

## МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.873.6:51-76:531

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-328-336

### Интенсификация процесса биодеструкции ибупрофена с использованием факторного анализа и кинетического моделирования

Григорий Андреевич Бажутин<sup>1, 2</sup>, Елена Александровна Тюмина<sup>3, 4</sup>,  
Александр Анатольевич Селянинов<sup>5</sup>, Елена Владимировна Вихарева<sup>6, 7</sup>✉

<sup>1, 3, 6</sup> Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>2, 4</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

<sup>5</sup> Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия,  
prof.selyaninov@yandex.ru

<sup>7</sup>✉ Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия, ajm@perm.ru

<sup>1</sup> sniffedbybadger@gmail.com

<sup>3</sup> elenatyumina@mail.ru

**Аннотация.** Ибупрофен – один из наиболее часто детектируемых фармполлютантов в сточных водах очистных сооружений многих стран. В ранее проведенных исследованиях подобраны условия актинобактериальной деструкции ибупрофена и разработана методика хроматографического анализа, позволяющая определять остаточные количества вещества в процессе биодеструкции. Однако влияние комплекса взаимодействующих факторов на динамику процесса биодеструкции ибупрофена изучено недостаточно. Цель настоящей работы – интенсификация этого процесса на основе многофакторного эксперимента с использованием управляемых параметров ключевых факторов, а также прогноз изменения содержания данного вещества и времени окончания оптимизированного процесса с применением кинетического моделирования. Варьирование концентраций глюкозы, *n*-гексадекана, инокулята и значения pH позволило уменьшить продолжительность процесса биодеструкции ибупрофена (0.1 г/л) с 10 до 2 сут. при использовании косубстратов в количестве 1.0 г/л, 10.0 мл/л и стандарта мутности БАК-5 соответственно, а также стабилизации pH на уровне 6.5. С использованием кинетического уравнения минус первого порядка  $dx/dt = -k x^{-1}$  определены значения параметра *k* скорости процесса биодеструкции ибупрофена  $138.88 \div 146.84\% / \text{ч}$ , период полураспада  $t_{1/2} = 25.54 \div 27.00$  ч и уточнено время окончания процесса  $t_{1/100} = 34.05 \div 36.00$  ч в оптимизированных условиях.

**Ключевые слова:** ибупрофен, актинобактерии, *Rhodococcus*, биодеструкция, факторный анализ, кинетическое моделирование

**Для цитирования:** Интенсификация процесса биодеструкции ибупрофена с использованием факторного анализа и кинетического моделирования / Г. А. Бажутин, Е. А. Тюмина, А. А. Селянинов, Е. В. Вихарева // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 328–336. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-328-336>.

**Благодарности:** исследование поддержано грантом РФФ № 21-14-00132.

## MICROBIOLOGY

Original article

### Enhancing the biodegradation of ibuprofen through factor analysis and kinetic modeling

Grigory A. Bazhutin<sup>1, 2</sup>, Elena A. Tyumina<sup>3, 4</sup>, Alexander A. Selyaninov<sup>5</sup>,  
Elena V. Vihareva<sup>6, 7</sup>✉

<sup>1, 3, 6</sup> Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

<sup>2, 4</sup> Perm State University, Perm, Russia

<sup>5</sup> Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia, prof.selyaninov@yandex.ru

<sup>7</sup>✉ Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia, ajm@perm.ru

<sup>1</sup> sniffedbybadger@gmail.com

<sup>3</sup> elenatyumina@mail.ru

**Abstract.** Ibuprofen ranks as one of the most frequently detected pharmaceutical pollutants in water across many countries. Previous studies identified conditions for actinobacterial degradation of ibuprofen and devel-

oped a chromatographic analysis technique, enabling the measurement of residual ibuprofen levels during biodegradation. However, the impact of a complex interplay of factors on the dynamics of ibuprofen biodegradation remains insufficiently explored. The objective of this study was to enhance the biodegradation process of ibuprofen through a multifactorial experiment that controlled key parameters and to predict changes in substance content and the time needed for process optimization using kinetic modeling. As a result of this study, varying the concentrations of glucose, n-hexadecane, inoculum, and pH values has enabled a remarkable reduction in the biodegradation process duration for ibuprofen (0.1 g/L), from 10 days to just 2 days when employing cosubstrates in quantities of 1.0 g/L, 10.0 ml/l, and adhering to the turbidity standard NTU-5, along with pH stabilization at 6.5. By applying the kinetic equation of the first-order derivative,  $dx/dt = -k x^1$ , we determined the parameter 'k' for the ibuprofen biodegradation rate to be  $138.88 \div 146.84\%^2/h$ . The half-life ( $t_{1/2}$ ) was calculated as  $25.54 \div 27.00$  hours, and the process's endpoint,  $t_{1/100}$ , was refined to  $34.05 \div 36.00$  hours under the optimized conditions.

**Keywords:** ibuprofen, actinobacteria, *Rhodococcus*, biodestruction, factor analysis, kinetic modeling

**For citation:** Bazhutin G. A., Tyumina E. A., Selyaninov A. A., Vihareva E. V. [Enhancing the biodegradation of ibuprofen through factor analysis and kinetic modeling]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 328-336. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-328-336>.

**Acknowledgments:** the study was supported by the Russian Science Foundation grant № 21-14-00132.

## Введение

Фармацевтические поллютанты, представляющие собой высокостабильные соединения с разнообразной химической структурой и выраженной биологической активностью, с начала 2000-х годов признаны новым классом ксенобиотиков [Patel et al., 2019]. Данные вещества оказывают неблагоприятное воздействие на окружающую среду даже в относительно невысоких, но экологически значимых концентрациях [Chopra, Kumar, 2020; Sánchez-Aceves et al., 2021]. Одними из многочисленных микроорганизмов, осуществляющих процессы естественного самоочищения окружающей среды от антропогенных ксенобиотиков, являются актинобактерии рода *Rhodococcus* – типичные обитатели водных и почвенных экосистем, отличающиеся наибольшим разнообразием деградируемых поллютантов [Ivshina, Kuyukina, Krivoruchko, 2017; Anteneh, Franco, 2019; Girardot et al., 2020]. Ранее нами была показана способность актинобактерий рода *Rhodococcus* к биологической деструкции лекарственных средств разной химической структуры и фармакологического действия, в том числе парацетамола, ацетилсалициловой кислоты, кодеина, дротаверина гидрохлорида, диклофенака натрия, мелоксикама, ибупрофена и др. [Ivshina et al., 2015, 2019, 2021].

Проведение процессов бактериальной деструкции лекарственных средств требует соблюдения многих условий, которые определяются влиянием комплекса фиксируемых на начальном этапе или регулируемых в ходе процесса факторов, основными из которых являются скорость вращения шейкера, температура процесса, концентрация бактериальных клеток, концентрация косубстратов (дополнительных источников углерода и энергии для микроорганизмов), концентрация фармпрепарата, установленная в зависимости от его минимальной подавляющей концентрации и др. Ранее в цикле исследований нами показано, что скорость уменьшения концентрации лекарственного средства в ходе процесса биодеструкции при фиксированных начальных условиях пропорциональна концентрации вещества в культуральной среде бактерий. Время окончания процесса деградации, критерием которого является полное удаление фармпрепарата из среды культивирования, составляло от нескольких часов до 30 сут. Динамика убыли количества вещества в процессе биодеструкции регистрировалась с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При этом проводился подбор условий хроматографического определения фармвещества в специфической биожидкости – среде культивирования бактерий [Karpenko et al., 2014; Plotnikov et al., 2017; Khrenkov et al., 2020; Vihareva et al., 2023].

Нами установлено, что продолжительность процесса биодеструкции ибупрофена (ИБП) клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в фиксированных условиях составляла более 5 сут., при этом остаточная концентрация ИБП находилась на уровне 20% [Vihareva et al., 2023]. На основе работ [Сергиенко, Бондарева, 2000; Karpenko et al., 2014] была подтверждена случайность процесса биодеструкции ИБП с позиций стохастического анализа, и с применением кинетического моделирования осуществлен прогноз изменения содержания ИБП в процессе биодеструкции, определены период его полураспада, время окончания (10 сут.) и воспроизводимость процесса [Vihareva et al., 2023].

Цель работы – интенсификация процесса биодеструкции ИБП и сокращение его продолжительности на основе многофакторного эксперимента с использованием управляемых параметров ключевых факторов (концентрация глюкозы, *n*-гексадекана, бактериальных клеток, значение pH среды), а также кинетическое моделирование оптимизированного процесса.

## Материалы и методы

В работе использовали натриевую соль ИБП ( $C_{13}H_{17}NaO_2$ , CAS 31121-93-4,  $\alpha$ -метил-4-(изобутил)фенилуксусной кислоты; Sigma-Aldrich, США): белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. Химические реагенты имели квалификацию х.ч., ч.д.а. или о.с.ч. (База № 1 химреактивов, Россия; Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США).

В качестве биодеструктора ИБП использовали штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmc.ru>, ЦКП 480868, УНУ 73559, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур) [Catalogue of Strains..., 2023]. В колбу Эрленмейера вместимостью 250 см<sup>3</sup> вносили 0.01 г ИБП, 100 см<sup>3</sup> минерально-солевой среды (г/л):  $K_2HPO_4$  – 1.0;  $KH_2PO_4$  – 1.0;  $NH_4NO_3$  – 1.0; NaCl – 1.0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.2;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0.02;  $FeCl_3 \cdot 7H_2O$  – 0.001, а также глюкозу (от 0.1 до 2.5 г/л) и *n*-гексадекан (от 0.1 до 50.0 мл/л) в качестве косубстратов (дополнительных источников углерода и энергии для бактериальных клеток). Инокулят (клетки родококков) вносили в соответствии со стандартным образом мутности бактериальных взвесей БАК-5 (5 международных единиц мутности), при этом использовали от 10 до 200% концентрации клеток, необходимых для достижения БАК-5. Значение pH в интервале от 4.0 до 8.0 регулировали с помощью растворов HCl и NaOH, в интервале от 5.5 до 7.0 – с помощью изменения соотношения  $KH_2PO_4$  и  $K_2HPO_4$  в составе минеральной среды. Родококки предварительно выращивали в течение трех сут. в питательном бульоне LB (Sigma, США) и затем отмывали 10 mM фосфатным буферным раствором (pH 7.0). Процесс биодеструкции ИБП проводили в течение 5 сут. в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере Certomat IS (Sartorius, Германия) при стабилизированных параметрах угловой скорости вращения шейкера (160 об/мин) и температуре 28°C. Отбор проб в количестве 1 мл проводили с интервалом 1 сут., в заключительных экспериментах – с интервалом 6 ч. Каждый опыт при варьировании параметров исследуемых факторов проводили в 3-кратных повторностях (реализациях) в одинаковых условиях.

Приборы и оборудование. Орбитальный шейкер Certomat IS (Sartorius, Германия); хроматограф; лабораторная центрифуга (12 000 об/мин, Eppendorf, Германия), pH-метр Hanna HI2215-02 (Hanna Instruments, США). Для обеспечения оптимального качества свежеприготовленной сверхчистой воды для ВЭЖХ использовали систему очистки воды Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (Millipore, США).

Убыль ИБП в процессе биодеструкции регистрировали с помощью хроматографа LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония), оснащенного обращено-фазной колонкой Kromasil 7uC18(2) 100A (4.6 mm × 250 mm) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Условия хроматографического анализа ИБП: подвижная фаза ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (pH 3) в соотношении 60:40; скорость потока элюента – 1 мл/мин; температура колонки – 40°C; объем пробы – 10 мкл; длина волны детектирования – 220 нм. В описанных условиях время удерживания ИБП составляло 10.80 ± 0.02 мин [Vikhareva et al., 2023]. Для осуществления ВЭЖХ-анализа аликвотную часть культуральной среды (1.0 мл), содержащую ИБП и его метаболиты, бактериальные клетки и продукты их жизнедеятельности, помещали в пробирку Эппендорфа и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0.45 мкм (Agilent Technologies, США). В качестве контролей использовали стерильную минеральную среду с ИБП (0.01%) без внесения бактериальных клеток (абиотический контроль) и стерильную минеральную среду с бактериальными клетками без ИБП (биотический контроль). Обработку полученных хроматографических данных проводили с использованием программного обеспечения LCSolution (v1.25 rus).

Для кинетического моделирования использовали кинетическое уравнение минус первого порядка  $dx/dt = -k x^1$  с начальным условием  $x_0 = 100\%$  при  $t = 0$ . Значения параметра скорости биодеструкции  $k$  в реализациях определяли с применением метода наименьших квадратов по полученным экспериментальным данным.

## Результаты и обсуждение

Базовыми значениями варьируемых факторов были следующие: концентрация глюкозы 0.1 г/л, концентрация *n*-гексадекана 0.1 мл/л, концентрация клеток до соответствия стандарту мутности БАК-5, значение pH 7.0.

По нашим данным, варьирование концентраций глюкозы и *n*-гексадекана уменьшало продолжительность процесса до 3 сут. при использовании данных косубстратов в количестве 1.0 г/л и 10.0 мл/л соответственно (табл. 1, 2). В диапазоне концентраций глюкозы с 0.1 до 1.0 г/л и *n*-гексадекана с 0.1 до 10.0 мл/л наблюдалось существенное сокращение времени процесса. Увеличение концентрации глюкозы (более 1.0 г/л) и *n*-гексадекана (более 10.0 мл/л) не способствовало ускорению процесса биодеструкции ИБП.

Таблица 1

**Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях глюкозы**

**[Ibuprofen concentration dynamics during biodegradation at different glucose levels]**

Концентрация глюкозы, г/л	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
0.1	100	94.1	76.8	75.8	73.9	67.0
	100	88.6	70.8	59.0	55.1	53.9
	100	89.4	74.3	66.3	60.6	58.7
0.5	100	84.5	37.8	27.9	0.0	-
	100	76.0	27.8	24.4	17.7	0.0
	100	75.5	28.4	26.9	11.3	0.0
<b>1.0</b>	<b>100</b>	<b>87.3</b>	<b>9.3</b>	<b>0.0</b>	-	-
	<b>100</b>	<b>86.5</b>	<b>8.5</b>	<b>0.0</b>	-	-
	<b>100</b>	<b>85.7</b>	<b>7.1</b>	<b>0.0</b>	-	-
2.5	100	84.3	4.1	2.1	0.0	-
	100	86.5	2.9	3.1	0.0	-
	100	83.6	3.4	1.2	0.0	-

\*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Таблица 2

**Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях *n*-гексадекана**

**[Ibuprofen concentration dynamics during biodegradation at different *n*-hexadecane levels]**

Концентрация <i>n</i> -гексадекана, мл/л	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
0.1	100	94.1	76.8	75.8	73.9	67.0
	100	88.6	70.8	59.0	55.1	53.9
	100	88.4	72.5	61.3	57.6	54.2
1.0	100	87.2	18.0	0.0	-	-
	100	88.4	32.2	8.6	0.0	-
	100	87.1	28.5	6.6	0.0	-
<b>10.0</b>	<b>100</b>	<b>87.3</b>	<b>9.3</b>	<b>0.0</b>	-	-
	<b>100</b>	<b>86.5</b>	<b>8.5</b>	<b>0.0</b>	-	-
	<b>100</b>	<b>85.7</b>	<b>7.1</b>	<b>0.0</b>	-	-
50.0	100	86.3	2.5	0.0	-	-
	100	81.2	2.1	0.0	-	-
	100	83.3	3.6	0.0	-	-

\*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

При варьировании рабочего объема бактериального инокулята принимали во внимание тот факт, что недостаточное его количество приводило к неспособности клеток преодолеть ингибирующее действие ИБП и к отсутствию их роста, и, как следствие, к значительному увеличению продолжительности лаг-фазы. Как видно из данных табл. 3, со снижением концентрации клеток ниже 50% от концентрации по БАК-5 снижается эффективность биодеструкции ИБП. Увеличение объема инокулята выше необходимой для БАК-5 не влияет на продолжительность процесса. Следовательно, рациональным значением данного фактора можно считать концентрацию инокулята, равную стандарту мутности БАК-5.

Таблица 3

**Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях инокулята**

**[Ibuprofen concentration dynamics during biodegradation with varying inoculum concentrations]**

Концентрация инокулята, %	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
10	100	99.9	99.3	97.9	81.4	63.3
	100	99.7	99.8	98.2	90.1	89.3
	100	99.7	97.2	97.1	85.5	80.2

Концентрация инокулята, %	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
50	100	96.3	73.3	71.4	57.6	55.5
	100	96.3	84.0	75.3	72.6	58.6
	100	96.2	80.2	72.5	60.6	57.5
<b>100</b>	<b>100</b>	<b>94.1</b>	<b>76.8</b>	<b>75.8</b>	<b>73.9</b>	<b>67.0</b>
	<b>100</b>	<b>88.6</b>	<b>70.8</b>	<b>59.0</b>	<b>55.1</b>	<b>53.9</b>
	<b>100</b>	<b>89.7</b>	<b>73.5</b>	<b>62.6</b>	<b>60.2</b>	<b>58.9</b>
200	100	90.9	77.7	75.5	73.9	73.0
	100	91.4	67.3	64.4	63.3	62.8
	100	91.4	69.6	67.5	65.6	61.8

\*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Наиболее значимым из исследованных факторов оказалось значение pH. При изменении показателя pH в щелочную сторону (с 6.0 до 8.0) продолжительность процесса увеличивалась (табл. 4). В кислой среде биодеструкция ИПБ практически не происходила.

Таблица 4

Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при значениях pH 4.0–8.0  
[Ibuprofen concentration dynamics throughout biodegradation across pH values 4.0–8.0]

Значение pH	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
4.0	100	100.0	100.0	99.0	99.0	97.0
	100	99.0	98.0	98.0	98.0	98.0
	100	100.0	100.0	99.0	98.0	98.0
5.0	100	97.0	92.0	89.0	87.0	86.8
	100	99.0	89.0	83.0	79.0	77.0
	100	99.0	97.0	91.0	86.0	79.0
<b>6.0</b>	<b>100</b>	<b>93.3</b>	<b>61.6</b>	<b>30.3</b>	<b>22.9</b>	<b>18.8</b>
	<b>100</b>	<b>93.9</b>	<b>69.9</b>	<b>50.5</b>	<b>36.4</b>	<b>33.4</b>
	<b>100</b>	<b>93.6</b>	<b>62.5</b>	<b>37.6</b>	<b>29.8</b>	<b>23.5</b>
7.0	100	98.4	92.8	90.9	88.6	87.5
	100	98.5	94.9	94.6	87.1	85.9
	100	98.5	93.0	91.3	87.0	86.0
8.0	100	99.2	99.1	98.3	95.4	92.4
	100	99.8	98.0	97.5	97.4	96.3
	100	99.2	99.0	98.0	97.1	94.8

\*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Следует отметить, что в процессе биодеструкции ИПБ происходило уменьшение значения pH культуральной среды, что приводило к увеличению времени процесса. В связи с этим возникла необходимость стабилизации pH. При повторении эксперимента со стабилизацией значений pH в пределах от 5.5 до 7.0 оказалось, что оптимальное значение pH равно 6.5. Время завершения процесса при этом уменьшилось до 2 сут. (табл. 5).

Таблица 5

Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при значениях pH 5.5–7.0  
[Ibuprofen concentration dynamics throughout biodegradation across pH values 5.5–7.0]

Значение pH	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
5.5	100	78.77	18.04	0	-	-
	100	71.22	29.78	0	-	-
	100	76.33	37.56	1.21	0	-
6.0	100	67.32	0	-	-	-
	100	66.32	4.91	0	-	-
	100	66.08	0.85	0	-	-

Значение pH	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
6.5	100	56.87	0	-	-	-
	100	55.78	0	-	-	-
	100	58.02	0	-	-	-
7.0	100	70.62	28.12	0	-	-
	100	68.36	32.99	3.72	-	-
	100	75.76	32.16	1.75	-	-

\*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

При разных значениях pH визуально рост культуры значительно различался (рис. 1). При pH 5.0 на вторые сутки процесса биодеструкции ИБП биомасса была белой, оформленной в длинные рыхлые агрегаты, мутность среды высокая. При pH 6.0 наблюдались агрегаты клеток кремового цвета. Наравне с мягкими белыми тяжами начали формироваться круглые, более плотные агрегаты яркой окраски, культуральная среда при этом имела меньшую мутность. При pH 6.5 на вторые сутки вся культура была организована в яркие агрегаты оранжевого цвета. При отстаивании биомасса всплывала, подосаточная жидкость была прозрачна (рис. 1).



Рис. 1. Внешний вид биомассы *R. cerastii* ИЭГМ 1243 при pH культуральной среды 5.0 (а), 6.0 (б), 6.5 (в)  
[Visualization of *R. cerastii* IEGM 1243 in culture media at pH 5.0 (a), 6.0 (б), and 6.5 (в)]

Таким образом, в результате факторного анализа определили рациональные значения концентрации глюкозы (1.0 г/л), *n*-гексадекана (10.0 мл/л), инокулята (БАК-5) и pH среды (6.5). Продолжительность процесса биодеструкции ИБП при этих значениях параметров находится в интервале 24–48 ч.

Для уточнения времени завершения процесса он был воспроизведен в 9-ти реализациях в одинаковых рациональных условиях со стабилизацией pH среды на уровне 6.5 (табл. 6). На данном этапе работы было использовано кинетическое моделирование.

Таблица 6

Динамика процесса биодеструкции ибупрофена (0.01 %) клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243  
[Dynamics of ibuprofen (0.01%) biodegradation by *R. cerastii* IEGM 1243]

№ п/п	Экспозиция, час.					Кинетическое моделирование		
	0	18	24	30	36	$k$ , % <sup>2</sup> /ч	$t_{1/2}$ , ч	$t_{1/100}$ , ч
	Концентрация ибупрофена, %							
1	100	69.54	51.97	28.69	0	146.84	25.54	34.05
2	100	71.62	54.40	30.69	0	142.96	26.23	34.97
3	100	72.50	54.42	31.30	0	141.91	26.43	35.23
4	100	71.57	53.20	27.88	0	144.37	25.98	34.63
5	100	70.00	51.92	28.67	0	146.42	25.61	34.14
6	100	72.72	54.32	31.88	0	141.59	26.48	35.31
7	100	72.51	57.47	35.74	0	138.88	27.00	36.00
8	100	71.72	58.54	34.49	0	139.39	26.90	35.87
9	100	72.71	56.96	33.75	0	139.56	26.87	35.82

\*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Поскольку в условиях стабилизации pH среды на уровне 6.5 скорость уменьшения концентрации ИБП оказалась обратно пропорциональной концентрации ИБП в процессе биодеструкции (табл. 6), для моделирования использовали кинетическое уравнение минус первого порядка  $dx/dt = -k x^{-1}$  с начальным

условием  $x_0 = 100\%$  при  $t = 0$ . После интегрирования уравнение кинетической кривой приняло вид  $x = (x_0^2 - 2kt)^{1/2}$ . Значения параметра скорости биодеструкции  $k$  в реализациях определяли с применением метода наименьших квадратов по полученным экспериментальным данным (табл. 6). Помимо этого, согласно выражению  $t_{1/2} = 0.75 x_0^2 / (2k)$  определяли период полураспада ИБП в процессе биодеструкции, а по выражению  $t_{1/100} = 0.9999 x_0^2 / (2k)$  устанавливали время окончания процесса при 100-кратном уменьшении начальной концентрации исследуемого вещества (табл. 6).

Кинетические кривые, характеризующие изменение остаточной концентрации ИБП в среде культивирования родококков (рис. 2), хорошо соответствуют полученным экспериментальным данным (табл. 6).

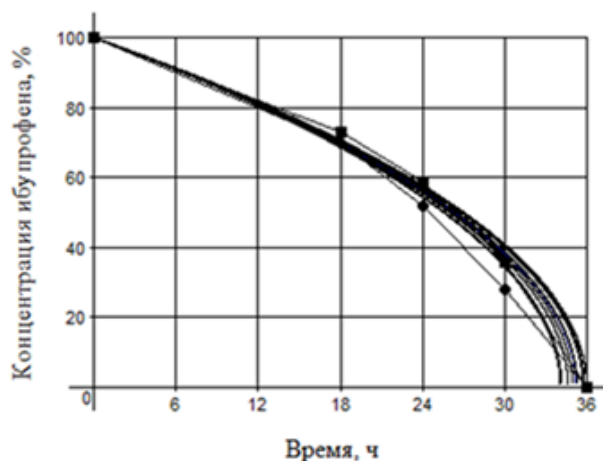


Рис. 2. Кинетические кривые изменения концентрации ибупрофена в процессе биодеструкции клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в условиях стабилизации рН среды (точками показаны экспериментальные значения пределов концентрации)

[Kinetic curves of ibuprofen concentration changes during biodegradation by *R. cerastii* IEGM 1243 cells with pH stabilization (experimental concentration limits marked as dots)]

Значения параметра  $k$  скорости процесса биодеструкции ИБП находятся в пределах  $138.88 \div 146.84\% / \text{ч}$ , период полураспада  $t_{1/2} - 25.54 \div 27.00$  ч, время окончания процесса  $t_{1/100} - 34.05 \div 36.00$  ч. Доверительные интервалы для выборочных средних значений параметра скорости, периода полураспада и времени окончания процесса, установленные с применением критического значения коэффициента Стьюдента для доверительной вероятности  $P = 95\%$  и числа степеней свободы  $(n - 1) = 8$ , составляют  $(142.44 \pm 2.28) \% / \text{ч}$ ,  $(26.34 \pm 0.42)$  ч и  $(35.11 \pm 0.56)$  ч соответственно. Полученное значение относительного стандартного отклонения для данных интервалов (2.08%) свидетельствует о приемлемой воспроизводимости интенсифицированного варианта процесса биодеструкции ИБП [Сергиенко, Бондарева, 2000].

## Заключение

Проведенный факторный анализ позволил выделить три варьируемых фактора, оказывающих наибольшее влияние на процесс биодеструкции ибупрофена актинобактериями рода *Rhodococcus*: концентрация глюкозы, концентрация *n*-гексадекана и параметр кислотности среды рН. Методом прямого экспериментального поиска определены их значения, позволившие сократить продолжительность процесса биодеструкции с 10 до 2 сут.

Кинетическое моделирование результатов эксперимента на повторяемость позволило с вероятностью  $P = 95\%$  получить доверительный интервал для времени завершения процесса, равный  $(35.11 \pm 0.56)$  ч., а также уточнить время завершения процесса (1.5 сут.). Ключевым фактором оказалось значение кислотности среды. Стабилизация рН культуральной среды родококков кардинально изменила ход процесса: при уменьшении концентрации ибупрофена скорость биодеструкции увеличивалась, в связи с чем в кинетических уравнениях вместо 1-го использовали минус 1-ый порядок, хорошо описывающий экспериментальные данные.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке биотехнологических способов очистки сточных вод фармацевтических предприятий от опасных для окружающей природной среды фармацевтических отходов.

## Список источников

1. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. 256 с.

2. Anteneh Y.S., Franco C.M.M. Whole cell actinobacteria as biocatalysts // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 77. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00077.
3. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. URL: <http://www.iegmc.ru/strains/index.html>. (Дата обращения: 01.11.2023).
4. Chopra S., Kumar D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation // *Heliyon*. 2020. Vol. 6, № 6. P. e04087. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04087.
5. Girardot F. et al. Bacterial diversity on an abandoned, industrial wasteland contaminated by polychlorinated biphenyls, dioxins, furans and trace metals // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 748. P. 141242. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141242.
6. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // *Microbial Resources. From Functional Existence in Nature to Applications* / ed. I.B. Kurtböke. Academic Press, 2017. P. 121–148. DOI: 10.1016/B978-0-12-804765-1.00006-0
7. Ivshina I.B. et al. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // *Current Microbiology*. 2015. Vol. 70, № 3. P. 307–314. DOI:10.1007/s00284-014-0718-1.
8. Ivshina I.B. et al. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. P. 9159. DOI: 10.1038/s41598-019-45732-9.
9. Ivshina I.B. et al. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effect of ibuprofen // *PLoS ONE*. 2021. Vol. 16, № 11. P. e0260032. DOI: 10.1371/journal.pone.0260032.
10. Karpenko Yu.N. et al. Chromatographic determination of drotaverine hydrochloride and kinetic modeling of the process of its biodestruction in a *R. rhodochrous* culture liquid // *Journal of Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 69, № 7. P. 681–685. DOI: 10.1134/S1061934814070077.
11. Khrenkov A.N. et al. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2020. Vol. 61, № 5. P. 309–314. DOI: 10.3103/S0027131420050053
12. Patel M. et al. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods // *Chemical Reviews*. 2019. Vol. 119, № 6. P. 3510–3673. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00299.
13. Plotnikov A.N. et al. Determination of codeine phosphate in the culture fluid of *Rhodococcus* by high-performance liquid chromatography // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2017. Vol. 72, № 6. P.328–332. DOI: 10.3103/S0027131418010054.
14. Sánchez-Aceves L. et al. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of ibuprofen and aluminum alters oxidative stress status on *Danio rerio* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*. 2021. Vol. 248. P. 109071. DOI: 10.1016/j.cbpc.2021.109071.
15. Vikhareva E.V. et al. Chromatographic determination of ibuprofen in *Rhodococcus* culture media and kinetic modeling of its biodegradation process // *Journal of Analytical Chemistry*. 2023. Vol. 78, № 2. P. 241–246. DOI: 10.1134/S1061934823010136.

## References

1. Sergiyenko V.I., Bondareva I.B. *Matematičeskaja statistika v kliničeskich issledovanijach* [Mathematical statistics in clinical research]. Moscow, GEOTAR Medicina Publ., 2000. 256 p. (In Russ.).
2. Anteneh Y.S., Franco C.M.M. Whole cell actinobacteria as biocatalysts. *Frontiers in Microbiology*. V. 10 (2019): pp. 77. DOI: 0:77. 10.3389/fmicb.2019.00077.
3. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. URL: <http://www.iegmc.ru/strains/index.html>. (accessed: 01.11.2023).
4. Chopra S., Kumar D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon*. V. 6, No. 6 (2020): pp. e04087. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04087.
5. Girardot F., Allégra S., Pfendler S., Conord C., Rey C., Gillet B., Hughes S., Bouchardon A.E., Hua A., Paron F., Bouchardon J.L., Faure O. Bacterial diversity on an abandoned, industrial wasteland contaminated by polychlorinated biphenyls, dioxins, furans and trace metals. *Science of the Total Environment*. V. 748 (2020): pp. 141242. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141242.
6. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation In: *Microbial Resources. From Functional Existence in Nature to Applications* / ed. I.B. Kurtböke. Academic Press, 2017. P. 121-148. DOI: 10.1016/B978-0-12-804765-1.00006-0.
7. Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber*. *Current Microbiology*. V. 70, No. 3 (2015): pp. 307-314. DOI: 10.1007/s00284-014-0718-1.
8. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Scientific Reports*. V. 9 (2019): pp. 9159. DOI: 10.1038/s41598-019-45732-9.
9. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Bazhutina G.A., Vikhareva E.V. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effect of ibuprofen. *PLoS ONE*. V. 16, No. 11 (2021): pp. e0260032. DOI: 10.1371/journal.pone.0260032.



10. Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Mukhutdinova A.N., Rychkova M.I., Baranova A.A., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. Chromatographic determination of drotaverine hydrochloride and kinetic modeling of the process of its biodestruction in a *R. rhodochrous* culture liquid. *Journal of Analytical Chemistry*. V. 69, No. 7 (2014): pp. 681-685. DOI: 10.1134/S1061934814070077.

11. Khrenkov A.N., Vikhareva E.V., Tumulovich E.Yu., Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Tyumina E.A. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids. *Moscow University Chemistry Bulletin*. V. 61, No. 5 (2020): pp. 309-314. DOI: 10.3103/S0027131420050053.

12. Patel M., Kumar R., Kishor K., Mlsna T., Pittman C.U. Jr., Mohan D. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews*. V. 119, No. 6 (2019): pp. 3510-3673. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00299.

13. Plotnikov A.N., Karpenko Y.N., Vikhareva E.V., Tyumina E.A., Richkova M.I., Selyaninov A.A. Determination of codeine phosphate in the culture fluid of *Rhodococcus* by high-performance liquid chromatography. *Moscow University Chemistry Bulletin*. V. 72, No. 6 (2017): pp. 328-332. DOI: 10.3103/S0027131418010054.

14. Sánchez-Aceves L., Pérez-Alvarez I., Gómez-Oliván L.M., Islas-Flores H., Barceló D. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of ibuprofen and aluminum alters oxidative stress status on *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*. V. 248 (2021): pp. 109071. DOI: 10.1016/j.cbpc.2021.109071.

15. Vikhareva E.V., Selyaninov A.A., Bazhutin G.A., Tyumina E.A. Chromatographic determination of ibuprofen in *Rhodococcus* culture media and kinetic modeling of its biodegradation process. *Journal of Analytical Chemistry*. V. 78, No. 2 (2023): pp. 241-246. DOI: 10.1134/S1061934823010136.

Статья поступила в редакцию 01.11.2023; одобрена после рецензирования 08.11.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 01.11.2023; approved after reviewing 08.11.2023; accepted for publication 20.11.2023.

#### **Информация об авторах**

Г. А. Бажутин – инженер лаборатории алканотрофных микроорганизмов, инженер Rhodococcus-центра;

Е. А. Тюмина – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных организмов, старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии;

А. А. Селянинов – доктор технических наук, профессор кафедры теоретической механики с курсом биомеханики;

Е. В. Вихарева – доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии.

#### **Information about the authors**

G. A. Bazhutin – engineer of the Laboratory of alkanotrophic microorganisms, engineer of the Rhodococcus-center;

E. A. Tyumina – candidate of biological sciences, researcher at the Laboratory of alkanotrophic organisms, senior lecturer at the Department of Microbiology and Immunology;

A. A. Selyaninov – doctor of technical sciences, professor of the Department of theoretical mechanics with a course in biomechanics;

E. V. Vikhareva – doctor of pharmaceutical sciences, professor, head of the Department of analytical chemistry.

#### **Вклад авторов:**

Бажутин Г. А. – проведение экспериментов; обработка результатов; написание исходного текста.

Тюмина Е. А. – доработка текста.

Селянинов А. А. – статистическая обработка материала; написание исходного текста.

Вихарева Е. В. – концепция исследования; методология; написание исходного текста.

#### **Contribution of the authors:**

Bazhutin G. A. – performing the experiments; formal data analysis; writing the initial draft.

Tyumina E. A. – editing the manuscript.

Selyaninov A. A. – data analysis; writing the initial draft.

Vikhareva E. V. – formulation of research goals; development of methodology; writing the initial draft.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.