

## **Использование биопрепаратов**

УДК 543[553/95::395]:628.35:57.083.133

Ю.В. ПЛЕХАНОВА<sup>1</sup>, А.Н. РЕШЕТИЛОВ<sup>1,\*</sup>, Т.В. МАНОЛОВ<sup>2</sup>, Л.А. ТАРАНОВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup> УРАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушино, Московская область, 142290

<sup>2</sup> Университет г. Лунда, Швеция, P.O. Box 124 SE-221 00

<sup>3</sup> Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко, Национальная академия наук Украины, Киев, Украина, 03142

e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

### **Биосенсорный контроль процесса микробной очистки сточных вод от нонилфенолполиэтоксилатов в условиях проточного культивирования**

Проведено исследование биodeградации нонилфенолполиэтоксилатов (НФЭ) в лабораторных биореакторах колонного типа, содержащих полиэтиленовый носитель, на котором иммобилизованы бактерии-деструкторы поверхностно-активных веществ рода *Pseudomonas*. Для контроля эффективности процесса микробной очистки модельных сточных вод разработан и использован биосенсор на основе кислородного электрода Кларка и бактерий-деструкторов НФЭ из биореакторов. Разработанный биосенсор позволял определять содержание моноалкилфенилового эфира полиэтиленгликоля на основе полимердистиллята (ОП-10), являющегося коммерческим препаратом НФЭ, в образцах в пределах 1—200 мг/л. Работа биосенсора была стабильной в течение 7 дней при стандартном отклонении, равном 1,35 мг/л для 20 повторных измерений концентрации ОП-10, равной 20 мг/л (7 %).

*Ключевые слова:* биodeградация, биосенсор, нонилфенолполиэтоксилаты, поверхностно-активные вещества, электрод Кларка.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) широко используются в различных промышленных технологических процессах. Особое место по значению и объему производства занимают неионногенные ПАВ — полиоксиэтиленовые эфиры алифатических спиртов и кислот, алкилфенолов, аминов и другие соединения с реакционно-способными атомами водорода.

В связи с отрицательным воздействием ПАВ на природу и человеческий организм возникает потребность в тщательном контроле за их содержанием в окружающей среде. Особое внимание уделяется биodeградации алкилфенолполиэтоксилатов, токсичные продукты которых отрицательно влияют на эндокринную систему человека [1, 2].

Плеханова Юлия Викторовна, Решетилов Анатолий Николаевич, Манолов Тарас Васильевич, Таранова Людмила Анатольевна.

*Список сокращений:* а.с. — авторское свидетельство; НПАВ — неионногенные ПАВ; НФЭ — нонилфенолполиэтоксилаты; ООУ — общий органический углерод; ОП-10 — моноалкилфениловый эфир на основе полимердистиллята; ПАВ — поверхностно-активные вещества; ПВХ — поливинилхлорид; ХПК — химическое потребление кислорода; ЦТАБ — цетилтриметиламмоний бромид; СТАС — Cobalt Thiocyanate Active Substances-method — метод определения ПАВ с роданидом кобальта; ТТАС — (Tin Thiocyanate Active Substances-method) метод определения ПАВ с роданидом олова.

\* Автор для переписки.

Для анализа этого типа ксенобиотиков обычно используют непрямые методы детекции, согласно которым определяется не само ПАВ, а его комплекс с определенным реактивом. Так, официально признанным методом для определения концентрации неионных ПАВ в воде является метод детекции с использованием роданида (тиоцианата) кобальта (Cobalt Thiocyanate Active Substances-method (СТАС)) [3]. Для анализа ПАВ в воде и осадках широко применяют также хроматографические методы в сочетании с экстракцией и предварительной концентрацией определяемых веществ [4—7]. Эти методы позволяют проводить качественную и количественную оценку указанных веществ в сложных многокомпонентных смесях; однако их использование связано с применением дорогостоящего оборудования, большого количества органических реагентов, а также характеризуется длительностью анализа. Кроме того, данные методы не могут применяться для измерения непосредственно на месте отбора проб.

В работе [8] сообщается об опточувствительной системе для определения катионных ПАВ, основанной на взаимодействии типа «хозяин—гость». Мембраны из пластифицированного поливинилхлорида (ПВХ) смешивали со сложным эфиром каликс[6]ареном и нейтральным чувствительным к  $H^+$  хромоионофором ETH5294, что позволяло проводить обратимое определение катионных ПАВ на примере цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ). Молекула «гостя» (ЦТАБ) диффундировала в мембрану (ПВХ), присоединяясь к молекуле «хозяина» каликс[6]арен-ионофора и вызывая высвобождение протона из протонированного хромоионофора в раствор. При депротонировании хромоионофор претерпевает изменение окраски, что используется для количественного определения цетилтриметиламмоний бромида. К недостаткам этого метода можно отнести то, что на показания опточувствительных систем может влиять окружающий свет; кроме того, оптические сенсоры часто имеют более узкий динамический диапазон по сравнению, например, с электрохимическими. Сигнал оптических сенсоров зависит также от количества реагента и миниатюризация сенсора приводит к уменьшению интенсивности измеряемого сигнала, что в свою очередь осложняет технику измерений.

В настоящее время разработка недорогих автоматизированных методов анализа остается актуальной. Одним из перспективных направлений в определении ПАВ является создание биосенсорных систем на основе бактерий-деструкторов. Некоторые микроорганизмы используют ПАВ как ис-

точники энергии и углерода [9—13]. Скрининг различных штаммов позволяет найти те микроорганизмы, которые способны разрушать определенные ПАВ до менее токсичных субстратов. Так, в работе [14] охарактеризованы штаммы *Comamonas acidovorans* и *Rhodococcus opacus*, которые утилизируют ряд сульфатов в качестве источника серы. В работе [15] представлены данные по аэробной и анаэробной биодegradации фторированных ПАВ, причем показана возможность degradation неионного фторированного ПАВ при аэробных условиях до 77 % в течение 28 дней. В работе [16] представлен метод, основанный на использовании пьезоэлектрических кварцевых кристаллов, позволяющих выявить влияние некоторых ПАВ на рост *Pseudomonas aeruginosa*. Детально изучено влияние концентрации ПАВ, количества гидрофобных групп и этоксила в составе неионных ПАВ на рост бактерий.

Известны модели биосенсоров на основе клеток *Pseudomonas* и *Achromobacter*, позволяющие определять додецилсульфат натрия в диапазоне концентраций 0,25—0,5 мг/л [17]. В работе [18] представлена модель биосенсора на основе *Pseudomonas rathonis* T для определения додецилсульфата натрия в диапазоне концентраций 0,25—1000 мг/л. В [19] показано применение биосенсора на основе клеток *Trichosporon cutaneum* для продолжительного мониторинга анионных ПАВ в речной воде.

С помощью биосенсоров для определения ПАВ можно проводить мониторинг процесса микробной деструкции в условиях проточного культивирования. Известны работы, в которых показана эффективная биодegradация ПАВ в различных типах биореакторов. Так, например, в [20] проводили очистку сточных вод, содержащих анионные ПАВ, в вертикальном реакторе с непрерывным перемешиванием с использованием штамма *Citrobacter braakii*. Была также показана эффективная биодegradация нонилфенолполиэтоксилатов в биореакторах с носителями из кварцевых шариков или гранулированного активированного угля, на поверхности которых иммобилизовали бактериальный консорциум [21]. Известны работы, в которых в degradation ПАВ участвует активный ил [22].

В данной работе для degradation нонилфенолполиэтоксилатов использовали аэробные бактерии-деструкторы ПАВ, потребляющие эти субстраты в качестве единственного источника углерода и энергии. Аэробные бактерии-деструкторы могут быть использованы как чувствительный элемент биосенсоров на основе электрода Кларка. С помощью такого биосенсора можно определять содержание НФЭ в окружающей среде и наблюдать

за степень их биодegradации при очистке промышленных сточных вод. Кроме того, в данном исследовании в отличие от предыдущих использованы неионогенные ПАВ.

Целью нашей работы являлась разработка микробного биосенсора для детекции нонилфенолполиэтоксилатов и оценка возможности его использования для контроля эффективности очистки модельных сточных вод от неионогенных ПАВ (НПАВ) в условиях проточного культивирования.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали гидроксид натрия, сульфат натрия, дигидрофосфат натрия, нитрат аммония, хлорид калия, хлорид магния, агар (все производства Sigma, США). В качестве НФЭ использовали коммерческий препарат, относящийся к оксиэтилированным алкилфенолам [23] — моноалкилфениловый эфир полиэтиленгликоля на основе полимердистиллята (ОП-10) —  $C_nH_{2n+1}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH$ , где  $n=8—10$ ,  $m=10—12$  (ЗАО “ВинницаБытХим”, Украина).

**Инокулят.** Для инокуляции биореакторов, в которых происходит деградация НФЭ, использовали чистые культуры бактерий-деструкторов, селекционированные в Институте биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко (Киев): *Pseudomonas rathonis* T (а.с. №962304, ВКПМ\* В-2330), *Pseudomonas alcaligenes* TR (а.с. №1177279, ВКПМ В-2981), *Pseudomonas fluorescens* TR (а.с. № 1639053, ВКПМ В-4881) и *Pseudomonas testosteroni* TO (а.с. № 1593221, ВКПМ В-4674). Кроме того, в качестве инокулята использовали образцы аэробного активного ила, любезно предоставленные компанией Anox AB (в настоящее время AnoxKaldnes AB, Lund, Швеция).

**Модельные сточные воды** содержали минеральную среду, pH 7,3—7,6, состоящую из 1 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л нитрата аммония, 0,5 г/л хлорида калия, 0,01 г/л хлорида магния, 5 г/л сульфата натрия. Среду стерилизовали автоклавированием при 120° в течение 20 мин и затем добавляли ПАВ. В качестве НФЭ (концентрация 66,6%) использовали ОП-10.

**Запуск биореакторов.** Биореакторы колонного типа (Университет Лунда, Швеция, соотношение диаметр:высота примерно 1:5, рабочий объем 0,9 л) заполняли полиэтиленовыми носителями (0,12—0,13 кг) (Natrix, Anox AB), стерилизова-

ли автоклавированием при 120° в течение 20 мин и вносили клеточную суспензию в объеме 0,7 л (концентрация  $\geq 10^{10}$  кл/л). После инкубации в течение 48 ч при 30° и непрерывной аэрации жидкое содержимое биореакторов удаляли и добавляли сточные воды так, чтобы носитель был неполностью погружен в жидкость; таким образом верхние две трети объема функционировали как капельный фильтр благодаря капельной подаче жидкости сверху. Нижняя заполненная сточными водами треть объема аппарата функционировала как биореактор, в котором подача воздуха выполняла также роль перемешивания.

Для оценки эффективности очистки сточных вод, содержащих неионные ПАВ, а также эффективности примененных микробных сообществ использовали 4 реактора с различными схемами иммобилизации: 1) биореактор 1-го типа был инокулирован только штаммом *P. rathonis* T (деструктор алкилсульфатов); 2) биореактор 2-го типа был инокулирован следующими штаммами: *P. rathonis* T, *P. alcaligenes* TR (деструкторы анионных ПАВ); *P. fluorescens*, *P. testosteroni* (деструкторы катионных ПАВ); 3) биореактор 3-го типа был инокулирован активным илом совместно с бактериями-деструкторами, используемыми в биореакторе 2-го типа; 4) биореактор 4-го типа был инокулирован только активным илом.

Продолжительность отстаивания была постоянной (1,5 дня). Образцы модельных сточных вод, подаваемых в реактор и жидкость на выходе из реактора отбирали не ранее, чем через 18 дней (срок, обеспечивающий установление стабильных параметров процесса деградации).

**Оценка эффективности процесса очистки сточных вод.** Химическое потребление кислорода (ХПК) измеряли с помощью спектрофотометрической системы Dr Lange (Lange, Германия); содержание общего органического углерода (ООУ) определяли с помощью анализатора Shimadzu TOC-5050 (Япония). Соотношение данных (коэффициент корреляции) между этими двумя параметрами составляло примерно 0,99.

Концентрацию НФЭ определяли методом с использованием роданида (тиоцианата) олова [23] (Tin Thiocyanate Active Substances-method (TTAS)); метод аналогичен STAS [3] и содержит некоторые модификации. Результаты этих измерений сравнивали с данными, полученными с помощью биосенсора.

\* ВКПМ — Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва, 117545.

Образцы модельных сточных вод собирали на входе и выходе из реактора проточного типа. Суммарный объем образцов из каждого реактора составлял 5,5 л. Жидкие образцы собирали, охлаждали на льду и делили на 5 частей по 1,1 л; из каждой части отбирали по 0,1 л для определения ХПК, ООУ и проведения анализа с помощью ТТАС и биосенсора. Стеклообразные флаконы, используемые для отбора сточных вод, также охлаждали на льду, чтобы избежать дальнейшей биодеградации ПАВ.

**Рецепторный элемент биосенсора.** Для приготовления рецепторного элемента биосенсора использовали суспензию микробных клеток, полученных в условиях периодического культивирования, или жидкость на выходе из биореактора. В качестве биорецептора применяли штамм бактерии-деструктора НФЭ *P. alcaligenes* TR. Микробные клетки, выращенные в течение 10—18 ч на ростовой среде (1 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л нитрата аммония, 0,5 г/л хлорида калия, 0,01 г/л хлорида магния, 0,2 г/л ОП-10; pH 7,3—7,6), центрифугировали при 3000 г в течение 25 мин, затем промывали 2 раза 0,2 М фосфатным буфером, pH 7,6, (Sigma, США) и суспендировали в 100—200 мкл такого же буфера. Затем бактерии помещали в 2%-ный агар-агаровый гель. Для этого клеточную суспензию смешивали с равным объемом 4%-ного геля при 50°. Фрагменты геля толщиной 1 мм и диаметром 0,5 см закрепляли с помощью специального фиксатора на поверхности преобразователя (кислородный электрод Кларка).

В случае использования в рецепторном элементе выходящей из биореактора жидкости биомассу собирали путем центрифугирования при 3000 г в течение 25 мин без предварительного культивирования.

**Биосенсорные измерения.** Все измерения проводили в фосфатном буфере (0,2 М, pH 7,6) на установке проточного типа (скорость потока буфера 0,25 мл/мин). Для измерений использовали кислородный электрод Кларка, который подключали к потенциостату IPStіco (ООО «Кронас», Россия) для регистрации и вывода данных на компьютер. На электроде (на катоде относительно электрода сравнения) создавали потенциал –700 мВ. Программное обеспечение позволяло измерять амплитуду и скорость изменения сигнала биосенсора, а также проводить сглаживание и аппроксимацию полученных кривых. Все измерения проводили в проточной кювете объемом 70 мкл.

После стабилизации базовой линии (выход сигнала на плато) в проточную систему подавали раствор субстрата ОП-10. Величина наблюдае-

мых сигналов отражала дыхательную активность микроорганизмов. Время восстановления сенсора после измерения зависело от концентрации подаваемого субстрата и составляло 20—50 мин. Между измерениями сенсор хранили при постоянном протоке (0,25 мл/мин) фосфатного буфера, содержащего 20 мг/л ОП-10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Биореакторы

Испытывали четыре различные схемы инокуляции биореакторов с целью получения данных об оптимальном наборе микроорганизмов-деструкторов для деградации НФЭ. Наилучшую суммарную эффективность очистки наблюдали у реактора 3-го типа, для инокуляции которого использовали селекционированные штаммы бактерий-деструкторов ПАВ, а также микрофлору активного ила. Для данного реактора можно отметить не только приемлемую эффективность снижения содержания НПАВ (концентрация на выходе 18 мг/л, ТТАС), но и высокую эффективность снижения общего содержания органических веществ, что выразилось в самом низком из достигнутых значений ХПК, равном 88 мг/л. Эффективность уменьшения концентрации НПАВ в реакторе 1-го типа была наибольшей (до 5 мг/л, ТТАС), однако деградация органических веществ была, напротив, практически самой низкой среди реакторов всех четырех типов (до 142 мг/л). Реактор 4-го типа был эффективен в отношении снижения общей концентрации органических веществ (ХПК 91,3 мг/л), но не обеспечивал активного снижения концентрации НПАВ (конечная концентрация 30 мг/л, ТТАС). Реактор 2-го типа оказался менее эффективным, чем реактор 1-го типа в отношении снижения как концентрации НПАВ (до 20 мг/л, ТТАС), так и ХПК (до 163 мг/л).

### Оптимизация работы биосенсора

Бактерии-деструкторы *P. alcaligenes* TR в качестве биорецепторного элемента не реагировали на введение ОП-10. Для активизации сигнала биосенсора бактериальная биомасса для приготовления рецепторного элемента была получена путем сбора бактериальной суспензии из стоков биореактора 1-го типа после 18-дневного культивирования в проточных условиях.

Так как предполагалось использование биосенсора проточного типа, в ходе работы были оп-

тимизированы скорость потока и время, в течение которого производили подачу субстрата в систему. При варьировании скорости потока использовали концентрацию ОП-10, равную 50 мг/л, а время подачи субстрата — 3 мин. Оптимальной оказалась скорость потока, равная 0,72 мл/мин. На рис. 1 показана зависимость сигнала сенсора от времени подачи субстрата в кювету при оптимальной скорости потока. Как видно из графика, при подаче субстрата в течение более чем 4 мин сигнал сенсора перестает увеличиваться. Таким образом, в дальнейших экспериментах использовали скорость подачи субстрата 0,72 мл/мин, а время подачи — 3 мин. В таких условиях соотношение «сигнал сенсора—расход субстрата» было наиболее близким к оптимальному.

### Калибровочная кривая для определения ОП-10

На рис. 2 показана зависимость сигналов сенсора от концентрации ОП-10, полученная при выбранных выше условиях. Нижний предел детекции составил 1 мг/л. Сенсор позволял определять ОП-10 в образцах в диапазоне концентраций 1—200 мг/л. Стандартное отклонение для 20 повторных измерений концентрации ОП-10, равной 20 мг/л, составило 1,35 мг/л (7%), что свидетельствует о достаточно точной регистрации сигнала.

Стабильность работы сенсора оценивали путем ежедневного измерения концентрации ОП-10, равной 20 мг/л, в течение 10 дней (рис. 3). Ответы сенсора были стабильны в течение 7 дней, при этом коэффициент вариации (отношение среднеквадратичного отклонения (0,5) к среднему арифметическому значению сигнала (11,9 нА)) составил 4%. Как видно из рис. 3, на 8-й день величина сигнала биосенсора уменьшалась на ~10% (до 10,7 нА), на 9-й день — на ~30% (до 7,9 нА), на 10-й — на ~53% (до 5,6 нА).

Ранее было показано, что включение клеток *P. rathonis* T в агаровый гель позволяет продолжительное время сохранять их активность и жизнеспособность при измерении ПАВ в высоких концентрациях, а также обеспечивает быстрое восстановление рецепторного элемента биосенсора после измерения [24]. В данном исследовании наблюдали стабильную метаболическую активность рецепторного элемента биосенсора на основе иммобилизованных в агар-агаровый гель бактерий-деструкторов в течение недели. В указанный период биосенсор может быть использован для оценки качества модельных сточных вод (показано далее). При дальнейшем функционировании биорецепто-

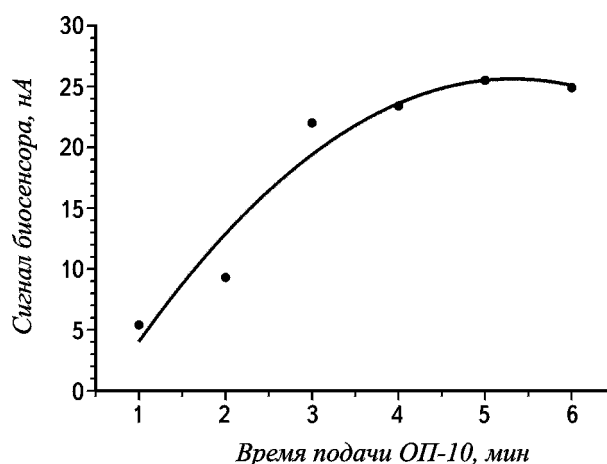


Рис. 1. Зависимость интенсивности сигнала сенсора от времени, в течение которого осуществлялась подача субстрата (скорость подачи субстрата в систему составляла 0,72 мл/мин; концентрация подаваемого субстрата ОП-10 — 50 мг/л)

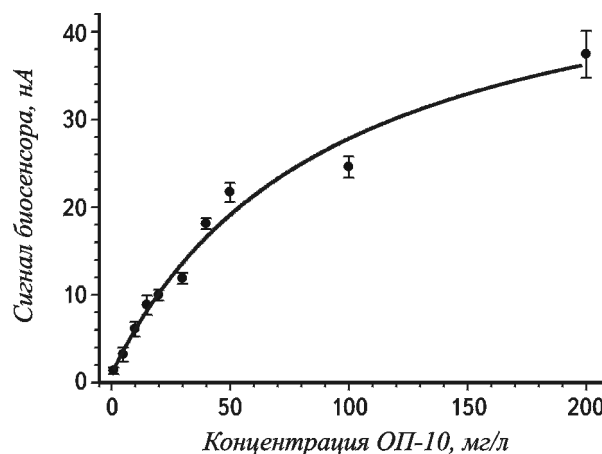


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения ОП-10 (скорость подачи субстрата — 0,72 мл/мин, время подачи субстрата — 3 мин. Измерения проводили в трех повторностях)

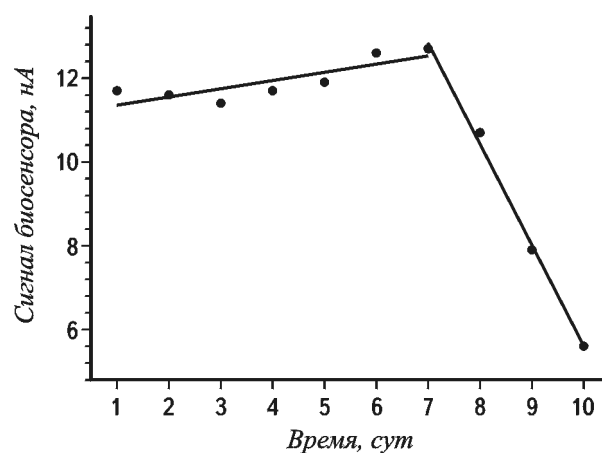


Рис. 3. Стабильность работы биосенсора (концентрация подаваемого субстрата ОП-10 — 20 мг/л; скорость подачи субстрата — 0,72 мл/мин, время подачи субстрата — 3 мин)

ра происходит снижение его активности, что приводит к уменьшению интенсивности сигналов биосенсора. Для получения адекватных данных о содержании в образце исследуемого соединения в этих условиях необходимо пользоваться вновь построенными калибровочными зависимостями и вводить поправочный коэффициент.

### Измерение образцов, содержащих НФЭ

С помощью описанного биосенсора было измерено содержание НП АВ в образцах входящей и выходящей после очистки сточной воды с использованием всех четырех типов биореакторов с различным содержанием иммобилизованных бактерий-деструкторов ПАВ.

В таблице представлены сравнительные результаты измерения содержания ПАВ в подаваемой и очищенной сточной воде различными методами.

В образцах, полученных на 7-й день работы биореакторов, концентрация ОП-10, измеренная биосенсором после очистки, была на 40—60 % больше содержания исследуемого вещества в образце, определенного методом ТТАС. Вероятно, жидкость, удаляемая из биореакторов, помимо остаточных количеств ОП-10 содержала дополнительные субстраты (продукты деградации), влияющие на сигнал сенсора. Одной из основных проб-

лем, связанной с такими ПАВ, как НФЭ, является их неполная деградация даже в наиболее эффективных очистных сооружениях [25]. Обычно, конечные продукты, такие как нонилфенол, моноэтоксифенилфенол, диэтоксифенилфенол, нонилфеноксисульфоновая кислота и нонилфеноксидисульфоновая кислота, более токсичны и устойчивы к биологической деградации, чем исходные НФЭ. Возможно, присутствие именно этих веществ влияло на сигнал сенсора. В то же время можно отметить, что чем ниже показатель ХПК, тем меньше разница между показаниями биосенсора и метода ТТАС (коэффициент корреляции 0,64). Иными словами, чем более полно происходит деградация ПАВ, тем меньше в стоках реакторов соединений, дополнительно увеличивающих сигнал биосенсора, и тем более точно работает биосенсор.

При дальнейшей работе биореакторов (до 32 дней) происходит более полная деградация НП АВ и показания биосенсора приближены к показаниям других методов (исключение составляет сток биореактора типа 1). Этот биореактор характеризуется наивысшей эффективностью по снижению концентрации НП АВ после 18 сут, но низкой эффективностью снижения содержания органики, т.е. в стоке биореактора явно присутствует больше слабоокисленных продуктов (спирты, кислоты), которые не определяются ТТАС, но влияют на сигнал биосенсора.

### Эффективность очистки модельных сточных вод от НФЭ различными методами в условиях проточного культивирования

Время отбора проб	Исследуемые показатели (метод)	Содержание модельной сточной воды, поступающей на очистку	Содержание ОП-10 в сточной воде после очистки в биореакторах различного типа			
			Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 4
7-й день работы биореакторов	ОП-10 (биосенсорные измерения), мг/л	200	24	38	23	37
	ОП-10 (ТТАС), мг/л	200	14	16	15	30
	ХПК, мг/л	435	124	155	70	103
	ООУ, мг /л	316	116	142	65	95
Между 18-м и 32-м днями работы биореакторов	ОП-10 (биосенсорные измерения), мг/л	200	17	19	20	24
	ОП-10 (ТТАС), мг/л	200	5	20	18	30
	ХПК, мг/л	435	142	163	88	91
	ООУ, мг /л	316	52	58	28	31

Затруднения при определении НФЭ в реальных стоках разработанным биосенсором могут возникнуть, если в исследуемых образцах будет содержаться активный ил. Если микроорганизмы активного ила не используют субстраты, на которые был ориентирован биосенсор, то в жидкости будет присутствовать «фоновое дыхание» активного ила; однако и в этих условиях ответ биосенсора на присутствие субстрата будет зарегистрирован. Если же активный ил разрушает те же субстраты, что и разработанный биосенсор, то для снижения влияния активного ила на сигнал биосенсора можно удалять ил путем фильтрования или разводить исследуемый образец.

Таким образом, в ходе проведенных исследований был разработан микробный биосенсор для определения нонилфенолполиэтоксилатов. Минимальная определяемая концентрация ОП-10 составляла 1 мг/л (см. рис. 2). Была продемонстрирована возможность использования биосенсора для оценки эффективности очистки модельных сточных вод в биореакторах колонного типа. Наивысшая эффективность очистки как от НП АВ, так и от продуктов деградации НП АВ, которые влияют на величину ХПК в стоках биореакторов, характерна для реактора, инокулированного селекционированными культурами бактерий-деструкторов ПАВ совместно с микрофлорой активного ила (биореактор 3-его типа). Следует отметить, что разница между показаниями биосенсора и контрольного метода измерения концентрации ПАВ сокращается по мере созревания биопленки и стабилизации процесса очистки (данные не приведены). Таким образом, разработанный биосенсор может быть использован для контроля эффективности процесса очистки модельных сточных вод в условиях проточного культивирования.

Исследование было частично поддержано ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 годы (ГК НК-№ 258, ГК № 16.740.11.0020).

Получено 30.12.10

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Sonnenschein, C.* An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists / C. Sonnenschein, A.M. Soto // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1998. — V. 65. — P. 143—150.
2. *Ying, G.-G.* Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates — a review / G.-G. Ying, B. Williams, R. Kookana // *Environ. Intern.* — 2002. — V. 28. — N. 3. — P. 215—226.
3. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 19th ed. — Washington DC USA: American Public Health Association, 1995. — 1325 p.
4. *Nakae, A.* Determination of trace amounts of alkylbenzene sulphonate by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection / A. Nakae, K. Tsuji, M. Yamanaka // *Anal. Chem.* — 1980. — V. 52. — P. 2275—2277.
5. *Nakae, A.* Determination of alkyl chain distribution of alkylbenzene sulphonates by liquid chromatography / A. Nakae, K. Tsuji, M. Yamanaka // *Anal. Chem.* — 1981. — V. 53. — P. 1818—1821.
6. *Takada, H.* Removal of linear alkyl benzene sulphonates (LAS) in Tamagawa Estuary / H. Takada, N. Ogura // *Mar. Chem.* — 1992. — V. 37. — P. 257—273.
7. *Jonkers, N.* Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry / N. Jonkers, T.P. Knepper, P. de Voogt // *Environ. Sci. Technol.* — 2001. — V. 35. — N. 2. — P. 335—340.
8. *Chan, W.H.* Optosensing of cationic surfactants based on host-guest chemistry / W.H. Chan, A.W.M. Lee, J.Z. Lu, Z.J. Wu // *Anal. Chim. Acta.* — 1998. — V. 370. — P. 259—266.
9. *Kanally, R.A.* Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria / R.A. Kanally, Sh. Harayama // *J. Bacteriol.* — 2000. — V. 182. — N. 8. — P. 2059—2067.
10. *Dua, M.* Biotechnology and bioremediation: successes and limitations / M. Dua, A. Singh, N. Sethunathan, A.K. Johri // *Appl. Microbiol. Biot.* — 2002. — V. 59. — P. 143—152.
11. *Taranova, L.* Bacteria-degraders as the base of an amperometric biosensor for detection of anionic surfactants / L. Taranova, I. Semenchuk, T. Manolov, P. Iliasov, A. Reshetilov // *Biosens. Bioelectron.* — 2002. — V. 17. — P. 635—640.
12. *Leon, V.M.* Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in seawater / V.M. Leon, A. Gomez-Parra, E. Gonza'lez-Mazo // *Environ. Sci. Technol.* — 2004. — V. 38. — N. 8. — P. 2359—2367.
13. *Wentzel, A.* Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes / A. Wentzel, T.E. Ellingsen, H.K. Kotlar, S.B. Zotchev, M. Throene-Holst // *Appl. Microbiol. Biot.* — 2007. — V. 76. — N. 6. — P. 1209—1221.
14. *Reichenbecher, W.* Desulfonation of propanesulfonic acid by *Comamonas acidovorans* strain P53: evidence for an alkane-sulfonate sulfonatase and an atypical sulfite dehydrogenase / W. Reichenbecher, J.C. Murrell // *Arch. Microbiol.* — 1999. — V. 172. — P. 387—392.
15. *Remde, A.* Biodegradability of fluorinated surfactants under aerobic and anaerobic conditions / A. Remde, R. Debus // *Chemosphere.* — 1996. — V. 32. — P. 1563—1574.
16. *He, F.* A new sensor method for studying the effect of surfactants on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* / F. He, X. Zhang, Zh. Liu // *Sensor Actuat. B-chem.* — 2006. — V. 113. — N. 1. — P. 428—434.
17. *Ivashchenko, G.V.* Use of *Pseudomonas* and *Achromobacter* species bacteria-degraders of surface-active agents for detection and destruction of polycyclic aromatic hydrocarbons /

- G.V. Ivashchenko, I.N. Semenchuk // Ukr. Biokhim. Zh. — 2001. — V. 73. — N. 1. — P. 148—152.
18. Reshetilov, A.N. The amperometric biosensor for detection of sodium dodecyl sulfate / A.N. Reshetilov, I.N. Semenchuk, P.V. Iliasov, L.A. Taranova // Anal. Chim. Acta. — 1997. — V. 347. — P. 19—26.
  19. Nomura, Y. Application of a linear alkylbenzene sulfonate biosensor to river water monitoring. Biosens bioelectron / Y. Nomura, K. Ikebukuro, K. Yokoyama, T. Takeuchi, Y. Arikawa, S. Ohno, I. Karube // Biosens. Bioelectron. — 1998. — V. 13. — P. 1047—1053.
  20. Dhoub, A. Large scale application of membrane bioreactor technology for the treatment and reuse of an anionic surfactant wastewater / A. Dhoub, N. Hdiji, I. Hassanri, S. Sayadi // Process Biochem. — 2005. — V. . — P. 2715—2720.
  21. Di Gioia, D. Nonylphenol polyethoxylate degradation in aqueous waste by the use of batch and continuous biofilm bioreactors / D. Di Gioia, L. Sciubba, L. Bertin, C. Barberio, L. Salvadori, S. Frassinetti, F. Fava // Water Res. — 2009. — V. 43. — N. 12. — P. 2977—2988.
  22. Lu, J. Biodegradation of nonylphenol polyethoxylates by denitrifying activated sludge / J. Lu, Q. Jin, Y. He, J. Wu, W. Zhang, J. Zhao // Water Res. — 2008. — V. 42. — N. 4—5. — P. 1075—1082.
  23. Абрамзон А.А., Бочаров В.В., Гаевой Г.М., Майофис А.Д., Майофис С.Л., Маташкина Р.М., Скворский Л.Я., Чистяков Б.Е., Шиц Л.А. Поверхностно-активные вещества: Справочник [под ред. А.А. Абрамзона и Г.М. Гаевого]. — Л.: Химия, 1979. — 376 с.
  24. Семенчук, И.Н. Влияние различных способов иммобилизации на стабильность микробного биосенсора на основе *Pseudomonas rathonis* Т при детекции поверхностно-активных веществ / И.Н. Семенчук, Л.А. Таранова, А.А. Каленюк, П.В. Ильясов, А.Н. Решетилов // Прикл. биохим. микробиол. — 2000. — Т. 36. — №. 1. — С. 80—84.
  25. Planas, C. Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS / C. Planas, J.M. Guadayol, M. Droguet, A. Escalas, J. Rivera, J. Caixach // Water Res. — 2002. — V. 36. — N. 4. — P. 982—988.
- Yu.V. PLEKHANOVA<sup>1</sup>, A.N. RESHETILOV<sup>1,\*</sup>, T.V. MANOLOV<sup>2</sup>, and L.A. TARANOVA<sup>3</sup>
- <sup>1</sup> The Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russ. Acad. Sci., 142290, Pushchino, Moskovskaya oblast Russia
- <sup>2</sup> The Lund University, P.O. Box 124 SE-221 00, Sweden
- <sup>3</sup> The Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry, Ukr. Acad. Sci., 03142, Kiev Ukraine
- e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

### Biosensor Monitoring of Microbial Decontamination of Waste Water from Nonylphenol Polyethoxylates under Flow-through Conditions

The nonylphenol polyethoxylates (NPEO) degradation in laboratory-scale flow-through column bioreactors with a fixed bed of polyethylene nature supporting immobilized surfactant-degrading bacteria of *Pseudomonas* genus has been studied. A biosensor based on an oxygen Clark electrode and bioreactor-derived NPEO-degrading bacteria was designed and used for monitoring of the efficacy of the model waste water microbial decontamination. The designed biosensor allowed to detect OP-10 (polyethylene glycol monoalkyl phenyl ether on the basis of polymer distillate, a commercial NPEO preparation) in samples in the range 1—200 mg/l. The biosensor operation was stable within seven days. The standard deviation for twenty consecutive measurements of OP-10 (20 mg/l) was 1,35 mg/l (7%).

*Key words:* biodegradation, biosensor, Clark type electrode, nonylphenol polyethoxylates, surface-active compounds.

---

\* Author for correspondence.