

МАКАШЕНКО АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

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

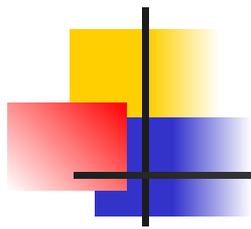


03.00.23 - биотехнология

---

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

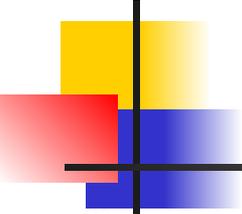
Практическое  
применение

Толуолсульфонат

Фенол

← Микроорганизмы-  
деструкторы

Изучение параметров  
биodeградации



## Цель работы

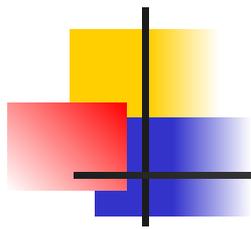
---

- Создание биосенсоров электрохимического типа для детекции сульфопароматических 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 *p*-толуолсульфоната и фенола и определить вид преобразования сигнала.
2. Оценить характеристики процесса деградации *p*-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 *p*-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



Микробные биосенсоры

Практическое применение

Фенол

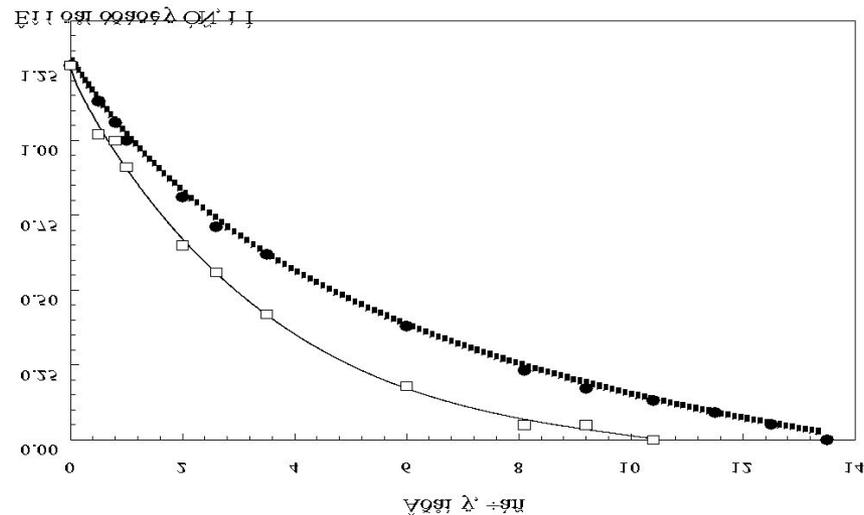
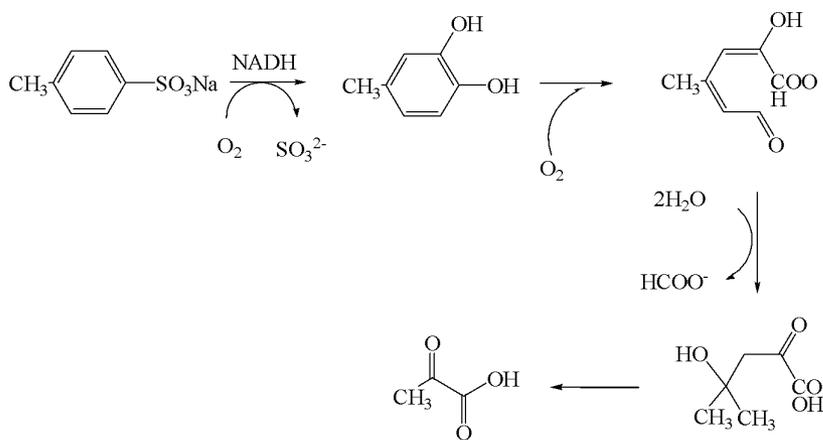
Толуолсульфонат

Изучение параметров биodeградации

Микроорганизмы-деструкторы

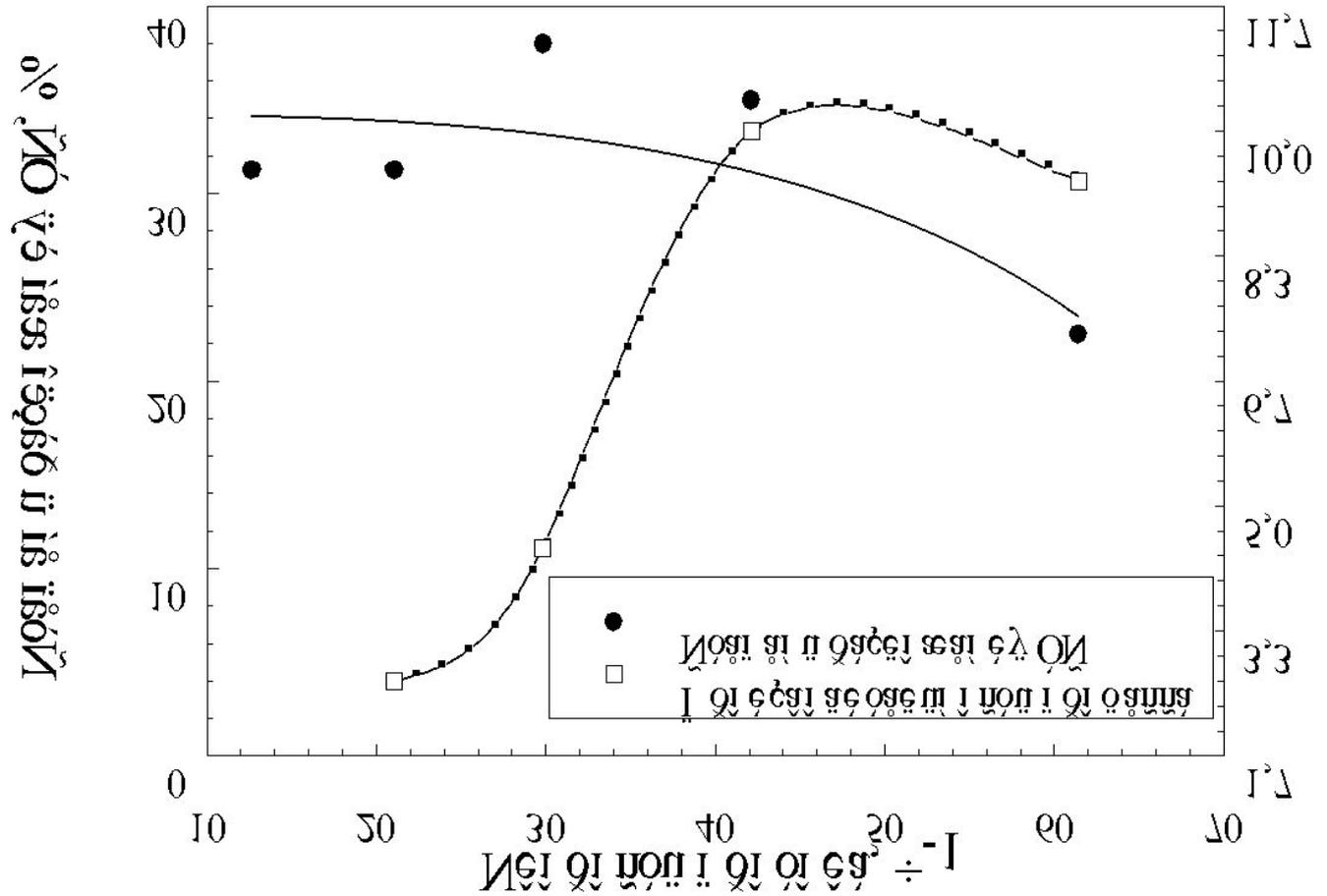
# Биодеградация ТС свободными и иммобилизованными клетками *C.testosteroni* BS1310 (pBS1010) в периодических условиях

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

# Дегградация ТС в непрерывных условиях клетками *C. testosteroni*

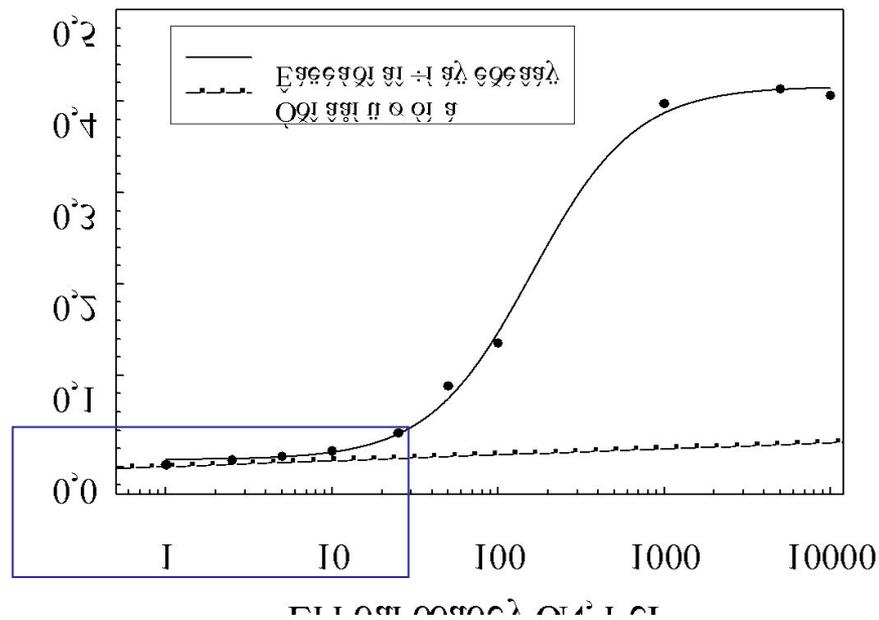
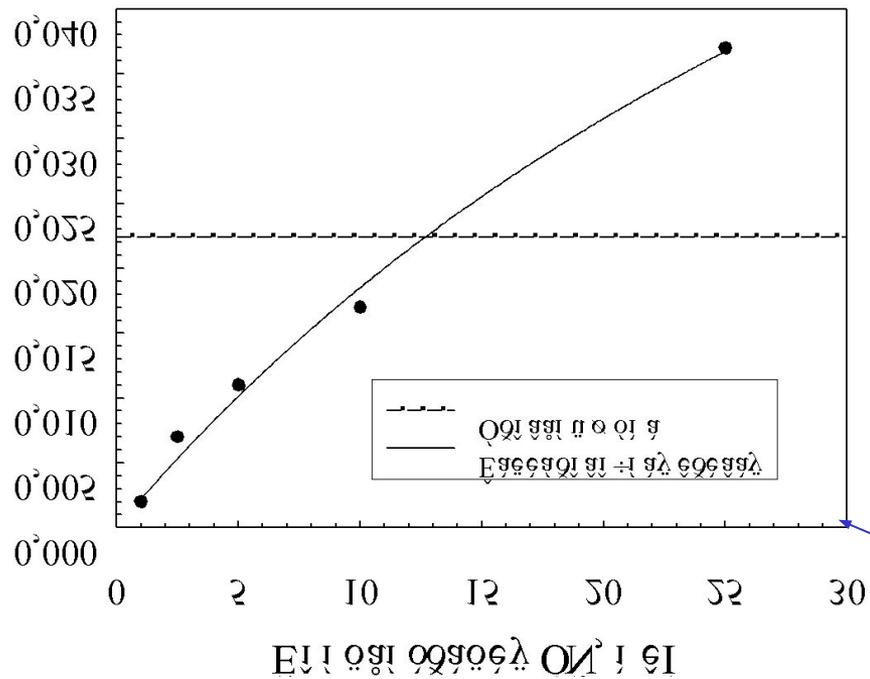
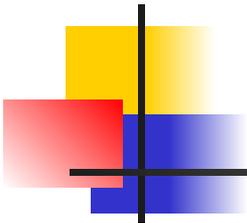


Исследован процесс дегградации *n*-толуолсульфоната свободными и иммобилизованными клетками *Comamonas testosteroni* BS1310 в периодических и непрерывных условиях. Потребление кислорода при разрушении *n*-толуолсульфоната происходит в стехиометрическом соотношении 2:1 (кислород: *n*-толуолсульфонат)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

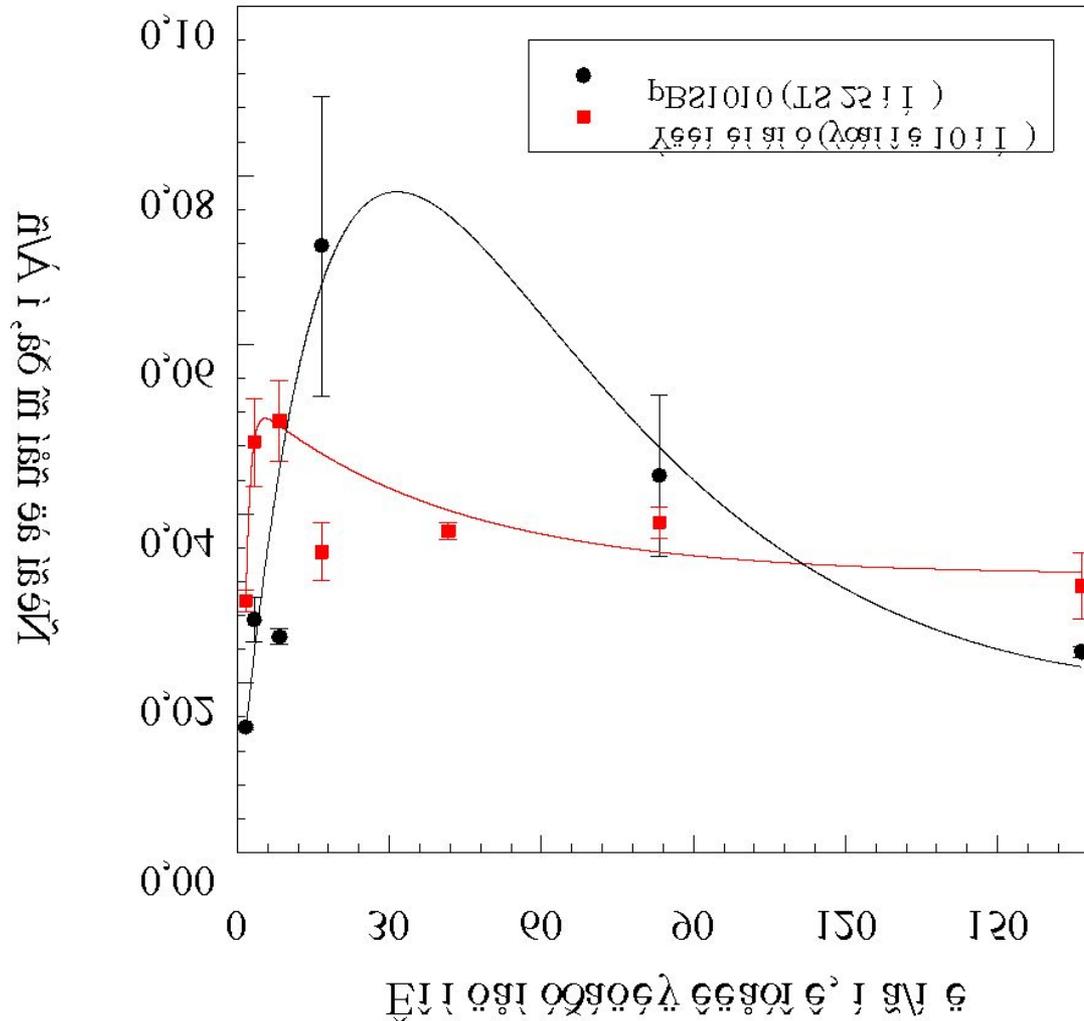
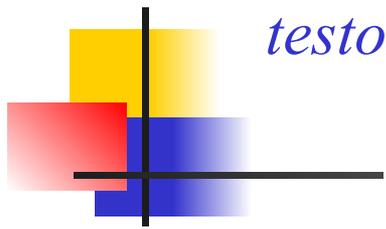
# Окружающая среда и проблемы мониторинга ее объектов



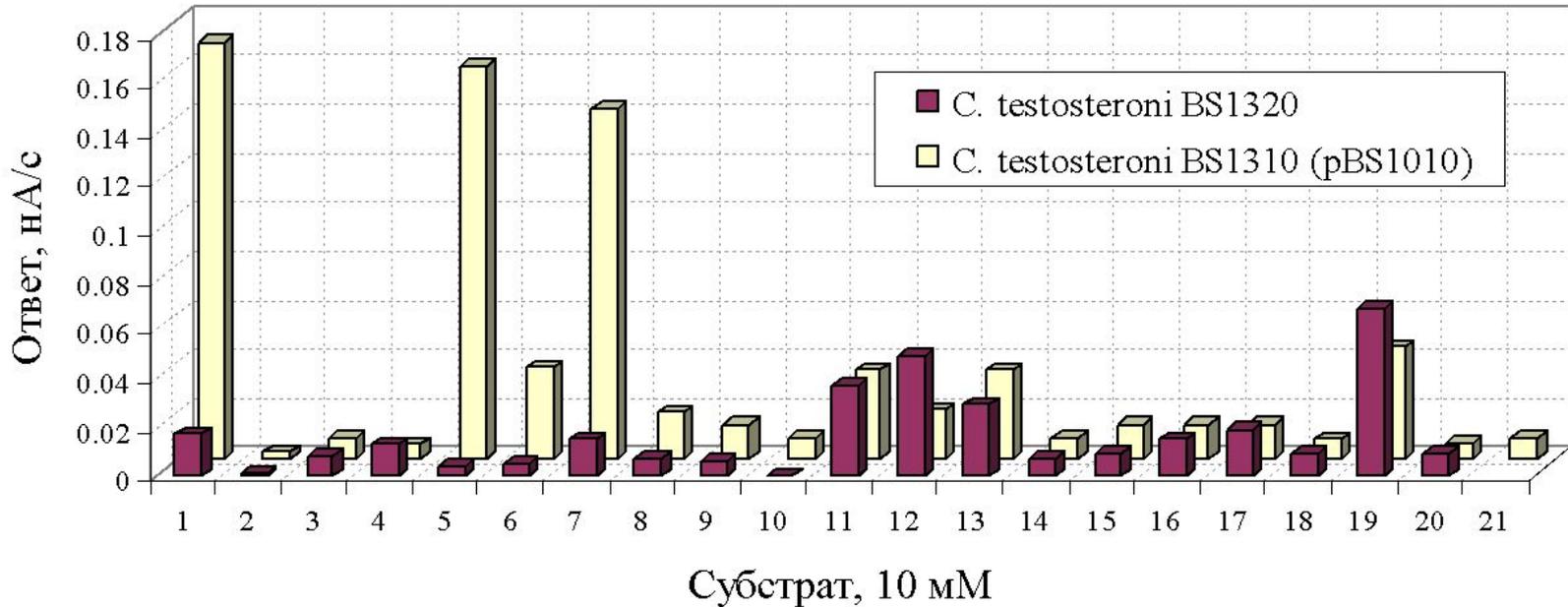
# Калибровка сенсора для ТС на основе штамма *S. testosteronei*



# Зависимость ответов моделей сенсоров на основе плазмидного и бесплазмидного вариантов штамма *S. 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

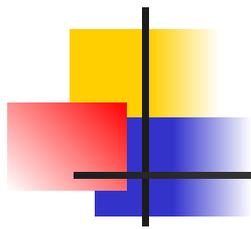
19 - ацетат

20 - сорбоза

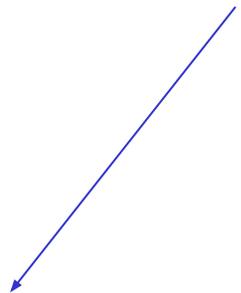
21 - ДДС-Na

На основе штамма *S. 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 толуолсульфонату 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



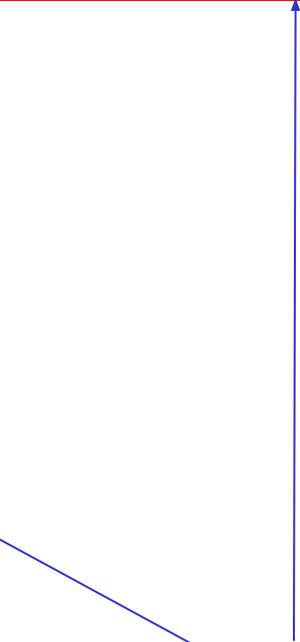
**Микробные биосенсоры**



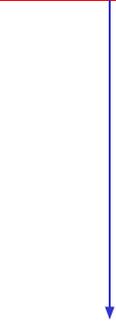
Толуолсульфонат



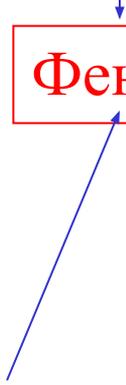
Изучение параметров биodeградации



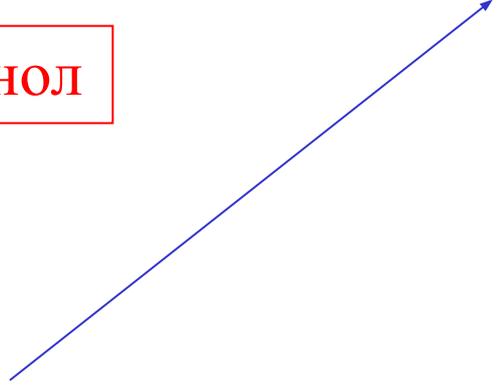
Микроорганизмы-деструкторы



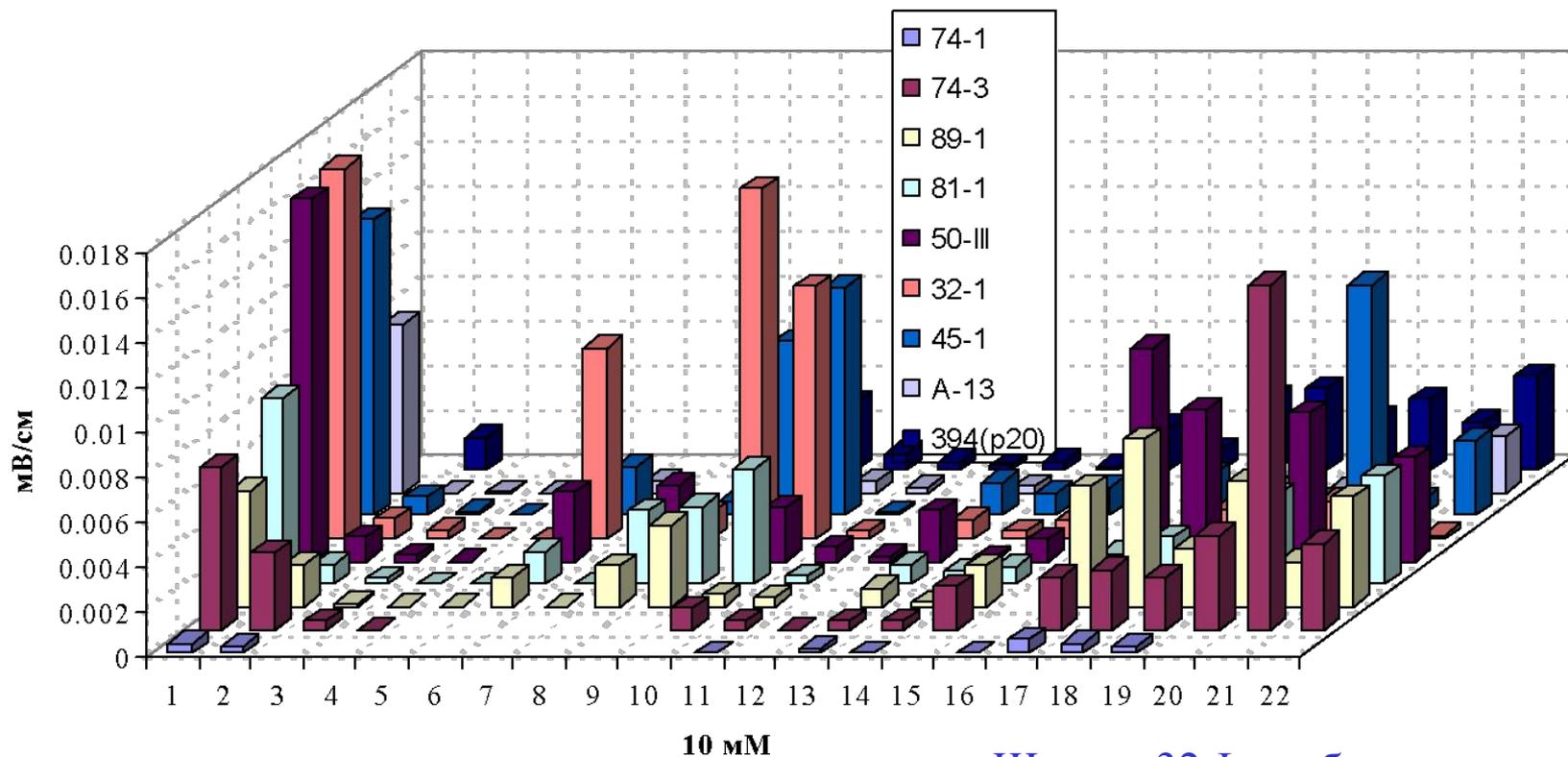
**Фенол**



Практическое применение



# 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-*n*-толуолсульфонат, 19-бензолсульфонат, 20-арсенит, 21-динитроортокрезол, 22-гранозан.

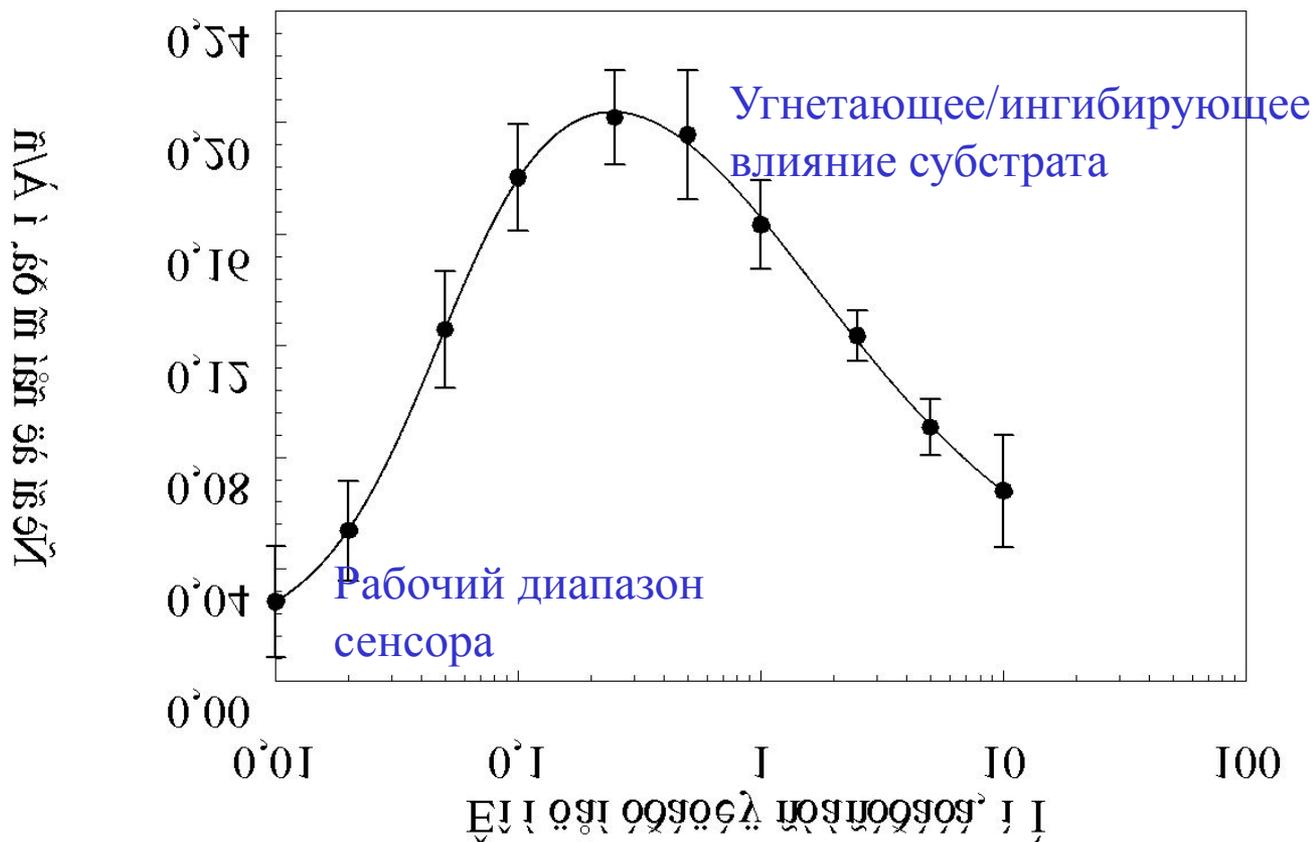
Штамм 32-1 наиболее селективен по отношению к фенолу и имеет наибольшую амплитуду сигнала на введение этого вещества

Наличие плазмиды у штамма 32-1 определили в Лаборатории биологии плазмид ИФМ 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

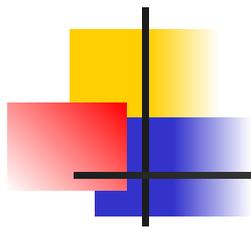


Произведен скрининг свойств 28 бактериальных штаммов рода *Pseudomonas*, полученных из образцов почв, загрязненных нефтепродуктами.

Штамм 32-I характеризовался 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-І. 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

Микроорганизмы-деструкторы

Изучение параметров биodeградации

# 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 биodeградации сульфоароматических соединений pBS1010. Показано, что биосенсор мембранного типа позволяет производить экспресс-анализ *л*-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 *л*-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 *p*-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 *p*-толуолсульфоната бактериальными клетками *Comamonas testosteroni* BS1310 как в свободном, так и в иммобилизованном состоянии происходит в стехиометрическом соотношении 2:1 (кислород: *p*-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).