (substraat, O₂) saavad läbi difundeeruda, kuid suuremate molekulide liikumine on takistatud. Meetodi eelisteks on lihtsus ja pehmed tingimused mikroorganismide jaoks (ei nõua kemikaale ega protseduure, mis kahjustaksid rakkude elujõulisust). Meetodi puudus seisneb võimaluses, et mikroorganismide liias võtta, viib see difusiooni kihi paksuse liiga suureks, mis omakorda toob kaasa sensori vasteaja pikeneduse. Füüsilise kinnistamise meetod on üks populaarsemaid immobiliseerimis viise. Esimesena kasutasid seda Clark ja Lyons 1962. aastal hapnikuanduril baseeruva biosensori konstrueerimisel [9].

Enim kasutatavamate kandja-materjalide liigitus on toodud tabelis 1: [16]

Tabel 1. Mikroorganismide immobiliseerimisel kasutatavate kandjamaterjalide klassifikatsioon

Tüüp	Kategooria	Näited
Anorgaaniline	Looduslik	Oksiidid (Al ₂ O ₃ , MgO)
	Tööstuslik	Aktiivsüsi, koks, klaas
Orgaaniline	Polüsahhariidid	Agar, agaros, alginaat, dekstraan, tselluloos
	Proteiinid	Kollageen, zelatiin
	Süntetilised polümeerid	Polüstüreen, polüuretaan, polüakrüülamiid,

Kõige mugavam on kasutada geeli immobiliseeritud rakke, sest enamasti on nende töökindlus suurem, kuna rakkude ensümaatiline aktiivsus ja elujõud säilib. Kõige lihtsam on kasutada polümeeri, mis lahustub kuumutamisel vees ning lahuse jahutamisel tardub geeliks [15].

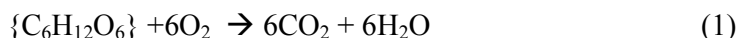
Antud magistritöös rakendati mikroorganismide immobiliseerimiseks füüsilist kinnitamist ning vastavaks polümeeriks valiti agaros. Agaros on merevetikates leiduv polüsahhariid, mille peamisteks komponentideks on β -D-galaktopüraanoos ja 3,6- α -L-galaktopüraanoos. Agarosi laialdast kasutamist on tinginud asjaolu, et võrreldes teist sarnaste polümeeridega on tal piisavalt madalad sulamistemperatuurid (nt 40 °C), mille mikroorganismid on võimelised hetkeliselt geeli immobiliseerimisel ära taluma. Lisaks tagab agarosgeeli küllaltki kõrge poorsus rakkude hea kinnitumise ning substraatide läbilaskvuse [15, 17].

1.4. Biokeemiline hapnikutarve

Biokeemiliseks hapnikutarbeks (BHT) nimetatakse ühes liitris vees sisalduvate orgaaniliste ainete biokeemiliseks oksüdeerimiseks kuluvat hapniku kogust milligrammides 20°C juures aeroobsetes tingimustes [18].

Mikroorganismid kasutavad orgaanilisi saasteaineid energia allikana ning kulutavad nende oksüdeerimisel hapnikku. Mida rohkem on saasteaineid, seda suurem on ka hapniku kulu. Et orgaanilised saasteained varieeruvad nii struktuurilt kui ka päritolult, on väga raske leida selliste saastete iseloomustamiseks mingit ühest parameetrit. Seetõttu ongi valitud orgaanilise saaste hulga iseloomustamiseks BHT, kuna hapniku hulk on ainus, mis biolagunevat orgaanilist saastet seob [19-20].

Orgaanilise aine lagunemist iseloomustab võrrand [20]:



BHT määramisel kasutatakse erinevaid inkubatsiooniaegasid (2, 5, 7 või 21 ööpäeva). Tähistusena kasutatakse BHT_n, kus n on inkubatsioonipäevade arv.

Alates 1936 aastast on rahvusvaheliselt tunnustatud standardiks jäänud BHT₇ [22]. Test näeb ette hapniku kontsentratsiooni mõõtmise enne ja pärast 7 päevast inkubatsiooniperioodi. Hapniku kontsentratsioon peab vähenema algkontsentratsioonilt (~8 mg/l) ligikaudu 2 mg/l-ni (et hapnikku jaguks terveks testiks), selle saavutamiseks tuleb teha analüüsitavast proovist lahjendusi (kuid kui uuritava vee BHT pole umbkaudu teada, tuleb teha mitu lahjendust). Paralleelselt tehakse ka pimekatse (lahjendusvesi ilma uuritava aineta), mille BHT väärtus ei tohi olla rohkem kui 0,5 mg/l, vastasel korral tuleb see uuritava proovide BHT leidmisel arvesse võtta [18].

Täielikuks biokeemiliseks hapnikutarbeks nimetatakse BHT analüüsi, kus inkubatsiooniaeg on 21 päeva [23].

1.5. BHT-mikroobsensor

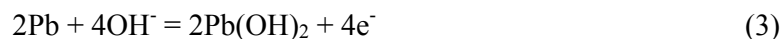
BHT₇ on hea indikaator iseloomustamaks heitvee orgaanilist reostust. Vastavad testid on universaalsed meetodid enamuse heitvete jaoks ning vajaminev aparatuur pole kallid. Ometi on tavapärase BHT₇ testi kasutamine piiratud tänu pikaajalisusele, sest biokeemiline oksüdatsioon on aeglane protsess ning tulemused saavad teatavaks alles 5 või 7 päeva pärast [3-5]. Looduse puhtuse seisukohast oleks hea, kui BHT väärtuse saaks teada kiiremini kui 5 või 7 päeva pärast, sest hiljem ei saa loodusesse jõudnud puhastamata veega enam midagi ette võtta. Nendest probleemidest ülesaamiseks on vaja arendada alternatiivne meetod, mis suudab vältida traditsioonilise BHT testi puudujääke. Kiirema BHT mõõtmiseks saab kasutada mikroobsensoreid, mis koosnevad põhimõtteliselt kahest osast: immobiliseeritud mikroorganismidest ja hapnikelektroodist [24; 25].

Hapnikelektroodina kasutatakse kõige rohkem Clark tüüpi hapnikandurit, mille konstrueeris Clark 1956 aastal. Andur on kahe-elektroodne süsteem, kus anoodiks on Ag/AgCl, Pb vm elektrood ja katoodiks Au, Pb vm, mis on eraldatud uuritavast lahusest gaasi (hapnikku) läbilaskva hüdrofoobse membraaniga (nt teflonist) [9,24].

Hapnik difundeerub läbi membraani ja redutseeritakse indikaatorelektroodil ehk katoodil vastavalt võrrandile:



Anoodil toimuv protsess vastavalt võrrandile:

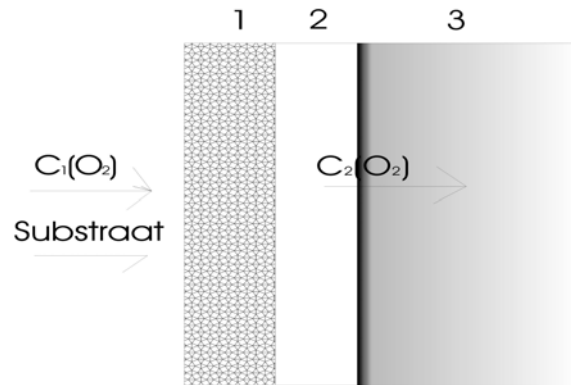


Hapniku redutseerimise tulemusel tekib kahe elektroodi vahel elektriline vool, mille väärtus on konstantsetes tingimustes võrdne hapniku kontsentratsiooniga uuritavas lahuses [13, 26-28].

Esimese sellise mikroob-BHT-sensori konstrueeris 1977 aastal Karube [10-11], kes kasutas mitmesuguseid aktiivmudast saadud puhtaid mikroorganisme [29]. Sellest ajast on bioloogilise äratundmissüsteemina on kasutatud mitmeid mikroobe: *Trichosporan cutaneum* [11; 15; 30-32], *Hansenula anomala* [33], *Saccharomyces cerevisiae* [34], *Arxula adenivorans LS3* [19; 35-36], *Torulopsis candida* [25], *Bacillus subtilis* [27-32], *Escherichia coli* [37], *Pseudomonas putida* [5; 38-39], *Pseudomonas fluorescens* [40], *Klebsiella (uue nimega sp* [41-42], *Serratia marcescens LSY 4* [43], *Clostridium cutaneum* [30], *Rhodococcus erythropolis* ja *Issatchenkia orientalis* [44-46], *Bacillus subtilis* ja *Bacillus licheniformis 7 B* [47], *Trichosporan cutaneum* ja *Bacillus licheniformis 7 B* [40] ja aktiivmuda mikroorganisme [41].

Mikroob-BHT-sensori kasutamine põhineb hapniku kontsentratsiooni muutuse mõõtmisel tänu orgaanilisi aineid lagundavatele mikroorganismidele. Sensori viimisel uuritavasse keskkonda hakkab lahustunud hapnik difundeeruma läbi immobiliseeritud mikroorganismide kihi ning seejärel läbi gaasiläbilaskva membraani hapnikuandurini. Immobiliseeritud mikroorganismide kihis hakkavad mikroobid orgaaniliste ainete lagundamiseks hapnikku tarbima. Mida rohkem on saasteaineid, seda rohkem hapniku kulub ning seega vastavad väiksemad hapniku hulgad detekteeritakse katoodi poolt [24; 48].

Tööpõhimõtte näitlik skeem on esitatud joonisel 2.



Joonis 2. Mikroobsensori tööpõhimõtte näitlik skeem. (1) Biomembraan, (2) poolläbilaskev teflon membraan, (3) katood.

1.6. BHT-mikroobsensori omadused

Biosensorite uurimisel ja iseloomustamisel kasutatakse mitmeid karakteristikuid – vasteaeg, taastumisaeg, täpsus, stabiilsus jne. Väga olulist rolli mängivad kasutatavate mikroorganismide spetsiifilised omadused.

1.6.1. Vasteaeg ja taasteaeg

Paljud analüütilised seadmed nõuavad aega, mis laseks mõõtesüsteemil jõuda tasakaalu seisundisse. BHT sensori vasteaeg varieerub vastavalt kasutatavale muundurile, membraanile ning mõõtmismeetodile. Stabiilse staadiumi meetodis võtab biosensori vastuse saamine aega 5-25 minutit, maksimaalse kiiruse meetodil aga 15-30 sekundit. Stabiilse staadiumi meetodis sõltub stabiilse näidu saavutamise substraadi kontsentratsioonist proovis – mida kõrgem kontsentratsioon, seda rohkem aega kulub stabiliseerumiseks.

Taasteaeg– aeg, mis kulub sensoril algnäidu taastumiseks. Taasteaega sõltub ka eelneva

mõõtmise pikkusest - mida pikem katse, seda kauem läheb aega, enne kui biosensorit saab jälle kasutada

Üldiselt kulub biosensori taastumiseks rohkem aega kui signaali registreerimiseks. Stabiilse staadiumi meetodi puhul on taasteaeg 15-60 ning maksimaalse kiiruse meetodil 5-10 minutit [9; 44].

1.6.2. Stabiilsus

Usaldusväärse BHT sensori saamiseks peab sensor olema mõõtmisperioodil stabiilne. Stabiilsust mõjutavad kasutatavad mikroorganismid, biosensori enda eripära, immobilisatsiooni meetodi ja kasutamise tingimused (temperatuur, pH, proovi maatriks) [6; 44].

Segakultuuride kasutamine sensorites vähendab samuti stabiilsust, kuna kasutatavad mikroobid ei pruugi omavahel hästi sobida (nt üks tarbib teist toiduks, substraadi kontsentratsioon võib neid erinevalt mõjutada).

Tihe mõõtmiste teostamine tagab hea sensori stabiilsuse. Mida harvemini sensorit kasutada, seda tõenäolisem on mikroorganismide hukkumine. Sensori signaal muutub ajas kuna kasutatavad mikroobid vananevad või surevad. Seega mikroorganismide koloonia hingab erineva kiirusega ning lagundab ka orgaanilisi ühendeid erineva kiirusega [6; 44].

1.6.3. Lineaarsus

Biosensori lineaarsuspiirkonnaks loetakse kontsentratsiooni vahemikku, kus substraadi kontsentratsiooni sõltuvus sensori vastesignaalist on lineaarne. Kalibratsioonigraafiku lineaarsus teatud substraadi kontsentratsioonide vahemikus näitab biosensori mõõtepiirkonda.

Lineaarsuspiirkond sõltub sensori tüübist, mikroorganismide kontsentratsioonist membraanil, lisaks mõjutab sensori lineaarsuspiirkonda selle tundlikkus mõningate orgaanilistele ühendite suhtes – sensori kalibratsiooni lahuse koostis peab olema võimalikult sarnane uuritava

lahusega [9; 44].

Kalibratsioonikõvera tõusu nimetatakse sensori tundlikkuseks [6]. Tundlikkust mõjutab mikroorganismide iseloom ja nende hulk membraanil. Võrreldes ühel tüvel baseeruvate sensoritega on segakultuurid üldjuhul tundlikumad. Rakkude hulga suurendamisega väheneb lineaarse ala ulatus. Mida rohkem mikroorganisme immobiliseeritakse, seda rohkem ka hapnikku tarbitakse. Optimaalne rakkude kogus tagab lineaarse piirkonna sattumise soovitud kontsentratsioonide vahemikku [35-36; 44].

1.6.4. Traditsioonilise BHT₇ testi ja mikroob- BHT-sensori vaste kokkulangevus

Uute biosensorite kasutuskõlblikkust hinnatakse paralleelselt tehtud traditsioonilisel BHT₇ testil saadud tulemuste põhjal. Üldjuhul ei lange need tulemused omavahel kokku. Erinevus tulemustes lähtub erinevatest mõõtmispõhimõtetest ning heitvee mitmekesisusest ja muutlikust koostisest.

Standartne BHT analüüs võtab olenevalt meetodist aega 5 või 7 päeva. Vastavat analüüsiaega nimetatakse inkubatsiooniajaks, mis hõlmab mikroobide adapteerumist, kasvamist ja vajalike ensüümide sünteesi soovitud ühendite lagundamise aega. Standardmeetodiga mõõdetud hapnikutarve summaarne hapniku hulk, mis on kulunud nii kergesti omistatavate ühendite kui ka biolagundatavate polümeeride oksüdeerimiseks.

BHT määramisel mikroobsensoris osalevad protsessis vaid valitud mikroobide kogumid, seega on substraadi valik piiratud ning registreerimisaeg on registreerimisaeg tunduvalt lühem kui standardmeetodi puhul. Seega mikroobsensori mõõtmisaja jooksul polümeeride lagunemine aset ei leia ning seega annab sensor ainult kergesti ja kiiresti lagundatavate ning omistatavate ühendite poolt tekitatud signaali.

Mikroobsensori ja standard BHT₇ testi tulemuste kokkulangevuse parandamiseks saab kasutada järgmisi meetmeid: sobivate mikroobtüvede valik, sobivamad kalibratsioonilahused, proovi eeltötlus (kasutades ensümaatilisi vaheetappe, mille tulemusel suured polümeeri molekulid lõhutakse väiksemateks ning ühtlasi ka kiiremini lagundatavamateks molekulideks) [13].

1.6.5. Mikroorganismide adapteerimine

Biosensori konstrueerimisel kasutatakse ära mikroorganismide head võimet kohaneda uute tingimustega. Selleks adapteeritakse kasutatavat bioloogilist materjali eelnevalt hiljem kasutatava kalibratsioonilahusega. Adapteerimisperioodil (maksimaalselt kuni 6 päeva) toodetakse orgaaniliste saasteainete lagundamiseks vajalikke ensüüme, mille tulemusel suureneb mikroorganismide biodegradatsiooni võime ning nad suudavad paremini orgaanilisi ühendeid lagundada. Seeläbi paraneb BHT₇ testi ja mikroobsensoriga saadud tulemuste kokkulangevus [13; 48].

1.6.6. Mikroobsensori kalibreerimine

Mikroobsensori ja traditsioonilise BHT₇ testiga saadud tulemuste parema kokkulangevuse saavutamiseks on vaja mikroobsensorit eelnevalt kalibreerida. Oluline on valida õige kalibratsioonilahus, mis peaks olema võimalikult lähedane uuritava heitvee koostisega. Laialdaselt kasutatud GGA (1:1 glükoos ja glutamiinhape) lahus pole kõige sobilikum hindama reaalseid mitmekesise koostisega heitvee proove, kuna see koosneb ainult kahest suhteliselt väikesest ning lihtsalt lagundatavast orgaanilisest komponendist [12-13].

Märkimisväärselt paremaid kokkulangevusi standardse BHT₇ testiga on saadud kasutades kalibratsioonilahuseks mitmekesisema koostisega OECD sünteetilist heitvett (koostis punktis 2.1. tabel 4) [12; 49].

Sobivaimat standardset kalibratsioonilahust kõikide heitvete jaoks ei ole, kuna neis sisalduvad ained on igas vees erinevad (ning erinevas hulgas). Kalibratsioonilahus, mis sobib ühe heitvee uurimiseks, ei pruugi sobida teistsuguse koostisega heitvee analüüsimiseks [13].

Antud töös valitigi kalibratsioonilahuseks just OECD sünteetiline heitvesi.

1.7. Ensüümkinetika põhvõrrandid

Mikroobsensoris kulgevaid protsesse saab kirjeldada ensüümkinetika põhvõrranditega. Seejuures eeldatakse, et antud ensüümi kontsentratsiooni juures sõltub ensüümreaktsiooni kiirus substraadi kontsentratsioonist. Graafiliselt väljendab reaktsiooni kiiruse ja substraadi kontsentratsiooni vahelist sõltuvust hüperbool - madalatel substraadi kontsentratsioonidel on reaktsioon esimest, kõrgematel aga null - järku [50].



kus: E, S, P - tähistavad vastavalt ensüümi, substraati ja produkti

k - reaktsioonide kiiruskonstandid

Seejuures eeldatakse, et ensüüm-substraat kompleks ES tekib sama kiiresti kui laguneb. Produkti ja ensüüm-substraat kompleksi moodustumise kiirust saab seega kirjeldada alljärgnevalt:

$$V_1 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E - S] \quad (5)$$

$$V_2 = \frac{d[E - S]}{dt} = k_1([E_t] - [E - S])[S] - (k_{-1} + k_2)[E - S] \quad (6)$$

kus: V - reaktsioonide kiirused.

[E_t] - ensüümi summaarne kontsentratsioon

Arvestades, et $\frac{d[E - S]}{dt} = 0$, saame

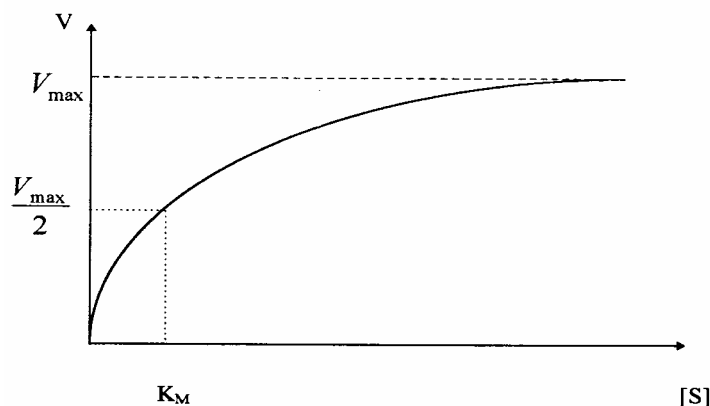
$$[E - S] = \frac{k_1[E][S]}{k_1[S] + k_1 + k_2} \quad (7)$$

Seejuures produkti moodustumise kiirust iseloomustav võrrand avaldub alljärgnevalt:

$$V = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

kus: K_m - tasakaalukonstandi pöördväärtus, mida nimetatakse Michaelise konstandiks.

Võrrandit (5) nimetatakse Michaelis-Menteni võrrandiks. Graafiliselt on kujutatakse reaktsiooni kiiruse sõltuvust substraadi kontsentratsioonist Joonisel 3.



Joonis 3. Reaktsiooni kiiruse V sõltuvus substraadi kontsentratsioonist $[S]$, kus K_m - Michaelise konstant ja V_{\max} - maksimaalne kiirus.

Konstandid K_m ja V_{\max} on omavahel seotud – kontsentratsioonil K_m on V_{\max} väärtus pool võimalikust maksimaalsest väärtusest. Reaktsiooni maksimaalne kiirus saavutatakse kõrge substraadi kontsentratsiooni korral kui kõik ensüümcentrid on küllastatud. Edasine substraadi kontsentratsiooni suurendamine ei mõjuta reaktsiooni toimumise kiirust. Suurus K_m sõltub substraadi omadustest, reaktsioonisegu pHst ja temperatuurist. Juhul kui ensüüm on võimeline katalüüsima mitme lähedaste omadustega substraadi muundumist, vastab igale substraadile erinev, individuaalne K_m väärtus. Esimeses lähenduses kulgeb reaktsioon seda kiiremini, mida väiksem on K_m .

Ensüümelektroodides soovitakse saavutada olukorda, kus V_{\max} on võimalikult kõrge ning K_m võimalikult väike. Väike K_m väärtus näitab, et sensor on väga tundlik ning graafikul väljendub see kitsa lineaarse osana. Graafiku lineaarne osa, mille algpunktiks on koordinaatide nullpunkt ning lõpppunktiks K_m väärtus, on analüütiliselt kasulik piirkond substraadi kontsentratsiooni määramiseks. Seega annab suurem K_m väärtus ulatuslikuma detekteeritava substraadi kontsentratsiooni vahemiku [26; 51].

Mikroorganismides toimuvad protsessid substraadi lagundamisel on ensüüm-katalüütilised reaktsioonid, mis alluvad ensüümikineetika põhivõrranditele [50].

1.8. Kasutatud bioloogilise materjali iseloomustus

Mikroorganismide tüvede valikul lähtuti asjaolust, et kergesti lagundavate orgaaniliste ainete lagundamise võime oleks võimalikult suur ja omaksid kiiret kasvuaega ning spetsiifilisust fenoolsetele ühenditele. Seega valiti kultuurideks heterotroofsed aeroobid, mis on võimelised kiiresti omandama kergesti lagundavaid orgaanilisi saasteaineid.

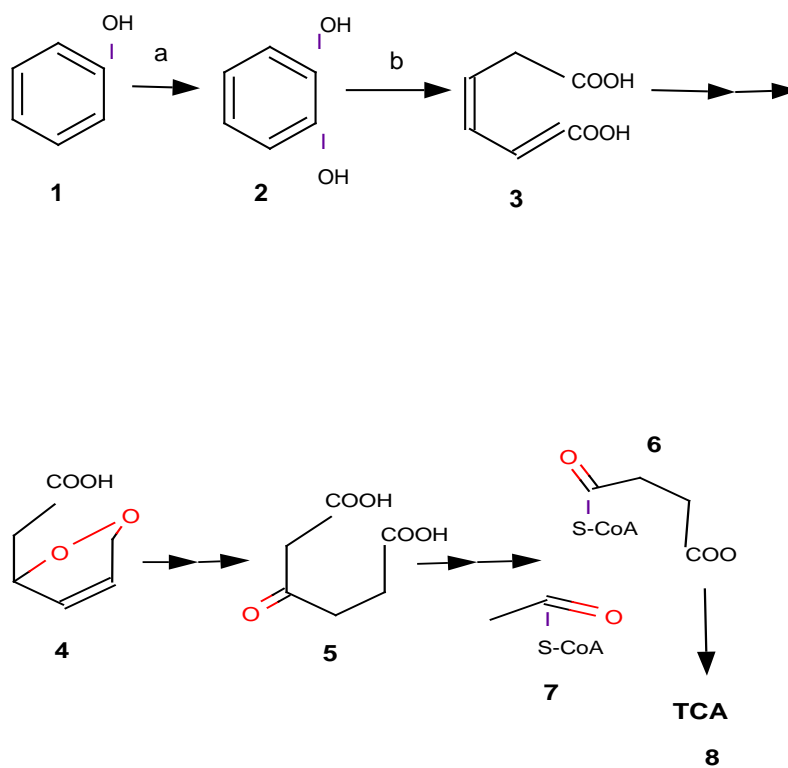
Pseudomonas putida P67.2 pulkbakter, kes kasutab energia allikana suhkruid nagu glükoos, fruktoos, ksüloos, lisaks erinevaid alkohole ja orgaanilisi happeid. Omab oksüdatsiivset metabolismi rada.

Pseudomonas fluorescens P75 on samuti oksüdatiivne pulkbakter, mis kasutab energia ja süsiniku allikana alkohole, suhkruid (nt glükoos, fruktoos, ksüloos) ja orgaanilisi happeid. Sarnaselt *Pseudomonas putida P67.2*-ga on nad võimelised lagundama tsüklilisi ühendeid, nende seas fenole, mis tõttu on neid edukalt kasutatud BHT–mikroobsensorites [40].

Escherichia coli R17.1.3 on kääritaja pulkbakter, kelle kasutab energia allikaks glükoosi, fruktoos, ksüloosi, mannitooli ning erinevalt teistest on võimeline lagundama laktoosi.

Tööks valiti tüved, mis testitavates tingimustes olid kiire kasvuga. Tüvede P75 ja P67.2 fenoolilagundamisvõimet oli eelnevalt testitud Petri tassidel minimaalsöötmel, kus ainsa süsiniku ja energiallikana kasutati 2,5 mM fenooli lahust. Kasvu hinnati külvijoone paksuse alusel. Biomassi moodustumise võime näitab süsinikuallika kasutamist antud tingimustel. Kiire biomassi moodustumise võime eelduseks on aktiivse ensüümaparaadi esinemine, mis on biosensoris substraatidele kiiresti reageerimise vajalikuks tingimuseks. Samuti on oluline erinevate süsinikeallikate kasutamise võime, mis näitab ensüümide laia substraadispetsiifilisust ja võimaldaks erinevate heitvete BHT väärtuse hindamist.

Fenooli metabolismi skeem on esitatud joonisel 4 [52]. *Ps. p.* kasutab aromaatsete ühendite nagu fenool vms lagundamiseks nn. perifeerseid ensüüme, mis muudavad väga paljud erinevad aromaatsed ühendid mingiks tsentraalseks vaheproduktiks, mis lagundatakse edasi juba üldistes katabolismi radades. Fenooli lagundamise esimeses etapis katalüüsib fenooli monooksügenaas fenoolist katehhooli. Järgnev oksüdatsioon läheb mööda orto-rada, mille käigus tekkinud produktid lagundatakse edasi tsitraaditsüklis [53].



Joonis 4. Fenooli lagundamise skeem mikroobides [52].

1- Fenool, 2- katehhool, 3- cis, cis mukonaat, 4- β -ketoadipaate enool-laktoon, 5- β -ketoadipaate, 6- suktsinüül CoA, 7- Atsetüül CoA, 8- tsitraaditsükkel

2. Eksperimentaalne osa

Antud magistritöö eksperimentaalne osa koosneb tinglikult kahest etapist. Töö esimeses pooles keskenduti mikroorganismide (spetsiifilisele) kasvatamisele ja uurimisele ning teises osas teostati konstrueeritud mikroobsensorite kalibreerimine ja biokeemilise hapnikutarbe (BHT) mõõtmised reaalses heitvetes.

2.1. Töös kasutatud reaktiivid ja kemikaalid

Bakterite kasvatamisel kasutatud LB söötmelahus koosneb järgmistest komponentidest:

Tabel 2. Luria-Bertani (LB) sööde (1000ml destilleeritud vee kohta)

Aine nimetus	Kogus (g)
Trüptoon	10
Pärmiekstrakt	5
NaCl	5
Agar*	15

* agar lisatakse tardsöötme saamiseks

Lahjenduskülvi lahjenduslahuseks kasutati 0,1% sisaldavat Tween 80 füsioloogilist lahust.

Bakterite pesemiseks ja säilitamiseks kasutati fosfaatpuhvrit (pH=6,86), mille koostises on järgmised reaktiivid:

Tabel 3. Fosfaatpuhvri koostis.

Aine nimetus	Kogus 1 liitris dest. vees
Na_2HPO_4	6,90 g/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7,04 g/l

Mikroorganismide immobiliseerimiseks kasutatud lahus valmistati agarosist, (type I-A: Low EEO, Sigma) puhverlahusest (koostis tabel 3.) ja bakterite suspensioonist.

Töös kasutatud kalibratsioonilahuse koostis on tabelis 4.

Tabel 4. Biosensori kalibratsioonilahusena kasutatud OECD sünteetilise heitvee koostis [54].

Aine nimetus	Kontsentratsioon (g/l)
Pepton	0,16
Lihaekstrakt	0,11
Karbamiid	0,03
K_2PO_4	0,028
NaCl	0,007
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002

Fenoolsete heitvete kombineerimiseks kasutati OECD sünteetilist heitvett ja fenooli (Molecular Biology grade, IBI).

2.2. Kasutatud aparatuur

Mikroorganismide mikromorfoloogiliste tunnuste hindamiseks vaadeldi tüvesid mikroskoobiga Olympus BH2-B130 (Olympus Europa Holding GmbH).

Kasvatatud bakterite pesemiseks ning söötmelahusest eraldamiseks kasutati tsentrifuug Jouan CR3.

Rakkude arvukuse ja kasvufaasi hindamiseks mõõdeti spektrofotomeetriga Pharmacia suspensiooni optilisi tihedusi lainepikkusel 590 nm.

Mikroorganismide puhtuse kontrolliks vaadeldi mikroobide mikromorfoloogiliste tunnuste hindamiseks tüvesid mikroskoobiga Olympus BH2-B130 (Olympus Europa Holding GmbH).

Magnetsegajat KEBO-LAB MR 2002 kasutati tagamaks hapniku ja lisatava substraadi ühtlast kontsentratsiooni uuritavas lahuses.

Hapniku kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati Clarki tüüpi hapnikandurit CelloX 325 (WTW, Saksamaa) ja signaali registreerimiseks mõõturit InoLab 740 (WTW, Saksamaa).

Katsetes kasutatud nõusid ja vahendeid puhastati mustusest ultrahelivanniga Sonica Mod 1200 MH (Sonic, Itaalia).

2.3. Mikrobioloogiline materjal

Töös kasutatud *Pseudomonas putida* 67.2 ja *Pseudomonos fluorescens* P75 ja *Escherichia coli* R17.1.3 on loodusliku päritoluga magevee bakterid, mis isoleeriti Raadi järveveest ja identifitseeriti 16S rRNA geeni nukleotiidsel järjestusel Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudi teaduri Ene Talpsepa poolt.

2.3.1. Bakterikultuuride tüvede kasvatamine puhtuse kontrolliks ja immobiliseerimiseks

Bakterite kasvatamine toimus Tartu Ülikooli Tehnoloogis Instituudis Ene Talpsepa juhendamisel. Bakterid kasvatati kas Luria-Bertani (LB) vedel- või tardsöötmetel (vt punktis 2.1. tabel 2) temperatuuril 30 °C. Vedelsöötmes inkubeeriti kultuure loksutil aereerides (180 p/min) ja tardsöötmetel termostaadis Petri tassidel termostateerides.

Kuna loodusest eraldatud isolaadid ei pruugi olla ühe ja sama tüve järglaskonnast, siis kontrolliti iga kultuuri puhtust nii makro kui ka mikromorfoloogiliste bakteritunnuste alusel. Selleks külvati bakterid eelnevalt ultraviolettkiirgusega steriliseeritud laminaarboksi all 2,5 ml-sse LB vedelsöötmesse. Bakterid kasvatati loksutil temperatuuril 30 °C 24 tundi aereerides aeroobsetes tingimustes. Järgnevalt tehti detsimaalsete lahjenduste rida arvestades, et rakkude arvukus jääks vahemikku 10^{-2} kuni 10^{-7} rakku/ml. Lahjendusveeks kasutati 0,1%-st Tween 80 füsioloogilist lahust. Lahjendustest rakkude arvukusega 10^{-5} kuni 10^{-7} r/ml külvati 100 µl suspensiooni pindkülvil meetodil LB tardsöötmele ning jäeti nädalaks kasvama. Võeti 100 µl baktereid ja 900 µl Tweeni lahust, segati korralikult segajal Vortex (Heidolph Reax) Järgmise lahjenduse saamiseks võeti eelmisest lahjenduslahusest 100 µl bakteried ning lisati uuesti 900 µl Tweeni lahust, sama skeemi kohaselt valmistati kõik vastavad lahjendused.

Makromorfoloogiliste tunnuste kontrollimiseks hinnati kolooniaid, veendudes kolooniate kuju sarnasuses. Rakkude mikromorfoloogilisi tunnuseid hinnati mikroskoopi kasutades. Rakkude värvimiseks kasutati grammi järgi värvimise meetodit. Mikroskoopimine viidi läbi 1000 kordse suurendusega, õliimmersioonsüsteemis ja veenduti kultuuri puhtuses.

Immobiliseerimiseks vajamineva bakterimassi saamiseks tehti esmalt eelkülv. Selleks külvati bakterid 1,5 ml LB vedelsöötmesse, iga kultuuri kohta kahes paralleelis. Külvatud bakteried kasvatati 12 tundi ülaloodud tingimustel. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakuksuspensiooniga inokuleeriti kahes paralleelis 50 ml-t LB vedelsöödet. Rakkude edasine kasvatamine toimus 8 tundi ülaloodud tingimustel. Rakususpensiooni kasvu kasvufaasi hindamiseks mõõdeti suspensiooni optilisi tihedusi spektrofotomeetriga lainepikkusel 590 nm. Ensüümide kõrge aktiivsuse tagamiseks kasvatati rakke eksponentsiaalse faasi viimasesse kolmandikku

jõudmiseni (*Ps. p.* OD₅₉₀=5,5; *Ps. fl.* OD₅₉₀=4,6) ja koguti rakud tsentrifuugides 15 minuti jooksul kiirusel 4000 (p/min) temperatuuril 4-11 °C. Söötmelahus dekanteeriti ning rakumassi pesti puhastamise eesmärgil 2 korda 10 ml-i fosfaatpuhvriga (pH = 6,86) ja tsentrifuugiti uuesti 15 minutit 4000 p/min.

2.3.2. Mikroorganismide immobiliseerimine

Mikroorganismidega membraanide valmistamiseks lahustati 180 g agarooši 7,5 ml-s fosfaatpuhvris (pH = 6,86) kuumutades. Agaroori lahus jahutati seejärel aeglaselt temperatuurini ~ 45 °C, seejärel lisati 800 µl bakterite suspensiooni. Suspensiooni segati ühtlaseks massiks ning saadud segu kanti kindla paksusega (800 µm) kettakujulisele (polüpropüleen, InterNet) võrgule. Ühtlase paksusega kihi saavutamiseks asetati membraanid eelnevalt kahe klaasplaadi vahele kuni püsiva geelikihi moodustumiseni. Biomembraane säilitati fosfaatpuhvris (pH = 6,86) külmkapis temperatuuril 4 °C.

2.3.3. Eksperimendi meetodika

BHT mõõtmisel kasutati Clark'i tüüpi hapnikuandurit Cellox 325 ja signaali detekteerimiseks mõõturit InoLab 740.

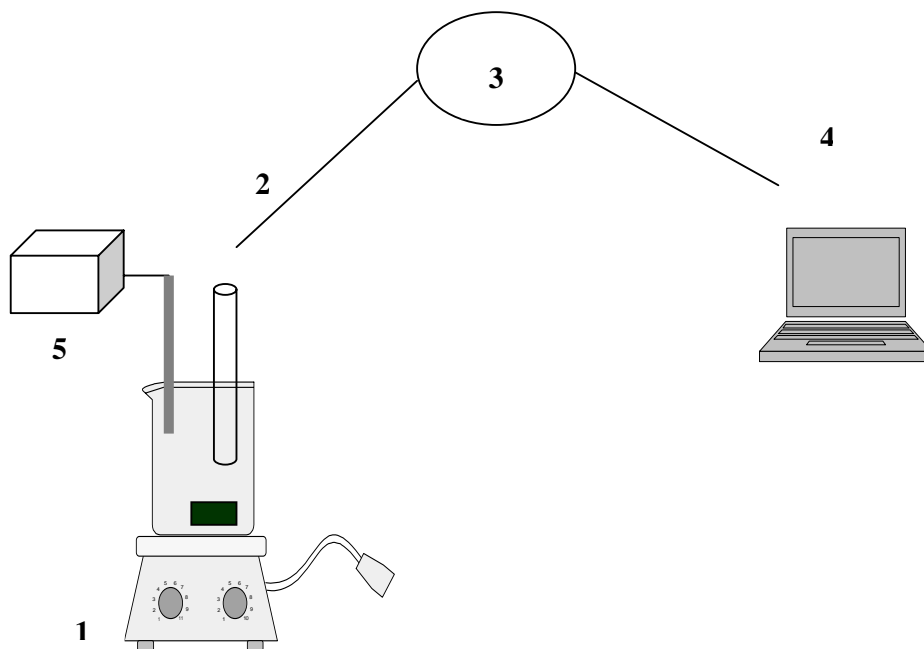
Eksperimendid teostati toatemperatuuril (23 ± 2 °C) 100 ml keeduklaasis 50 ml fosfaatpuhvris. Uuritavat lahust aereeriti pidevalt pumbaga ning segati magnetsegajal.

Kalibratsioonilahusena kasutati OECD sünteetilist heitvett (10 korda kangem kui lahus koostisega punkt 2.1. tabel 4), et lisatavad substraadi kogused mõõtelahusele oleksid väiksemad. OECD sünteetilise heitvee BHT₇ väärtus on kirjanduse andmetel ~2000 mg/l. Töös kontrolliti seda väärtust tehes kalibratsioonilahusega standartne BHT₇ analüüs, mis andis BHT ~1780 mg/l, see jääb lubatud vea piiridesse (15-20%).

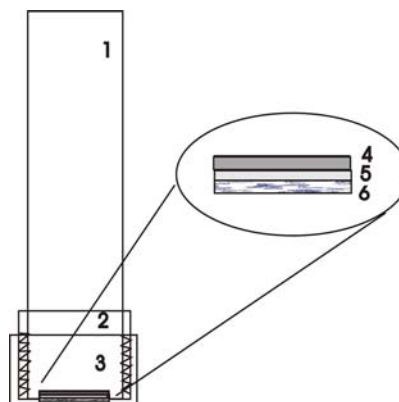
Biosensori väljundsignaali muutust uuriti erinevatel substraadi kontsentratsioonidel statsionaarse oleku ehk lõpp-punkti mõõtmismeetodil. Esiteks oodati sensori signaali stabiliseerumist eelnevalt aereeritud puhverlahuses, misjärel lisati mõõtelahusele vastav kogus substraati ning jälgiti hapniku kontsentratsiooni muutust ajas kuni stabiilse näidu püstitumiseni. Sama skeemi kohaselt lisati samasse mõõtelahusesse eelnevalt arvatud kogus substraati iga uue BHT kontsentratsiooni saamiseks. Mõõtmistest koostati kalibreerimisgraafik – normaliseeritud stabiliseerunud väljundsignaali muutus algkontsentratsioonist sõltuvus substraadilahuse BHT –st.

Järgnevalt uuriti mikroobsensorite käitumist kombineeritud heitvetes ja fenoolis ning saadud sensor BHT võrreldi BHT₇ testi väärtustega.

Eksperimendis kasutatud mõõtmisüsteemi näitlik skeem on joonisel 5. Siinkohal tooks esile hapniku andurile kohandatud spetsiaalselt otsikut, mis annab võimaluse kiiresti ja käepäraselt vahetada erinevate kultuuridega membraane ning muudab seeläbi biosensori käsitlemise kergemaks ja efektiivsemaks.



A



B

Joonis 5. (A) Eksperimendis kasutatud mõõtesüsteem, kus 1- magnetsegaja, 2 – biosensor, 3- mõõtur InoLab 740, 4-arvuti (andmete registreerija), 5- pump. (B) Biosensori joonis, kus 1– Clarki tüüpi hapnikuandur Cellox 325, 2- otsiku kinnitus õlg, 3- otsik, 4- katood, 5- poolläbilaskev Teflon, 6- immobiliseeritud bakteritega membraan.

3. Tulemused ja arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida võimalikult paljusid bakterkultuure ning nende sobivust poolspetsiifilise BHT-biosensori jaoks.

Töö esimeses pooles kontrolliti *Ps. p.* hapnikutarbe aktiivsust olenevalt kasvufaasist ning konstrueeriti Clarki tüüpi hapnikuanduri baasil *Ps. p.* sensor, mille iseloomustamiseks vaadeldi erinevaid sensori karakteristikuid. Töö teises pooles viidi mikroobsensoriga läbi mõõtmised erinevates heitvetes ning võrreldi teistel kultuuridel põhinevate mikroobsensoritega.

Biosensori väljundsignaali sõltuvust substraadi kontsentratsioonist uuriti statsionaarse lõpppunkti meetodil. Substraadi kontsentratsiooni suurendades sensori signaali sõltuvus kontsentratsioonist väheneb ja väljundvool saavutab minimaalse väärtuse. Suurematel substraadi kontsentratsioonidel toimub baktermembraanis intensiivne toitainete lagundamine, mille tõttu väheneb katoodini jõudva hapniku hulk ja biosensori väljundsignaal läheneb nullile. See asjaolu on tingitud hapniku difusiooni limitatsiooniga mõõtmisprotsessis.

Andmete töötlemisel kasutati standardset andmetöötlusprogrammi Microsoft Excel ja GraphPad Prism 4.

Mikroobsensorite erinevate graafikute K_m -de ja lineaarse ala tõusude võrdlusest selgus, et need ei ole ühes suunas muutuvad. Kui K_m -d on ühes suunas muutuvad, siis peaksid ka graafikute tõusude puhul olemas samasugune vastavus. Seletada saab seda graafikute erinevate kujudega. Mida mittelinearsem on substraadi kontsentratsiooni ja sensori signaali vaheline sõltuvuse graafik, seda enam vastab antud kõver Michaelis-Menteni võrrandile (vt võrrand 8). Kuid mida määravamaks saab difusiooniline taksitus, seda pikemaks muutub lineaarse ala ulatus ning seda lineaarsem on vastava graafiku kuju. Kuna antud töös esines mõlemat tüüpi kujudega graafikuid, siis kasutati mikroobsensori tundlikkuse iseloomustamiseks vastavate graafikute lineaarsete alade tõuse.

Mikroobsensorite kasutatavuse selgitamiseks võrreldi uuritud sensorite eksperimentaalseid väärtusi standartse BHT₇ testi tulemustega. Ideaalses olukorras oleksid väärtused identsed, kuid enamasti mikroobsensor alahindab BHT väärtus. Mikroorganismid ei lagunda nii lühikese mõõtmisajaga erinevaid polümeere ning seega anna sensor ainult kergesti ja kiiresti

lagundatavate ning omistatavate ühendite poolt tekitatud signaali. Seega võeti BHT määramisel lubatud veaks 20 %, mis on standardse BHT₇ testi piirveaks.

3.1. *Ps. putida* P67.2 kasvukõver

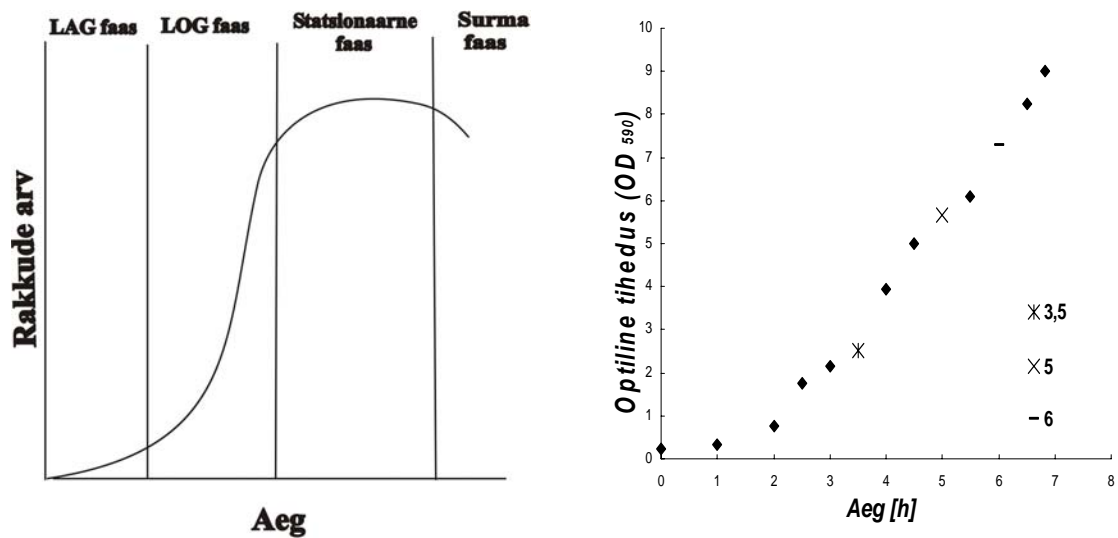
Kasutades biosensori äratundmissüsteemina bioloogilise materjalina bakter kultuure, tuleb olla kindel, millise kasvufaasi ja optilise tiheduse juures baktereid koguda ja immobiliseerida. Tavaliselt kasutatakse kogumishetkena kasvukõvera logaritmilise faasi 2/3-u (Joonis 6 A.), kuna mikroobide ensümaatiline aktiivsus on siis kõige kõrgem. Analoogne kasvukõver võeti kontrolli mõttes ka *Ps. p.* jaoks, vastav kõver on toodud joonisel 6 B.

Esmalt tehti vajaliku baktermassi saamiseks eelkõlv analoogiliselt punktis 2.3.1. kirjeldatud viisil. Peale 12 tundi kasvatamist inokuleeriti bakterite suspensioon edasi 500 ml-sse LB vedelsöötmesse, kus toimus edasine kasvatamine samadel tingimustel. Järgnevalt võeti iga tunni, hiljem iga poole tunni tagant bakter suspensiooni proov ning mõõdeti selle optilist tihedust.

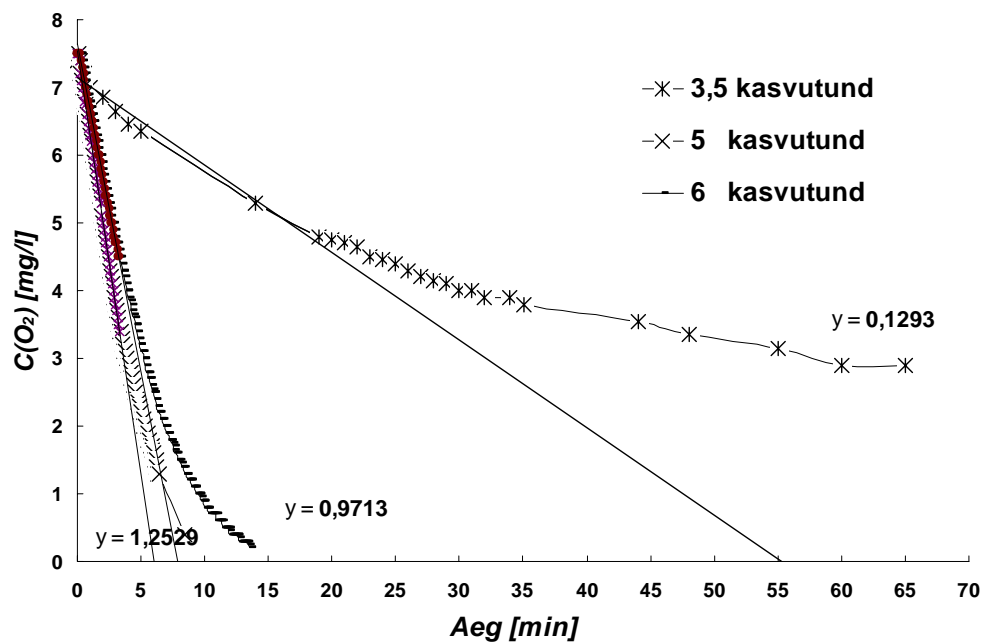
Paralleelselt antud kasvukõvera võtmisega teostati esmakordselt katse, millega tehti samaaegselt kindlaks ka hapnikutarbimisvõime sõltuvalt kasvutunnist. Selleks koguti 1 ml kasvatatavat bakter suspensiooni 3,5-1, 5-1 ja 6-1 kasvutunnil ning tsentrifuugiti. Saadud baktermass lisati otse lahusesse, kus sisaldus sensori kalibratsiooni lahuseks kasutatavat OECD sünteetilist heitvett (Kalibratsioonilahusest tehti 400 kordne lahjendus). Samaaegselt alustati Clark'i tüüpi hapnikuanduriga CellOx 325 hapniku sisalduse muutumise jälgimist antud lahuses.

Kolmel uuritud aja hetkel saadud tulemused on toodud joonisel 7. Kui 3,5 kasvutunnil võetud prooviga kulus hapniku sisalduse 0-i jõudmiseks ligikaudu tund aega, siis 5-1 ja 6-1 tunnil võetud proovidel puhul kõigest 10 minutit. Vastavate graafikute tõusude võrdlus näitab, et aktiivseimat käitumist substraadi suhtes näitasid bakterid 5 kasvutunnil (tõus =1,25) OD₅₉₀ = 5,5 juures.

Esmakordselt labiviidud katse on oluline kinnitamaks *Ps. p.* ensümaatilist aktiivsust log faasi 2/3 peal.



Joonis 6. (A) Mikroobide kasvukõver, (B) *Ps. p.* kasvukõver



Joonis 7. *Ps. p.* hapnikutarbe kiiruse sõltuvus asukohast kasvufaasis

3.2. Mikroobsensori iseloomustamine

3.2.1. Mikroobsensori signaali vaste

Biosensori väljundsignaali sõltuvust substraadi kontsentratsioonist uuriti statsionaarse lõpp-punkti meetodil. Substraadi kontsentratsiooni suurendades sensori signaali sõltuvus kontsentratsioonist väheneb ja väljundvool saavutab minimaalse väärtuse. Suurematel substraadi kontsentratsioonidel toimub biomembraanis intensiivne toitainete lagundamine, mille tõttu väheneb katoodini jõudva hapniku hulk ja biosensori väljundsignaal läheneb nullile. See asjaolu on tingitud hapniku difusiooni limitatsiooniga mõõtmisprotsessis.

Stabiliseerunud biosensori signaali püstitamiseks kulus aega 15 – 45 minutit, olenevalt BHT väärtusest ning mikroorganismide valmisolekust analüüsiks.

Madalaim uuritud kontsentratsioon, mis andis arvestatava muutuse substraadile oli BHT = 5 mg/l, määramispiir jäi alla selle väärtuse.

3.2.2. Mikroobsensori signaali taastumine

Taasteaeg on aeg, mis kulub sensoril algnäidu taastumiseks peale eksperimenti. Antud töös uuriti biosensori signaali taastumist lähemalt, kuna mitte ühegi kasutatud kultuuriga ei õnnestunud mõõtmisi läbi viia enne 1-2, enamus kordadel mitte enne 4-5 päeva, kuigi kirjanduses leiduvate andmete põhjal on statsionaarse meetodi taasteajaks pakutud 15-60 min [9; 44].

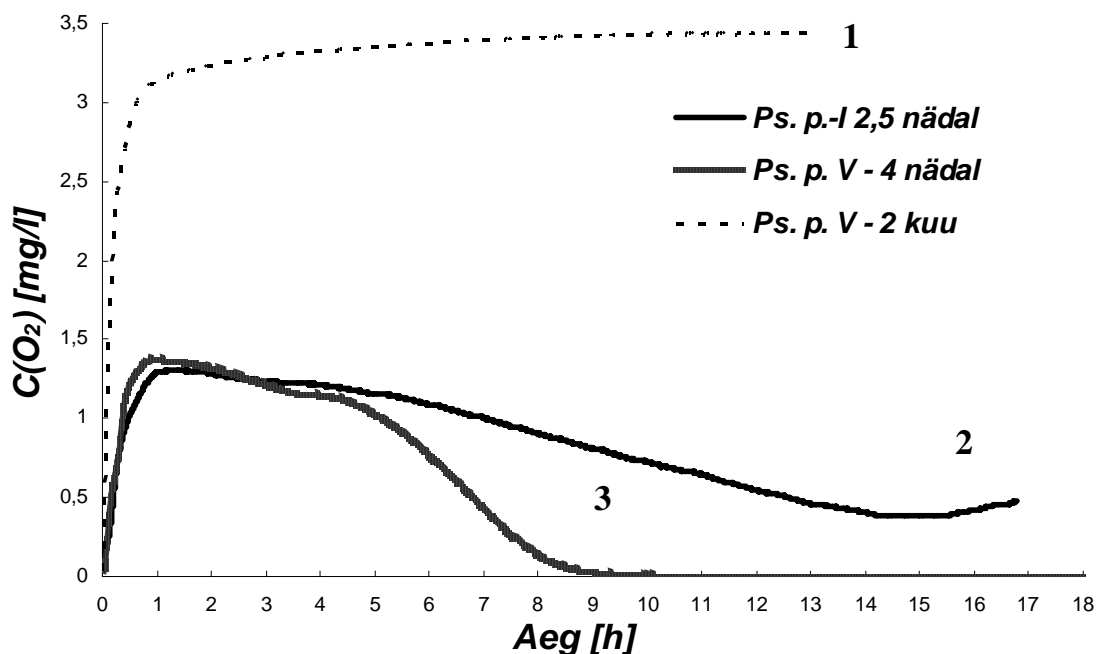
Selleks viidi peale eksperimenti biosensor vastava membraaniga eelnevalt aereeritud puhvrissse ning jälgiti biosensori signaali taastumist ~ 20 tunni jooksul. Uuriti kahte erinevat *Ps. p.*-ga partiid, millest ühega õnnestus kokku töötada 2,5 kuud. Enamus juhtudel nägid taastumisgraafikud välja joonisel 8 kõvera 1 toodud kujul, kuid mõlema partii puhul saadi ootamatute „maksimumidega” kõveraid nagu joonisel 8 (kõverad 2 ja 3) näha võib.

Kahe maksimumiga taastumiskõverad vastavad sellistele mõõtmistele, kus substraadist sõltuvuse mõõtmine ise võttis aega ligikaudu 5 tundi erinevalt tavaliselt kulunud 3-st tunnist.

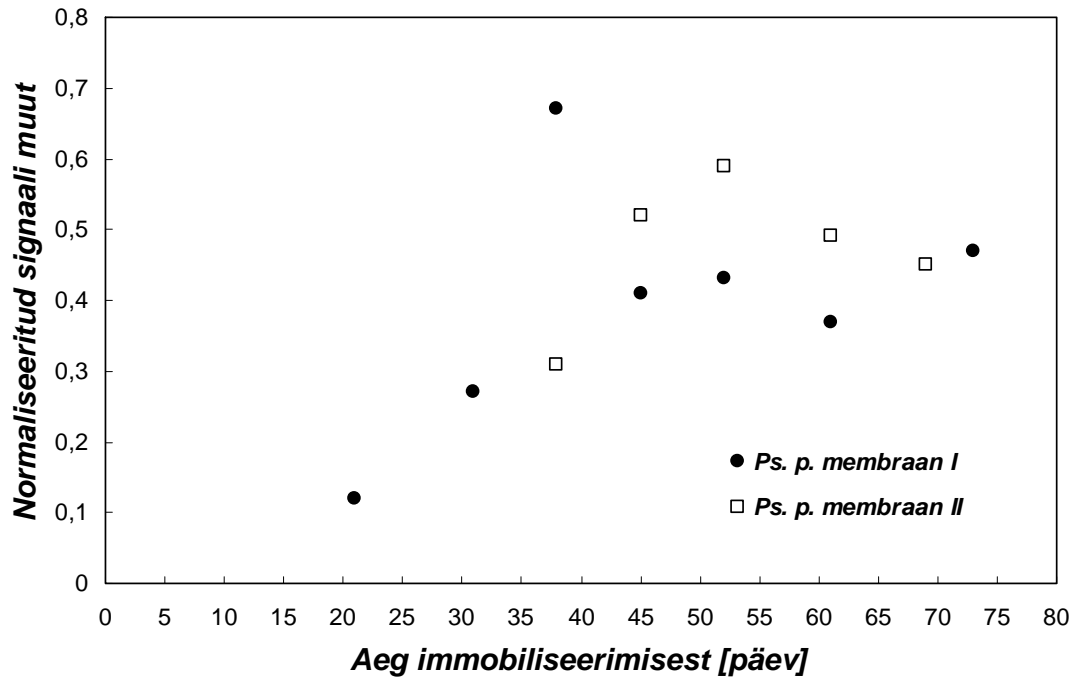
Sellist nähtust võib seletada bakterite antud hetkel sisemistele energia allikate olemasolule, millest on tingitud ka aeglasem reageerimine substraadile. See omakorda viitab asjaolule, et selleks hetkeks ei ole mõõtmisstabiilsus täielikult saavutatud, arvestades seda, et hiljem olid antud membraanid kasutuskõlblikud nii kalibratsioonilahuse kui ka heitveega mõõtmiste jaoks. Parim stabiilsus biosensorite jaoks saavutati peal 1 kuu möödumist, kui mõõtmisi oli võimalik teha iga 3 päeva tagant. Seda toetab ka joonise 8 kõverate 2 ja 3 võrdlus, kust on näha, et 4-l nädalal on taastumine 6 tunni võrra lühem.

Kuigi sellise staadiumi esinemine on mõõduv, aitaks ilmselt peale immobiliseerimist pikem adapteerimisperiood seda lühendada või lausa ennetada.

Joonisel 9 on toodud *Ps. p.* sensori 2 paralleel membraani normaliseeritud signaali muudud ajas BHT = 25 mg/l juures. Antud jooniselt on tuleb välja, et membraanid on saavutanud oma parima mõõtmisstabiilsuse kuul mõõtmiskuul.



Joonis 8. *Ps. p.* taastumisgraafikud peale esimest maksimumi



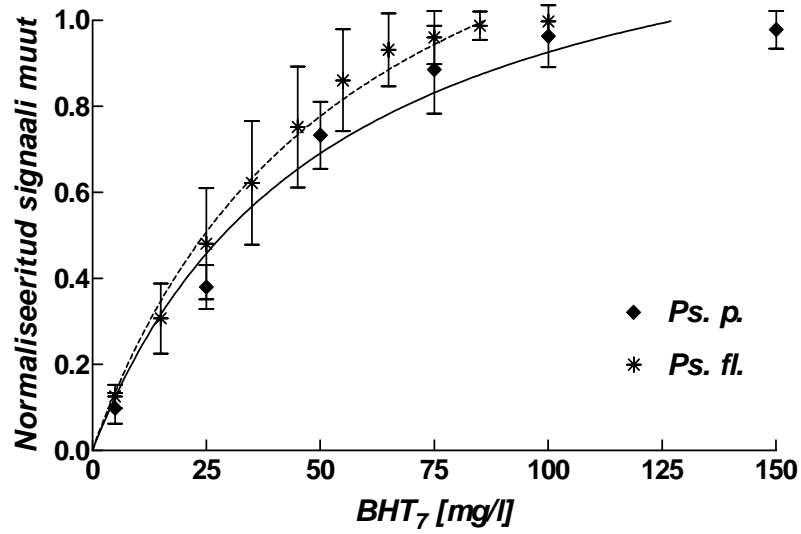
Joonis 9. *Ps.p.* sensori 2 paralleel membraanide normaliseeritud signaali muutude muutumine ajas.

3.3. *Ps. p.* sensoriga mõõtmised erinevates heitvetes

Konstrueeritud *Ps. p.* sensori keskmistatud kalibratsioonikõver on toodud joonisel 10. Paralleelsete mõõtmistulemuste kokkulangevus oli vahemikus 2-15%.

Tõhusamaks *Ps. p.* sensori iseloomustamiseks võrreldi seda ühises uurimisgrupi samal ajal samades tingimustes kasvatatud bakteri *Ps. fl.* baasil põhineva sensoriga.

Kuigi *Ps. p.* ja *Ps. fl.* on sarnase substraadi tarbimisega, siis kalibratsiooni graafikute võrdlus tabelis 5 näitab, et *Ps. fl.* on OECD sünteetilisele heitveele märksa tundlikum. Kalibratsioonigraafikute tõusude erinevus on ainult 1 %.



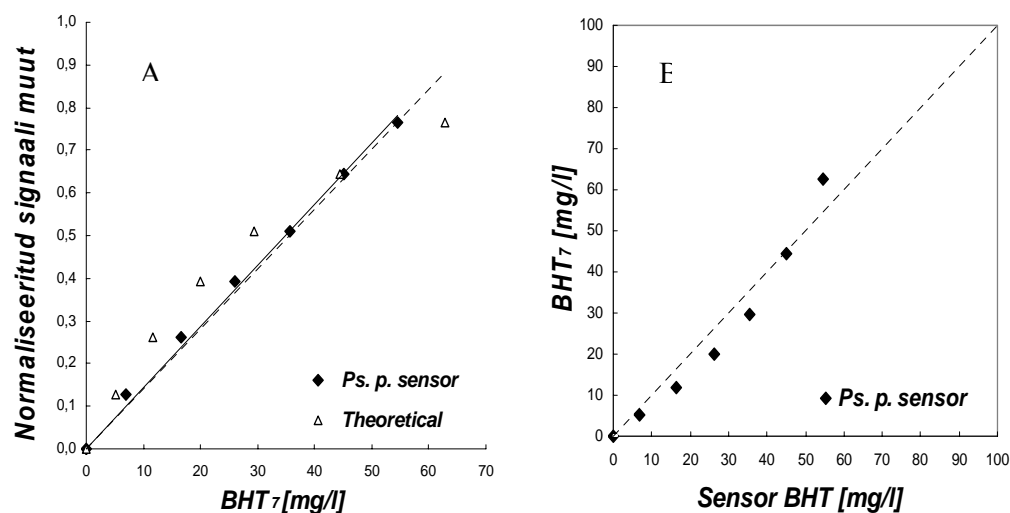
Joonis 10. *Ps. p.* ja *Ps. fl.* sensorite keskmistatud kalibratsioonigraafikute võrdlus

Tabel 5. *Ps. p.* ja *Ps. fl.* sensorite kalibratsioonikõverate tõusud ja lineaarsed alad OECD sünteetilises ja fenoolses heitvees.

	<i>Ps. putida</i> P67.2		<i>Ps. fluorescens</i> P75	
	BHT lineaarne ala [mg/l]	Tõus	BHT lineaarne ala [mg/l]	Tõus
OECD	0 – 50	0,0151	0 - 65	0,0156
OECD + Fenool	0 - 73	0,0136	0 - 89	0,011

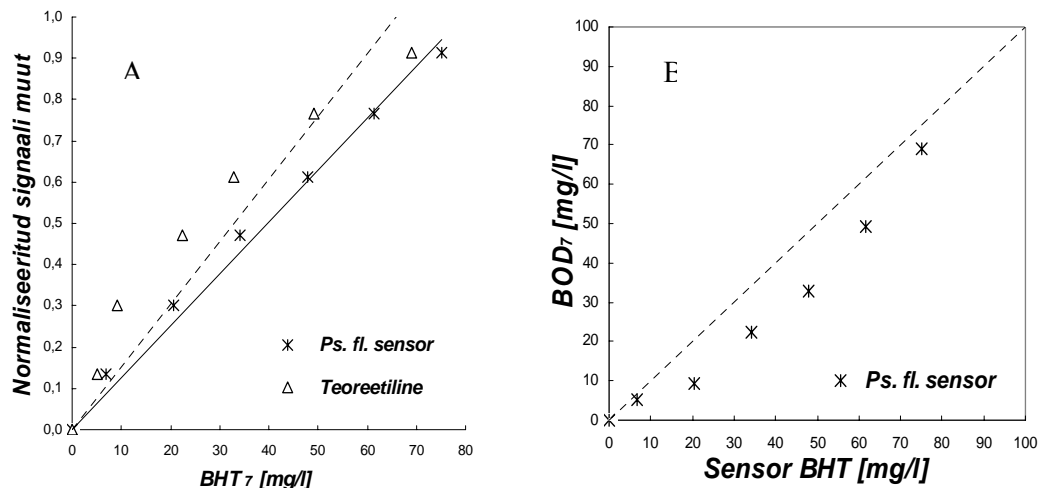
Kuna antud magistritöö eesmärgiks oli leida sobivad kultuurid fenoolse heitvee jaoks, siis oli oluline testida sensorit fenoolseid ühendeid sisaldavas keskkonnas. Selleks kombineeriti OECD sünteetilise heitveega lahuse, mis sisaldas fenooli sellises hulgas, et tema lisatav BHT väärtus kogu lahuse BHT-le (2000 mg/l) oleks 400 mg/l. Kirjeldatud lahus valmistati selleks, et imiteerida heitvett, mis leidub põlevkivi tööstuse piirkonnas.

Nagu jooniselt 11 näha võib alahindab *Ps. p.* sensor BHT väärtust madalatel kontsentratsioonidel, kuid üle BHT = 45 mg/l ülehindab. Kõrvalekalle teoreetilisest väärtusest on vahemikus 1,2-13 % (lineaarse ala piires), mis jääb standardse BHT₇ meetodi lubatud vea piiridesse (20%). Paralleel mõõtmised varieerusid ainult 1-5%.



Joonis 11. (A) *Ps. p.* sensori fenoolse OECD sünteetilise heitveega saadud lineaarse ala võrdlus kalibratsioonikõvera põhjal arvatatud BHT teoreetiliste väärtustega. (B) Sensor BHT kokkulangevus BHT₇ testiga fenoolses heitvees *Ps. p.* sensori korral.

Võrreldud *Ps. fl.* sensori puhul samas fenoolses heitvees saadud tulemuste korral võime näha erinevat pilti (joonis 12.). Erinevalt *Ps. p.* sensorist antud sensor alahindab BHT väärtust kogu lineaarse ala (BHT = 75 mg/l) ulatuses ning kõrvalekalle teoreetilisest väärtusest on alla 20 % alates BHT = 61mg/l. Madalamatel kontsentratsioonidel alahindab sensor teoreetilist väärtust juba üle lubatud piiri (20 %).



Joonis 12. (A) *Ps. fl.* sensori fenoolse OECD sünteetilise heitveega saadud lineaarse ala võrdlus kalibratsioonikõvera põhjal arvatatud BHT teoreetiliste väärtustega. (B) Sensor BHT kokkulangevus BHT₇ testiga fenoolses heitvees *Ps. fl.* sensori korral.

Lisaks viidi *Ps. p.* sensoriga fenooli spetsiifilisuse uurimiseks läbi mõõtmised puhta fenooli lahuses. Selleks teostati 3-l järjestikusel päeval 1 mõõtmine päevas. Peale esimest mõõtmist adapteeriti tundlikkuse parandamiseks ainult *Ps. p.*-ga membraane BHT = 5 mg/l fenooli lahuses, et näha adapteerimise efekti. *Ps. fl.* sensoriga mõõtmine oli nn paralleelkatseks, et võrrelda nende spetsiifilisust enne adapteerimist.

Nagu tabelis 6. toodud vastavate päevade mõõtmiste (graafikute) tõusudest näha võib paranen *Ps. p.* sensori fenooli tundlikkus adapteerimise tagajärjel märgatavalt.

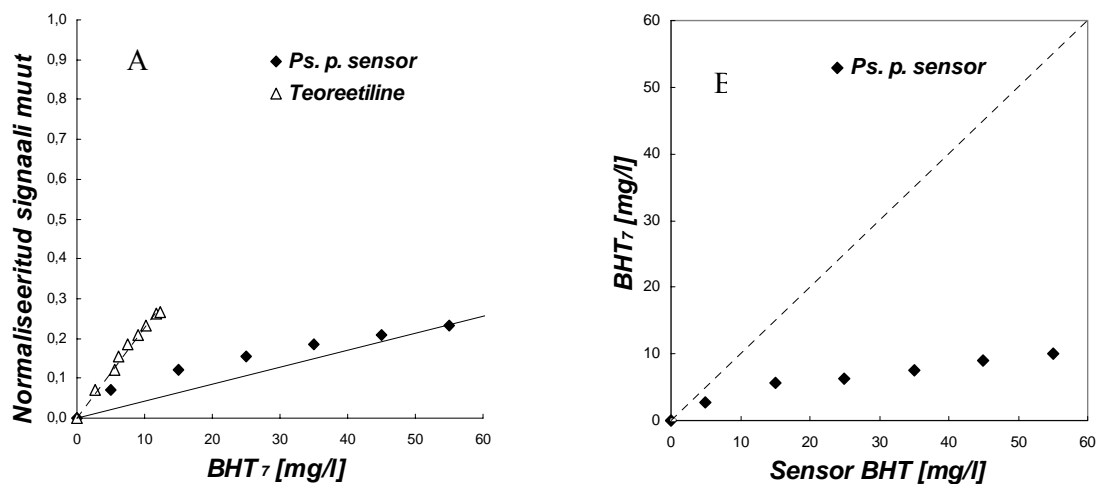
Table 6. Eeltöötlemise efekt *Ps. p.* sensori fenooli tundlikkusele

Päev	Kalibratsiooni kõvera tõus	
	<i>Ps. putida</i>	<i>Ps. fluorescens</i>
1	0,0056	0,0042
2	0,0077	-
3	0,027	-

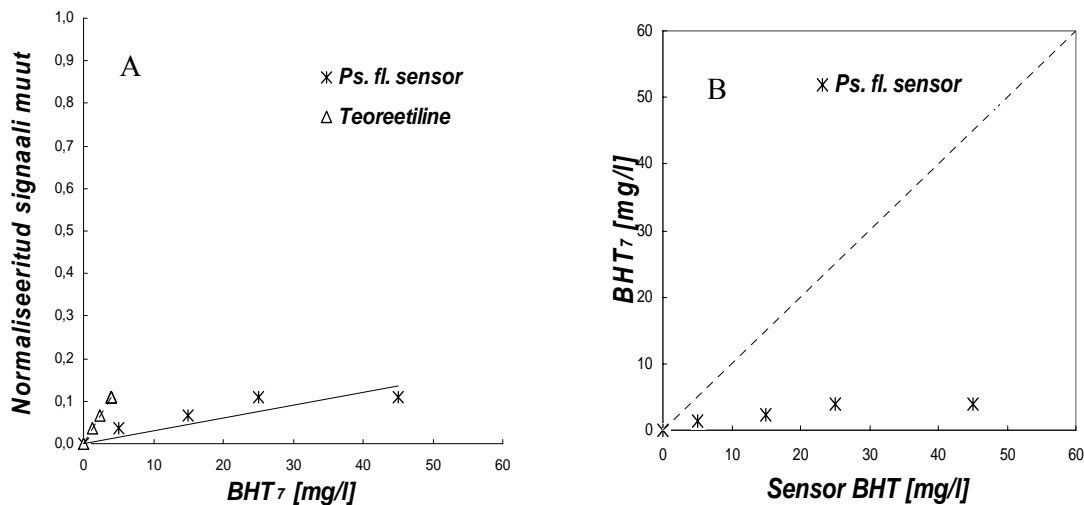
Joonistel 13 ja 14 on toodud mõlemate mikroobsensorite eksperimentaalsete BHT väärtuste kokkulangevus teoreetiliselt arvatud väärtustega ning BHT₇ testi tulemustega.

Hoolimata positiivsest adapteerimise efektis alahindas *Ps. p.* sensor teoreetilist BHT väärtus tugevalt. Madala kontsentratsioonil nagu BHT = 5 mg/l on kõrvalekalle teoreetilisest väärtusest juba 45 % ja BHT = 15 mg/l juures ületab viga lausa 100 %.

3 päevase adaptatsioonitesti tulemused ning asjalolu, et fenooli lagundamisvõimet oli bakteritel eelnevalt ka positiivselt testitud (vt punkt 1.8) lubavad eeldada, et pikemalt fenoolses lahuses *Ps. p.* membraanide adapteerimine annab võimaluse fenooli täpsemaks määramiseks.



Joonis 13. (A) *Ps. p.* sensori fenooli lahuses saadud lineaarse ala võrdlus kalibratsioonikõvera põhjal arvatud BHT teoreetiliste väärtustega. (B) Sensor BHT kokkulangevus BHT₇ testiga fenoolis *Ps. p.* sensori korral.



Joonis 14. (A) *Ps. fl.* sensori fenooli lahuses saadud lineaarse ala võrdlus kalibratsioonikõvera põhjal arvutatud BHT teoreetiliste väärtustega. (B) Sensor BHT kokkulangevus BHT₇ testiga fenoolis *Ps. fl.* sensori korral.

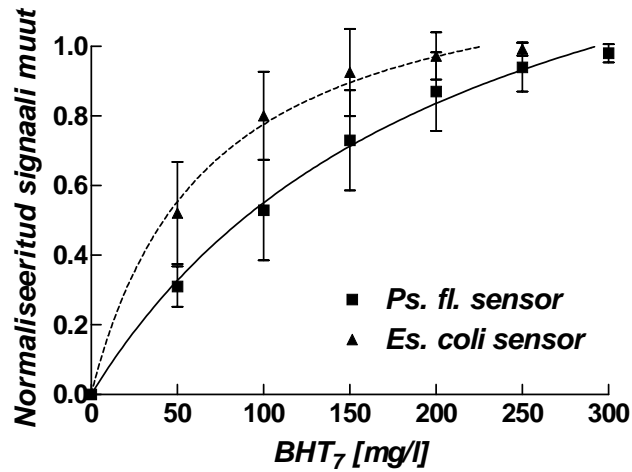
3.4. *Ps. fl.* ja *Es. coli* sensorite võrdlus fenoolse heitvee korral.

Antud magistritöö raames konstrueeriti lisaks *Ps. p.* sensorile ka *Ps. fl.* sensor, mis kalibreeriti samuti OECD sünteetilise heitveega ning lisaks teostati mõõtmised reaalse heitveega, mis pärines Kiviõlist.

Mikroobidel on erinev substraadi tarbimine ning spetsiifilisus erinevatele ühenditele [42], mille illustreerimiseks võrreldi *Ps. fl.* sensori ja ühises uurimisgrupis oleva inimese (Evelin Linde) poolt kasutatud *Es. coli* sensoriga saadud tulemusi samas Kiviõlist pärineva fenoolse heitveega.

Joonisel 15. on toodud võrdluseks mõlemate biosensorite vastavad keskmistatud kalibratsiooni graafikud. On selgesti näha, et *Es. coli* sensor annab võrreldes *Ps. fl.* sensoriga kalibratsioonilahusele tundlikuma vaste (33 % ja 1,49 korda), mida näitavad ka vastavad lineaarsete alade tõusude väärtused tabelis 7.

Ps. fl. sensori paralleelsete mõõtmistulemuste (n=7) kokkulangevus oli vahemikus 10-20 % ning *Es. coli* sensori (n= 5) puhul kuni 25 %.



Joonis 15. *Ps. fl.* ja *Es. coli* sensorite keskmistatud kalibratsioonigraafikute võrdlus

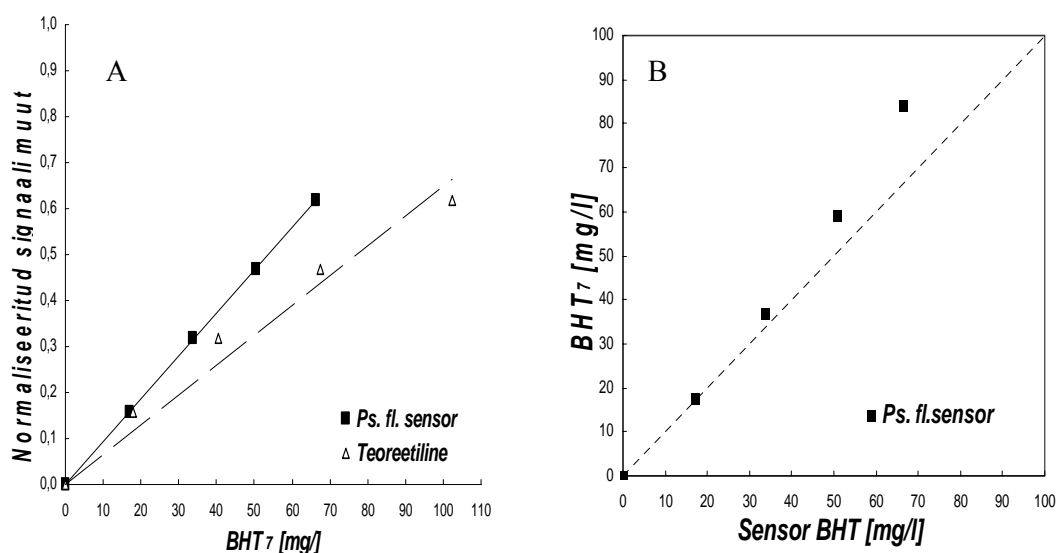
Tabel 7. *Ps. fl.* ja *Es. coli* sensorite keskmistatud kalibratsioonikõverate tõusud ja lineaarsed alad OECD sünteetilises heitvees ja reaalses heitvees.

	<i>Ps. fluorescens</i> P75		<i>Es. coli</i> R17.1.3	
	BHT lineaarne ala [mg/l]	Tõus	BHT lineaarne ala [mg/l]	Tõus
OECD	0-200	0,0047	0-150	0,007
Kiviõli heitvesi	100	0,0096	80	0,0133

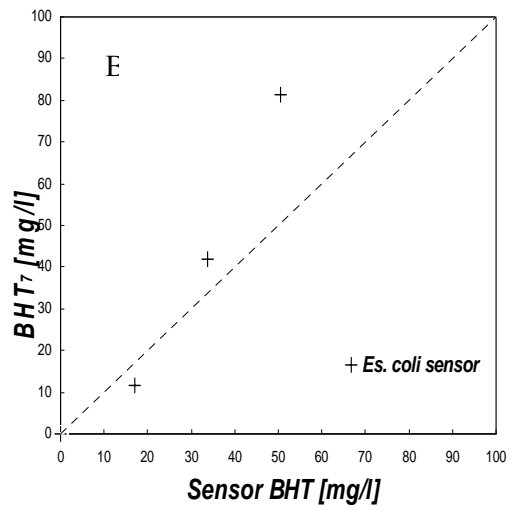
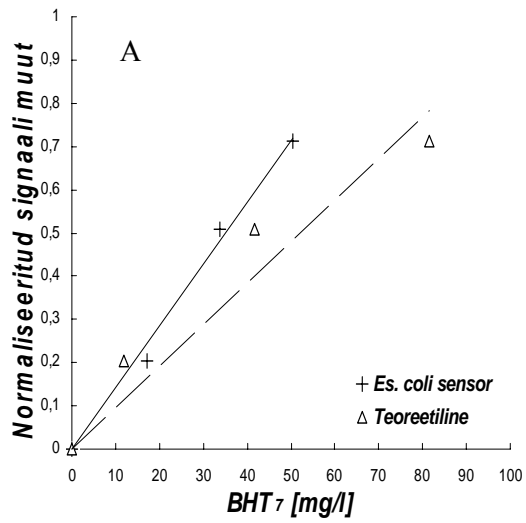
Näitamaks spetsiifilisust fenoolsele heitveele viidi läbi mõdtmised Kiviõlist pärinevas heitvees (BHT₇ = 1721 mg/l) ning saadud tulemusi võrreldi BHT₇ testi väärtustega.

Nagu Joonistelt 16B näha võib annab *Ps. fl.* sensor märgatavalt parema kokkulangevus BHT₇ analüüsiga saadud tulemustega. Kui alates BHT väärtusest 50 mg/l on *Ps. fl.* sensori puhul viga 25 %, siis *Es. coli* sensor annab sama kontsentratsiooni juures veaks juba 37 % (Joonis 17B.). Kuigi *Es. coli* näitab suuremat tundlikkust OECD sünteetilise heitvee suhtes, siis fenoolse heitvete korral on eeldatud madalam spetsiifilisus põhjendatav vastavate ensüümide puudumisega fenoolsete ühendite lagundamiseks. Siit tuleb hästi välja võrreldud bakterite poolspetsiifilisus.

Vastavad paralleel katsed heitvees hälbisid *Ps. fl.* puhul (n=2) ainult 5% (alates BHT = 33 mg/l on viga 25%) kui *Es. coli*-l puhul kuni 30 % (alates BHT = 27 mg/l ülehindab).



Joonis 16. *Ps. fl.* sensor BHT kokkulangevus BHT₇ väärtusega fenoolse heitvee korral



Joonis 17. *Es. coli* sensor BHT kokkulangevus BHT₇ väärtusega fenoolse heitvee korral

Kokkuvõte

Käesolevas magistritöös uuriti *Pseudomonas putida* P67.2, *Pseudomonas fluorescens* P75 ja *Escherichia coli* R17.1.3 kultuuridel põhinevaid mikroobsensorite kasutamist BHT määramisel fenoolsetes heitvetes.

Põhitähelepanu pöörati bakteri *Ps. p.* uurimisele tänu heale fenooli lagundamisvõimele. BHT mikroobsensori bioloogilise materjalina kasutamise sobivuseks kontrolliti tema hapnikutarbe kiiruse olemust asukohast kasvufaasis. *Ps. p.* sensori karakteristikute uurimisel leiti, et mikroobsensori vasteaeg oli 15-45 min. Väga oluline oli topelthaastumiskõverate avastamine, kuna see aitas välja selgitada bakterite stabiilsuse saavutamise hetke. *Ps. p.* sensor saavutas parima mõõtmisstabiilsuse 1 kuu peale immobiliseerimist ning püsis sellisena ka peale 2,5 kuud.

Katsed näitasid, et nii *Ps. p.* kui ka *Ps. fl.* sensori puhul oli OECD sünteetilises heitvees ja fenoolses heitvees viga teoreetilisest väärtusest ainult 1,2-13 %. Hoolimata sellest, et *Ps. fl.* oli kalibratsiooni lahusele tundlikum, näitas *Ps. p.* sensor fenoolse heitvee ja fenooli lahuse korral paremat kokkulangevust.

Mõõtmised *Ps. fl.* ja *Es. coli* sensoriga reaalses heitvees tõid välja kultuuride poolspetsiifilisuse näidates erinevate substraaditarvet sama substraadi korral, kus leidis nii kergemini kui ka raskemini lagundavaid ühendeid.

Kuigi *Ps. p.* sensori eeltöötlemine fenooli lahuses (BHT = 5 mg/l) andis märgatava spetsiifilisuse tõusu oli võrreldes teoreetiliste väärtustega viga 45 % juba väga madalatel kontsentratsioonidel. Sellegipoolest on kogutud info heaks aluseks uurimaks edaspidi võimalusi adaptatsiooni tingimuste parandamiseks ja seeläbi fenooli spetsiifilisuse tõstmiseks.

Kokkuvõttes võib öelda, et mõlemad *Ps. p.* sensor ja *Ps. fl.* sensor on kasutatavad fenoolsete heitvete BHT määramisel.

Summary

Investigation of the usability of bacterial cultures in the semispecific BOD biosensor

Pseudomonas putida P67.2, *Pseudomonas fluorescens* P75 ja *Escherichia coli* RI7.1.3 based microbial sensors were studied and tested in order to develop the semispecific BOD biosensor for phenolic wastewaters.

A special attention was paid on *Ps. p.* thanks to the ability to biodegrade phenol. In order to check the rate of oxygen consumption of the culture, its growth curve was taken.

The basic characteristics of microbial sensor were also studied. The response time was 15-45 min. It was relevant to discover double recovery curves, because it provides us with the information about of microbial sensors condition.

Experiments showed that both bacterial cultures gave good results in OECD synthetic wastewater (used for calibration) and phenol-spiked OECD synthetic wastewater. The deviation from the theoretical value was 1,2-13 % and parallel measurements resulted in 1-5 % deviation from each other. The best stability for measurements was achieved after a month and it remained up to 2,5 month.

Measurements with *Ps. fl.* and *Es. coli* sensors showed different sensitivity to same substrate. Even though in the calibration solution *Ps. fl.* showed higher sensitivity, *Ps. p.* showed better results with phenol-spiked OECD synthetic wastewater and phenol solution. Preconditioning in the low concentration phenol solution of 5 mg/l gave noticeable rise in *Ps. p.* sensor's sensitivity to phenol. Nevertheless, the deviation from the theoretical values was 45% even at very low BOD values of phenol solution. This shows that even more attention should be paid to adaptation and preconditioning of the microbial membranes.

In conclusion it can be said that both bacterial cultures can be used successfully for monitoring of wastewater BOD levels. Preconditioned *Pseudomonas putida* based microbial sensor showed also promise to be used in the phenolic wastewaters of oil shale industry.

Kasutatud kirjandus

1. Handique, J.G., Baruah, J.B., Polyphenolic compounds: an overview, *Reactive Funct Polym.*, 2002, **52**, 163-188.
2. Amalathe, S., Upadhyay, S., Gupta K., V. Spectrophotometric determination of trace amounts of phenol in waste water and biological fluids, *Analyst.*, 1987, **112**, 1463-1465.
3. Liu, J., Mattiasson, B., Microbial BOD sensors for wastewater analysis, *WATER RESEARCH*, 2002, **36**, 3786-3802.
4. Preininger, C., Klimant, I., Wolfbels, O.S., Optival fiber sensor for biological oxygen demand, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1841-1846.
5. Chee, G.-J., Nomura, Y., Karube, I., Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand, *Analytica Chimica Acta*, 1999, **379**, 185-191.
6. Thévenot, D., R., Toth, K., Durst, R., A., Wilson, G., S., Electrochemical biosensors: recomended definitions and classification *Biosensors&Bioelectronics*, 2001, **16**, 121-131.
7. D'Souza, S.F., Microbial biosensors Review, *Biosensors&Bioelectronics*, 2001, **16**, 337-353.
8. Griffiths, D., Hall, G., Biosensors – what real progress is being made?, *TIBITECH*, 1993, **11**, 122-130.
9. Eggins, B., *Biosensors. AnIntroduction*, , Wiley Teubner, 1996, 1-10, 31-35, 133-135.
10. Riedel, K., Renneberg, R., Wollenberg,U., Kaiser, G., Scheller, W. Microbial sensors. Fundamentals and application for process control. *J. Chem. Tech. Biotech.* 1989, **44**, 85-106.
11. Karube, I., Suzuki, M., Microbial biosensors, Biosensors. Practical Approach, ed.Gass, A.E.G., Ox.Univ.Press, 1990, 155-170.
12. Liu, J., Björnsson, L., Mattiasson, B., Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurment, *Biosensors&Bioelectronics*, 2000, **14**, 883-893.

13. Liu, J., Mattiasson, B., Microbial BOD sensors for wastewater analysis, *WATER RESEARCH*, 2002, **36**, 3786-3802.
14. Sakaguchi, T., Kitagawa, K., Ando, T., Murakami, Y., Morita, Y., Yamamura, A., Yokoyama, K., Tamiya, E., Arapid BOD sensing system using luminenscent rekombinants of *Escherichia coli*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **19**, 2, 115-121.
15. Gizeli, E., Lowe, C. R., *Biomolecular sensors*, London, Taylor&Francis, 2002, 49-78.
16. Tampion, J., Tampion, M. D., *Immobilized Cells: Principles and Applications*, Cambridge Studies in Biotechnology 5, Cambridge University Press, 1987, 8-12.
17. Mattiasson, B., *Immobilized Cells and Organells*, Vol. II, ed.Bo Mattiasson, CRC Press, 1983, 95-123.
18. APHA. *Standard methods for examination of water and wastewater*. Washington DC: American Public Health Association Water Works Assotsiation. American Water Environment Federation, 1992.
19. Chan, Chiyui; Lehmann, Matthias; Chan, Kinman; Chan, Puiyee; Chan, Chiwai, Gruendig, Bernd; Kunze, Gotthard; Renneberg, Reinhard, Designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor, *Biosensors&Bioelectronics*, 2000, **15**, 343-353.
20. Gupta, R. S., *Environmental Engineering and Science. An Introduction*, USA, Goverment Institutes, Rockville, MD, 1997, 129-157,229, 266.
21. Gupta, R. S., *Environmental Engineering and Science. An Introduction*, USA, Goverment Institutes, Rockville, MD, 1997, 129-157,229, 266.
22. Karube, I., Tamiya, E., Biosensors for environmental control, *Pure and Appl. Chem.*, 1987, **59**, 4, 545-554.
23. G. Tyler Miller, Jr., *Environmental Science An Introduction*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, 1986, 307.
24. Liu, J., Mattiasson, B., Microbial BOD sensors for wastewater analysis, *WATER RESEARCH*, 2002, **36**, 3786-3802.
25. Sangeetha, S., Sugandhi, M., Murugesan, V., Madhav, M., *Torulupsis candida* based sensor for the estimation of biochemical oxygen demand and its evaluation, *Electroanalysis*, 1996, **8**, 698-702.

26. Wang, J., *Analytical Electrochemistry*, VCH Publishers, Inc, USA, 1994, 138-153.
27. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*, Michelson Laboratory, China Lake, California, 1998, 458-497.
28. Suzuki, H., Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring, *Materials Science & Engineering*, 2000, C12, 55-61.
29. Rastogi, S., Kumar, A., Mehra, N.M., Makijani S.D., Manoharan, A., Gangal, V., Kumar, R., Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand.
30. Yang, Z., Sasaki, S., Karube, I., Suzuki, H., Fabrication of oxygen electrode arrays and their incorporation into sensors for measuring biochemical oxygen demand, *Anal. Chem.*, 1997, **357**, 41-49.
31. Reiss, M., Heibges, A., Metzger, J., Hartmeier, W., Determination of BOD-values of starch-containing wastw water by a BOD-sensor, *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, **13**, 1083-1090.
32. Reiss, M., Heibges, A., Metzger, J., Hartmeier, W., Determination of BOD-values of starch-containing wastw water by a BOD-sensor, *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, **13**, 1083-1090.
33. Kulys, J., Kadziauskiene, K., Yeast BOD sensor, *Biotech. Bioeng.*, 1980, **22**, 221-226.
34. Velling, S., Amperomeetrilises biosensoris kulgevate mittestatsionaarsete protsesside modelleerimine, Magistritöö, Tartu, 2001.
35. Tag, K., Lehmann, M., Chan, C., Measurment of biodegradable substances with a mycelia-sensor based on salt tolerant yeast *Arxula adeninivotans LS3*, *Sensors and Actuators*, 2000, **B:67**, 142-14.
36. Chan, C., Lehmann, M., Tag, K., Measurment of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivotans LS3* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate (PCS) part I: construction and characterization of the microbial sensor, *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, **14**, 131-138.
37. Sakaguchi, T., Kitagawa, K., Ando, T., Murakami, Y., Morita, Y., Yamamura, A., Yokoyama, K., Tamiya, E., Arapid BOD sensing system using luminenscent

- rekombinants of *Escherichia coli*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **19**, 2, 115-121.
38. Sakaguchi, T., Kitagawa, K., Ando, T., Murakami, Y., Morita, Y., Yamamura, A., Yokoyama, K., Tamiya, E., Arapid BOD sensing system using luminenscent rekombinants of *Escherichia coli*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **19**, 2, 115-121.
39. Chee, G-J., Nomura, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., Biosensor for the evaluation of biochemical oxygen demand using photocatalic pretreatment, *Sensors and Actuators*, 2001, B **4034**, 1-6.
40. Suriyawattanakul, L., Surareungachai, W., Stritonkam, P., The use of co-immobilization of *Trichosporan cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 2002.
41. Suriyawattanakul, L., Surareungachai, W., Stritonkam, P., The use of co-immobilization of *Trichosporan cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 2002.
42. Liu, J., Mattiasson, B., Microbial BOD sensors for wastewater analysis, *WATER RESEARCH*, 2002, **36**, 3786-3802.
43. Qiun, Z., Tan, T. C., Response characteristics of a dead-cell BOD sensor, *Wat. Res.*, 1998, **32**, 3, 801-807.
44. Li, F., Tan, T. C., Lee, Y. K., Effects of pre-conditioning and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor, *Biosensors&Bioelectronics*, 1994, 9, 197-205.
45. Tan, T.C., Wu, C., BOD sensors using multi-species living or thermally killed cells of a BODSEED microbial culture, *Sensors and Actuators*, 1990, **54**, 252-260.
46. Alamäe, T., Kull, K., Kõljalg, U., Masso, R., Usatv, M., *Bioloogia gümnaasiumile II osa*, Tallinn, Eesti Loodusfoto, 2000, 33-52, 74-91.
47. Kim, M. N., Park, K. H., Immobilization of enzymes for *Klebsiella* BOD sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, **98**, 1, 1-4.
48. Kim, M.-N., Park, K.-H., *Klebsiella* BOD sensor, *Sensors&Actuators*, 2001, **4030**, 1-6

49. Yoshida, N., Hoashi, J., Morita, T., McNiven, S. J., Nakamura, H., Karube, I., Improvement of mediator-type biochemical oxygen demand sensor for on-site measurement, , 2001, **88**, 269-275.
50. Mottola, H. A., *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, A Wiley-Interscience Publications, USA, 1988, 55-58.
51. Balows, A., *The Prokaryotes*, Vol. 2, Springer-Verlag, New York, 1992, 1387, 1663-1666.
52. Kivisaar, M., *Dissertationes Biologicae Universitatis Tartuensis*, Tartu, 1993.
53. Molekulaarse mikrobiöökoloogia loengu magistrantidele. Biodegradatsioon, 2006.
54. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), *Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewares*, 1986, ed.16th , 525-531.