МАКАРЕНКО АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ СУЛЬФОАРОМАТИЧЕСКИХ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДОВ *COMAMONAS* И *PSEUDOMONAS* - ДЕСТРУКТОРОВ *n*-ТОЛУОЛСУЛЬФОНАТА И ФЕНОЛА

03.00.23 - биотехнология

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН
им. Г.К.Скрябина
Научный руководитель
д.х.н. Решетилов А.Н.

Окружающая среда и проблемы мониторинга ее объектов

Микробные биосенсоры

Практическое применение

Толуолсульфонат

Фенол

Изучение параметров биодеградации

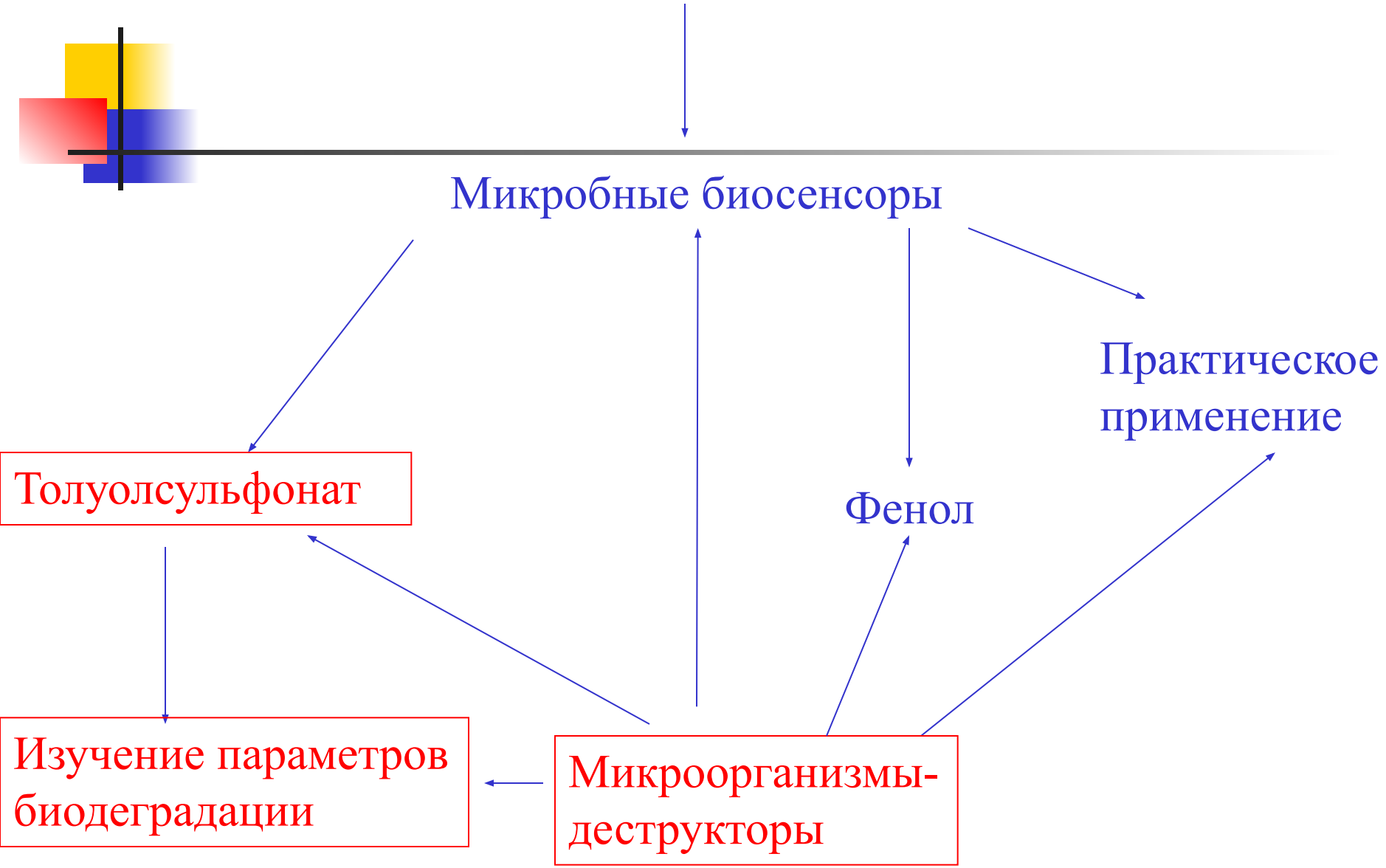
Микроорганизмы-деструкторы

Цель работы

- Создание биосенсоров электрохимического типа для детекции сульфоароматических и фенольных соединений на основе бактерий родов *Comamonas* и *Pseudomonas*, являющихся деструкторами *n*-толуолсульфоната и фенола, соответственно.

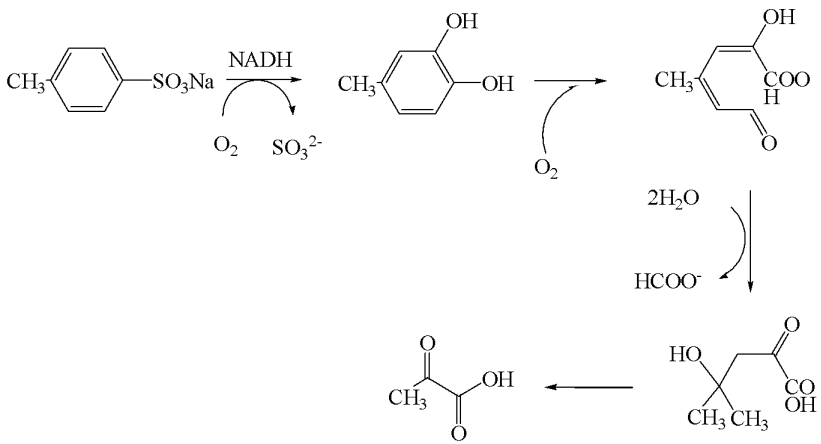
- **Задачи:**
- 1. На основании имеющихся литературных данных произвести выбор штаммов, обладающих характеристиками, требуемыми для формирования биорецепторного элемента сенсоров для детекции *п*-толуолсульфоната и фенола и определить вид преобразования сигнала.
- 2. Оценить характеристики процесса деградации *п*-толуолсульфоната свободными и иммобилизованными клетками *Comamonas testosteroni* BS1310 (pBS1010) в периодических и непрерывных условиях. Разработать лабораторные макеты биосенсоров на основе бактерий *Comamonas testosteroni* BS1310 (pBS1010) и бактерий рода *Pseudomonas* с использованием амперометрической детекции (кислородного электрода типа Кларка). Оценить возможность использования колоночного и мембранного сенсоров.
- 3. Выполнить сравнительную оценку характеристик биосенсоров для детекции *п*-толуолсульфоната на основе плазмидсодержащего и бесплазмидного штаммов *C. testosteroni* BS1310 (pBS1010) и для детекции фенола на основе плазмидсодержащего и бесплазмидного штаммов *Pseudomonas*.
- 4. Используя активный ил водоочистных сооружений в качестве биологического материала в реакторе с непрерывной подачей субстрата, оценить параметры процесса промышленных стоков от фенола. На основании полученных данных представить предложения по оптимизации процесса очистки сточных вод нефтеперерабатывающего производства.

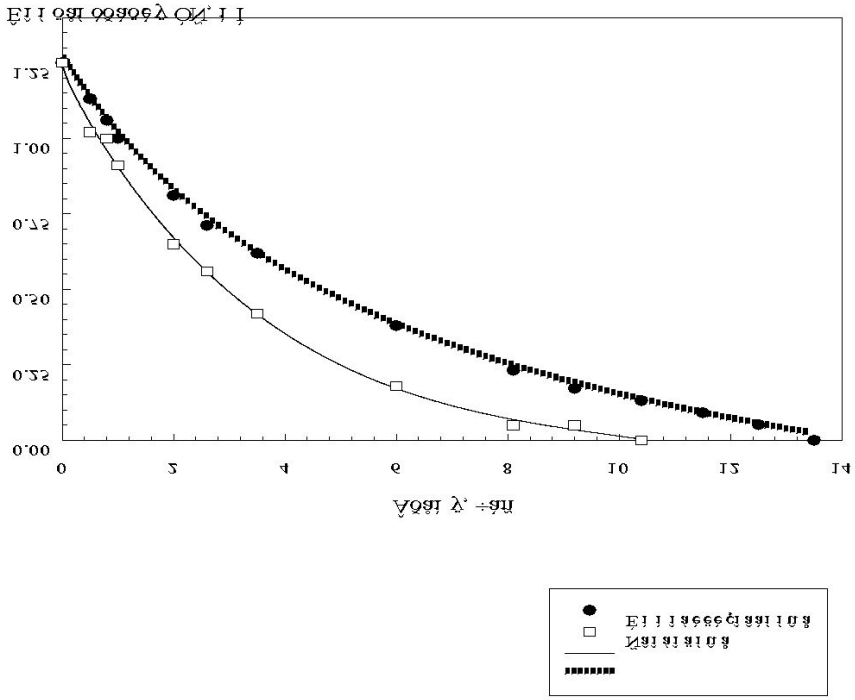
Окружающая среда и проблемы мониторинга ее объектов



Биодеградация ТС свободными и иммобилизованными клетками *C.testosteroni* BS1310 (pBS1010) в периодических условиях

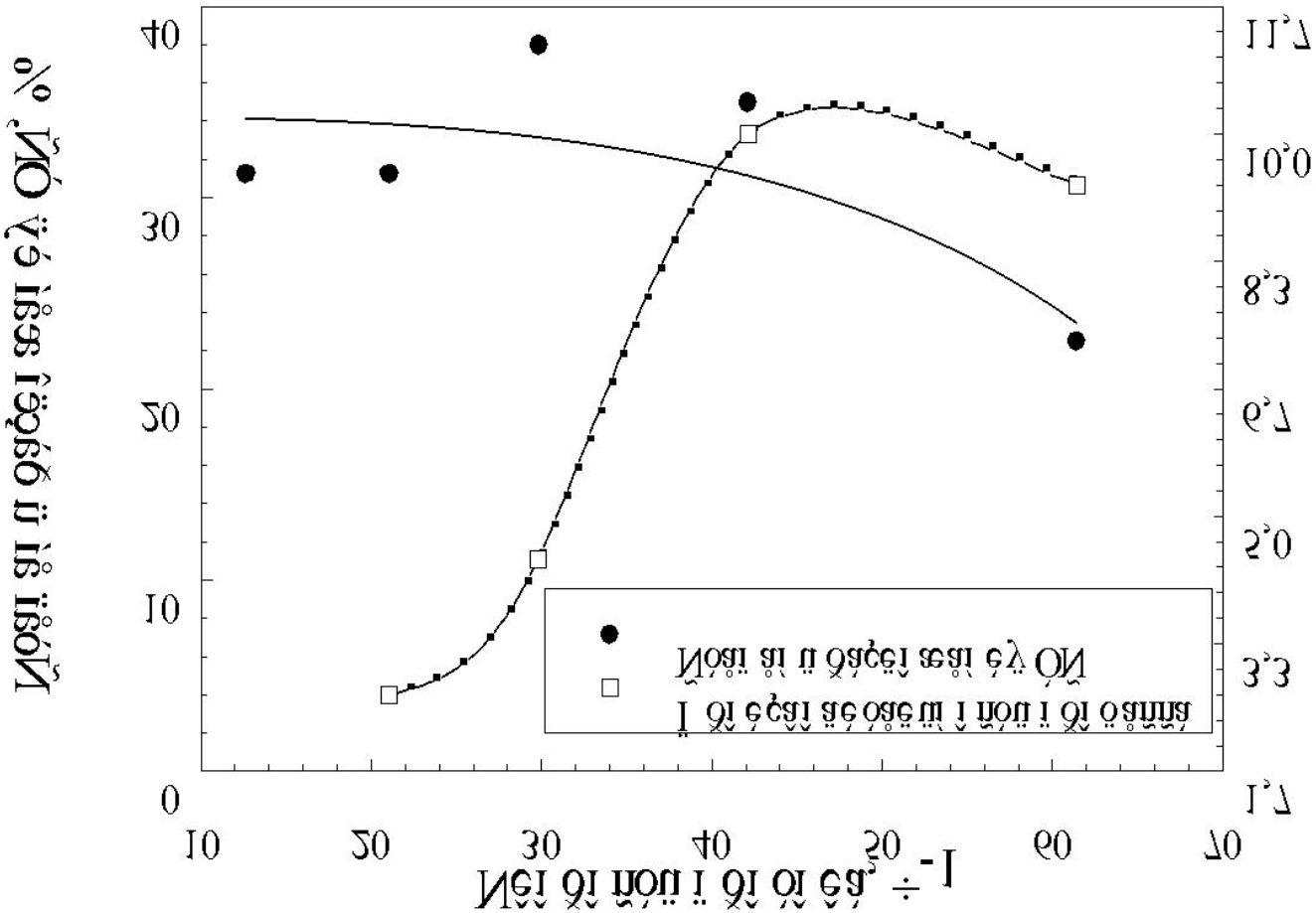
Схема деградации ТС по мета-пути (Балашов, 1997)





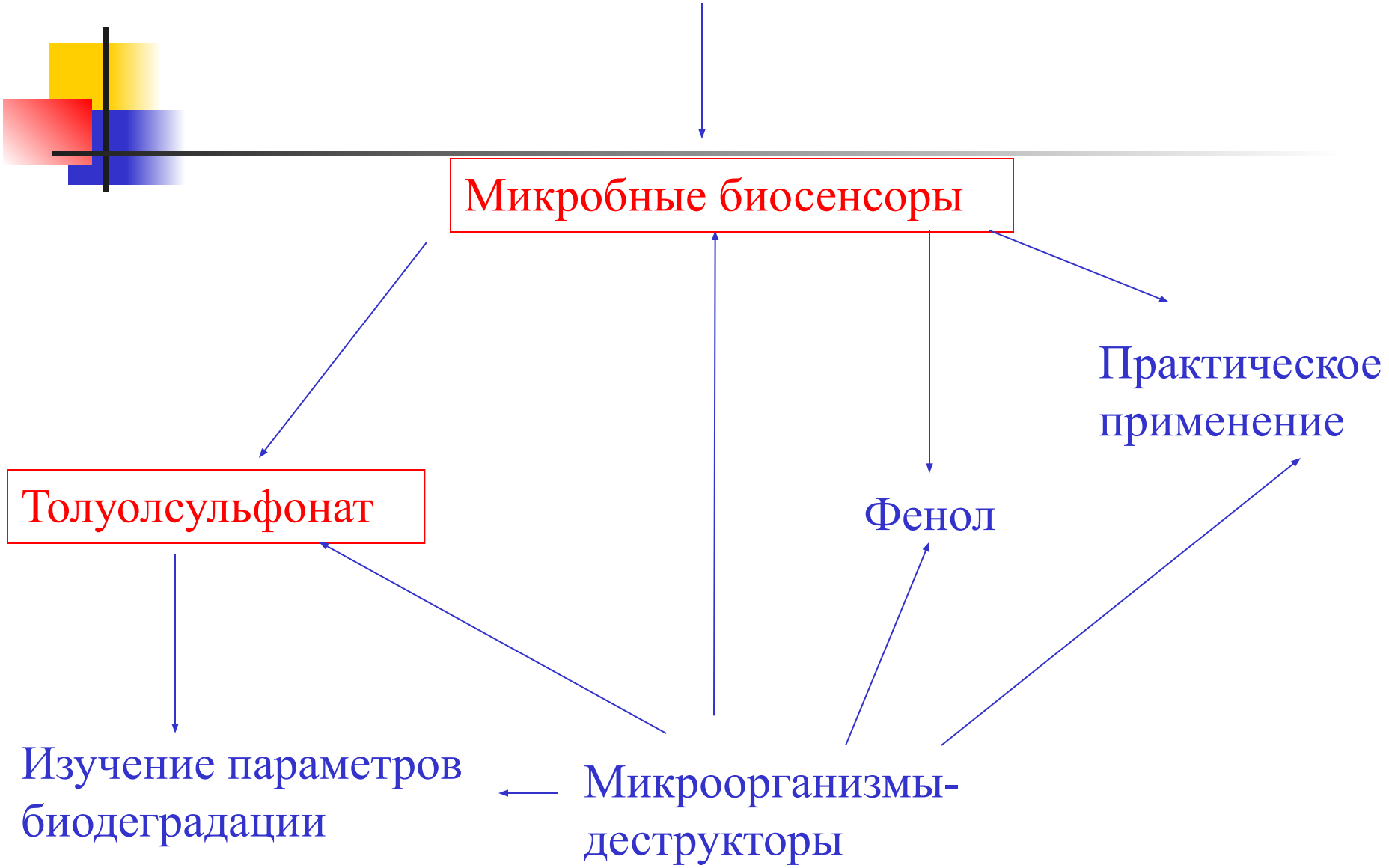
Активность иммобилизованных клеток ниже на 25% по сравнению со свободными. Стехиометрическое соотношение ТС и кислорода 1:2

Деградация ТС в непрерывных условиях клетками *C.testosteroni*

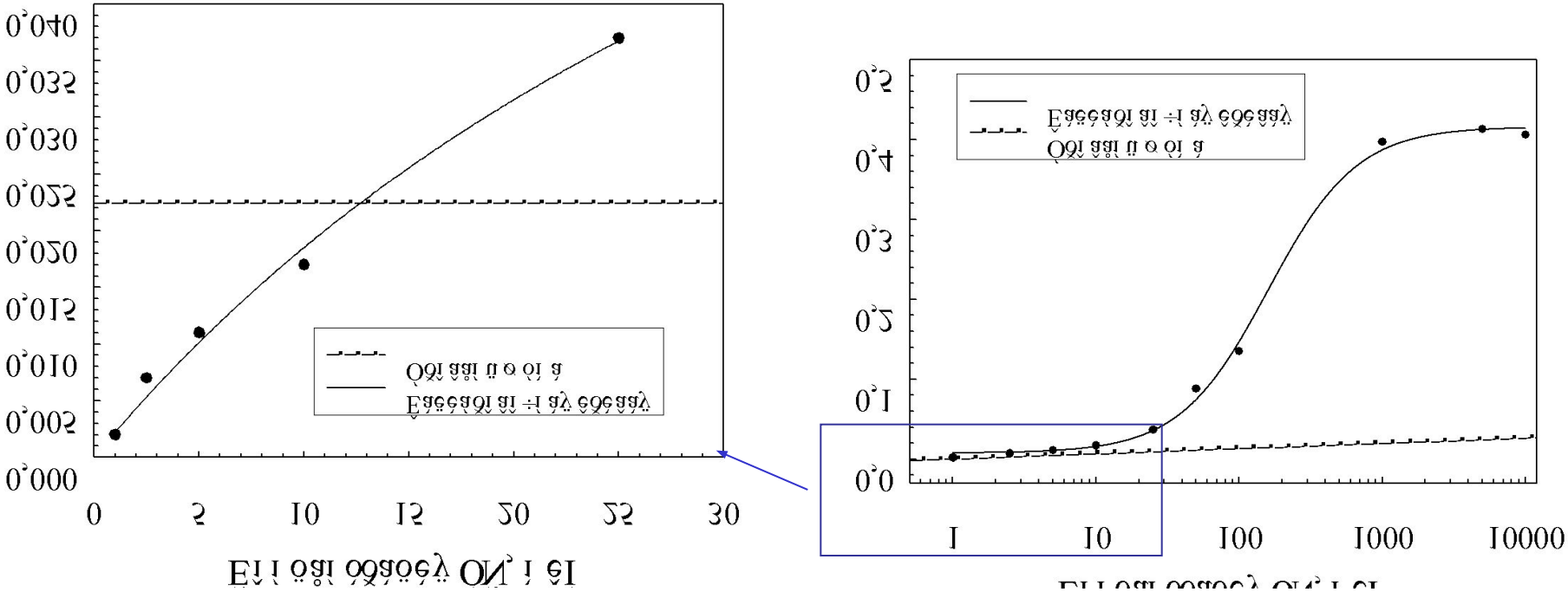


Исследован процесс деградации *п*-толуолсульфоната свободными и иммобилизованными клетками *Comamonas testosteroni* BS1310 в периодических и непрерывных условиях. Потребление кислорода при разрушении *п*-толуолсульфоната происходит в стехиометрическом соотношении 2:1 (кислород: *п*-толуолсульфонат) свободными и иммобилизованными клетками.

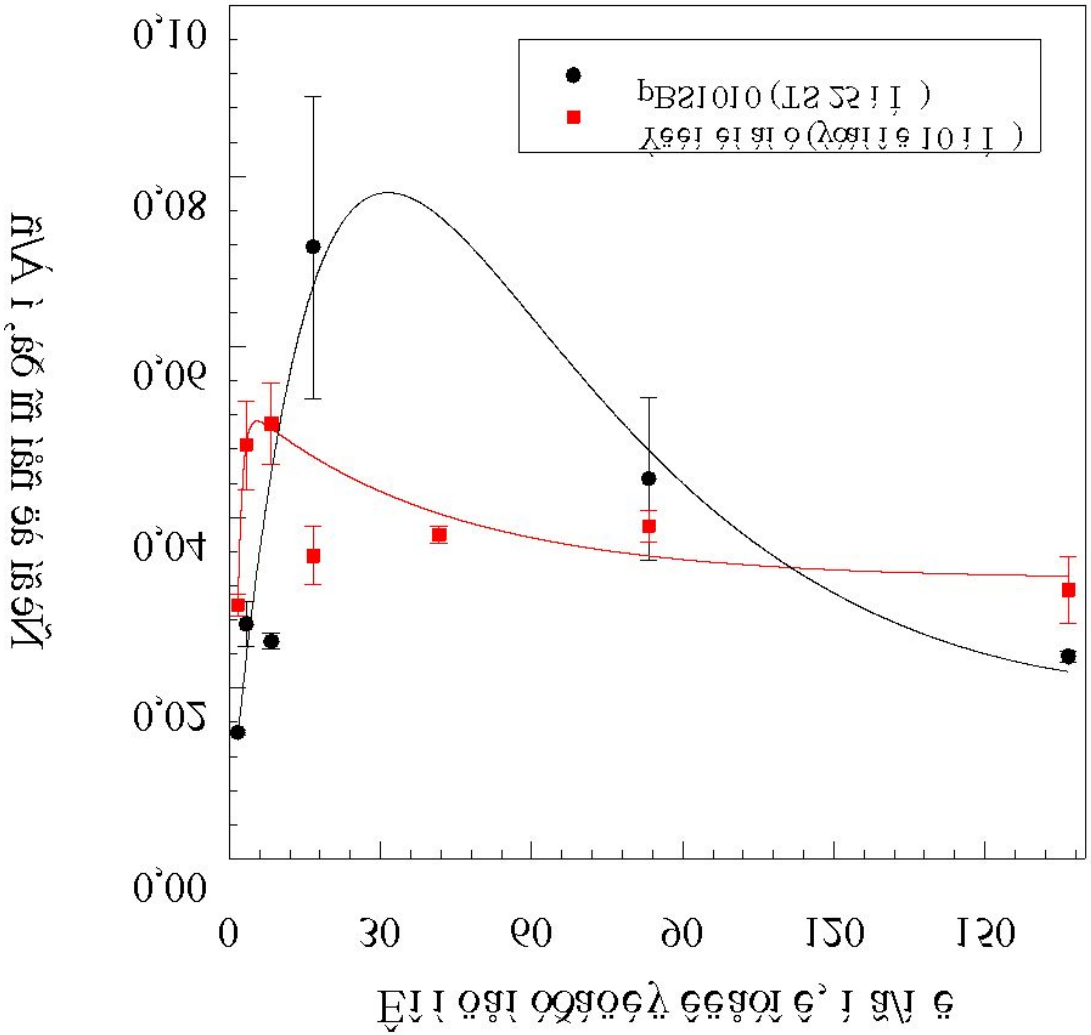
Окружающая среда и проблемы мониторинга ее объектов



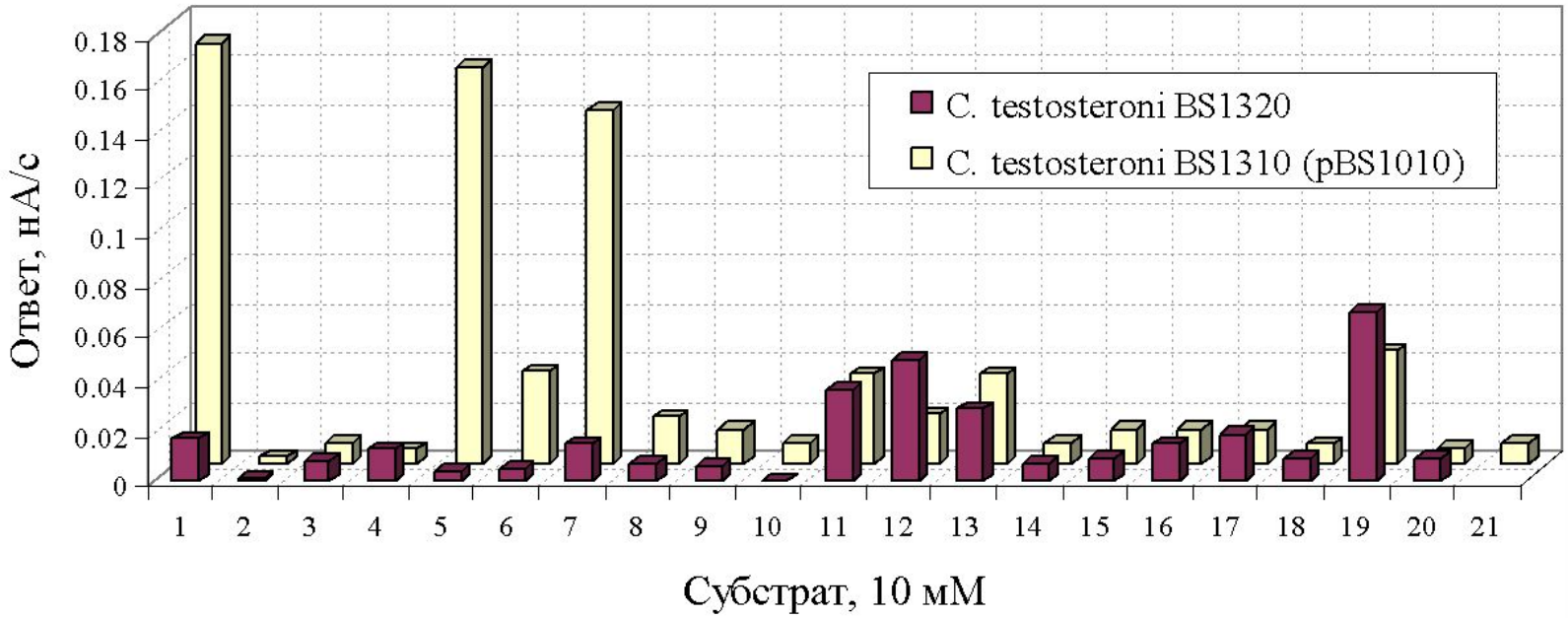
Калибровка сенсора для ТС на основе штамма *C. testosteroni*



Зависимость ответов моделей сенсоров на основе плазмидного и бесплазмидного вариантов штамма *C. testosteroni* от концентрации клеток в биорецепторном элементе



Субстратная специфичность сенсоров на основе плазмидного и бесплазмидного вариантов штамма *C. testosteroni* BS1310



1 – толуолсульфонат
2 – фенол
3 – салицилат
4 – бензоат
5 – бензолсульфонат
6 – сульфобензоат
7– катехол
8 – алкилбензолсульфонат
9 – арабиноза
10 – арабит
11 – глицерин
12 – этанол
13 – глюкоза
14 – ксилоза
15 - ксилит
16 - метанол
17 - сорбит
18 - цитрат
19 - ацетат
20 - сорбоза
21 - ДДС-Na

На основе штамма *C. testosteroni* BS1310 (pBS1010) создан сенсор, позволяющий производить экспресс-анализ *n*-толуолсульфоната. Нижний предел детекции составлял 5 мкМ, верхний – 1 мМ. Чувствительность сенсора по отношению к тололсульфонату составляла 0.17 нА/с. Селективность в отношении *n*-толуолсульфоната сенсора, основанного на плазмидсодержащих бактериях, в 11 раз превышает селективность сенсора на основе бесплазмидного штамма.

Окружающая среда и проблемы мониторинга ее объектов

Микробные биосенсоры

Практическое применение

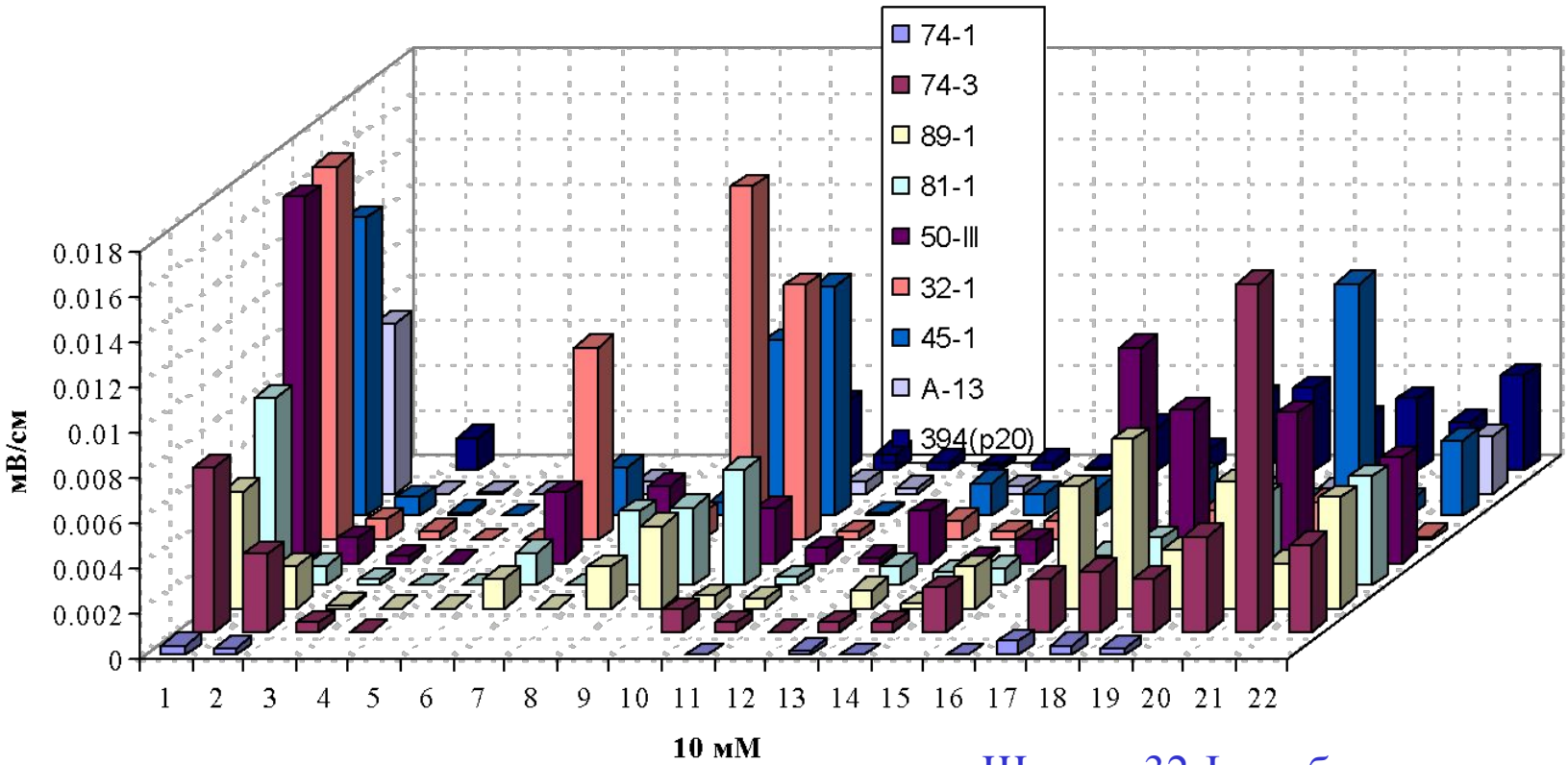
Толуолсульфонат

Фенол

Изучение параметров биодеградации

Микроорганизмы-деструкторы

Субстратная специфичность фенолутилизирующих штаммов



1-фенол, 2-этанол, 3-глицерин, 4-сорбит, 5-сорбоза, 6-ксилоза, 7-бутанол, 8-изопропанол, 9-глюкоза, 10-катехол, 11-нафталин, 12-арабит, 13-ксилит, 14-метанол, 15-пропанол, 16-изобутанол, 17-ацетат, 18-*п*-толуолсульфонат, 19-бензолсульфонат, 20-арсенит, 21-динитроортокрезол, 22-гранозан.

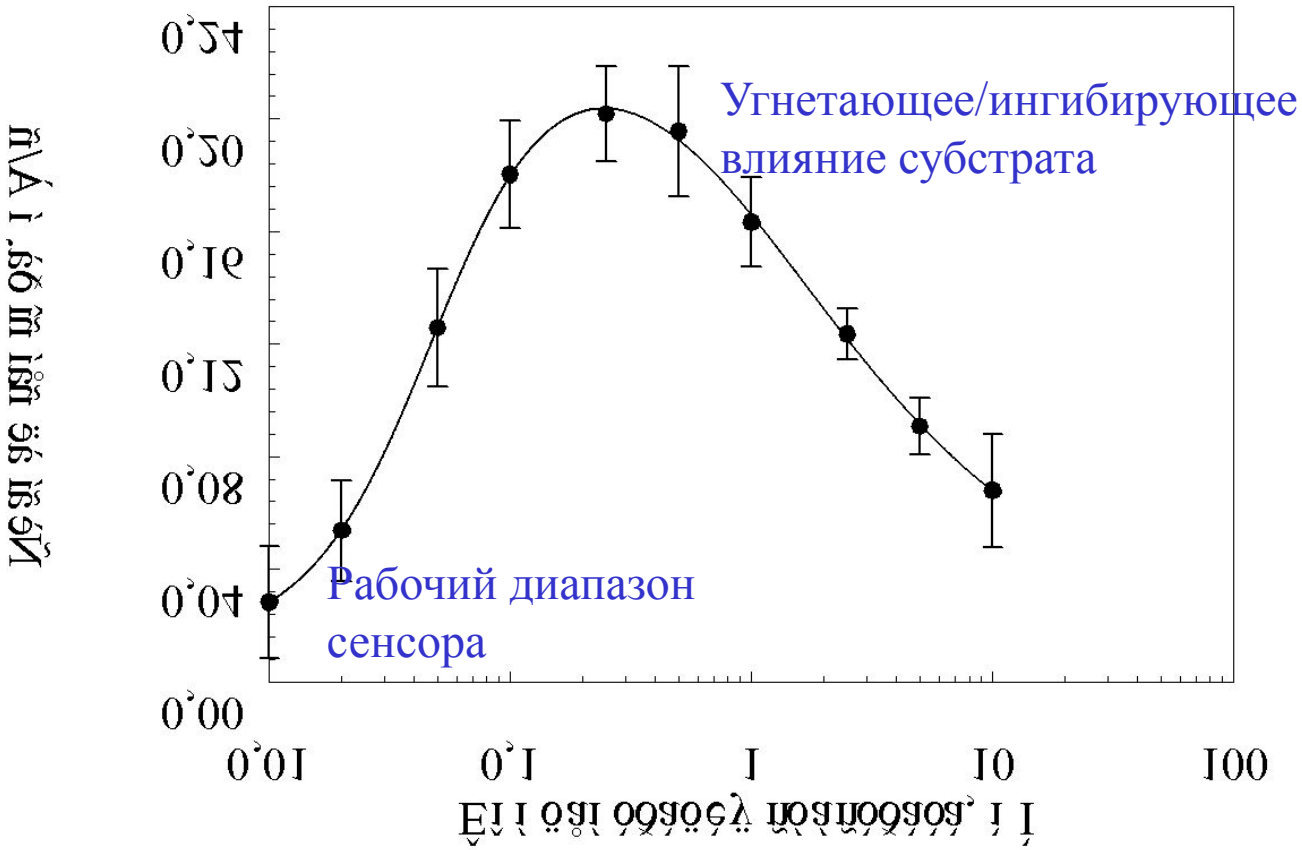
Штамм 32-I наиболее селективен по отношению к фенолу и имеет наибольшую амплитуду сигнала на введение этого вещества

Наличие плазмиды у штамма 32-I определили в Лаборатории био-логии плазмид ИБФМ РАН

Субстратная специфичность сенсоров на основе плазмидного и бесплазмидного вариантов штамма 32-I

Субстраты вводились в концентрации 10 мМ. Обозначение субстратов: фенол –1, катехол – 2, салицилат – 3, гентизат – 4, бензоат – 5, ДНФ – 6, ДНОК – 7 ,глюкоза – 8, сорбоза – 9, ксилоза -10, галактоза – 11, манноза – 12, изопропанол – 13, этанол – 14, бутанол – 15, метанол – 16.

Калибровка сенсора на основе штамма 32-I по фенолу



Произведен скрининг свойств 28 бактериальных штаммов рода *Pseudomonas*, полученных из образцов почв, загрязненных нефтепродуктами.

Штамм 32-I характеризовал-ся наибольшей скоростью роста на феноле и был использован как основа биосенсора для детекции фенола.

Нижний предел детекции фенола в модельных условиях составлял 5 мкМ, верхний - 300 мкМ. Выполнено сравнительное исследование субстрат-ной специфичности биосенсоров на основе плазмидсодержащего и бесплазмидного штаммов 32-I. Селективность в отношении фенола сенсора, основанного на плазмидсодержащих бактериях, в 17 раз превышает селективность сенсора на основе бесплазмидного штамма.

Окружающая среда и проблемы мониторинга ее объектов

Микробные биосенсоры

Практическое применение

Толуолсульфонат

Фенол

Изучение параметров биодеградации

Микроорганизмы-деструкторы

Деградация фенола иммобилизованным активным илом в реакторе колоночного типа

Кривая 1 – деградация на колонке без аэрации. Наблюдается лимит по кислороду.

Кривая 2 – деградация на колонке с аэрацией, пропорциональная зависимость степени деградации от высоты колонки.

Выводы

1. Создана модель микробного биосенсора, обладающего высокой чувствительностью и селективностью в отношении сульфоароматических соединений. В основе биорецептора использован штамм *C. testosteroni* BS1310 (pBS1010) несущий плазмиду биодеградации сульфоароматических соединений pBS1010. Показано, что биосенсор мембранного типа позволяет0 производить экспресс-анализ *п*-толуолсульфоната в модельных средах в диапазоне детекции 5 – 1000 мкМ. Чувствительность сенсора по отношению к толуолсульфонату составляет 0.17 нА/с при концентрации 1 мМ. Использование плазмидсодержащих бактерий в сенсоре позволяет в 11 раз повысить селективность в отношении *п*-толуолсульфоната по сравнению с сенсором на основе бесплазмидного штамма.

2. Для упрощенной модели дифференциальной детекции произведена оценка возможной ошибки измерения целевых соединений - толуолсульфоната и фенола на фоне исследованных мешающих примесей. Нашли, что погрешность детекции составила бы 24% при определении *п*-толуолсульфоната, 11% при определении общего содержания сульфоароматических соединений, 35% при определении фенола и 12% при определении общего содержания ароматических соединений в случае равной концентрации как мешающих, так и целевых соединений. При анализе реальных сточных вод, содержащих преимущественно целевые соединения, погрешность должна существенно снизиться.

3. Впервые экспериментально показали, что окисление *п*-толуолсульфоната бактериальными клетками *Comamonas testosteroni* BS1310 как в свободном, так и в иммобилизованном состоянии происходит в стехиометрическом соотношении 2:1 (кислород: *п*-толуолсульфонат). Полученные данные составили основу для выбора типа биорецептора – мембранного или колоночного - при создании биосенсора для детекции данного соединения.

4. Бактериальный штамм, принадлежащий к роду *Pseudomonas* (рабочая маркировка "32-I"), использовали как основу биосенсора для детекции фенола. Измерение концентрации фенола было возможно в диапазоне 5 - 300 мкМ. Нашли, что в отношении фенола селективность сенсора, основанного на плазмидсодержащих бактериях, в 17 раз превышает селективность сенсора на основе бесплазмидного штамма. Изучили параметры биосенсора и их зависимость от внешних условий.

- 5. На основании выполненных тестов с активным илом, имитирующим функционирование биологического материала в составе биосенсора, представили рекомендации по оптимизации работы водоочистных сооружений нефтеперерабатывающего производства, заключающиеся в проведении контроля степени оксигенации стоков. Полученные данные позволили на практике на 17% увеличить степень очистки стоков, содержащих фенол (оценка по индексу ХПК).