

TARTU ÜLIKOOL
Loodus-ja tehnoloogiateaduskond
Füüsikalise keemia instituut
Kolloid-ja keskkonnakeemia õppetool

Evelin Linde

BAKTERKULTUURIDE *ESCHERICHIA COLI* JA *RAOULTELLA TERRIGENA*
SOBIVUSE UURIMINE POOLSPETSIIFILISE BHT MIKROOBANDURI
KONSTRUEERIMISEKS PIIMATÖÖSTUSELE

Magistritöö

Juhendaja: Timo Kikas Ph.D

Tartu 2008

SISUKORD

Sissejuhatus	3
1. TEOREETILINE SISSEJUHAUS	5
1.1. Piimatööstuse heitveed kui orgaanilise reostuse põhjustajad.....	5
1.2. Lühiülevaade biosensoritest	7
1.3. Mikroobsensorid ja nende omadused.....	10
1.3.1. BHT-mikroobsensorid, sensorite spetsiifilisus	12
1.3.2. Mikroorganismide kinnitamine membraanile	14
1.3.3. Mõõtmismetoodikad sensor-BHT määramiseks	16
1.3.4. Kalibreerimislahuse valik	16
1.3.5. Ensüümikineetika mehhanismid	17
1.3.6. Tavapärane biokeemilise hapnikutarbe test	18
2. KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKA.....	20
2.1. Mikroorganismide valik	20
2.1.1. Laktoosi omastamine ja lagundamine <i>E. coli</i> bakterirakus.....	21
2.2. Mikroorganismide kultiveerimine.....	23
2.3. Mikroorganismide immobiliseerimine.....	23
2.4. Mikroobmembraanide kalibreerimine.....	24
2.5. Mõõtmised teiste lahustega	25
3. TULEMUSED JA ARUTELU	27
3.1. Konstrueeritud BHT-mikroobsensori väljundsignaal kalibreerimisel	27
3.1.1. Lineaarne ala ja tundlikkus	29
3.1.2. Sensori vasteaeg.....	32
3.1.3. BHT-sensorite eluiga ning taasteaeg.....	33
3.2. Mõõtmised reoveeproovides	36
3.2.1. Täpsus, lineaarne ala ning tundlikkus uuritavates proovides.....	37
3.2.2. Sensor-BHT ja BHT ₇ võrdlus	39
Kokkuvõte	43
Summary	45
Kasutatud kirjandus.....	47

SISSEJUHATUS

Tänapäeva maailmas toimub pidev rahvastiku kasv ning tööstuse areng. Selle tulemusena on hoogustunud ka vee tarbimine nii tööstuses kui kodustes majapidamistes. Näiteks võrreldes eelmise sajandiga, on inimeste arv kolmekordistunud ning vee kasutamine tõusnud peaaegu kuus korda [1]. Arenenud riikide linnades on veetarbimine inimese kohta tavaliselt 300–600 liitrit ööpäevas, USAs ja Kanadas ning Lääne-Euroopas kohati kuni 800 l/ööp. Samas tarbitakse suuremas osas Aasias, Aafrikas ja Ladina-Ameerikas 50–100 l/ööp, veevaestes piirkondades aga ainult 10–40 l/ööp inimese kohta või veelgi vähem. Sotsiaalse arengu ja elatustaseme tõusu tõttu laiendatakse pidevalt arengumaade linnades ühisveevärki ja -kanalisatsiooni. See aga suurendab veetarvet ning pingestab veevarude kasutust, eriti veevaestes piirkondades [2]. Tööstuse arengu ja mitmekesisumisega suureneb ka loodusesse suunatava vee reoainete mitmekesisus (antibiootikumid [3], genotoksilised ühendid [4], orgaanilised reoained [5, 6], kodumajapidamistes tekkivad kemikaalid [7], anorgaanilised reoained [8] jne). Sellest tulenevalt on vesikeskkonna saastumine muutunud järk-järgult suuremaks ning aktuaalsemaks probleemiks. Keskkonna reostumine avaldab mõju nii inimese tervisele kui ka tema elukvaliteedile [9, 10].

Üheks põhiliseks reostuse liigiks vees on orgaanilise reostus. Selle peamiseks näitajaks loetakse biokeemilist hapnikutarvet (BHT). BHT on hapniku hulk (milligrammides liitri kohta), mida kasutavad elusorganismid vees leiduva orgaanilise aine lagundamiseks. BHT test võtab sõltuvalt meetodist aega 5 või 7 päeva, mille jooksul inkubeeritakse proove 20 °C juures. Lahustunud hapniku hulk mõõdetakse enne ja pärast 5 (7) päeva inkubatsiooni [11].

Vee puhastamise käigus on reoveepuhastusjaamades oluline pidev seire ning kontrollmõõtmine nii sissevoolu kui keskkonda tagasi suunatava vee kvaliteedi kohta. Kuna reovee viibeaeg puhastites küündib mõne tunnini, ei ole standardne BHT test puhastusjaamades piisav just oma pika kestvuse pärast. Seetõttu oleks vaja kiiremaid mooduseid BHT määramiseks. Üheks võimaluseks on kasutada mikroorganismide

baasil konstrueeritud biosensoreid. Viimased põhinevad immobiliseeritud mikro-organismide elutegevuse tagajärjel vähenenud lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõtmisel ning annavad vastuse juba mõne tunni jooksul. Kuna standardse testi ja BHT-sensoritega saadud tulemused erinevad eelkõige piimatööstuse heitvee mõõtmisel, on vaja leida võimalusi selle puudujäägi kõrvaldamiseks. Üheks variandiks on just selle reovee jaoks valitud ning kohandatud kultuuride kasutamine mikroobsensoris.

Käesolevas magistritöös uuritakse erinevate bakterkultuuride sobivust ning nende kasutamise võimalust poolspetsiifilise BHT-mikroobsensori konstrueerimisel. Esmalt iseloomustatakse valitud bakterkultuure ning hinnatakse nende sobivust üldise BHT₇ ning piimatööstuse reovete BHT mõõtmiseks. Hiljem võrreldakse nii mikroobsensoril kui ka standardmeetodil saadud tulemusi.

1. TEOREETILINE SISSEJUHATUS

1.1. Piimatööstuse heitveed kui orgaanilise reostuse põhjustajad

Orgaaniline reostus on anorgaanilise ja patogeenilise saastumise kõrval üks kolmest suuremast vesikeskkonna reostuse liigist. Orgaaniline reostus ilmneb suure hulga orgaaniliste ühendite, mis koosnevad süsivesikutest, rasvadest ja nukleiinhapetest, sattumisel vette. Orgaanilised reoaine pärinevad põhiliselt reostunud või halvasti puhastatud tööstuslikust, põllumajanduslikust või olmeheitveest. Selliste vete juhtimisel veekogusse toimuvad seal mitmesugused muutused olulistes parameetrites nagu pH, lahustunud O₂ hulk jt. Mikroorganismid kasutavad orgaanilisi reoaineid toidullikana ning kompleksühendite lagundamisel lihtsamateks, vajavad nad hapnikku. Reoainete oksüdatsiooni käigus langeb lahutunud hapniku kontsentratsioon. Kui aga vees leidub reoaineid liiga palju, võib hapniku tase vees langeda nullini, mis põhjustab hapnikust sõltuvate organismide hukkumise. Samuti võivad heitveed sisaldada suurel hulgal ka suspendeerunud tahkeid osakesi, mis vähendavad vee valguse läbilaskevõimet. Viimane mõjutab omakorda fotosünteesi [12].

Tööstusliku reovee omadused sõltuvad suuresti tootmises kasutatava tehnoloogia ja tooraine valikust ning tootmiskultuurist. Üheks orgaanilise reostuse tekitajaks on piimatööstus, kus reovee koostis sõltub suuresti tootmises kasutatavast tehnoloogiast, millist produkti toorpiimast toodetakse (juust, pastöriseeritud piim, või, jogurt jne) [13] ning missuguse tootmistsükli käigus reovesi eraldub (Tabel 1).

Tabel 1. Piimatööstuse reovee füüsikalised ja keemilised omadused sõltuvalt tootmissektorist [13].

Reovee päritolu	BHT ₅ (mg/l)	KHT (mg/l)	BHT ₅ /KHT (mg/l)	Kuivaine (mg/l)	Rasvad (mg/l)	(pH)
Masinaruum	3470,0	14 639,5	0,27	3821,2	3105,2	10,37
Võitootmise osakond	2423,3	8925,9	0,27	5066,5	2882,4	12,08
Piima vastuvõtu koht	797,6	2542,9	0,31	653,6	1056,8	7,18
Juustutootmise osakond	3456,7	11 753,0	0,29	939,5	330,5	7,90
Kodujuustutootmise osakond	2599,0	17 645,4	0,15	3375,3	950,3	7,83
Pumpla	1748,0	4441,5	0,39	1071,8	573	8,35

*KHT — keemiline hapnikutarve

*BHT₅ — biokeemiline hapnikutarve

Toodetava reovee hulk sõltub eelkõige tööstuse suurusest ning tootlikkusest. Näiteks Prantsusmaal on piimatööstus reoveetootlikkuse poolest keemiatööstuse järel teisel kohal, kuna iga liitri piima kohta toodetakse 0,3-10 l reovett [14].

Piimatööstuse väljavool on rikas biodegradeeruvate orgaaniliste ainete ning toitainete poolest [16]. Lisaks tootmise käigus eralduvatele ühenditele (laktoos, lahustunud suhkrud ning valgud, rasvad, erinevad lisandid) [17, 18], sisaldab see lisaks ka tööstuses olevate seadmete puhastamisest ja pesemisest tulnud vett [19]. Nimetatud orgaaniliste ühendite omavaheline proportsioon mõjutab biodegradatsiooniprotsessi. Mõned piimavalgud (kaseiin) on suhteliselt resistentsed biodegradatsioonile. Rasvade biodegradatsioon on väga aeglane [20] ning pika ahelaga rasvhapped võivad tekitada kahju näiteks metanogeensetele mikroorganismidele [21]. Süsivesikute lagundamine toimub seevastu palju kiiremini ning lihtsamalt.

Üldiselt jääb piimatööstuse reovee BHT₅ vahemikku 2000-4000 mg/l [22], samas on täheldatud ka sesoonset varieeruvust produtseeritava reovee BHT₅ väärtuses: 954 mg/l talvel ning 2974 mg/l suvel [15]. Piimatööstuse väljavoolu kohta annab informatsiooni

Tabel 2, kus on esitatud seitsme piimatööstuse väljavoolu, tähistatud rooma numbritega, tähtsamad parameetrid.

Tabel 2. Piimatööstuste väljavoolude I-VII peamiste näitajate arvvaartused [22].

Piima- tööstuse välja- vool	KHT (mg/l)	BHT ₅ (mg/l)	Rasvad (mg/l)	Üld- lämmastik (mg/l)	Üld- fosfor (mg/l)	pH	Kuiv- aine (mg/l)	Üld- heljum (mg/l)
I	4000	2160	—	200	60	5-9	5100	—
II	2926	1580	294	36	21	6,7	2750	—
III	633	260	—	106	—	8,9	710	240
IV	2209	1112	60	—	—	7,2	—	278
V	4500	2300	—	56	33	7,2	2540	816
VI	3190	1950	690	43	7	5-10	—	820
VII	4000	2600	400	55	35	8-11	—	675

*KHT — keemiline hapnikutarve

*BHT₅ — biokeemiline hapnikutarve

1.2. Lühiülevaade biosensoritest

Biosensoriteks nimetatakse analüüsivahendeid, mis muudavad bioloogilise signaali elektriliseks ja mõõdavad seda. Biosensoritel on kaks põhielementi [23]:

- Keemiline (või füüsikaline) muundur, millega on võimalik muuta bioloogiline signaal (reaktsioon) töödeldavaks signaaliks.
- Bioloogiline materjal, millest tuleneb ka sensori spetsiifilisus.

Biosensoreid klassifitseeritakse tavaliselt signaali muundumise ja bioloogilise süsteemi järgi erinevatesse gruppidesse.

Vastavalt muundurile jaotatakse biosensorid [24, 25]:

- Amperomeetrilised biosensorid — ensüümid katalüüsivad redoksreaktsioone, mille käigus tekib mõõdetav redokselektronide voog. Elektroodidele rakendatakse konstantne pinge ja määratakse voolutugevust, mis tekib

elektroodreaktsioonil. Amperomeetriliseks sensoriks on näiteks glükoosi biosensor, mis mõõdab lahustunud O_2 vähenemist ning sellest tulenevalt glükoosi hulka. Probleemideks peetakse reaktsiooni sõltuvust molekulaarse hapniku kontsentratsioonist ning teiste segavate redoksprotsesside tekkimist.

- Potentsiomeetrilised biosensorid — mõõdavad konstantsel voolutugevusel aktiivse elektroodi ja referentselektroodi vahel tekkivat potentsiaalide erinevust. Potentsiomeetriliste sensorite hulka kuulub näiteks pH-sensor. Põhiprobleemiks on *on-line* temperatuuri kompensatsiooni vajadus.
- Konduktomeetrilised biosensorid — mõõdavad muutusi ionide kontsentratsioonis, mis võivad toimuda mitmete bioloogiliste reaktsioonide tagajärjel. Selliseks sensoriks on näiteks urea sensor.
- Termomeetrilised biosensorid — kui ensüümreaktsioonide käigus eraldub soojust, saab termomeetriliste sensorite abil mõõta nende reaktsioonide termoeffekti.
- Piesoelektrilised biosensorid — nende abil on võimalik määrata piesoelektrilise kristalli resonantssageduse muutusi.
- Optilised biosensorid — võimaldavad nii ohtlike ainetega kulgevate protsesside ohutut jälgimist kui ka tundliku keskkonna monitooringut. Optilised muundurid kasutavad kas valguse absorptsiooni, fluorestsentsi/fosforestsentsi, bio/kemoluminesentsi või peegeldust. Selliste sensorite alla kuuluvad näiteks ühekordseks kasutamiseks mõeldud testribad glükoosi hulga määramiseks veres.

Bioloogilise komponendi järgi jagatakse sensoreid [23, 26, 27, 28, 29]:

- Katalüütilised sensorid — metabolismi sensorid, kus biokatalüütiline reaktsioon on seotud analüüdi kontsentratsiooniga. Seda saab mõõta produkti moodustumise kiiruse, reaktandi kadumise või reaktsiooni inhibeerimise jälgimisel.
- Afinsusel põhinevad sensorid — retseptormolekul seondub analüüdiga mitte katalüütiliselt ja antud füsiokeemilist muutust saab mõõta transduktoriga.

Enamus katalüütilisi biosensoreid baseeruvad elektrokeemilistel meetoditel, samal ajal kui afiinsusel põhinevad sensorid on rohkem sobilikud optiliste meetodite jaoks [30].

Biosensori tähtsaimaks osaks on sensorelement. Vastavateks bioretseptoriteks võivad olla [26, 31, 32, 33, 34,]:

- Ensüümid — ehk valgud, mis katalüüsivad spetsiifilisi keemilisi reaktsioone. Neid võib kasutada nii iseseisvalt puhastatud vormina kui ka konkreetsetes mikroorganismis asetsevatena. Ensüümid muudavad näiteks analüüdi sensoriga mõõdetavaks produktiks, võimalik on määrata ensüümi inhibiitorit või ensüümi omaduste muutumist.
- Antikehad või antigeenid — antigeen on molekul, mis käivitab organismi immuunvastuse, mille käigus hakatakse tootma antikehi. Viimased tunnevad ära just selle antigeeni, mis konkreetse protsessi käivitas. Antikehi/antigene kasutatakse immunosensorites, mille eeliseks on nende väga hea tundlikkus ning selektiivsus immunokeemilistes reaktsioonides.
- Nukleiinhapped — äratundmisprotsess põhineb A (adeniin), G (guaniin), C (tsütosiin) ja T (tümiin) komplementaarsusel. DNA-l põhinevatel sensoritel on saasteainete määramiseks kaks meetodit: nukleiinhappe järjestuse hübridisatsiooni määramine nakatunud mikroorganismidel ning väiksemate saasteainete (näiteks mutageensed saasteained) interaktsioon immobiliseeritud DNA kihiga.
- Rakustruktuurid või terved rakud — biokatalüütiliseks materjaliks võib olla nii organell, koetükk kui ka mikroorganism. Mikroobsensorites on võimalik kasutada nii elusaid kui ka surmatud mikroobirakke.
- Biomiimilised retseptorid — äratundmine saavutatakse bioretseptorit jäljendavate retseptorite abil. Näiteks geneetiliselt modifitseeritud molekulid, kunstlikud membraanid või molekulaarselt jäljendatud polümeerid.

Sensorelement koosneb tavaliselt õhukesest bioloogiliselt aktiivse materjali kihist, mis on tihedas kontaktis muunduriga. Bioloogilise protsessi käigus tekkiva signaali muundamine loetavaks signaaliks on kõige efektiivsem siis, kui vahemaa bioloogilise

materjali, reaktsiooni toimumispaiga ning muundamiskoha vahel on väikseim. Seetõttu on väga oluline sensorelemendi õige immobiliseerimine.

1.3. Mikroobsensorid ja nende omadused

Mikroobsensor on biosensor, mis koosneb kahest omavahel ühendatud elemendist: immobiliseeritud mikroorganisme sisaldavast membraanist ning bioloogilise signaali muundurist. Muundurina kasutatakse peamiselt hapnikuelektroodi, mis muudab keemilise reaktsiooni signaali mõõdetavaks signaaliks. Mikroobid kindlustavad sensori selektiivsuse. Mikroobsensorite põhimõtteks ongi rakkude võime toota püsivat mõõdetavat signaali, mida saab kasutada keskkonnaparameetrite jälgimiseks [35].

Mikroobsensorites saab kasutada nii elusaid kui ka surmatud mikroobirakke. Antud töös on vaatluse all just elusad mikroobirakud. Viimaseid saab mikroobsensorites kasutada nende metabolismi tõttu, sest rakus toimuvad efektiivselt mitmeastmelised reaktsioonid. Elusatest rakkudest koosnevate mikroobsensorite oluliseks omaduseks on võime toota erinevate ainete mõjul informatiivset signaali [36].

Elus mikroobirakk on kui miniatuurne biokeemiline reguleeritud keskus, kus vajaminevad ensüümid ja kofaktorid esinevad looduslikus kaitsvas elukeskkonnas [37]. Elusrakud on võimelised pidevalt parandama neisse integreeritud ensüümide aktiivsust. See loob eelise ensüümsensorite ees, kuna jääb ära ka pikk, kallis ja vaevaline ensüümide puhastamise protsess. Tänu pidevale ümbritseva keskkonna tunnetamisele, saab elusrakkudest biosensorite abil määrata lihtsalt ka väga keeruliste reaktsioonide seeriaid, mis leiavad aset just elusas ning funktsioneerivas rakus [34, 38, 39]. Biosensoreid saab kasutada nii meditsiinis, toidu kvaliteedi kontrollis, keskkonnareostuse monitooringul kui ka teistes valdkondades [40].

Biosensorite abil saab määrata näiteks biokättesaadavust, toksilisust jt, mida ei saa mõõta keemiliste analüüsidega. Lisaks spetsiifiliste kemikaalide analüüsimisele, saab biosensoreil põhinevaid meetodeid kasutada ka vee kvaliteediparameetrite (BHT, ksenobiootiliste ühendite, raskmetallide jt) määramiseks [41, 42], samuti patogeensete organismidega saastuse hindamiseks [43, 44].

Mikroorganismide eeliseks on lai keemiliste substraatide vahemik ning nende võime hakata tarbima uusi substraate. Samuti on neid on kerge looduslikust keskkonnast isoleerida. Mikroobe on laboritingimustes lihtne kasvatada, neil on hea pH - ja temperatuuri muutuste taluvus ning kohanemisvõime uute tingimustega. Kõik eelnimetatu annab mikroobsensorile kõrge spetsiifilisuse, kiire vasteaja, lihtsa kasutatavuse, madala maksumuse ning pideva reaajas tuleva signaali [34, 45, 46, 47]. Mikroorganismid on ka vastuvõtlikud geneetilistele modifikatsioonidele ja neid on võimalik integreerida kiibile.

Mikroobsensorite puuduseks peetakse võrreldes ensüümsensoritega pikemat vasteaega ning vähest selektiivsust. Viimane on parandatav aga rekombinantsete bakteritüvedega [45]. Kuna mikroobsensorid annavad vastuse kergesti kättesaadavate ning biolagundavate ühendite kohta, ei pruugi tavapäraste testidega ning sensoriga saadud tulemused väga hästi kokku langeda. Suurte ning bioloogiliselt püsivate molekulide lagundamiseks on kasutatud fotokatalüütilisi biosensoreid või proovide eeltöötlemist (näiteks osooniga) [48, 49]. Üldiselt on elusrakkudel baseeruvatel biosensoritel ka piiratud kasutamisaeg, kuna rakud lüüsuvad.

Mikroobsensorite iseloomustamiseks kasutatakse mitmeid näitajaid [23, 41, 50, 51]:

- Vasteaeg — aeg, mis kulub sensorilt stabiilse vastuse saamiseks peale substraadi lisamist. See näitab, kui vastuvõtlikud on bakterid proovis leiduvatele orgaanilistele ühenditele. Mõjutavateks teguriteks on nii mikroobmembraan (sh bakterite aktiivsus, membraanide paksus ja läbilaskevõime), kasutatav mõõtmismeetod, analüüt, ühendite transpordi kiirus läbi mikroobmembraani kui ka bioloogilise signaali muundur.
- Stabiilsus — ajaperiood, mille vältel saab mikroobsensoriga töötades kokkulangevaid tulemusi. Stabiilsust mõjutavad sensorsüsteemis kasutatavad mikroobkultuurid, immobilisatsiooni protsess, keskkonnatingimused (pH, temperatuur, kasutatava proovi koostis) jt faktorid.
- Signaali taastootmisvõime — aja jooksul saadud tulemuste hajuvus või nihe. Taastootmisvõime on sensori omadus ühel ja samal kontsentratsioonil toota korduvalt samaväärset signaali.

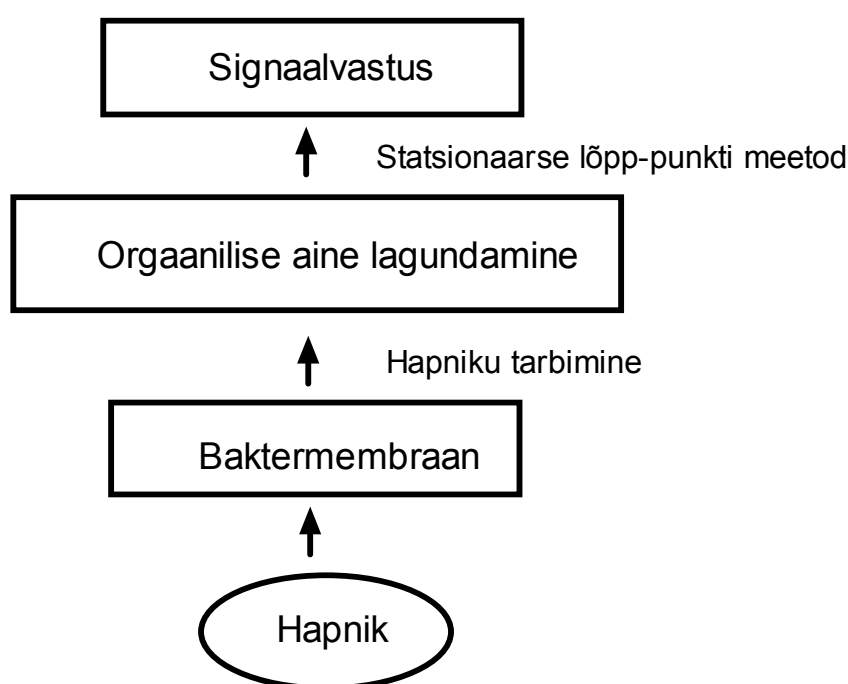
- Taastumisaeg — aeg, mida vajavad membraanile kinnitatud mikroorganismid algse signaali väärtuse regenereerimiseks.
- Eluiga — ajaperiood, mille jooksul annab sensor stabiilseid vastuseid ning tema tundlikkus ei ole langenud.
- Tundlikkus — seda näitab sensori kalibratsioonikõvera lineaarse ala tõus: mida järsemalt graafik tõuseb, seda tundlikum on kasutatav sensor. Tundlikkus sõltub läbilaskva kihi paksusest, immobiliseeritud rakkude kontsentratsioonist biomembraanis, nende bioaktiivsusest ja muundurist.
- Lineaarsuspiirkond — ehk kontsentratsioonide vahemik, ala kalibratsiooni-graafikul, kus substraadi kontsentratsiooni sõltuvus sensori antavast vastesignaalist on lineaarne. Sellega piiritletakse ka sensori mõõteperioodi ehk millises vahemikus saab antud sensorit kasutada. Piirkonda, kus normaliseeritud biosensori väljundsignaal ja substraadi (lahjendatud standardlahuse BHT₇) kontsentratsioon annavad tulemuseks sirge, nimetatakse sensori lineaarseks piirkonnaks.
- Vastuse usaldusväärsus — sõltub nii sensori tundlikkusest kui signaali taastootmisvõimest. Vastuse usaldusväärsust saab määrata reaalsel sensoril töötingimustel ning arvesse tuleks võtta ka protsessi kulgu mõjutavaid segavaid faktoreid.

1.3.1. BHT-mikroobsensorid, sensorite spetsiifilisus

Tavapärase BHT testiga [11] vastuse saamine võtab sõltuvalt meetodist aega 5 kuni 7 päeva. Tulemuse kättesaamise ajaks on uuritav reovesi juba reoveepuhastist väljas ning keskkonnareostuse vältimiseks on keeruline midagi ette võtta. Seepärast oleks hea kasutada kiireid orgaanilise reostuse analüüsivahendeid nagu näiteks BHT-mikroobsensoreid.

Biokeemilise hapnikutarbe määramiseks kasutatavad BHT-mikroobsensorid koosnevad immobiliseeritud mikroorganismide kihist ja amperomeetrilisest hapnikuelektroodist. Hapnik difundeerub läbi mikroobmembraani, kus ühe osa sellest kasutavad ära mikroorganismid ja teine osa jõuab hapnikuelektroodini [52, 53].

Mikroobsensori tööpõhimõte seisnebki läbi mikroobmembraani elektroodini jõudva hapniku kontsentratsiooni mõõtmises (Joonis 1). Mikroorganismid kasutavad reoainete ehk substraadi lagundamiseks hapnikku. Mida rohkem nad hapnikku tarbivad ehk mida väiksem kogus jõuab sensorini, seda suurem on uuritava lahuse orgaaniliste ühendite sisaldus. Teisisõnu: sensorini jõudva hapniku voolu vähenemine on proportsionaalne substraadi kontsentratsiooniga lahuses. Sensori signaali mõjutavad temperatuur, pH, orgaaniliste ühendite sisaldus ning proovis olevate toksiliste ühendite hulk [54].



Joonis 1. Mikroobsensori tööpõhimõte.

Seesuguste mikroobsensorite kasutamine võimaldab orgaaniliste ühendite metabolismist tuleneva signaali mõõtmist kiiremini kui tavapärased BHT testid. Puuduseks võib lugeda sensori muutlikkust kalibreerimisel BHT₅ (BHT₇) väärtustega.

Kuna tavaliste BHT biosensoritega saadud tulemuste ning BHT₅ väärtuste vahel tekivad tihti lahkkelid, oleks tõhusam kasutada konkreetse reovee BHT määramiseks spetsiaalselt valitud ja adapteeritud organisme. Viimased muudaksid mikroobsensori poolspetsiifiliseks. Mittespetsiifilistel mikroobitüvedel on iseloomulik kindel substraadi vahemik, mida nad on võimelised lagundama. Poolspetsiifiliste puhul on osa vahemikust sama, osa võrreldes teiste mikroobidega erinev.

1.3.2. Mikroorganismide kinnitamine membraanile

Mikroobsensorite täielikuks funktsioneerimiseks on oluline mikroorganismide ja muunduri lähikontakt, seega on tähtis roll immobiliseerimise protsessil. Valitud tehnikast sõltub biosensorite vasteaeg, stabiilsus, katsetulemuste korduvus ning töötamisaeg. Immobiliseerimine takistab ka rakkude sattumist mõõtmisprotsessidel kasutatavate lahuste sisse.

Tavaliselt püütakse luua bioloogiliselt aktiivsest materjalist õhuke kile kas otse muunduri pinnale või võimalusega see sinna asetada ja hiljem eemaldada [55]. Kuigi tänapäevased immobiliseerimise meetodid võimaldavad õhukeste biofilmide valmistamist, võib liiga õhukeseks vormitud biokile tagajärjel ilmned bioloogilise materjali aktiivsuse langus. Üldiselt kasvab aktiivsus mikroobsuspensiooni massi suurenemisega pinnal, kuid liiga paks ja tihe biokile viib biomolekulide agregateerumisele, mis omakorda vähendab aktiivsust. Liigne biokile koormus blokeerib immobiliseeritud materjali signaali vastuvõtmisvõimet.

Mikroobe saab immobiliseerida keemiliste või füüsikaliste meetoditega [28, 55, 56, 57]:

- Mikroorganismide üheks keemiliseks kinnitamise viisiks membraanile on kovalentse ühenduse loomine pinnaga, mis põhinevad mikroorganismide rakuseina funktsionaalrühmade (karboksüül-, sulfidrüül-, tiol- jt) ning muunduri vahel. Kovalentse seondumise eeliseks on biomolekulide tugev kinnitamine kandjale ning on ebatõenäoline, et need võiksid biokile kasutamise käigus pinnalt lahti tulla. Samuti on heaks omaduseks kovalentseks seondumiseks sobivate funktsionaalrühmade rohkus. Selle meetodi reagentideks on näiteks glutaaraldehüüd, karbodiimiid jt, mis võivad vähendada rakkude bioloogilist aktiivsust või neid muul viisil kahjustada.
- Molekulidevaheline ristseondumine tähendab võrgustikulaadse silla loomist rakuseina välismembraani funktsionaalrühmade ning multifunktsionaalsete reagentide vahel. Antud meetod on kiire, lihtne ning on laialt kasutatav. Nimetatud meetodi puudusteks on reaktsiooni raske kontrollitavus, suure hulga bioloogilise materjali vajadus ja moodustunud valgulise kihi jäikus. Samuti

võivad kujuneda mitmed kohakuti olevad kihid, mis vähendavad biokihi aktiivsust. Lisaks võivad tekkida difusioonilised barjäärid.

- Van der Waalsi jõude hõlmav füüsikaline adsorptsioon on lihtsaim meetod mikroorganismide kinnitamiseks tahkele kandjale. Tavaliselt mikroob-suspensioon inkubeeritakse koos elektroodiga või muu maatriksiga (klaas- või alumiiniumhilmega) ning mitteadsorbeerunud rakud pärast lihtsalt pestakse välja.
- Membraani, pindaktiivsete ainete maatriksi, polümeeri või mikrokapsli sisse kinnitamine saavutatakse, kui rakud immobiliseeritakse muunduri pinnale filtermembraanide või keemiliste (bioloogiliste) polümeeride abil. Meetodi üheks negatiivseks küljeks on kasutatava materjali võime takistada difusiooni. Viimane omakorda viib alla sensori tundlikkuse ja määramispiiri.
- Sool-geeli sisse kinnitamisel on bioloogilised molekulid kinni poorilise maatriksi (polümeeriline SiO_2 võrk) vesi-keskkonnas. Nimetatud maatriksid on värvitud ning seetõttu on võimalik jälgida biomolekulide keemilisi reaktsioone. Meetodi käigus säilitavad bioloogilised elemendid oma aktiivsuse ning on nii keemiliselt, termiliselt kui ka struktuurselt stabiilsed. Puuduseks on difusioonilised piirid poorilises võrgustikus.
- Langmuir–Blodgett kinnitamisel viiakse õhk-vesi piirpinnal asuvad molekulid tahkele substraadile lastes substraati läbi monokihiga kaetud vedelikpinna. Põhiliseks eeliseks peetakse moodustunud bioloogiliste kilede tiheduse kontrollimise võimalust.
- Elektropolümerisatsiooni kasutatakse laialdaselt ensüümide ja valkude immobiliseerimiseks. Selle käigus kinnitatakse bioelemendid elektrookeemiliselt elektroodi pinnal moodustunud polümeersele filmile. Nimetatud meetodiga saab konstrueerida selektiivselt läbilaskvat polümeerset kilet.

1.3.3. Mõõtmismetoodikad sensor-BHT määramiseks

Biosensori väljundsignaali mõõtmiseks doos-vastuse jaoks on võimalik kasutada kahte meetodit [52, 58, 59, 60]:

- Statsionaarse oleku ehk lõpp-punkti mõõtmismeetod — põhineb kahe mõõdetud statsionaarse väljundsignaali väärtuste erinevusel. Seda nimetatakse ka dünaamiliseks meetodiks.
- Algkiiruste meetod ehk kineetiline meetod — põhineb biosensori väljundsignaali maksimaalse muutumise kiirusel substraadi erinevatel kontsentratsioonidel.

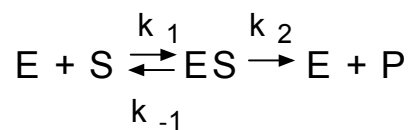
Algkiiruste meetod on kiirem ja võimaldab paremaid kordusmõõtmisi, kuid tundliku anduri korral osutub statsionaarse oleku mõõtmine edukamaks. Viimane põhineb substraadi lisamisel mõõtekeskkonda ja hapniku elektroodini jõudva signaali stabiliseerumises. Stabiilsete näitude erinevus enne ja pärast substraadi lisamist, vastab antud proovi BHT väärtusele. Vasteaeg selle meetodi puhul jääb tavaliselt 15-30 minuti piiresse. Antud töös uuriti biosensori väljundsignaali sõltuvust substraadi kontsentratsioonist statsionaarse lõpp-punkti meetodil.

1.3.4. Kalibreerimislahuse valik

Võimaldamaks tavapärase BHT testi ning sensor-BHT kõrvutamist, tuleb mikroobsensoreid eelnevalt kalibreerida. Sobiliku kalibreerimislahuse valik tähendab ka head kokkulangevust tavapärase BHT testi tulemuste ning sensor-BHT vahel. Laialdaselt on sensorite kalibreerimiseks kasutusel olnud GGA-lahus (D-glükoosi ja L-glutamiinhappe lahus), millel esineb kahjuks puudusi. Nimetatud lahus saastub kiirelt teiste keskkonnas (õhus, lahuses jne) leiduvate mikroorganismidega. Samuti on mikroobide glutamiinhappe reaktsioon pärsitud glükoosi tõttu. Reaalne heitvesi on segu mitmetest erinevate ühendite kompleksstruktuuridest, mistõttu ei anna GGA-lahus piisavalt usaldusväärseid tulemusi kuna koosneb ainult kahest lihtsast komponendist. Sünteetilised reoveed sisaldavad aga BHT-mikroobsensorite kalibreerimiseks piisaval määral erinevaid komponente [41]. Seetõttu on ka antud töös kasutatud kalibreerimislahusena OECD retsepti järgi segatud sünteetilist reovett (vt ptk 2.4.).

1.3.5. Ensüümkineetika mehhanismid

Mikroorganismides toimub orgaanilise aine lagundamise protsess ensüüm-katalüütilise mehhanismi alusel. Vastavalt sellele seondub substraat (S) pöördvalt ensüümiga (E) ning moodustub ensüüm-substraat kompleks (ES). Viimane konverteeritakse pöördumatult produktiks (P) ning ensüüm (E) taastatakse järgmise katalüütilise tsükli jaoks (Võrrand 1). Klassikaline Michaelis-Menteni võrrand kirjeldab seost substraadi muutumise kiiruse ning substraadi kontsentratsiooni vahel (Võrrand 2). Nimetatud võrrand selgitab, kuidas on hüperboolselt omavahel seotud reaktsiooni kiirus ning substraadi kontsentratsioon konstantse ensüümi kontsentratsiooni korral (Joonis 2 A). Michaelis-Menteni konstant (K_m) on ekvivalentne substraadi kontsentratsiooniga, mille puhul reaktsiooni kiirus on pool $V_{\max} * K_m$. Väike K_m viitab kõrgele afiinsusele ning väiksema K_m väärtusega substraat läheneb kiiremini $V_{\max}$ väärtusele [61].



{1}

k_1, k_{-1}, k_2 — kiiruskonstandid

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

{2}

V — reaktsiooni kiirus

$V_{\max}$ — reaktsiooni maksimumkiirus

$[S]$ — substraadi kontsentratsioon

K_m — Michaelis-Menteni konstant

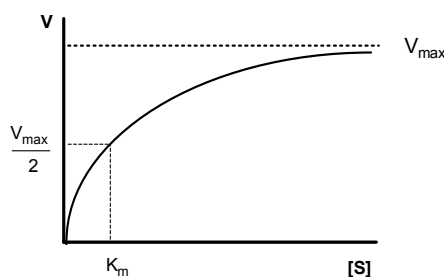
Reaktsiooni kiirus tõuseb teatud piirini ($V_{\max}$) suure substraadi hulga puhul, millest edasi enam substraadi kontsentratsiooni suurenemine reaktsiooni kiirust ei mõjuta.

Michaelis-Menteni võrrandit saab optimiseerida lineaarseks regressiooniks — Lineweaver-Burk'i võrrandiks (Võrrand 3), mida illustreerib joonis 2 B.

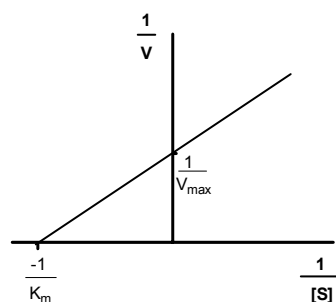
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} [S]}$$

{3}

A



B



Joonis. 2. (A) Michaelis-Menteni võrrandi graafiline kujutis.

(B) Lineweaver-Burk'i võrrandi graafiline kujutis.

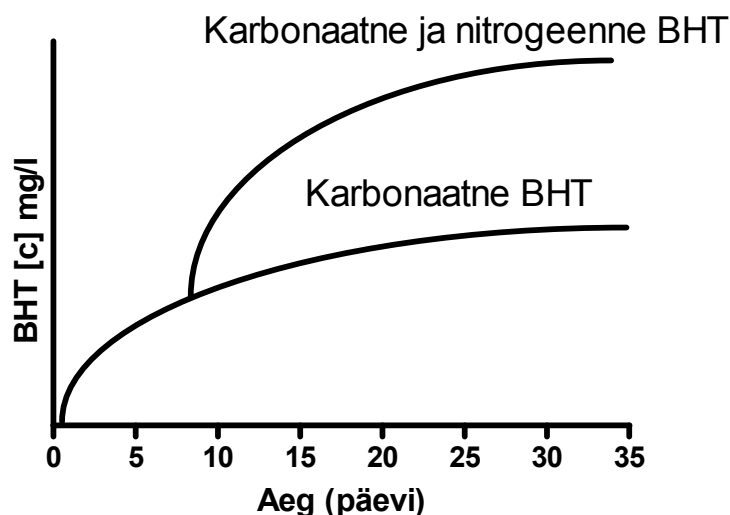
1.3.6. Tavapärane biokeemilise hapnikutarbe test

Üks olulisemaid mõjusid, mida avaldavad orgaanilised jäätmed vesikeskkonnale, on lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähenemine. Selle määramiseks on laialt levinud biokeemilise hapnikutarbe (BHT) test, mille käigus lagundavad aeroobsed mikroorganismid orgaanilist ainet etteantud ajaperioodi jooksul kindlatel tingimustel. BHT testi võib vaadelda ka kui laboris esilekutsutud vee isepuhastumisprotsessi. Tavapärase meetodi käigus mõõdetakse 20 °C juures kasutatud hapniku hulk 5 (või ka 7) päeva jooksul. Mikroorganismid (põhiliselt bakterid) tarbivad hapnikku hingamise ja rakuelutegevuse käigus. Suurem osa orgaanikast lagundatakse ära süsihappegaasiks,

kuid teatud osa oksüdeeritakse ka energiaks või konverteeritakse uuteks rakumaterjalideks.

BHT test ei anna vastust kõigi reoveeproovis leiduvate oksüdeeritavate materjalide kohta, sest osa sellest võib olla resistentne bioloogilisele oksüdatsioonile. Täielik biodegradeeruvate jäätmete lagundamine võtab aega nädalaid, seega 5- või 7-päevase testi käigus lagundatakse ainult osa orgaanilisest materjalist. Näiteks tselluloos jääb aeroobsetest mikroorganismidest puutumata, kuna tema lagundamine toimub hoopiski anaeroobselt. Antud testi põhilisteks puudusteks on tema pikk kestvus, samuti võib probleeme põhjustada lahjendamine ning ei saa kindlad olla selles, kas proov vajab eelnevalt veel mikroorganismide lisamist või mitte [62].

Joonis 3 näitab karbonaatset ja nitrogeenset oksüdatsiooni. Põhikõver esindab orgaanilist materjali, mille lagundamine 20 °C juures võtab aega kuni 3 nädalat. Lisahapnikutarbe kõver tuleb nitrifikatsioonist. Tavalistes reovetes muutub nitrifikatsioon määravaks alles 8-10 päeval, kuid pooleldi töödeldud reovetes võib see protsess valitseda juba mõne päeva pärast.



Joonis 3. Karbonaatset ja nitrogeenset oksüdatsiooni illustreeriv BHT kõver [62].

2. KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKA

2.1. Mikroorganismide valik

Käesoleva magistritöö eksperimentaalse osa käigus konstrueeriti kahe katseseeria vältel piimatööstuse reovete suhtes poolspetsiifiline mikroobsensor. Kõigepealt toimus sensori kalibreerimine, seejärel teostati BHT mõõtmisi ka reaalsetes piimatööstuse jäätmeid sisaldavates heitvetes. Tõendamaks sensori poolspetsiifilisust just piimatööstuse reovete jaoks, testiti sensorit ka fenoolses reovees. Katsete jaoks valiti laktoosi lagundamisele spetsiifilised bakterikultuurid *Escherichia coli* tüvi R17.1.3 (*E. coli*) ja *Raoultella terrigena* tüvi P74.3 (*R. terrigena*), kes on suutelised oma elutegevuse käigus lagundama laktoosi [53, 63].

Töös kasutatud kultuure on laboris sobivaid tingimusi luues lihtne kasvatada, nad taluvad hästi mitmesuguste keskkonnatingimuste (temperatuuri, pH jt) muutusi [54] ning on ka kiire kasvuga. Võrdluskultuurina kasutati universaalset mikroobi *Pseudomonas fluorescens* tüve P75 (*P. fluorescens*), kes ei lagunda hästi piimavalke ning tema reageerimine laktoosile on minimaalne [67]. *P. fluorescens* kultuuriga teostas katseid Karita Raudkivi.

- *E. coli* — on lühike, liikuv, Gram-negatiivne pulkbakter, kes eksisteerib looduslikult nii pinnases kui ka vees, samuti inimese seedetraktis. Ta on ovaalse kehakujuga predominantne fakultatiivne anaeroob ning ei moodusta spore. *E. coli* on oksüdatiivne, eksoensümaatilist aktiivsust omav kääritaja, kes on võimeline kasutama süsiniku-ja energiaallikana nii glükoosi, galaktoosi, fruktoosi, ksüloosi, sahharoosi, mannitooli kui ka laktoosi. *E. coli* le on iseloomulikuks Endo söötmel roheka metalse läikega kolooniate moodustamine. *E. coli*’t on kasutatud nii glükoosi sensoris [68] kui ka orgaanilistest ühenditest ning raskmetallidest tuleneva akuutse toksilisuse hindamiseks loodud sensoris [37, 69, 70].

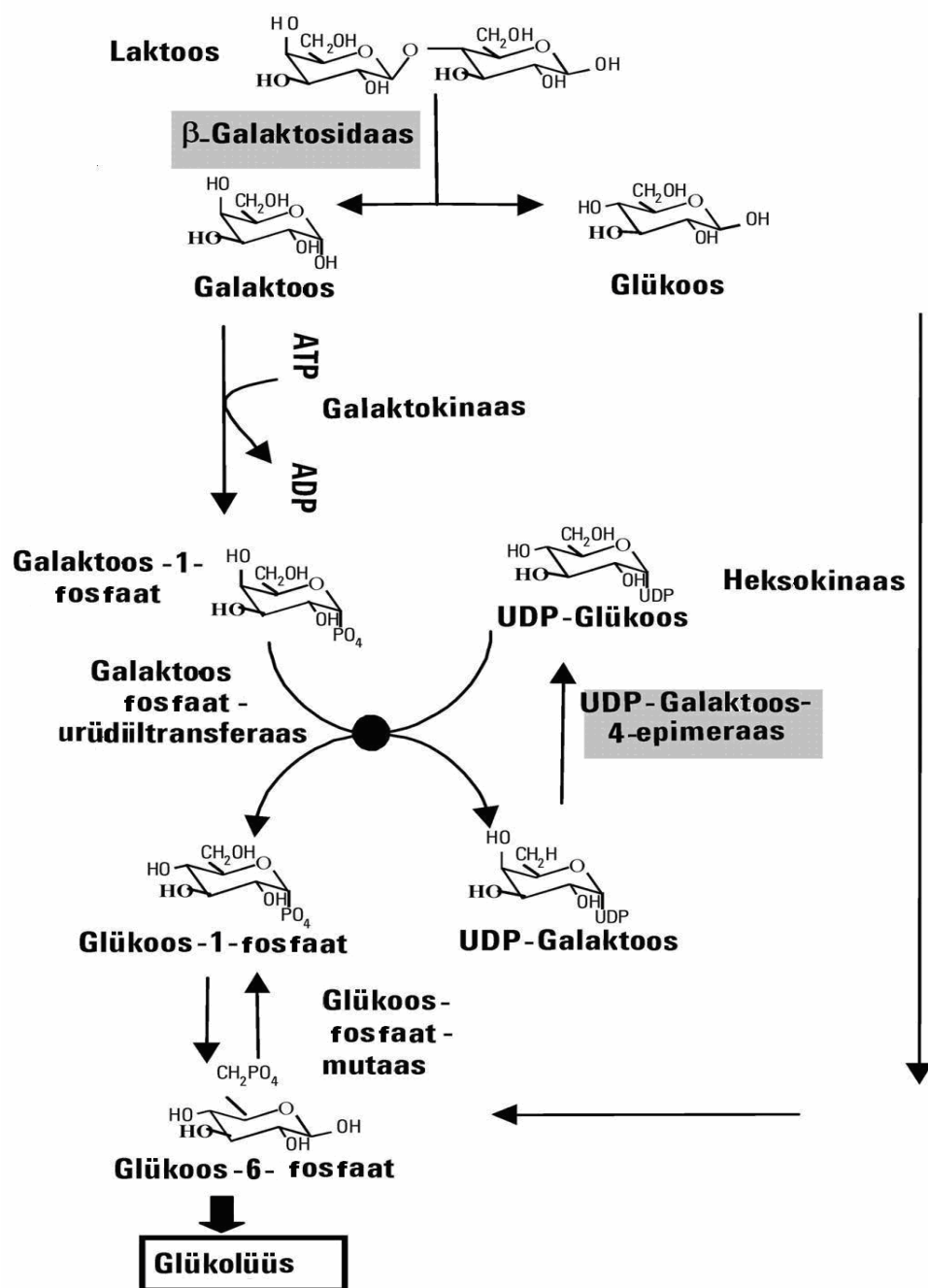
- *R. terrigena* — on lühike, ovaalse kehakujuga liikumisvõimetu pulkbakter, kes on samuti fakultatiivne anaeroob ning ei sporuleeru. Teda leidub looduses nii pinnases kui ka vees. *R. terrigena* on võimeline süsinikuallikana kasutama fruktoosi, ksüloosi, laktoosi, sahharoosi ja mannitooli. *R. terrigena*'t on kasutatud ka BHT-sensoris [53].
- *P. fluorescens* — on oksüdatiivne pulkbakter, kes kasutab energia- ja süsinikuallikana alkohole, suhkruid (nt glükoos, fruktoos, ksüloos) ja orgaanilisi happeid. Ta on võimeline lagundama tsüklilisi ühendeid, nende seas fenoole, mistõttu on teda edukalt kasutatud BHT-mikroobsensorites [71, 72, 73].

2.1.1. Laktoosi omastamine ja lagundamine *E. coli* bakterirakus

Mikroobid omastavad lahustunud toitaineid raku pinnaga — nad toituvad osmootselt. Ainete transpordi kiirus rakku sõltub suuresti aine loomusest ning kontsentratsioonist. Aktiivtranspordi käigus luuakse *E. coli* membraanil prootongradient ja läbi transporterite kanali sisenevad rakku nii prooton kui ka laktoos.

E. coli rakus toimub laktoosi lagundamine laktoosi operoni (*lac* operon) abil, mis sisaldab promootorit *P*, operaatorit *O* ja kolme struktuurgeeni *lacZ*, *lacY* ja *lacA*. Et laktoosi lagundada, peab *E. coli* kõigepealt aktiveerima *lacZ* geeni, mis sünteesiks ensüümi β -galaktosidaasi. Laktoosi lagundamine toimub β -1,4 glükosiidse sideme hüdrolyüüsi käigus ning selle tulemusena tekivad monosahhariidid β -D-glükoos ja β -D-galaktoos (Joonis 4), mis on hingamisteggevuseks kasutatavad lihtsamad suhkrud. β -galaktosidaas konverteerib laktoosi operoni induktoriks allolaktoosiks. β -galaktosiidi permeaas, mida kodeerib geen *lacY*, transpordib laktoosi rakku. Geeni *lacA* poolt kodeeritud transatsetülaasi bioloogilist funktsiooni rakus ei teata [64].

Kui *E. coli* rakkude kasvukeskkonnas leidub glükoosi, on selle kasutamine võrreldes teiste substraatidega eelistatud. Vastavat nähtust nimetatakse kataboliitseks repressiooniks ehk glükoosi efektiks. Glükoosi puudumisel avalduvad aga teised metaboolsed rajad. Kuna laktoosi leidub põhiliselt piimas ja mitte niipalju teistes kasvukeskkondades, siis oleks *E. coli* rakule energeetiliselt kulukas, kui vajalik ensüüm oleks kogu aeg sisse lülitatud [65].



Joonis 4. Metaboolne rada laktoosi lagundamiseks [66].

2.2. Mikroorganismide kultiveerimine

Bakterite puhaskultuurid pärinesid Raadi järveveest ja need identifitseeriti 16S rRNA geeni nukleotiidses järjestuses alusel Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis teaduri Ene Talpsepa poolt.

E. coli, *R. terrigena* ja *P. fluorescens* kasvatati aeroobsetel tingimustel Luria-Bertan'i (LB) vedelsöötmes (sisaldades 10 g trüptooni, 5 g pärmiekstrakti ja 5 g NaCl) [74]. Inkubeerimistemperatuur oli looduslikul 24 °C ning kasvuaeg kuni 20 tundi.

Kindlustamaks piisavat baktermassi hulka, sellest tulenevalt ka baktermembraani aktiivsust ning stabiilsust, oli oluline rakkude pärinemine statsionaarsest kasvufaasist. Selle tagamiseks hinnati suspensiooni optilist tihedust spektrofotomeetriga *Pharmacia* lainepikkusel 590 nm. Kui optiline tihedus oli piisav, koguti rakud tsentrifuugimisel (20 minutit kiirusel 4000 p/min). Vältimaks söötme sattumist mikroobmembraanile ning tagamaks puhtaid mikroobirakke, pesti neid tsentrifuugimise käigus kaks korda 10 ml fosfaatpuhvri ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – Na_2HPO_4 , pH = 6,86) lahusega.

2.3. Mikroorganismide immobiliseerimine

Antud töös kasutati bakterite immobiliseerimiseks adsorptsioonil põhinevat meetodit. Selleks valiti mikroobide kinnitamise keskkonnaks sobiv bioloogiline polümeer — hüdrogeel. Hüdrogeeliks oli agaros (type I-A: Low EEO, Sigma), milles puudusid toitained. Agaros on väga hea geelistaja, sest on mikrobioloogiliselt inertne (seda hüdroolüüsivad vähesed mikroobid).

Immobiliseerimise jaoks kasutati agarosi ja fosfaatpuhvri 2,3 % lahust, mida kuumutati vesivannis 80 °C juures agarosi täieliku lahustumiseni. Seejärel jahutati segu 45 °C ning lisati umbes 300 µl baktersist suspensiooni. Pärast kiiret segamist pipeteeriti see kolmele 780 µm poorisuurusega paralleelmembraanile. Segu ühtlaseks jaotumiseks membraanidel, paigutati membraanid koos baktersist suspensiooniga kahe klaasplaadi vahele 5 minutiks, kuni agaros oli tardunud ning ühtlased mikroobmembraanid moodustunud. Seejärel asetati membraanid paariks päevaks fosfaatpuhvrisse 4 °C juurde, et mikroobid saaksid kohaneda uute tingimustega.

Kirjanduse andmetel on selline toitainete- ja hapnikupuuduses toimuv hoiustamistingimus vajalik, et mikroobid tarvitaksid ära rakus olevad toiduvarud. Sellelaadne eelinkubatsioon muudab sensori stabiilsemaks ja lühendab ka stabiliseerimiseks vajaminevat aega [56].

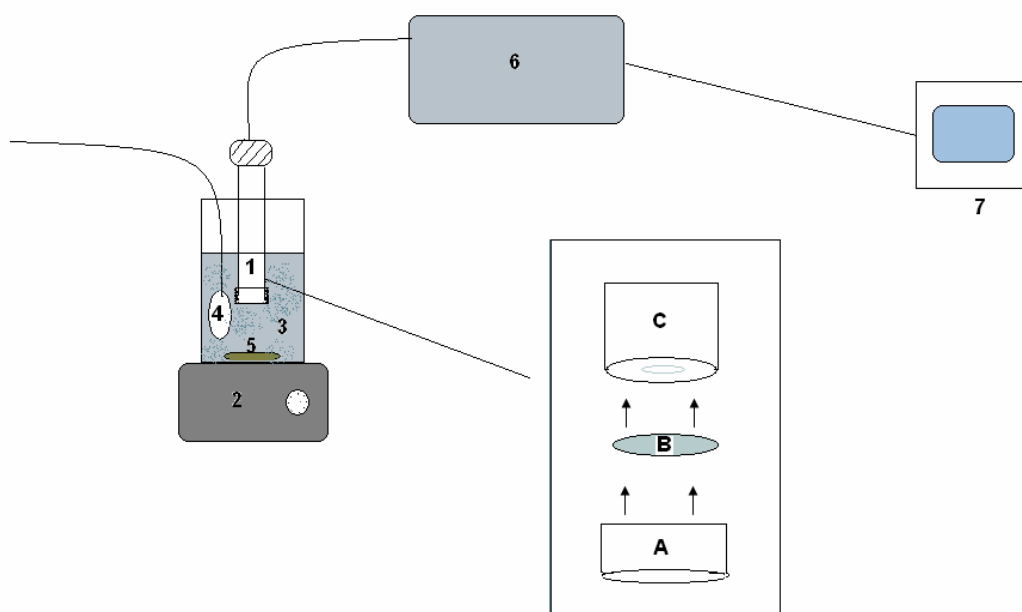
Agaroosi sisse kinnitatud bakterid saavad hiljem eluks vajalikke toitaineid uuritavast lahusest ehk proovist ning membraan püsib aktiivsena sõltuvalt tingimustest ja adaptatsiooni üleelamisest 3-9 nädalat. Paljunemine ei ole võimalik tihke agaroosi tõttu, mis ei lase neil minna ka uuritavasse lahusesse.

2.4. Mikroobmembraanide kalibreerimine

Kogu eksperimendi käigus kasutati BHT mõõtmiseks Clark tüüpi hapnikuandurit *CellOx* 325 ja signaali detekteerimiseks mõõturit *InoLab* 740. Pärast mikroobmembraanide nälgutamisperioodi, mõõdeti 50 ml fosfaatpuhvril nende tühihingamist. Viimane näitab, kas mikroobmembraan on valmis kasutamiseks ning kalibreerimisgraafiku konstrueerimiseks. Liiga kõrge tühihingamine (läbi membraani jõuab andurini vähem hapnikku) näitab, et baktermembraani rakkudes on peidus veel toiduvarusid, mida hakatakse soodsate tingimuste (temperatuur, hapnikuga küllastatus) saabudes jõudsalt tarbima. Eriti iseloomulik on varuainete moodustumine *Pseudomonas* perekonnale, kui mikroobi kasv on mingi kasvuaine poolt limiteeritud või inhibeeritud. Aga ka *E. coli* kogub rakku toitainete varusid näiteks glükogeeni [75]. Kui membraanide tühihingamisel jõudis hapnikuandurini 4-5 mg/O₂, olid membraanid valmis kalibreerimiseks.

Moodustunud mikroobmembraanide kalibreerimiseks kasutati mõõtekeskkonnana 50 ml fosfaatpuhvril, mida aereeriti ca 15 minutit lahuse küllastamiseks hapnikuga. Lahuse homogeensuse tagamiseks toimus pidev segamine. Seejärel kinnitati hapnikuandurile spetsiaalse otsiku abil mikroobmembraan, mis sukeldati lahusesse, kus jätkati aereerimist ja segamist. Peale mikroobsensori viimist lahusesse, stabiliseerus hapnikuanduri näit umbes 15-20 minuti jooksul. Mõõtesüsteemi on skemaatiliselt kujutatud Joonisel 5. Kalibreerimislahusena kasutati OECD kunstlikku reovett (1,6 g peptooni, 1,1 g lihaekstrakti, 0,30 g karbamiidi, 0,28 g K₂PO₄, 0,04 g CaCl₂×2H₂O, 0,07 g NaCl ja 0,02 g MgSO₄×7H₂O) [76].

Antud lahuse eelnevalt välja arvatud kogust lisati puhversüsteemi ning oodati uue näidu stabiliseerumist. Selline järk-järguline substraadi lisamine süsteemi ja uue püsiva signaali saamine toimus BHT kontsentratsioonidel 50, 100, 150, 200, 250, 300 ja 350 mg/l. Stabiilse näidu saamine võttis aega maksimaalselt 45 minutit ja katse kestis niikaua, kuni läbi membraani difundeeruva hapniku näit hakkas lähenema nullile või muutus nulliks. Kõik teostatud katsed viidi läbi toatemperatuuril.



Joonis 5. Eksperimendiks kasutatud mõõtesüsteem biokeemilise hapnikutarbe mõõtmiseks: 1 – mikroobsensor, 2 – magnetsegaja, 3 – proov, 4 – aeraator, 5 – magnetsegaja pulk, 6 – muundur, 7 – arvuti.

Sisemine joonis: A – spetsiaalne otsik, B – biomembraan, C – hapnikuandur.

2.5. Mõõtmised teiste lahustega

Kui kalibreerimisel saadi stabiilsed tulemused, prooviti uurida konstrueeritud poolspetsiifilise BHT-mikroobsensori sobivust piimatööstuse reovete jaoks. Uuritavaks lahuseks valiti reaalsele reoveele sarnane lahus, milleks oli 1 ml steriliseeritud piima sisaldav OECD sünteetiline reovesi (edaspidi tähistatud kui proov A). Eksperiment teostati samal viisil kui kalibreerimisel: signaali stabiliseerumisel lisati lahusele kindel hulk (0,5 ml) piimasegust reovett ning oodati signaalnäidu stabiliseerumist.

Näitamaks mikroobsensori spetsiifilisust piimatööstuse reovete jaoks, püüti BHT-mikroobsensoriga mõõta Põlva reoveepuhastist saadud kahte reaalselt reoveeproovi (vastavalt proov B ja proov C). Tõestamaks, et piimatööstuse jaoks sobiv sensor ei anna arvestatavaid tulemusi muudes reoveeproovides, kasutati Kiviõli-Püssist pärinevat fenoolset reovett (proov D). Eksperimentide käigus toimus jällegi lahuse aereerimine, anduri sukeldamine proovi ning läbi membraani jõudva hapniku mõõtmine. Nimetatud kalibratsioonilahuse kui ka uuritavate proovide BHT₇ määrati vastavalt tavapärasele BHT₇ testile ning saadud väärtused on märgitud Tabelisse 3.

Tabel 3. Antud töös kasutatud lahuste BHT₇ väärtused.

Lahus	BHT ₇ mg/l
Süntetiline reovesi (kalibratsioonilahus)	1780
Süntetilisest reoveest ja piimast koosnev lahus (proov A)	2333
Piimatööstuse heitvesi Põlva reoveepuhastusjaamast (proov B)	1220
Piimatööstuse heitvesi Põlva reoveepuhastusjaamast (proov C)	880
Kiviõli-Püssi reovesi (proov D)	1721

Kuna membraane kalibreeriti nädalas 2 korda, siis uuritavate lahustega toimusid mõõtmised sellest lähtuvalt kas ühe või kahe päeva möödudes. Tihedamalt ei olnud võimalik mõõtmisi sooritada, kuna baktermembraanid vajasisid vähemalt 24 tundi puhkust, mis oli tarvilik mõõtmiste ajal proovilahusest saadud ning rakku varutud toitainete tarbimiseks. Nagu eelnevalt mainitud hoiti ka sel põhjusel membraane mõõtmiste vahel fosfaatpuhvrts toitainete puuduses.

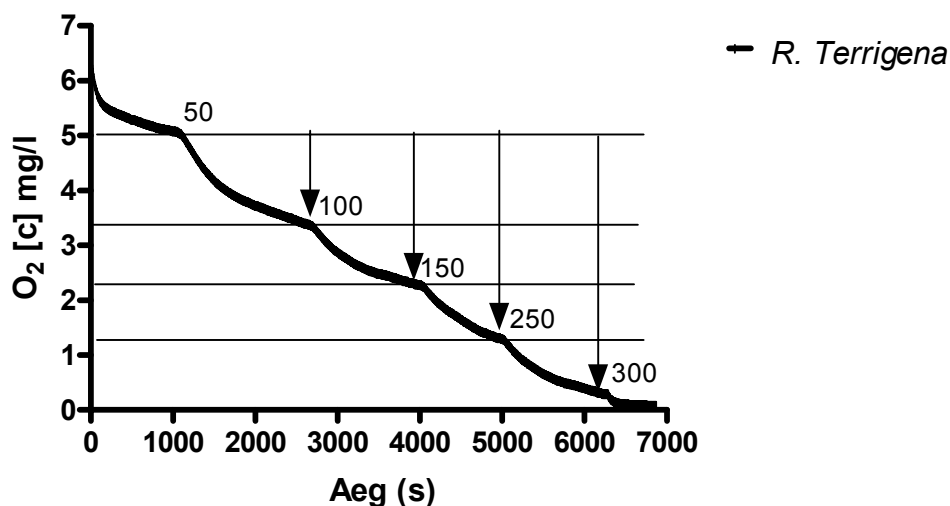
3. TULEMUSED JA ARUTELU

Antud magistritöö eesmärgiks oli poolspetsiifilise BHT mikroobsensori konstrueerimine ja selle sobivuse uurimine piimatööstuse heitvete jaoks. Töö esimeses osas kasvatati kolme mikroobikultuuri: *E. coli*, *R. terrigena* ja *P. fluorescens* ning immobiliseeriti nad agarooši abil membraanile. Teises pooles toimus BHT-mikroobsensori konstrueerimine ja selle kalibreerimine. Kolmandas osas püüti määrata sensoriga ka reaalsete proovide BHT ning analüüsida sensori peamisi omadusi lähtuvalt saadud tulemustest. Biosensori väljundsignaali määramiseks kasutati statsionaarse oleku ehk lõpp-punkti mõõtmismeetodit. Saadud tulemusi analüüsiti andmetöötlusprogrammidega *GraphPad Prism 4* ja *Microsoft Excel*, mille abil koostati graafikud, kus signaali vastuseks on normaliseeritud sensori näit vastavalt lisatud substraadi kontsentratsioonile.

3.1. Konstrueeritud BHT-mikroobsensori väljundsignaal kalibreerimisel

Esimeses katseseerias konstrueeriti *E. coli* ja *R. terrigena* membraanid, millel mõõdeti statsionaarsest kasvufaasist kogutud bakterirakkude suspensiooni optiliseks tiheduseks *E. coli* puhul $OD_{\lambda=590} = 2,44$ ja *R. terrigena* puhul $OD_{\lambda=590} = 1,8$. Baktermembraane jälgiti nende eluea vältel, sensoreid kalibreeriti kinnitades membraanid hapnikuandurile ning registreeriti saadud tulemused. Kahjuks ei osutunud valitud paksusega suspensioon piisavaks, kuna sensorite eluiga oli lühike ning peale kalibratsiooni lahuse ei saadud sensoreid muudes reoveeproovides katsetada. Seepärast suurendati suspensiooni optilist tihedust teises katseseerias vastavalt *E. coli* $OD_{\lambda=590} = 6,66$ ja *R. terrigena* $OD_{\lambda=590} = 6,14$. Nagu eespool öeldud võeti teises katseseerias kasutusele võrdluskultuurina *P. fluorescens*, mille $OD_{\lambda=590} = 4,6$.

Kalibratsioonimõõtmiste käigus toimuva hapniku kontsentratsiooni vähenemine seoses substraadi lisamisega lahusesse ning signaali stabiliseerumine, on näidatud Joonisel 6. Nimetatud joonisel esitatud andmed pärinevad *R. terrigena* biosensori kalibreerimisest teises katseseerias.



Joonis 6. Tüüpiline biosensori kalibreerimisel saadud kõver, mis kirjeldab signaalvastuse sõltuvust ajast ning hapniku kontsentratsioonist. Noolte kõrval on lisamärkusena ära toodud BHT₇ väärtus (mg/l) konkreetsel ajahetkel.

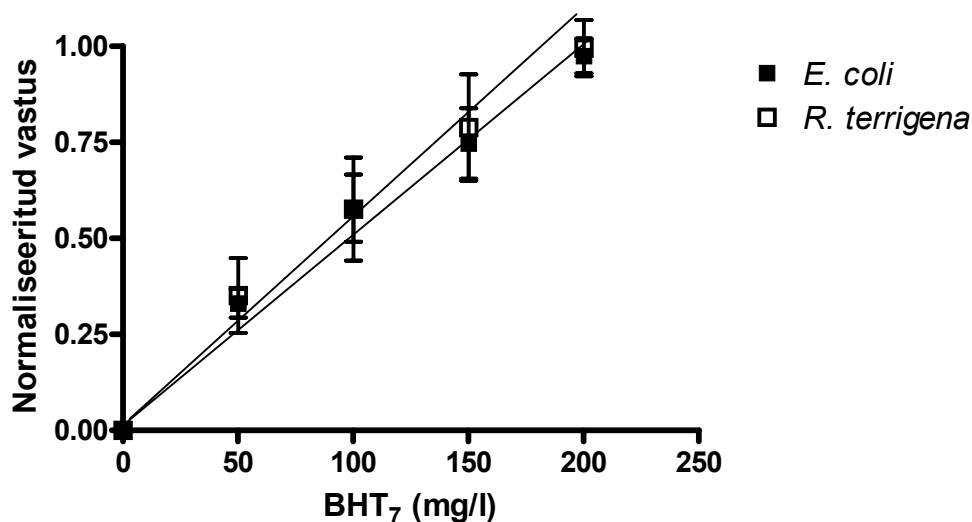
Kalibratsioonikõverad saadi sensori väljundsignaali määramiseks kasutatud statsionaarse oleku mõõtmismeetodi käigus kahe mõõdetud signaalväärtuse erinevuse normeerimisel.

Kalibreerimiskõverate koostamisel oli esimeses katseseerias kasutusel nii *E. coli* kui *R. terrigena* jaoks 4 paralleelmõõtmise keskmist tulemust. Kalibreerimiskõverate loomisel on kasutatud teises katseseerias *E. coli* 6, *R. terrigena* puhul 4 ja *P. fluorescens*'i puhul 7 paralleelmõõtmise keskmist tulemust. Kõikide kõverate puhul on arvesse võetud nii keskvaartust kui ka selle standardhälvet (< 15 %).

3.1.1. Lineaarne ala ja tundlikkus

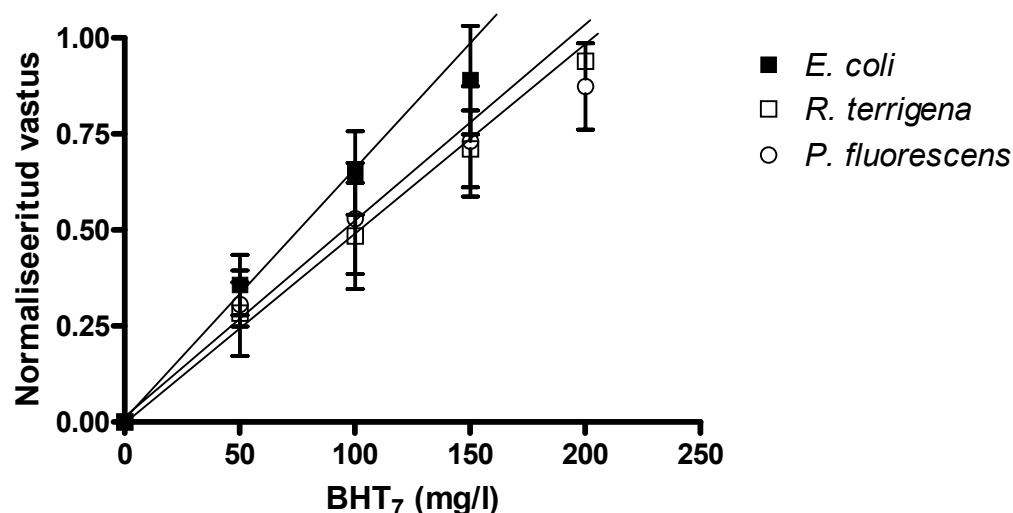
Lineaarne ala näitab kontsentratsioonide vahemikku, kus on võimalik biosensorit kasutada. Esimese katseseeria kalibreerimisgraafikutelt saadud *E. coli* ja *R. terrigena* biosensori lineaarsed piirkonnad sünteetilises reovees on esitatud Joonisel 7.

Mõlema sensori korral ulatub lineaarne piirkond kuni 200 mg/l, mis on küllaltki paljulubav. Graafikul on näha ka biosensorite kalibreerimispunktide hea kokkulangevus, mis annab tunnistust mikroobmembraanide ühtlasest moodustumisest ning bakterite sarnasest reageerimisest kalibratsioonilahusele. Viimane tõestab, et töös kasutatud OECD kunstlik reovesi sisaldab mõlemale kultuurile vajalikke energiaallikaid ning on seetõttu sobilik *E. coli* ja *R. terrigena* biosensori kalibreerimiseks.



Joonis 7. *E. coli* ja *R. terrigena* biosensori lineaarsed alad esimeses katseseerias kalibratsioonilahuse korral.

Teises katseseerias saadud kolme biosensori: *E. coli*, *R. terrigena* ja *P. fluorescens*'i lineaarseid alasid sünteetilises reovees kajastab Joonis 8. Graafikult saab välja lugeda, et lisatava proovi maksimaalne BHT väärtus võib olla *E. coli* sensori puhul oli kuni 150 mg/l, aga *R. terrigena* ja *P. fluorescens* sensori jaoks kuni 200 mg/l. Nimetatud vahemikud on vastavalt ka sensorite lineaarsed piirkonnad. Huvitaval kombel lühenes lineaarne ala *E. coli* biosensori puhul seoses membraanile immobiliseeritud baktermassi kasvuga, kuid *R. terrigena* biosensorit see ei mõjutanud. OECD sünteetilise reovee valiku õigsust kinnitavad ka *P. fluorescens* sensori kalibreerimistulemused, mis on sarnased *R. terrigena* biosensorile. Samuti osutab kõik eelnev sobilikule substraadi lisamise vahemikule.



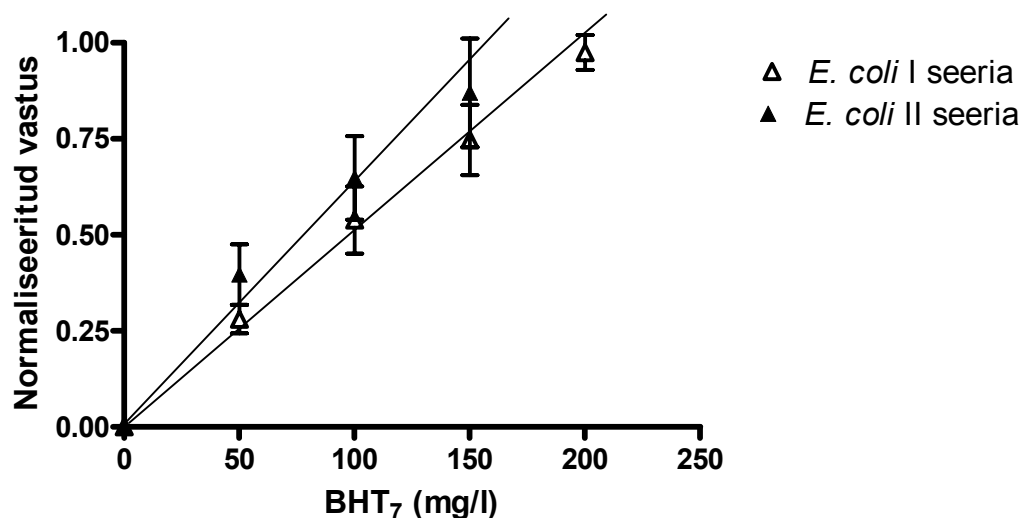
Joonis 8. *E. coli* ja *R. terrigena* biosensori lineaarsed alad teises katseseerias kalibratsioonilahuse korral.

Sensori tundlikkust näitab lineaarse piirkonna tõus: mida järsemalt graafik tõuseb, seda tundlikum on sensor. Kuna antud töös on tegemist positiivse tõusuga, siis mida suurem on tõusu arvuline väärtus, seda tundlikum on sensor.

Esimeses katseseerias olid nii *E. coli* kui *R. terrigena* sensori graafikute tõusud 0,005, mis on üpriski hea. Teises katseseerias näitas *E. coli* sensor kalibreerimise ajal üles suuremat tundlikkust kalibratsioonilahuse suhtes kui *R. terrigena* või *P. fluorescens*'i

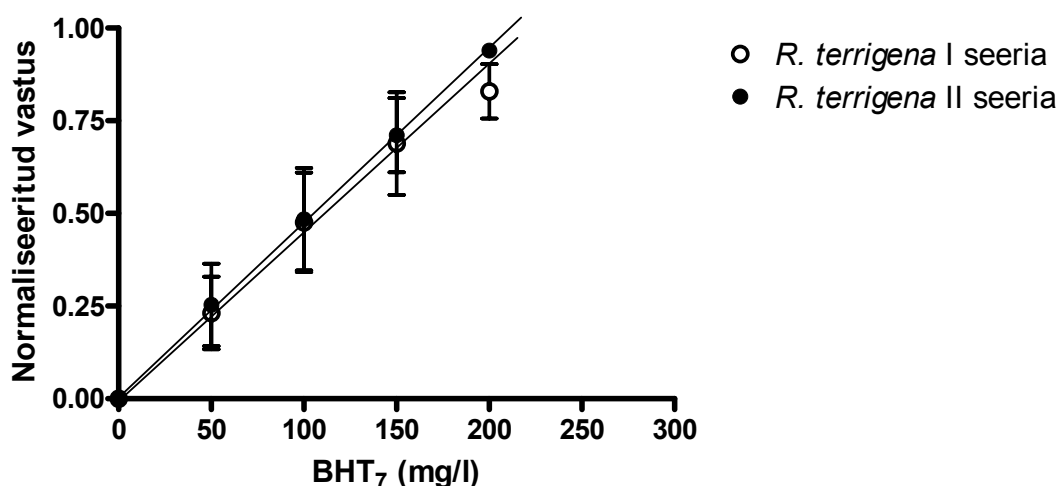
sensor. Sensorite graafiku tõusud olid *E. coli* sensoril 0,007, nii *R. terrigena* kui ka *P. fluorescens* sensoril 0,005. Kultuuride sarnane käitumine kalibratsioonilahuses on heaks eelduseks kultuuride testimisele teistes reovetes.

Kui asetada mõlema katseseeria lineaarsed alad kultuuride lõikes ühele graafikule, on näha erinevust vaid *E. coli* biosensori korral (Joonis 9). Teise seeria graafik tõuseb järsemalt kui esimese seeria oma, mis võib tuleneda sensori paremast stabiilsusest ning tundlikkusest. Üks põhjusi võib olla, et *E. coli* sensoril paiknevate mikroobirakkude optiline tihedus oli teisel korral suurem kui esimesel (2,7 korda), mis muutiski sensori tundlikumaks. Mida rohkem aktiivseid bakterirakke on membraanile kinnitatud, seda rohkem hapnikku tarbitakse ning seda tundlikum on sensor. Kuid nagu eelnevalt märgitud, on oluline roll nii baktersistensiooni tihedusel kui ka statsionaarsel kasvufaasil. Suspensiooni optiline tihedus võib küll piisav olla, kuid määravaks on just aktiivsed bakterirakud, mitte surnud mass. Liiga suur baktermassi hulk membraanil võib negatiivselt mõjutada sensori signaalvastust, kuna on häiritud hapniku ning toitainete transport rakku. Kuid nagu eelnevalt öeldud, lühenes *E. coli* biosensori korral tundlikkuse tõusuga sensori lineaarne ala. Põhjus võib olla selles, et aktiivsed *E. coli* rakud hakkasid koheselt lisatud substraati lagundama, mistõttu tekkis kiirelt küllastus. Viimane väljendus hapnikuandurini jõudva signaali lähenemises nullini.



Joonis 9. *E. coli* biosensori lineaarsed alad esimeses ja teises katseseerias kalibratsioonilahuse korral.

R. terrigena biosensori puhul on aga olukord teistsugune. Joonisel 10 on näha väga head kokkulangevust kahe erineva katseseeria vahel. Seda kuni 150 mg/l BHT₇ väärtuse juures. Mis osutab sellele, et *R. terrigena* biosensori korral ei pruugigi optiliste tiheduste kolmekordne vahe sensori tundlikkust mõjutada. Alates 150 mg/l BHT₇ väärtuse juures toimub kahe katseseeria tulemuste lahknevus.



Joonis 10. *R. terrigena* biosensori lineaarsed alad esimeses ja teises katseseerias kalibratsioonilahuse korral.

3.1.2. Sensori vasteaeg

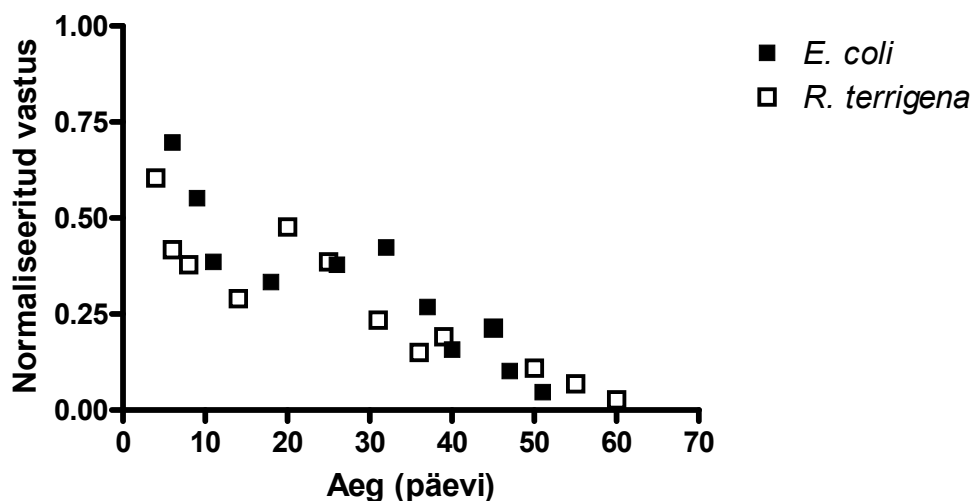
BHT mõõtmiste käigus leiab aset immobiliseeritud mikroorganismide endogeenne ja aktiivne hingamine. Kui lahusele lisatakse substraati, hakkavad membraanile kinnitatud bakterid orgaaniliste ühendite lagundamiseks tarbima vees lahustunud hapnikku. Selle protsessi tõttu hapnikuandurini jõudev O₂ kogus väheneb. Läbi membraani difundeerunud O₂ hulk näitab, palju kasutavad seda ära mikroorganismid reoainete lagundamiseks. Mida suurem on reoainete sisaldus lahuses, seda vähem hapnikku andurini jõuab. Vasteaeg näitab bakterite valimisolekut lagundada lihtsamaid ühendeid.

Nii esimese kui teise katseseeria puhul oli *E. coli* sensoril vasteaeg mõõtmiste vältel lühem ning stabiilsem kui *R. terrigena*’l. Kui membraanid võeti säilituslahusest (4 °C) välja, siis *E. coli* sensori vasteaeg oli 15-20 minutit. *R. terrigena* puhul vasteaeg

varieerus ning oli katse alguses kuni 30 minutit, mõõtmise keskpaigas see lühenes 20 minutile ning oli katsete lõpus 15 minutit. *P. fluorescens* biosensori vasteaeg jäi 15 ja 45 minuti vahele. See näitab, et *E. coli* baktermembraanid võetuna säilituslahusest on koheselt valmis mõõtmisprotsessiks. Seevastu *R. terrigena* ja *P. fluorescens* vajaksid enne mõõtmisi eelnevat adaptatsiooni toetemperatuurile.

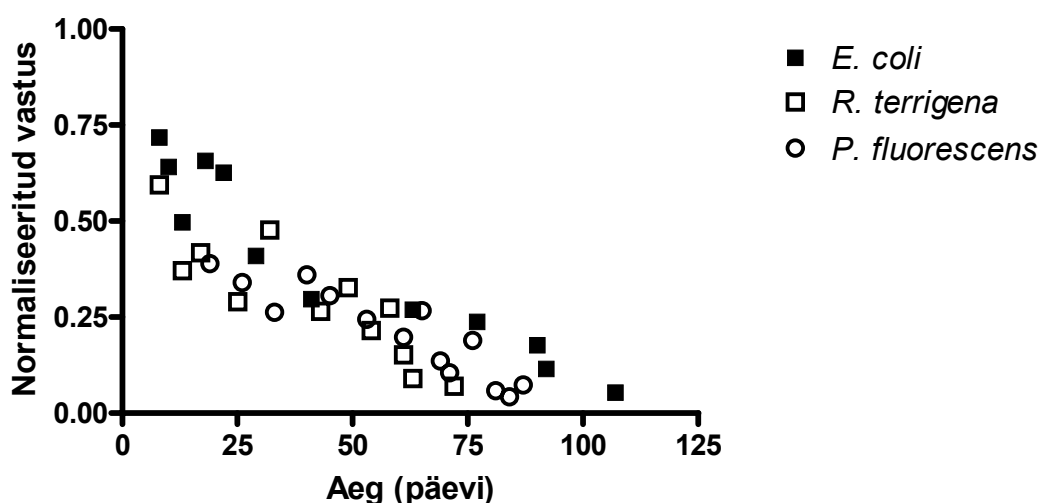
3.1.3. BHT-sensorite eluiga ning taasteaeg

Sensorite töötamisstabiilsus on seotud membraanile immobiliseeritud mikroorganismide stabiilsusega. Kuna esimeses katseseerias oli baktermembraanidele immobiliseeritud suspensiooni optiline tihedus väiksem kui teises katseseerias, siis sellest tulenevalt olid erinevad ka sensorite eluead. Esimeses katseseerias oli *E. coli* sensori töötamisperiood 37 päeva, *R. terrigena* sensoril 31 päeva. Joonis 11 kirjeldab, kuidas muutus ühe kindla kontsentratsiooni juures sensori signaalvastus nii *E. coli* kui *R. terrigena* sensori puhul. On näha, et 30 ja 40 päeva vahel hakkab membraanide töötamisaeg lõppema. Sama kontsentratsiooni juures on membraanide normeeritud vastus tunduvalt väiksem kui algusperioodil ning aja kasvades see hääbub täiesti.



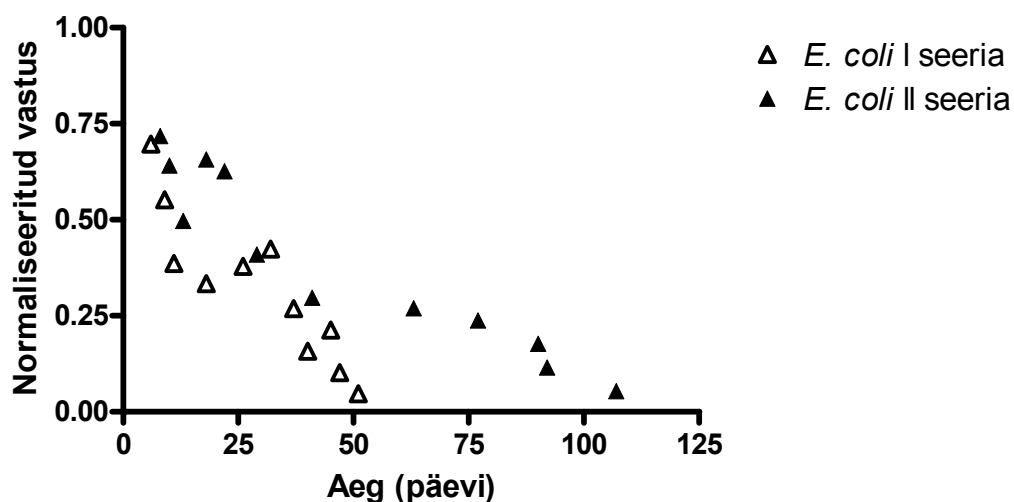
Joonis 11. Esimeses seerias toimunud signaalvastuse muutus ajas kalibratsioonilahuse puhul ($[c] = 50 \text{ mg/l BHT}_7$).

Teie katseseeria puhul jäid töös kasutatud biomembraanid stabiilseks rohkem kui üheks kuuks peale immobiliseerimisprotsessi. *E. coli* sensori töötamisperiood oli 60 päeva, *R. terrigena* sensoril aga 40 päeva. *P. fluorescens* biomembraani eluiga oli samuti 60 päeva. Pärast nimetatud perioodi leidis aset sensorite signaalvastuse vähenemine ning membraanid kaotasid kasutavuse. Signaali vähenemine ajas teise katseseeria korral on näidatud Joonisel 12.



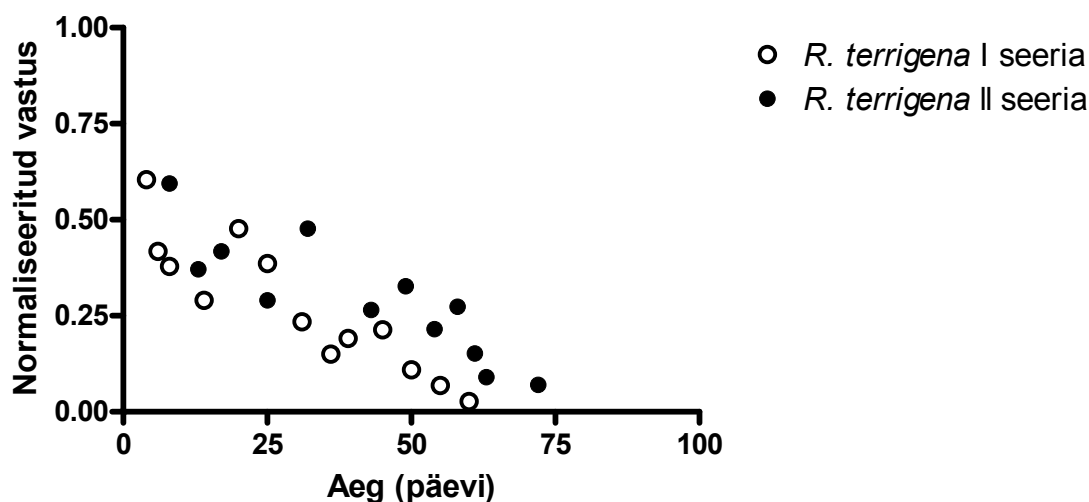
Joonis 12. Teises seerias toimunud signaalvastuse muutus ajas kalibratsioonilahuse puhul ($[c] = 50 \text{ mg/l BHT}_7$).

Nagu eelnevalt mainitud, *E. coli* baktersistensiooni suurem optiline tihedus membraanil mitte ainult ei suurenda rakkude stabiilsust, vaid ka sensori eluiga (Joonis 13). Võib oletada, et *E. coli* rakud on võimelised paremini taluma temperatuuri muutust, mis on vajalik immobiliseerimisprotsessiks ning samuti on vastupidavamad kõrvalfaktorite mõjule mõõtmisperioodi vältel.



Joonis 13. *E. coli* biosensori signaali vähenemine esimeses ja teises katseseerias sõltuvalt elueast.

Katseseeriade lineaarseid piirkondi võrreldes selgus, et *R. terrigena* sensori puhul ei pruugi paksem baktersistensiooni mass suurendada sensori tööpiirkonda, ega ka pikendada kultuuri eluiga. Teises katseseerias kasvas *R. terrigena* biosensori eluiga ainult 9 päeva võrra: 31 päevalt 40 päevale (Joonis 14). Üheks võimaluseks on, et *R. terrigena* rakud ei pärinenud aktiivsest statsionaarsest kasvufaasist. Baktersistensioon võis teises katseseerias sisaldada lisaks aktiivsetele elusrakkudele ka surnud rakke, mis tõstsid massi optilist tihedust. Tõenäoline on, et *R. terrigena* rakud lüüsuvad kiiremini kui teised töös kasutatud kultuurid. Samuti võisid *R. terrigena* membraanide eluiga vähendada kõrvalfaktorid.



Joonis 14. *R. terrigena* biosensori signaali vähenemine esimeses ja teises katseseerias sõltuvalt elueast.

Taastumisperiood oli mõlema katseseeria korral kõikidel sensoritel katsete alguses peaaegu nädal, hiljem see vähenes 2-3 päevale. Pikem taasteperiood mõõtmiste alguses osutab sisemiste toitainete varude esinemisele bakterirakkudes. Hiljem tarbiti need mikroobide elutegevuse käigus ära ning taasteperiood lühenes.

3.2. Mõõtmised reoveeproovides

Hindamaks konstrueeritud *E. coli* ja *R. terrigena* biosensorite sobilikkust just piimatööstuse heitvete jaoks, kasutati sellelaadse reovee imiteerimiseks sünteetilise reovee ja piima lahust (proov A). Kuna katsete eesmärgiks oli näidata, et poolspetsiifilised biosensorid on võimekamad piimatööstuse reovetes leiduva orgaanika lagundamises kui tavalised biosensorid, rakendati võrdlusena *P. fluorescens* kultuuri.

Hindamaks *E. coli* ja *R. terrigena* biosensorite spetsiifilisust reaalsete piimatööstuse reovete jaoks, kasutati Põlva Piimatööstuse reoveest võetud proove (proov B ja proov C) ning võrdlusena fenoolset reovett (proov D). Reoveeproovide mõõtmiste käigus olid kasutusel teises katseseerias konstrueeritud biomembraanid. Edaspidi võetakse arvesse

vaid nendega saadud tulemusi, kuna esimese seeria biomembraanide eluiga ei olnud kahjuks piisavalt pikk, et neid teistes reovetes testida.

BHT mõõtmiste graafikute jaoks kasutati *E. coli* puhul 7, *R. terrigena* puhul 4 ja *P. fluorescens* jaoks 2 paralleelmõõtmiste keskmist tulemust.

3.2.1. Täpsus, lineaarne ala ning tundlikkus uuritavates proovides

Biosensori kirjeldamisel on oluline omadus selle tulemuste korduvus, mis näitab sensori täpsust. Biosensorite töötamisaeg on piiratud, sest varem või hiljem agarooxi kinnitatud rakud lüüsuvad. Seetõttu peetakse tulemuste korduvust väga oluliseks kvaliteedinäitajaks.

Katsetest selgus, et paralleelsete mõõtmiste standardhälve oli kõige väiksem *E. coli* membraani korral. See näitab, et *E. coli* kohanes teiste kultuuridega võrreldes kiiremini ning oli valmis lagundama reovees sisalduvaid orgaanilisi ühendeid. Kahjuks *R. terrigena* biosensori eluiga oli oodatust lühem ning seetõttu ei saanud bakterirakkude aktiivsuse vähenemise tõttu reovee proove B ja C antud sensoriga testida.

Nagu eelpool öeldud, sensorite lineaarne vahemik ning tundlikkus omavad olulist tähtsust spetsiifiliste reovete BHT mõõtmiste juures. Täpsus, lineaarne ala ning tundlikkus kui tähtsaimad sensorite omadused on kirjeldatud Tabelis 4.

Tabel. 4. Biosensorite põhilised omadused kasutatud reoveeproovides.

		Reoveeproov			
		Proov A	Proov B	Proov C	Proov D
Standardhälve paralleel- tulemuste vahel	<i>E. coli</i> biosensor	≤ 14 %	≤ 10 %	≤ 12 %	≤ 20%
	<i>R. terrigena</i> biosensor	≤ 19 %	—	—	—
	<i>P. fluorescens</i> biosensor	≤ 20 %	—	—	≤ 5 %
Lineaarne ala	<i>E. coli</i> biosensor	≤ 90 mg/l	≤ 110 mg/l	≤ 80 mg/l	≤ 60 mg/l
	<i>R. terrigena</i> biosensor	≤ 90 mg/l	—	—	—
	<i>P. fluorescens</i> biosensor	≤ 300 mg/l	—	—	≤ 90 mg/l
Sirge tõus	<i>E. coli</i> biosensor	0,01	0,007	0,01	0,008
	<i>R. terrigena</i> biosensor	0,01	—	—	—
	<i>P. fluorescens</i> biosensor	0,003	—	—	0,01

Tulemusi vaadeldes selgub, et *E. coli* biosensori puhul olid proovis A-C väiksemad kõrvalekalded paralleeltulemuste suhtes kui proovis D, milleks oli fenoolne reovesi. Nagu Tabelist 4 järeldeb, oli *E. coli* biosensoril reaalsete piimatööstuse heitvete BHT paralleeltulemuste kokkulangevus hea, vastavalt ≤ 10 % ja ≤ 12 %, mis lähevad igati APHA lubatud ± 15 % vahemikku [11]. Paraku ületab *R. terrigena* biosensori standardhälve (≤ 19 %) lubatud piiri. Proovis D on *E. coli* biosensori kõrvalekalle kuni 20 %, mis on juba liiga suur. *P. fluorescens* näitas aga fenoolses proovis D üles väga head tulemuste korduvust (≤ 5%) kuid proovis A hälbis vastupidiselt *E. coli* biosensorile suuresti (≤ 20 %). Erinevused biosensorite tulemuste kokkulangevuses on tingitud kasutatud reovete koostisest, mis mõjutab bakteriaalse hingamise kiirust.

Lisaks omastavad immobiliseeritud bakterid orgaanilisi aineid erinevate metaboolsete radade käigus erisuguste ensüümide abil [52].

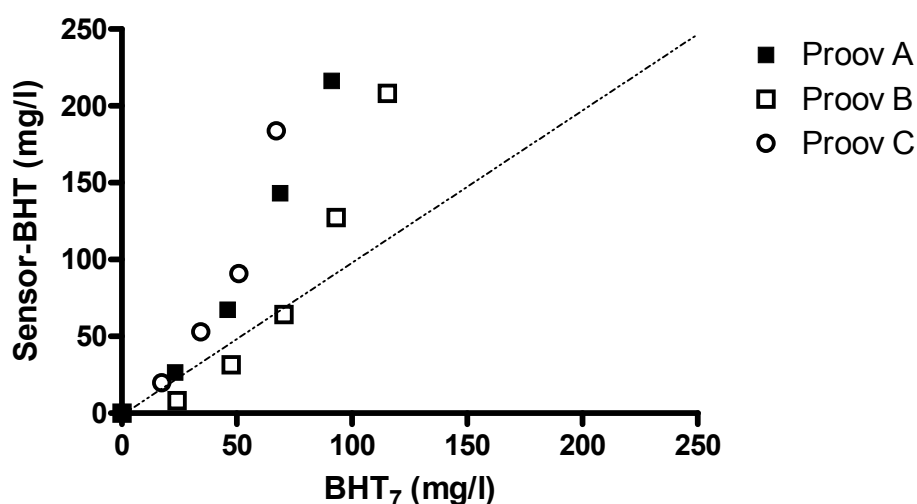
Lineaarne ala oli proovis A nii *E. coli* kui ka *R. terrigena* biosensoril sama (90 mg/l), kuid *P. fluorescens*'il suur (300 mg/l). Tundlikkust saab kirjeldada ka läbi lineaarse ala: tundlikkuse väärtus on pöördvõrdeline lineaarse piirkonnaga. Proovilahuses A oli nii *E. coli* kui ka *R. terrigena* tundlikkus 0,01. *E. coli* puhul täheldati sama tundlikkust ka proovi C suhtes, kuid proovides B ja D oli see mõnevõrra väiksem (0,007 ja 0,008). Vastupidiselt *E. coli* biosensorile näitas *P. fluorescens* üles suurt tundlikkust proovi D suhtes (0,01) ja madalat tundlikkust proovi A suhtes (0,003).

Bakterite metabolismi eripäradest tulenevad ka erinevused töös kasutatud mikroobmembraanide lineaarsete alade tõusudest, mis kirjeldavad sensori tundlikkust. Kui hapnikutarbe kiirus on madal, toimub proovi lisatava substraadi lagundamine aeglaselt. Põhjus on kas sobimatutes keskkonnatingimustes või ei sisalda lisatav substraat mikroobidele eluks vajalikke energiaallikaid. Kuna kalibreerimine toimus edukalt samadel keskkonnatingimustel kui proovide A-D mõõtmine, siis keskkonnatingimused määravaks faktoriks ei olnud. Seega jääb üle võimalus, et bakteritel kas üldse puuduvad rakus vastavates proovides leiduvate ühendite lagundamiseks vajalikud ensüümid või neid ei suudeta nii kiiresti aktiveerida. See kajastubki pikas lineaarses alas ning väikeses graafiku tõusus. Nimetatust nähtubki, et kasutatud *E. coli* biosensor on spetsiifilisem just piimatööstuse reovete jaoks ning *P. fluorescens* annab paremaid tulemusi fenoolsetes heitvetes.

3.2.2. Sensor-BHT ja BHT₇ võrdlus

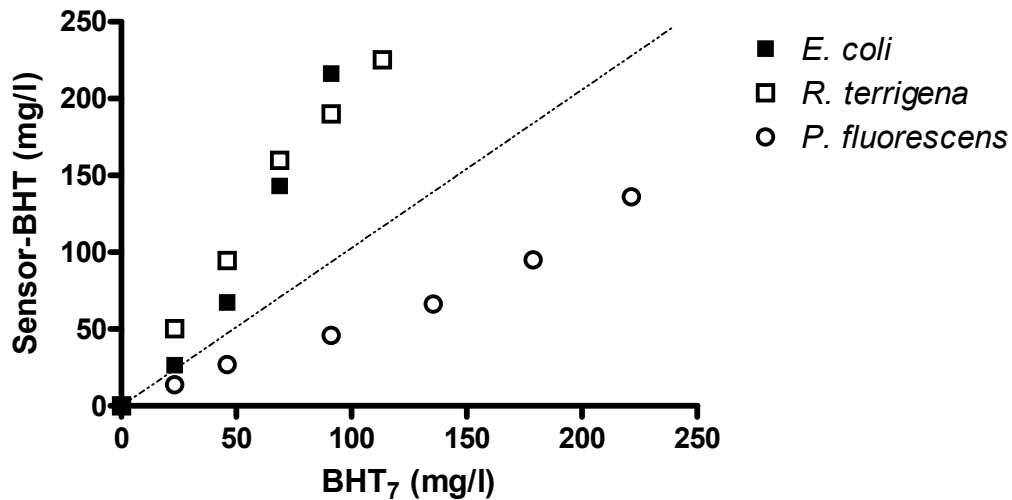
Piimatööstuse heitvete jaoks testiti kahte bakterikultuuri, *E. coli* ja *R. terrigena*, millest moodustatud mikroobmembraan ühendati hapnikuanduriga. Reoveeproovides A-C mõõdeti nii sensor-BHT kui ka tavapärane BHT₇. Lahuste hetkeline BHT₇ arvutati vastavalt lahuse tavapärase BHT₇ väärtusele ning vastandati sensor-BHT väärtusega. *E. coli* rakkudel põhinev biosensor ülehindab nii proovis A kui C proovi BHT väärtust; proovis B toimub aga madalamatel BHT väärtustel alahindamine (Joonis 15). Ülehindamine võib olla tingitud sellest, et proovilahused B ja C võeti reoveepuhastist erinevatel aegadel ning sellest sõltuvalt on erinev ka nende koostis. Viimane kajastub ka

BHT₇ väärtuste erinevuses. Katsetulemustest võis järeldada, et proovilahus C sisaldas *E. coli* rakkude jaoks rohkem kiirestiomastatavaid toitained kui proov B. Mida rohkem lisati proovikeskkonda substraati, seda suurem oli *E. coli* sensor-BHT ülehindamine. Võimalik, et kõrgematel kontsentratsioonidel kiirenevad lagundamisprotsessi katalüüsreaktsioonid veelgi, mis suurendab omastavate ühendite lagundamist ning sellest tulenevalt ka hapnikutarvet. Katalüsaatoritena võivad esineda kas reoveeproovis sisalduvad ühendid või nende koosmõju teiste oluliste teguritega (temperatuur jne). Vastavalt Michaelis-Menteni võrrandile, mis iseloomustab reaktsiooni kiiruse ja substraadi kontsentratsiooni vahelist sõltuvust, on madalatel substraadi kontsentratsioonidel reaktsioon esimest, kõrgematel aga null-järku.



Joonis 15. Korrelatsioon *E. coli* sensor-BHT ja BHT₇ vahel reoveeproovides A-C. Graafikul olev abijoon näitab 1/1 sensor-BHT ja BHT₇ korrelatsiooni.

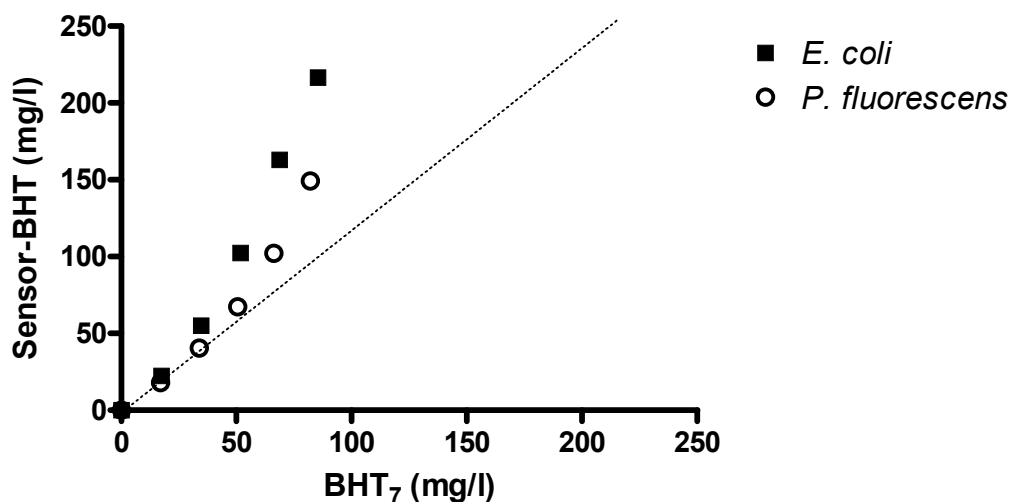
Joonis 16 iseloomustab kolme bakterikultuuri käitumist proovis A. On näha, et *E. coli* ja *R. terrigena* sensorid ülehindavad proovilahuse BHT väärtust, mis viitab asjaolule, et proovis sisaldus mõlemale kultuurile lagundamiseks sobivaid aineid. Küll aga alahindab *P. fluorescens* proovi A BHT väärtust suuresti.



Joonis 16. Korrelatsioon *E. coli*, *R. terrigena* ja *P. fluorescens* sensor-BHT ja BHT₇ vahel proovis A. Graafikul olev abijoon näitab 1/1 sensor-BHT ja BHT₇ korrelatsiooni.

Proovilahus A ei olnud järelikult *P. fluorescens*'i jaoks sobivaks substraadiks. Kuna prooviks A oli kalibratsioonilahus, millele oli lisatud 1 ml piima, võib sellest järeldada, et piimas sisalduv ühend/ühendid pärivad *P. fluorescens*'is edasist orgaaniliste ainete omastamist. Sellega saab kinnitust ka väide, et *E. coli* ja *R. terrigena* kultuuri on võimalik kasutada piimatööstuse reovee BHT mõõtvast biosensoris bioloogilise elemendina ning saadav tulemus on tunduvalt kiirem ja õigem kui mittespetsiifilist *P. fluorescens* kultuuri kasutades. Siiski leiab märkimist ka asjaolu, et *E. coli* biosensor oli märksa sobilikum ning paindlikum töös kasutatud proovide BHT määramiseks kui *R. terrigena* biosensor.

E. coli ja *P. fluorescens* sensor-BHT ja BHT₇ võrdlust proovis D, milleks oli fenoolne reovesi, illustreerib Joonis 17.



Joonis 17. Korrelatsioon *E. coli* ja *P. fluorescens* sensor-BHT ja BHT₇ vahel proovis D. Graafikul olev abijoon näitab 1/1 sensor-BHT ja BHT₇ korrelatsiooni.

Nagu sellelt nähtub, on esimene sensor-BHT väärtus mõlemal bakterikultuuril samaväärne BHT₇ väärtusega. Seejärel hakkab *E. coli* sensor BHT₇ väärtust kiiremini ülehindama, samal ajal kui *P. fluorescens* sensori kolm esimest sensor-BHT väärtust kattuvad BHT₇ väärtusega. Viimane näitab, et *P. fluorescens* sensor on poolspetsiifiline just fenoolsete reovete jaoks. Mida suuremaks lisatava substraadi kontsentratsioon muutus, seda enam ülehindas *E. coli* sensor proovi BHT. Kuid tuleb täheldada, et proovil D ning kalibratsioonilahusel oli sarnane BHT₇ väärtus (vastavalt 1721 mg/l ning 1780 mg/l). APHA järgi võib BHT₇ mõõtmisel tehtud viga olla $\pm 15\%$ [11], mis tähendab, et mõlemad nimetatud BHT väärtused saavad olla näiteks ühe ja sama proovi erinevad mõõtmistulemused. Siiski hälbisid *E. coli* biosensori paralleelkatsete tulemused nimetatud lahuses $\leq 20\%$, mis jääb lubatavast vahemikust välja.

Kuigi katsetest selgub, et koostatud BHT-biosensorid pigem üle- kui alahindavad BHT väärtust, on suuremaks probleemiks nende ebaühtlane korrelatsioon tavapärase BHT₇ meetodiga. Viimane sõltub lisatava substraadi (reovee) kontsentratsioonist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli konstrueerida piimatööstuse reovete jaoks biokeemilise hapnikutarbe (BHT) kiiremaks mõõtmiseks BHT-biosensor. Selleks kasutati sensori bioloogilise elemendina bakterikultuuride *Escherichia coli* R17.1.3 (*E. coli*) ja *Raoultella terrigena* P74.3 (*R. terrigena*) elusrakke, mis olid immobiliseeritud agarooši sisse. Nimetatud bakterikultuurid valiti antud tööks, kuna nad on võimelised lagundama piimatööstuse heitvetes leiduvat laktoosi. Võrdluskultuurina kasutati *Pseudomonas fluorescens* tüve P75 (*P. fluorescens*), kes on universaalne reoainete lagundaja, kuid ei lagunda eriti piimavalke.

Esimeses katseseerias moodustati *E. coli* ja *R. terrigena* mikroobmembraan madalama optilise tihedusega baktermassist. Sellest tulenevalt jäi membraanide eluiga lühikeseks. Teises katseseerias kasutati kõrgema optilise tihedusega baktersistensiooni, mis parandas *E. coli* membraani eluiga ning stabiilsust. *R. terrigena* membraani eluiga ning mõõtmispüsivust see oluliselt ei tõstnud. *E. coli* ning võrdluskultuuri *P. fluorescens* biomembraanid olid stabiilsed ning andsid korratavaid tulemusi kauem kui 55 päeva, samal ajal kui *R. terrigena* kultuur püsis stabiilsena 4 mõõtmiskorda ning töötamisaega oli veidi üle ühe kuu.

Testid näitasid, et *E. coli* biosensor oli kalibratsioonilahuse suhtes tundlikum (tõus 0,007) ning lühema vasteajaga (≤ 20 min) kui *R. terrigena* biosensor (tõus 0,005, vasteaeg ≤ 30 min) või *P. fluorescens* biosensor (tõus 0,005, vasteaeg ≤ 45 min). Kalibratsioonilahuses oli nii *R. terrigena* kui *P. fluorescens* biosensoril suurem lineaarne vahemik kui *E. coli* biosensoril (vastavalt 200 mg/l ja 150 mg/l).

Proovis A (süntetilise reovee ja piima lahus) oli mõlemal piimatööstuse reoveele poolspetsiifilisel sensoril sama lineaarne piirkond (90 mg/l) ning tundlikkus (0,01). Kuid jällegi oli *E. coli* biosensoriga standardhälve paralleelkatsete vahel väiksem (≤ 14 %) ning jäi lubatud ± 15 % piiresse võrreldes *R. terrigena* (≤ 19 %) või *P. fluorescens*

($\leq 20\%$) biosensoriga. Kuigi nii *E. coli* kui *R. terrigena* mõlemad biosensorid ülehindasid BHT väärtust nimetatud proovis, on need bakterikultuurid piimatööstuse reovete BHT mõõtmiseks sobivamad kui mitte-spetsiifilised. Testid näitasid, et *P. fluorescens* omas kõige väiksemat tundlikkust proovis A (tõus 0,003) ja alahindas suuresti proovi BHT väärtust. Reaalses Põlva reoveepuhastist pärinenud heitveeproovidest (proovidest B ja C) saadud sensor-BHT ja BHT₇ väärtuste korrelatsioon ei olnud küll ühtlane kogu lineaarse ala korral, kuid siiski lootustandev. Proovid B ja C olid võetud Põlva reoveepuhastist erinevatel aegadel, sellest tulenevalt varieerusid need koostise poolest. Eelpoolnimetatust olenevalt toimus *E. coli* sensoriga esimeses lahuses alahindamine ning teises ülehindamine. Reaalsete reovete lahendamisel tulekski arvestada reovee koostisest tingitud iseärasusi, mis mõjutavad mikroorganismide hingamist. Arvesse peaks võtma ka seda, et membraanile kinnitatud organismid ei suuda lühikese aja jooksul kõrgema molekulaarmassiga ühendeid oma rakkudesse transportida ning neid lagundada. Seepärast sensor-BHT korral jääb keerulisemate ühendite lagundamisest tulenev võimalik BHT₇ väärtuse muut märkimata.

Töös saadud tulemustest järeldus, et nii *E. coli* kui *R. terrigena* biosensorid on piimatööstuse heitvete jaoks pool-spetsiifilised. Kinnitust sai ka tõik, et võrdluskultuur *P. fluorescens* seda ei ole. *E. coli* oli stabiilsem, tundlikum ning andis kauem korduvaid tulemusi kui *R. terrigena* biosensor. Samuti oli tal pikem eluiga, kuid tema kasutamine ja sobilikkus piimatööstuse heitvete jaoks vajab veel täiendavaid katsetusi, saavutamaks ühtlasemat korrelatsiooni tavapärase BHT meetodiga.

SUMMARY

TESTING BACTERIAL CULTURES OF *ESCHERICHIA COLI* AND *RAOULTELLA TERRIGENA* IN SEMI-SPECIFIC BOD BIOSENSORS FOR DAIRY WASTEWATER

Evelin Linde

In this study the semi-specific BOD biosensors for the fast determination of the biochemical oxygen demand (BOD) of dairy wastewater were constructed. The biorecognition element consisted of cells of *Escherichia coli* R17.1.3 (*E. coli*) and *Raoultella terrigena* P74.3 (*R. terrigena*) immobilized in agarose gel matrix. These bacteria were selected due to their ability to degrade lactose that is found in dairy wastewaters. In comparison bacterial cells of *Pseudomonas fluorescens* P75 (*P. fluorescens*) were used in biosensor system.

Testing series with *E. coli* and *R. terrigena* biomembranes of lower and higher optical density of cell suspension were made. The experiments showed that *E. coli* biomembranes of higher cell concentration were more stable and had longer lifetime than membranes with lower cell concentration. The increase of cell concentration within *R. terrigena* biomembranes did not have any significant effect on lifetime or stability.

Activated *E. coli* and *P. fluorescens* biomembranes gave reproducible results and remained stable for more than 55 days. With *R. terrigena* the reproducibility and the stability period was slightly over month.

The tests showed that *E. coli* biosensor was more sensitive to the calibration solution (slope 0,007) and also had shorter response time (≤ 20 min) than *R. terrigena* biosensor (slope 0,005, response time ≤ 30 min) or *P. fluorescens* biosensor (slope 0,005, response

time ≤ 45 min). In calibration solution both *R. terrigena* and *P. fluorescens* biosensors had linear range up to 200 mg/l, whereas *E. coli* biosensor had linear range up to 150 mg/l. The standard deviation between parallel results was also smaller with *E. coli* biosensor ($\leq 14\%$) than with *R. terrigena* or *P. fluorescens* biosensor (correspondingly $\leq 16\%$ and $\leq 15\%$).

In the sample A (mixture of synthetic wastewater and milk) both semi-specific biosensors had the same linear range (90 mg/l) and sensitivity (0,01) but the standard deviation between parallel results was again reduced with *E. coli* biosensor ($\leq 14\%$) compared to *R. terrigena* or *P. fluorescens* biosensors (correspondingly $\leq 19\%$ and $\leq 20\%$). Although *E. coli* and *R. terrigena* biosensors overestimated the BOD value in the sample solution A, these bacterial cultures are more suitable for BOD monitoring in dairy wastewater than non-specific ones, as the tests indicated that the comparison biosensor *P. fluorescens* was least sensitive to sample A (slope 0,003) and greatly underestimated the BOD₇ of the sample.

The correlation between sensor-BOD and BOD₇ was not single-valued within linear area but still hopeful. The B and C samples of Põlva wastewater treatment plant were taken in different times and consequently varied in composition. This could be the reason why *E. coli* biosensor overestimated BOD in sample C and underestimated it in sample B. The different composition of wastewater has different effect on bacterial respiration. It has to be considered that immobilized microorganisms are not able to transport substances with higher molecular weight with short time into their cells and decompose them. Due to that the sensor-BOD indicates only the degradation of easier substances.

Comparison of two semi-specific biosensors of the present study showed that *E. coli* biosensor was not only more stable, sensitive and reproducible, but it also had longer lifetime than *R. terrigena* biosensor.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization. Water Portal [<http://www.unesco.org/water>] 05.02.2008.
2. FAO Water Reports. (2003). "Review of World Water Resources by Country", No. 23. [<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y4473E/y4473E00.pdf>] 07.09.2007.
3. Costanzo, S. D., Murby, J. and Bates, J. (2005). "Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment." *Marine Pollution Bulletin* **51**(1-4): 218-223.
4. Chen, G. and White, P. A. (2004). "The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **567**(2-3): 151-225.
5. Wang, C. X., Wang, Y., Kiefer, F. Y. A., Wang, Z. J. and Kettrup, A. (2003). "Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**(2): 211-217.
6. Minh, T. B., Minh, N. H., Iwata, H., Takahashi, S., Viet, P. H., Tuyen, B. C. and Tanabe, S. (2007). "Persistent Organic Pollutants in Vietnam: levels, patterns, trends and human health implications." *Developments in Environmental Sciences* **7**(2): 515-555.
7. Keller, V. (2006). "Risk assessment of "down-the-drain" chemicals: Search for a suitable model." *Science of The Total Environment* **360**(1-3): 305-318.
8. Camargo, J. A. and Alonso, Á. (2006). "Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment." *Environment International* **32**(6): 831-849.

9. Davies, J. M. and Mazumder, A. (2003). „Health and environmental policy issues in Canada: the role of watershed management in sustaining clean drinking water quality at surface sources. “*Journal of Environmental Management* **68**(3): 273-286.
10. Daughton, C. G. (2004). “Non-regulated water contaminants: emerging research.” *Environmental Impact Assessment Review* **24**(7-8): 711-732.
11. American Public Health Association (APHA), (1986) 16th Ed.
12. Gray, N. F. (2004). “Biology of Wastewater Treatment.” 2nd Ed. [http://www.worldscibooks.com/environsci/etextbook/p266/p266_chap1_3.pdf] 12.01.2008.
13. Janczukowicz, W., Zieliński M. and Dębowski, M. (2008). “Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production.” *Bioresource Technology* **99**(10): 4199-4205.
14. Arros, S., Torrijos, M., Gésan-Guiziou, G., Merin, U., Lafforgue, C. and Daufin, G. (2001). „Is the anaerobic membrane bioreactor a valuable process for purification af end-of-pipe dairy wastewater with reduced sludge production?” *International Conference: Membrane technology for wastewater reclamation and reuse*. pp: 98-113.
15. Healy, M. G., Rodgers, M. and Mulqueen, J. (2007). „Treatment of dairy wastewater using constructed wetlands and intermittent sand filters.” *Bioresource Technology* **98**(12): 2268-228.
16. Ramasamy, E. V. and Abbasi, S. A. (2000). “Energy recovery from dairy wastewaters: impacts of biofilm support systems on anaerobic CST reactors.” *Applied Energy* **65**(1-4): 91–98.
17. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. and Bunko, K. (2007). “Bioutilisation of whey for lactic acid production.” *Food Chemistry* **105**(1): 1-14.
18. Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R. and Lema, J. M. (2000). “Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters.” *Bioresource Technology* **74**(3): 231-239.

19. Ramasamy, E. V., Gajalakshmi, S., Sanjeevi, R., Jithesh, M. N. and Abbasi, S. A. (2004). "Feasibility studies on the treatment of dairy wastewaters with upflow anaerobic sludge blanket reactors." *Bioresource Technology* **93**(2): 209-212.
20. Petruy R. and Lettinga, G. (1997). "Digestion of a milk-fat emulsion." *Bioresource Technology* **61**(2): 141-149.
21. Perle, M., Kimchie, Sh. and Shelef, G. (1995). "Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater." *Water Research* **29**(6): 1549-1554.
22. Carta-Escobar, F., Pereda-Marín, J., Álvarez-Mateos, P., Romero-Guzmán, F., Durán-Barrantes, M. and Barriga-Mateos, F. (2004). "Aerobic purification of dairy wastewater in continuous regime: Part I: Analysis of the biodegradation process in two reactor configurations." *Biochemical Engineering Journal* **21**(2): 183-191.
23. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, G. S. (2001). "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification." *Biosensors and Bioelectronics* **16**(1-2): 121-131.
24. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda, M. J, Marco, M. P. and Barcelo, D. (2004). „Biosensors for environmental applications: Future development trends." *Pure Applied Chemistry* **76**(4): 723-753.
25. Kurg, A. (2003). „Biosensorid" loengukonspekt.
26. Marazuela, M. D., Moreno-Bondi, M. C. (2002). "Fiber-optic biosensors – an overview." *Anal. Bioanal. Chem.* **372**(5-6): 664-682.
27. Turner, A. P. F. (2000). *Science* **290**(5495): 1315-1317.
28. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda, M. J, Marco, M. P. and Barcelo, D. (2005). „Biosensors for environmental monitoring: A global perspective." *Talanta* **65**(2): 291-297.
29. Ramanathan, K. and Danielsson, B. (2001). "Principles and applications of thermal biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* **16**(6): 417-423.
30. Chauhan, S., Rai, V., Singh, H.- B. (2004). "Biosensors." *Resonance*. pp.: 33-44.

31. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M. (1997). "DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review." *Analytica Chimica Acta* **347**(1-2): 1–8.
32. Hock, B., Wanebo, H. J., Chougule, P., Akerley, W. L., Koness, R. J., McRae, R., Nigri, P., Leone, L., Ready, N., Safran, H., Webber, B., Cole, B. (1997). "Antibodies for immunosensors." *Analytica Chimica Acta* **347**(1-2): 177-186.
33. Wang, J. (2002). "Electrochemical nucleic acid biosensors." *Analytica Chimica Acta* **469**(1): 63-71.
34. Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A. (2006). "Microbial biosensors." *Analytica Chimica Acta* **568**(1-2): 200-210.
35. Bjerketorp, J., Håkansson, S., Belkin, S. and Jansson, J. K. (2006). „Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active." *Current Opinion in Biotechnology* **17**(1): 43-49.
36. Popovtzer, R., Natan, A. and Shacham-Diamand, Y. (2007). "Mathematical model of whole cell based bio-chip: An electrochemical biosensor for water toxicity detection." *Journal of Electroanalytical Chemistry* **602**(1): 17-23.
37. Bettaieb, F., Ponsonnet, L., Lejeune, P., Ouada, B. H., Martelet, C., Bakhrouf, A., Jaffrézic-Renault, N. and Othmane, A. (2007). "Immobilization of *E. coli* bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design." *Bioelectrochemistry* **71**(2): 118-125.
38. Premkumar, J. R., Rosen, R., Belkin, S. and Lev, O. (2002). "Sol–gel luminescence biosensors: Encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films". *Analytica Chimica Acta* **462**(1): 11–23.
39. Paitan, Y., Biran, D., Biran, I., Shechter, N., Babai, R., Rishpon J., Ron, E. Z. (2003). "On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution." *Biotechnology Advances* **22**(1-2): 27-33.
40. Patel, P. D. (2002). "(Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**(2): 96-115.

41. Liu, J and Mattiasson, B. (2002). "Microbial BOD sensors for wastewater analysis." *Water Research* **36**(15): 3786-3802.
42. Belkin, S. (2003). „Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants." *Current Opinion in Microbiology*, **6**(3): 206-212.
43. Koubová, V., Brynda, E., Karasová, L., Škvor, J., Homola, J., Dostálek, J., Tobiška, P. and Rošický, J. (2001). „Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors." *Sensors and Actuators B: Chemical* **74**(1-3): 100-105.
44. Alcock, S. J., Newman, J. D. (2000). „BIOSET: Biosensors for Environmental Technology."

[http://www.cranfield.ac.uk/biotech/bioaset/bioaset_brochurev2.pdf] 05.08.2007.
45. Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S. A., Ryabov, A. D. and Csöregi, E. (2004). "Biosensors for life quality: Design, development and applications." *Sensors and Actuators B: Chemical* **102**(2): 179-194.
46. Batzias, F. and Siontorou, C. G. (2007). "A novel system for environmental monitoring through a cooperative/synergistic scheme between bioindicators and biosensors." *Journal of Environmental Management* **82**(2): 221-239.
47. D'Souza, F. (2001). "Microbial biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* **16**(6): 337-353.
48. Chee, G. J., Nomura, Y., Ikebukuro, K. and Karube, I. (2007). "Stopped-flow system with ozonizer for the estimation of low biochemical oxygen demand in environmental samples." *Biosensors and Bioelectronics* **22**(12): 3092-3098.
49. Kumlanghan, A., Kanatharana, P., Asawatreratanakul, P., Mattiasson, B. and Thavarungkul, P. (2008). "Microbial BOD sensor for monitoring treatment of wastewater from a rubber latex industry." *Enzyme and Microbial Technology*, **42**(6): 483-491.

50. Li, F., Tan, T. C., Lee, Y. K. (1994). "Effects of pre-conditioning and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor." *Biosensors and Bioelectronics* **9**(3): 197-205.
51. Chan, C., Lehmann, M., Chan, K., Chan, P., Chan, C., Gruendig, B., Kunze, G. and Renneberg, R. (2000). "Designing an amperometric thick film microbial BOD sensor." *Biosensors and Bioelectronics* **15**(7-8): 343–353.
52. Liu, J., Björnsson, L. and Mattiasson, B. (2000). "Immobilized activated sludge-based biosensor for biochemical oxygen demand measurement." *Biosensors and Bioelectronics* **14**(12): 883–893.
53. Kim, M. N and Park, K. H. (2001). " Klebsiella BOD sensor." *Sensors and Actuators B: Chemical* **80**(1): 9-14.
54. Kim, M. N and Kwon, H. S. (1999). "Biochemical oxygen demand sensor using *Serratia marcescens* LSY 4." *Biosensors and Bioelectronics*. **14**(1): 1–7.
55. Collings, A. F. and Caruso, F. (1997). "Biosensors: recent advances." *Reports on Progress in Physics* **60**(11): 1397-1445.
56. Liu, J., Olsson, G. and Mattiasson, B. (2004). "Short-term BOD (BOD_{st}) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process: Part I. A novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor." *Biosensors and Bioelectronics* **20**(3): 562-570.
57. Corbisier, P., Thiry, E. and Diels, L. (1997). "Bacterial biosensors for the toxicity assessment of solid wastes." *Biosensors and Bioelectronics* **12**(4): 5-6.
58. Rastogi, S., Rathee, P., Saxena, T. K, Mehra, N. K. and Kumar, R. (2003). "BOD analysis of industrial effluents: 5 days to 5 min." *Current Applied Physics* **3**(2-3): 191-194.
59. Jiang, Y., Xiao, L. L., Zhao, L., Chen, X., Wang, X. and Wong, K. Y (2006). "Optical biosensor for the determination of BOD in seawater." *Talanta* **70**(1): 97-103.

60. Kwok, N. Y., Dong, S., Lo, W. and Wong, K. Y. (2005). "An optical biosensor for multi-sample determination of biochemical oxygen demand (BOD)." *Sensors and Actuators B: Chemical* **110**, (2): 289-298.
61. English, B. P., Min, W., Van Oijen, A. M., Lee, K. T., Luo, G., Sun, H., Cherayil, B. J., Kou, S. C. and Xie, X. S. (2005). "Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited." *Nature Chemical Biology* **2**(1): 87-94.
62. Gray, N. F. (2004). "Biology of Wastewater Treatment." 2nd Ed.
[http://www.worldscibooks.com/environsci/etextbook/p266/p266_chap1-3.pdf]
27.11.2007
63. Kuhlman T., Zhang Z., Saier M. H. Jr and Hwa, T. (2007). "Combinatorial transcriptional control of the lactose operon of *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **104**(14): 6043-6048.
64. Kivisaar, M. (2000) Geneetika loengukonspekt.
[www.ebc.ee/tymri00/loengud/maia/gen2/Geneetika2b.htm] 16.01.2008.
65. Kimball, J. W. (2008). "Kimball's online Biology Pages." [<http://biology-pages.info>] 22.08.2007.
66. Vollmer, M., Nägele, E. and Hörth, P. "Differential Proteome Analysis: Two-Dimensional Nano-LC/MS of *E. Coli* Proteome Grown on Different Carbon Sources." *Journal of Biomolecular Techniques*, **14**(1):128-135.
67. Yoshida, N., Nakamura, H., Karube, I., Yano, K., Morita, T. and McNiven, S. J. (2000). "A mediator-type biosensor as a new approach to biochemical oxygen demand estimation." *The Analyst* **125**: 2280- 2284.
68. Der, B. S. and Dattelbaum, J. D. (2008). "Construction of a reagentless glucose biosensor using molecular exciton luminescence." *Analytical Biochemistry* **375**(1) : 132-140

69. Wang, H., Wang, X. J., Zhao, J. F. and Chen, L. (2008). "Toxicity assessment of heavy metals and organic compounds using CellSense biosensor with *E.coli*." *Chinese Chemical Letters* **19**(2): 211-214.
70. Shapiro E. and Baneyx. F. (2007). "Stress-activated bioluminescent *Escherichia coli* sensors for antimicrobial agents detection." *Journal of Biotechnology* **132**(4): 487-493.
71. Trögl, J., Ripp, S., Kuncová, G., Sayler, G. S., Churavá, A., Pařík, P., Demnerová, K., Hálová, J. and Kubicová, L. (2005). "Selectivity of whole cell optical biosensor with immobilized bioreporter *Pseudomonas fluorescens* HK44." *Sensors and Actuators B: Chemical* **107**(1): 98-103.
72. Valdman, E., Valdman, B., Battaglini F. and Leite, S. G. F. (2004). "On-line detection of low naphthalene concentrations with a bioluminescent sensor." *Process Biochemistry* **39**(10): 1217-1222.
73. Leedjärv, A., Ivask, A., Virta, M. and Kahru, A. (2006). "Analysis of bioavailable phenols from natural samples by recombinant luminescent bacterial sensors." *Chemosphere* **64**(11): 1910-1919.
74. Miller, J. H. (1972). "A short course in bacterial genetics."
75. Heinaru, E., Talpsep, E. (2001). Mikrobioloogi praktikum. Tartu Ülikooli Molekulaar-ja Rakubioloogia Instituut.
76. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). (1981). "Activated sludge, respiration inhibition test." OECD Guidelines for Testing of Chemicals **209**: 1–10.