

УДК 543.544:615.216.5

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДРОТАВЕРИНА И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЕГО БИОДЕСТРУКЦИИ В ПОЧВЕ

© 2023 г. Е. В. Вихарева^{a, b, *}, А. А. Селянинов^c, Е. А. Тюмина^a

^aПермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук
ул. Ленина, 13а, Пермь, 614990 Россия

^bПермская государственная фармацевтическая академия
ул. Полевая, 2, Пермь, 614900 Россия

^cПермский национальный исследовательский политехнический университет
Комсомольский просп., 29, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: ajm@perm.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 16.05.2023 г.

Изучены закономерности процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве актинобактериями рода *Rhodococcus* в присутствии аборигенной микрофлоры. Предложен способ определения фармацевтического поллютанта в почве, основанный на жидкостно-жидкостной экстракции хлороформом с последующим анализом методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Представлен прогноз уменьшения концентрации экотоксиканта в 100 раз в процессе его биодеструкции с заданной вероятностью 95%.

Ключевые слова: дротаверин, ВЭЖХ, *Rhodococcus*, биодеструкция в почве, математическое моделирование.

DOI: 10.31857/S0044450223120216, **EDN:** YXAVQB

В последние годы проводятся интенсивные исследования по биологической деструкции фармацевтических поллютантов — компонентов лекарственных средств и их метаболитов, детектируемых в окружающей среде. Интерес к данной теме вызван глобальным фармацевтическим загрязнением водных объектов: в 71 стране мира обнаружено уже более 600 веществ, относящихся к фармацевтическим препаратам [1]. При этом наиболее часто обнаруживают антибиотики, эстрогены, антидепрессанты, нестероидные противовоспалительные средства, спазмолитики и др. [2–4].

Проблема фармацевтического загрязнения приобрела планетарный характер по своим масштабам и значимости. Фармполлютанты обнаружены даже в особо охраняемых регионах, таких как Антарктика, территория которой до недавнего времени считалась неподверженной антропогенному воздействию [5]. Несмотря на относительно низкие уровни присутствия фармполлютантов, их постоянное пополнение в природных средах может привести к высоким долговременным концентрациям и стимулировать потенциально отрицательное воздействие на человека и окружающую среду [6–9].

Фундаментальный интерес к поиску эффективных методов обезвреживания и детоксикации фармполлютантов растет, в том числе к изучению степени их биодоступности и токсического воздействия на природные микроорганизмы, играющие роль системы первичного реагирования и иницирующие адаптивные реакции. Эти исследования позволяют установить потенциальные последствия и снизить риск от присутствия фармполлютантов для окружающей среды и здоровья человека. Среди микроорганизмов, участвующих в процессах самоочищения природных экосистем, важная экологическая роль в биологической детоксикации и деконтаминации почв и воды принадлежит актинобактериям рода *Rhodococcus* — устойчивым обитателям загрязненных почв, водоемов, активных илов, сточных вод, обладающим высокой активностью оксидоредуктаз и богатыми адаптивными возможностями в отношении различных токсических соединений [10–13]. Актуальность использования метаболического потенциала родококков для биодегradации лекарственных средств подтверждается все возрастающим количеством исследований по этой тематике [14–17]. Проведенные нами исследования пока-

зали способность родококков к полной биодеструкции фармацевтических препаратов группы нестероидных противовоспалительных средств, в том числе парацетамола [18], ацетилсалициловой кислоты [19], диклофенака натрия [20], ибупрофена [21], кетопрофена [22], а также препарата спазмолитического действия дротаверина гидрохлорида [23, 24].

Дротаверина гидрохлорид (ДГ, $C_{24}H_{31}NO_4$, CAS: 985-12-6, 1-(3,4-диэтоксифенил)-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин в форме гидрохлорида, *син.* Но-шпа) является одним из распространенных устойчивых фармполлютантов изохинолинового ряда (схема 1). Данное соединение является синтетическим аналогом папаверина гидрохлорида, но обладает более сильным и продолжительным действием. Ежегодное потребление ДГ в развитых странах составляет сотни тонн, что неизбежно приводит к попаданию его в окружающую среду [25]. Есть данные, указывающие на эмбрио- и общетоксическое действие дротаверина в отношении млекопитающих [26].

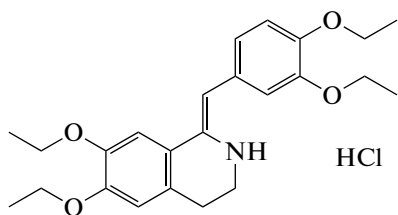


Схема 1. Структурная формула дротаверина гидрохлорида.

Ранее нами разработана методика обнаружения и определения ДГ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в культуральной жидкости актинобактериальных штаммов, пригодная для изучения динамики разложения и оптимизации процесса биодеструкции данного вещества в водной среде [27]. Изучены основные кинетические закономерности и предложена математическая модель, позволяющая прогнозировать длительность и оптимальное время окончания процесса биодеструкции ДГ в водных средах [27]. Отмечено, что процессы биодеструкции лекарственных средств разного химического строения относятся к классу кинетически моделируемых [28]. Соответствующие математические модели основаны на кинетических уравнениях первого порядка [19, 27, 29–31]. Разработан вероятностный подход к определению времени завершения процессов биодеструкции лекарственных средств по верхней границе доверительного интервала [28].

Цель настоящей работы — изучение процесса биодеструкции ДГ в почве актинобактериями рода *Rhodococcus*, в том числе подбор метода определения остаточной концентрации ДГ в почве, а также вероятностный прогноз полной биодеструкции ДГ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Микробиологические методы. Для исследования биологической деструкции ДГ в фармацевтически загрязненные образцы почвы с естественной почвенной микрофлорой дополнительно вносили штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 647, поддерживаемый в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 285, УНУ/ЦКП 73559/480868, <http://www.iegmc.ru>) [32]. Для этого бактериальные клетки предварительно выращивали в течение 3 сут в мясопептонном бульоне (МПБ, Sigma-Aldrich, США) и дважды отмывали 50 мМ фосфатным буферным раствором (рН 7.0). В отдельных экспериментах культуры предварительно выращивали в МПБ в присутствии низких (2 мг/л) концентраций ДГ, получая таким образом адаптированные к ДГ клетки. Оптическая плотность ($ОП_{600}$) посевного материала составляла 0.2 ед., что соизмеримо с показателями КОЕ (колониеобразующие единицы) 2.3×10^7 клеток/мл. Показатели оптической плотности измеряли с помощью спектрофотометра Lambda EZ 201 (Perkin Elmer, США).

Выделение из почвенных образцов и учет численности микроорганизмов различных физиологических групп проводили методом предельных разведений с последующим высевом на плотные питательные среды: мясопептонный и технический агар для учета гетеротрофных и олиготрофных микроорганизмов соответственно. Для более полного высвобождения микроорганизмов из почвенных частиц и их связей друг с другом навеску почвенного образца в течение 3 мин перемешивали магнитной мешалкой в режиме максимальной скорости. Подсчет общей численности микроорганизмов и оценку их биоразнообразия проводили каждые 5 сут. Для микроскопических наблюдений использовали световой микроскоп Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия).

Образцы почвы. В качестве модельной почвы использовали универсальный почвогрунт (ООО “Уралэкоил”, Екатеринбург, Россия) на основе верхового и низинного торфа (60%), дерновой земли (30%), песка речного (10%), извести (<1%). Согласно классификации почв по гранулометрическому составу (Н.А. Качинский) используемая модельная почва относится к легкому суглинку. Почвенная структура зернистая, размер песчаных частиц 0.05–0.25 мм. Содержание гумуса варьировало до 5–7%, общее содержание азота — 3–5%, общее содержание углерода — 10%. Количество питательных элементов составляло (мг/кг): азот — 100, фосфор — 100, калий — 140. Состав переходных элементов (по М.С. Симаковой, С.А. Санину, В.М. Фридланду, Н.И. Усову) в % на прокаленную бескарбонатную навеску: SiO_2 — 58, Al_2O_3 — 8,

Fe_2O_3 — 8, CaO — 10, MgO — 4, Na_2O — 0.9, TiO_2 — 0.4, MnO — 0.1. pH почвы составлял 5.8–6.0. Дротаверина гидрохлорид в почвенные образцы вносили из концентрированного 0.1%-ного водного раствора до конечных концентраций 0.002, 0.02 и 0.2% в объеме 5.0 мл на 50 г почвы. Влажность почвы на протяжении всего эксперимента поддерживали на уровне 25–28%.

Реагенты. Дротаверина гидрохлорид использовали в виде фармацевтической субстанции (светло-желтый кристаллический порошок без запаха, чистота — 98.5% в пересчете на сухое вещество, умеренно растворимый в воде, Ирбитский химико-фармацевтического завод, Россия).

Химические реагенты, в том числе ацетонитрил, трифторуксусная кислота, хлороводородная кислота, хлороформ, этанол имели квалификацию х. ч., ч. д. а. или ос. ч. (Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США). Для получения ультрачистой воды для высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (Millipore, США).

Модельные смеси почвы (контрольные образцы, “контроли”). В качестве “контролей” использовали: (1) модельную почву с инактивированными бактериальными клетками, содержащую ДГ в исследуемых концентрациях (для оценки абиотических факторов деструкции фармполлютанта); (2) модельную почву с аборигенной микрофлорой (для оценки физиологической активности бактериальных клеток при отсутствии фармацевтического загрязнения); (3) модельную почву, содержащую аборигенную микрофлору и ДГ в исследуемых концентрациях (для оценки физиологической активности бактериальных клеток в условиях фармацевтического загрязнения).

Пробоподготовка и хроматографическое определение дротаверина гидрохлорида в почве. Условия извлечения ДГ из почвы выбирали с учетом физико-химических свойств аналита (растворимость, показатели pK_a и $\text{Log } P$). Исследования проводили на модельных смесях почв с содержанием ДГ 0.002, 0.02 и 0.2%. Первоначально для извлечения аналита (0.2%) апробировали настаивание образца почвы в полярных растворителях при постоянном перемешивании в течение 30 мин. В качестве растворителей использовали кислоту хлороводородную 10%-ную, этанол 96%-ный и этанол 96%-ный, подкисленный хлороводородной кислотой до pH 5.

Методика. Навеску образца почвы массой 10 г с содержанием ДГ 0.002, 0.02 или 0.2% помещали в коническую колбу емк. 200 мл, прибавляли 50 мл растворителя и перемешивали на устройстве ЛАБ-ПУ-04 в течение 30 мин. Вытяжку из почвы фильтровали через шприцевой фильтр Chromafil (0.45 мкм RC-45/15) и исследовали на содержание

ДГ методом ВЭЖХ с помощью хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором (SPD-M20A) в ранее разработанных нами условиях [27]. Хроматографические данные регистрировали и обрабатывали с помощью программы LcSolution (v.1.25 rus). Разделение проводили на хроматографической колонке с обращенно-фазовым сорбентом Luna C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм, Phenomenex, США) в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы использовали смесь 0.1%-ного раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила; линейное возрастание доли ацетонитрила в элюенте с 30 до 80 об. % в течение 20 мин; скорость потока элюента — 1.2 мл/мин; температура колонки — 40°C; объем вводимой пробы — 20 мкл. Детектирование ДГ осуществляли при длине волны 246 нм, соответствующей максимуму поглощения вещества. В описанных условиях время удерживания ДГ составляло 11.5 ± 0.02 мин [27].

Математическое моделирование процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве. Для сравнительного анализа скорости процесса биодеструкции ДГ в почвенных образцах при различных вариантах экспериментов использовали кинетическое уравнение первого порядка, в котором параметр скорости k для процесса в целом представлял собой случайную величину. Вследствие ограниченного набора опытов для вероятностного анализа k применили математическую статистику в условиях малой выборки, а из-за медленного течения процесса с большим разбросом концентраций ДГ по реализациям для параметра скорости k использовали логнормальный закон распределения. В результате процесс биодеструкции ДГ в почве считали случайным и моделировали обычной функцией случайного параметра k . Для прогноза времени завершения использовали верхнюю границу доверительного интервала изменения концентрации ДГ с вероятностью 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая численность микроорганизмов в почве и оценка их биоразнообразия. По совокупности морфологических признаков в исследуемых посевах модельной почвы, не содержащей ДГ, выделили 10 вариантов колоний, образованных бактериями и грибами. Общая численность гетеротрофных микроорганизмов при этом составила 8.3×10^4 КОЕ, углеводородокисляющих — 5.0×10^4 КОЕ. Микроскопические исследования показали, что большая часть выявленных колоний гетеротрофных микроорганизмов относится к группе грамотрицательных бактерий, представленных кокками, и грамположительными палочковидными бактериями с внутриклеточными спорами. Также обнаружены две желтые пигментированные колонии грибов. Для бактериальных колоний пигмента-

Таблица 1. Эффективность извлечения дротаверина гидрохлорида полярными растворителями из модельных образцов почвы ($n = 6$)

Растворитель	Введено ДГ, %	Найдено ДГ, %
Кислота хлороводородная 10%-ная	0.2 (принято за 100)	39.96 ± 4.53
Этанол 96%-ный	0.2 (принято за 100)	87.92 ± 6.95
Этанол 96%-ный, подкисленный HCl до pH 5	0.2 (принято за 100)	79.50 ± 7.16

ция была выражена слабо. Цвет колоний варьировал от грязно-белого до кремового. Углеводородокисляющие изоляты бактерий в основном были представлены бесцветными гладкими колониями (при микрокопировании — граммотрицательные прямые или искривленные палочки с закругленными концами) и единичными розовыми шероховатыми пигментированными колониями (в культуре преобладали грамположительные кокковидные клетки с палочковидными фрагментами), предположительно относящимися к актиномицетам.

При внесении в почвенные образцы ДГ в исследуемых концентрациях общая численность микроорганизмов к концу эксперимента увеличивалась до $1.8\text{--}2.3 \times 10^6$ КОЕ с преобладанием углеводородокисляющих бактерий, в то время как разнообразие вариантов колоний уменьшалось в 2.5 раза. Пигментированные колонии грибов были выявлены в образцах на протяжении всего эксперимента.

В фармацевтически чистых почвенных образцах с дополнительным внесением родококков исходная общая численность микроорганизмов составляла 3.6×10^6 КОЕ и была представлена 13 вариантами колоний, большая часть которых имела бледно-розовый, персиковый или грязно-белый цвет. Культуры были представлены как грамположительными, так и граммотрицательными клетками. На протяжении эксперимента численность бактерий варьировала от 3.6×10^6 до 4.0×10^5 КОЕ.

При внесении ДГ в почвенные образцы, содержащие родококки, наблюдалось снижение числа КОЕ до 1.2×10^5 по истечении 20 сут с последующим восстановлением исходного значения к концу эксперимента. Значительного изменения в морфологическом разнообразии выросших колоний не наблюдалось. Вероятно, внесение родококков в почву, содержащую ДГ, позволило частично преобразовать трудно разрушимую молекулу фармполлутанта до более доступных соединений [23], которые послужили субстратом для представителей аборигенной микрофлоры.

Способ пробоподготовки почвы для хроматографического определения дротаверина гидрохлорида. Наиболее эффективное извлечение ДГ из почвенных образцов происходит с использованием 96%-ного этанола (табл. 1). Однако разбавление

почвенного образца растворителем в процессе пробоподготовки неизбежно приводит к снижению чувствительности методики хроматографического анализа, что препятствует работе с объектами, содержащими ДГ в концентрациях 0.002 и 0.02% и, соответственно, затрудняет исследование динамики изменения содержания ДГ в процессе биодеструкции.

В связи с этим разработали способ извлечения ДГ из почвы, заключающийся в первоначальном настаивании образца почвы в 96%-ном этаноле при непрерывном перемешивании с последующей экстракцией ДГ из спиртового извлечения хлороформом. Это позволило добиться концентрирования аналита и увеличить чувствительность методики определения содержания ДГ в почве. Абсолютный предел обнаружения ДГ составил 2.4×10^{-3} мкг.

Методика. Навеску образца почвы массой 10 г с содержанием ДГ 0.002, 0.02 или 0.2% помещали в коническую колбу емк. 200 мл, прибавляли 50 мл 96%-ного этанола и перемешивали на устройстве ЛАБ-ПУ-04 в течение 30 мин. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента» и переносили в делительную воронку. Фильтрат подщелачивали 10%-ным раствором аммиака до pH 9–10 для перевода аналита в молекулярную форму и дважды экстрагировали хлороформом порциями по 5 мл. Хлороформные извлечения объединяли и упаривали в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяли в 1000 мл подвижной фазы. Полученные растворы фильтровали через шприцевой фильтр Chromafil (0.45 мкм RC-45/15) и исследовали на содержание ДГ методом ВЭЖХ (табл. 2). Потери ДГ при экстракции из почвенных образцов составили от 20 до 40% в зависимости от концентрации ДГ.

Хроматографическое определение дротаверина гидрохлорида в процессе биодеструкции в почвенных образцах. При определении содержания ДГ в исследуемых образцах почвы отметили, что в абиотическом «контроле» происходит сорбция деструктируемого вещества на почвенных частицах (до 20%). Значения ДГ, полученные в дальнейших экспериментах, корректировали с учетом поправки на сорбционную активность данного вещества.

В почвенных образцах, содержащих только аборигенную микрофлору, деструкцию ДГ через 35 сут практически не наблюдали (не более 10%).

Таблица 2. Результаты хроматографического определения дротаверина гидрохлорида в модельных образцах почвы с использованием разработанной методики пробоподготовки ($n = 6$)

Введено ДГ, %	Найдено ДГ, %
0.2 (принято за 100)	78.42 ± 6.07
0.02 (принято за 100)	75.83 ± 12.62
0.002 (принято за 100)	57.80 ± 10.18

При дополнительном внесении родококков остаточное содержание ДГ к концу 35-х суток эксперимента составляло от 36 до 70% в зависимости от начальной концентрации фармполлутанта. Наиболее интенсивные процессы деструкции отмечены в почвенных образцах с содержанием ДГ 0.02%: убыль ДГ через 35 сут эксперимента составила 58–64%. При более высоких концентрациях ДГ скорость деструкции значительно снижалась. Так, в образцах, содержащих 0.2% ДГ, через 35 сут эксперимента убыль исследуемого вещества составила только 30–33%. При низкой (0.002%) концентрации фармполлутанта скорость деструкции оставалась на среднем уровне, через 35 сут эксперимента убыль ДГ составила 37%. Использование адаптированных клеток родококков увеличивало убыль ДГ до 6%. Увеличение продолжительности опытов №№ 1–3 до 61-х суток не выявило новых закономерностей данного процесса (табл. 3).

Математическое моделирование процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве. Концептуальная постановка задачи заключалась в составлении прогноза уменьшения концентрации ДГ в почве в 100 раз с вероятностью 95% на основе полученных экспериментальных данных. Как следует из табл. 3, все рассмотренные реализации процесса биодеструкции ДГ в почве протекали с постоянным уменьшением концентрации фармполлутанта со временем. Наиболее высокая скорость уменьшения концентрации ДГ наблюдалась при среднем значении начальных концентраций исследуемого вещества (0.02%). Процесс

биодеструкции ДГ в почве оказался более длительным по сравнению с метаболизмом ДГ в водной среде: продолжительность последнего составляла 10–20 сут [27]. Данный факт, очевидно, обусловлен медленным высвобождением ДГ из почвенных частиц. Тем не менее по терминологии авторов [19, 29–31] процесс биодеструкции ДГ в почве происходит по интенсивному типу, когда максимум скорости биодеструкции наблюдается в начальный период времени, а затем уменьшается. Поэтому изменение концентрации ДГ в каждой реализации во времени адекватно описывается кинетическим уравнением первого порядка

$$dx/dt = -kx \quad (1)$$

при концентрации вещества $x_0 = 100\%$ в качестве начального условия и постоянной константе скорости биодеструкции $k = \text{const}$.

В табл. 3 представлены значения константы k для реализаций процесса биодеструкции ДГ, определенные с применением метода наименьших квадратов, а также прогноз времени t_p достижения концентрации ДГ величины, равной 1% от начальной, сделанный на основании уравнения (1) по каждой реализации.

Понимая ситуацию неравномерного распределения ДГ в почве в реальных условиях как случайную, для решения поставленной задачи данную случайность исключили, принимая начальные концентрации ДГ во всех реализациях за 100%. Само же изменение концентрации данного вещества при биодеструкции в почве (табл. 3) можно представить случайным процессом, причем с необходимостью анализа в условиях малой выборки. Параметр k кинетического уравнения (1) в данном случае следует воспринимать как случайную величину.

Реализации процесса биодеструкции ДГ в почве после кинетического моделирования, соответствующие данным табл. 3, приведены на рис. 1. Представленная кинетическая модель (1) показала адекватность полученным экспериментальным данным (табл. 3). Поведение кинетических

Таблица 3. Динамика изменения содержания дротаверина гидрохлорида в процессе биодеструкции в почве (x , % от начальной концентрации)

№	Условия эксперимента	Экспозиция, сут				Константа, k , сут ⁻¹	Прогноз времени, t_p , сут
		0	19	35	61		
1	Неадаптированные родококки + ДГ 0.2%	100	80.4	70.6	53.1	0.0106	434.5
2	Адаптированные родококки + ДГ 0.2%	100	78.4	66.7	46.9	0.0123	374.4
3	Неадаптированные родококки + ДГ 0.02%	100	66.0	42.0	32.0	0.0218	211.2
4	Адаптированные родококки + ДГ 0.02%	100	64.0	36.0	—	0.0263	175.4
5	Неадаптированные родококки + ДГ 0.002%	100	66.9	63.3	—	0.0171	267.9
6	Адаптированные родококки + ДГ 0.002%	100	66.7	63.1	—	0.0172	267.7

Примечание: начальную концентрацию ДГ приняли за 100%; остаточную концентрацию ДГ не определяли.

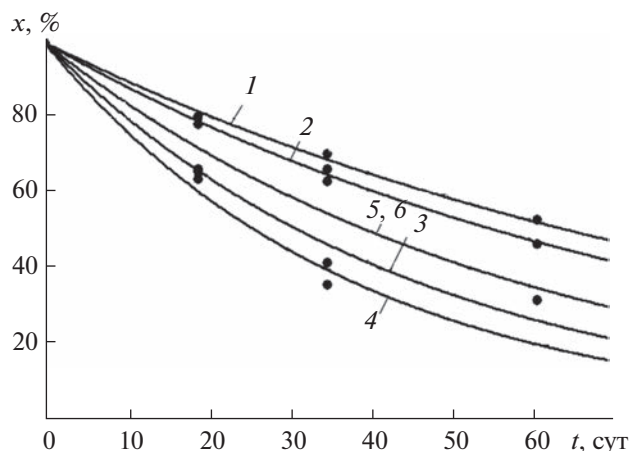


Рис. 1. Кинетические кривые реализаций процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве: 1–6 – номер эксперимента, ● – экспериментальные данные концентрации дротаверина гидрохлорида.

кривых свидетельствует о ламинарном течении случайного процесса. Разброс относительных значений концентрации ДГ в пределах наблюдения возрастает со временем, что подтверждает необходимость прогноза поведения кинетических кривых за пределами эксперимента.

Из-за ограниченного набора реализаций и соответствующих значений констант k применили математическую статистику в условиях малой выборки [33, 34], что позволило определить для случайного параметра скорости биодеструкции ДГ выборочные аналоги математического ожидания, дисперсии и среднего квадратического отклонения: $m_k = 0.0176 \text{ сут}^{-1}$; $D_k = 0.000034 \text{ сут}^{-2}$; $\sigma_k = 0.0060 \text{ сут}^{-1}$. Если применить для этих данных “правило трех сигм”, то в доверительный интервал со 100%-ной вероятностью войдут реализации с отрицательными значениями k , что приведет к некорректному применению нормального закона распределения. К тому же в работе [28] показано, что для случайного параметра кинетического уравнения биодеструкции ДГ в культуральной жидкости родококков достоверным является логнормальный закон распределения.

Случайный процесс изменения концентрации ДГ при биодеструкции в почве можно представить обычной функцией случайного параметра k вида

$$X(t) = x_0 e^{-kt}. \quad (2)$$

С целью установления закономерностей биодеструкции ДГ в почве согласно известным выражениям [28] определили основные числовые характеристики процесса: выборочные аналоги математического ожидания $m_x(t)$, дисперсии $D_x(t)$ и среднего квадратического отклонения $\sigma_x(t)$.

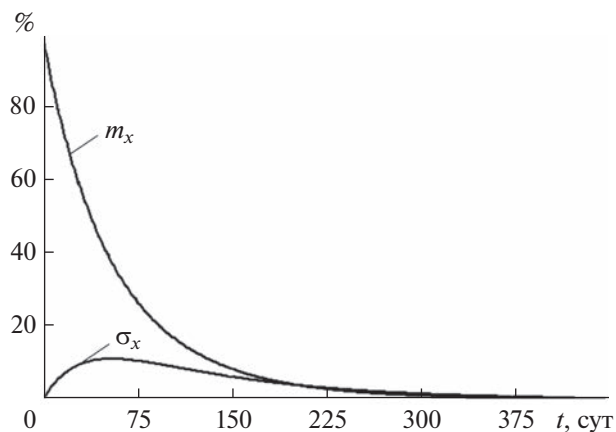


Рис. 2. Зависимость от времени выборочных аналогов процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве.

На рис. 2 представлены зависимости от времени выборочных аналогов математического ожидания $m_x(t)$ и среднего квадратического отклонения $\sigma_x(t)$. Выборочный аналог математического ожидания $m_x(t)$ в качестве среднего значения концентрации ДГ изменяется внутри разброса реализаций, что следует из сравнения с кривыми на рис. 1. Выборочный аналог среднего квадратического отклонения $\sigma_x(t)$ возрастает со временем, достигает максимального значения на 50-е сутки, сравнивается по величине с выборочным аналогом математического ожидания примерно на 200-е сутки и стремится вместе с ним к нулю после 450-х суток. В результате независимо от того, что разброс течения реализаций до 50-ти суток увеличивается, процесс биодеструкции ДГ в почве является устойчивым.

Для определения времени уменьшения концентрации ДГ в 100 раз при биодеструкции в почве с заданной вероятностью 95% использовали верхнюю границу доверительного интервала с соответствующей вероятностью. Согласно методике, представленной в работе [28], получили значения $k^- = 0.1060 \text{ сут}^{-1}$ и $k^+ = 0.0103 \text{ сут}^{-1}$, определяющие нижнюю 2 и верхнюю 1 границы доверительного интервала для процесса биодеструкции ДГ в почве с вероятностью 95% (рис. 3).

Следует отметить, что доверительный интервал для изменения относительной концентрации ДГ является несимметричным относительно выборочного аналога математического ожидания (кривая 3 на рис. 3). Время t_p достижения концентрацией ДГ значения $x_p = 1\%$ с вероятностью 95% можно определить либо графически по кривой 1 на рис. 3, либо по значениям $x = x_p$ и $k = k^+$ в уравнении (1). В результате прогноз времени уменьшения концентрации ДГ в 100 раз в процессе биодеструкции в почве с использованием адапти-

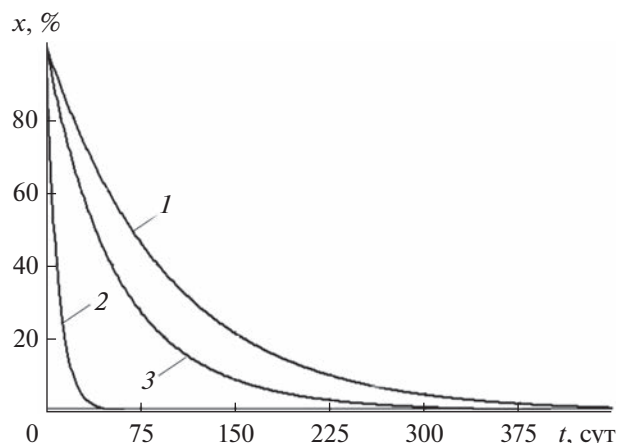


Рис. 3. Доверительный интервал для процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве с вероятностью 95%: 1 – верхняя граница; 2 – нижняя граница; 3 – выборочный аналог математического ожидания.

рованных и неадаптированных клеток родококков с вероятностью 95% составляет $t_p = 447$ сут.

* * *

Таким образом, экспериментально установлено, что актинобактерии рода *Rhodococcus* способны к биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве в условиях лабораторного микрокосма. Присутствие дротаверина приводит к снижению морфологического разнообразия почвенного консорциума, в то время как наличие в почве актинобактерий рода *Rhodococcus* способствует его сохранению. Разработан способ определения фармацевтического поллютанта в почве, основанный на жидкостно-жидкостной экстракции хлороформом с последующим анализом методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, пригодный для изучения динамики изменения содержания дротаверина в процессе биодеструкции. С использованием математического моделирования реализаций процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида в почве и стохастического анализа установлено, что с вероятностью 95% можно прогнозировать время уменьшения концентрации данного фармполлютанта в почве в 100 раз за 447 сут.

Исследования проведены в рамках Государственного задания 122010800029-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Küster A.H.A. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives // *Environ. Toxicol. Chem.* 2016. V. 35. P. 823. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
2. Тюмина Е.А., Бажутин Г.А., Картагена Гомез А.П., Ившина И.Б. Нестероидные противовоспалитель-

ные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей // *Микробиология.* 2020. Т. 89. № 2. С. 152.

Tyumina E.A., Bazhutina G.A., Cartagena Gómez A.d.P., Ivshina I.B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as emerging contaminants // *Microbiology.* 2020. V. 89. № 2. P. 148.

<https://doi.org/10.31857/S0026365620020135>

3. Wilkinson J.L., Boxall A.B.A., Kolpin D.W., Leung K.M.Y., Lai R.W.S., Galban-Malag C., Adell A.D., Mondon J., Metian M., Marchant R.A., Bouzas-Monroy A., Cuni-Sanchez A., Coors A., Carriquiriborde P., Rojo M., Gordon C., Cara M., Moermond M., Luarte T., Petrosyan V., Perikhanyan Y., Mahon C.S., McGurk C.J., Hofmann T., Kormoker T., Iniguez V., Guzman-Otazo J., Tavares J.L., de Figueiredo F.G., Razzolini M.T.P., Dougnon V., Gbaguidi G., Traore O., Blais J.M., Kimpe L.E., Wong M., Wong D., Nichantcho R., Pizarro J., Ying G.G., Chen C.E., Paez M., Martinez-Lara J., Otamanga J.P., Pote J., Ifo S.A., Wilson P., Echeverria-Saenz S., Udikovic-Kolic N., Milakovic M., Fatta-Kassinos D., Ioannou-Ttofa L., Belusova V., Vymazal J., Cardenas-Bustamante M., Kassa B.A., Garric J., Chaumot A., Gibba P., Kunchulia I., Seidensticker S., Lyberatos G., Halldorsson H.P., Melling M., Shashidhar T., Lamba M., Nastiti A., Supriatin A., Pourang N., Abedini A., Abdullah O., Gharbia S.S., Pilla F., Chefetz B., Topaz T., Yao K.M., Aubakirova B., Beisenova R., Olaka L., Mulu J.K., Chatanga P., Ntuli V., Blama N.T., Sherif S., Aris A.Z., Looi L.J., Niang M., Traore S.T., Oldenkamp R., Ogunbanwo O., Ashfaq M., Iqbal M., Abdeen Z., O'Dea A., Morales-Saldaña J.M., Custodio M., de la Cruz H., Navarrete I., Carvalho F., Gogra A.B., Koroma B.M., Cerkenik-Flajs V., Gombac M., Thwala M., Choi K., Kang H., Celestino Ladu J.L., Rico A., Amerasinghe P., Sobek A., Horlitz G., Zenker A.K., King A.C., Jiang J.J., Kariuki R., Tumbo M., Tezel U., Onay T.T., Leju J.B., Vystavna Y., Vergeles Y., Heinzen H., Perez-Parada A., Sims D.B., Figy M., Good D., Teta C. Pharmaceutical pollution of the world's rivers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119. № 8. Article e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>
4. Miettinen M., Khan S.A. Pharmaceutical pollution: A weakly regulated global environmental risk // *Rev. Eur. Comp. Int. Environ. Law.* 2022. V. 31. № 1. P. 75. <https://doi.org/10.1111/reel.12422>
5. González-Alonso S., Merino L.M., Esteban S., López de Alda M., Barceló D., Durán J.J., López-Martínez J., Aceña J., Pérez S., Mastroianni N., Silva A., Catalá M., Valcárcel Y. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region // *Environ. Pollut.* 2017. V. 229. P. 241. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.060>
6. Grabarczyk Ł., Mulkiewicz E., Stolte S., Puckowski A., Pazda M., Stepnowski P., Białk-Bielińska A. Ecotoxicity screening evaluation of selected pharmaceuticals and their transformation products towards various organisms // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020. V. 27. № 21. P. 26103. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08881-3>
7. Davey C.J.E., Kraak M.H.S., Praetorius A., ter Laak T.L., van Wezel A.P. Occurrence, hazard, and risk of psychopharmaceuticals and illicit drugs in European surface wa-

- ters // Water Res. 2022. V. 222. Article 118878. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2022.118878>
8. Ramírez-Morales D., Masís-Mora M., Beita-Sandí W., Montiel-Mora J.R., Fernández-Fernández E., Méndez-Rivera M., Arias-Mora V., Leiva-Salas A., Brenes-Alfaro L., Rodríguez-Rodríguez C.E. Pharmaceuticals in farms and surrounding surface water bodies: Hazard and ecotoxicity in a swine production area in Costa Rica // Chemosphere. 2021. V. 272. Article 129574. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129574>
 9. Alkimin G.D., Daniel D., Frankenbach S., Seródio J., Soares A.M.V.M., Barata C., Nunes B. Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba* // Sci. Total Environ. 2019. V. 657. P. 926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.002>
 10. Ivshina I., Bazhutin G., Tyumina E. *Rhodococcus* strains as a good biotool for neutralizing pharmaceutical pollutants and obtaining therapeutically valuable products: Through the past into the future // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Article 3861. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.967127>
 11. Krivoruchko A., Kuyukina M., Ivshina I. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies // Catalysts. 2019. V. 9. Article 236. <https://doi.org/10.3390/catal9030236>
 12. Liang Y., Yu H. Genetic toolkits for engineering *Rhodococcus* species with versatile applications // Biotechnol. Adv. 2021. V. 49. Article 107748. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107748>
 13. Cappelletti M., Presentato A., Piacenza E., Firrincieli A., Turner R.J., Zannoni D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. № 20. P. 8567. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10861-z>
 14. Zhao H., Tian K., Qiu Q., Wang Y., Zhang H., Ma S., Jin S., Huo H. Genome analysis of *Rhodococcus* sp. DSSKP-R-001: A highly effective β -estradiol-degrading bacterium // Int. J. Genomics. 2018. V. 2018. Article 3505428. <https://doi.org/10.1155/2018/3505428>
 15. Zhang Y., Ji J., Xu S., Wang H., Shen B., He J., Qiu J., Chen Q. Biodegradation of picolinic acid by *Rhodococcus* sp. PA18 // Appl. Sci. 2019. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.3390/app9051006>
 16. Luchnikova N.A., Grishko V.V., Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanolic acid using *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 757 // Catalysts. 2022. V. 12. № 11. Article 1352. <https://doi.org/10.3390/CATAL12111352>
 17. Rodrigues C.J.C., de Carvalho C.C.C.R. Phenotypic adaptations help *Rhodococcus erythropolis* cells during the degradation of paraffin wax // Biotechnol. J. 2019. V. 14. № 8. Article 1800598. <https://doi.org/10.1002/biot.201800598>
 18. Ivshina I.B., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Chekryshkina L.A., Mishenina I.I. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic rhodococci // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42. № 4. P. 392. <https://doi.org/10.1134/S0003683806040090>
 19. Хренков А.Н., Вихарева Е.В., Тумилович Е.Ю., Карпенко Ю.Н., Селянинов А.А., Тюмина Е.А. Хроматографический анализ ацетилсалициловой кислоты в культуральных жидкостях родококков // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Хим. 2020. Т. 61. № 5. С. 388. (Khrenkov A.N., Vikhareva E.V., Tumilovich E.Yu., Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Tyumina E.A. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2020. V. 61. № 5. P. 309.) <https://doi.org/10.3103/S0027131420050053>
 20. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. Article 9159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45732-9>
 21. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Bazhutin G.A., Vikhareva E.V. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effects of ibuprofen // PLoS One. 2021. V. 16. № 11. Article e0260032. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0260032>
 22. Bazhutin G.A., Polygalov M.A., Tyumina E.A., Tyan S.M., Ivshina I.B. Cometary bioconversion of ketoprofen by *Rhodococcus erythropolis* IEGM 746 // Science and Global Challenges of the 21st Century – Science and Technology. Perm Forum 2021 / Eds. Rocha A., Isaeva E. 2022. P. 404.
 23. Ivshina I.B., Vikhareva E.V., Richkova M.I., Mukhutdinova A.N., Karpenko J.N. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. № 10. P. 2997. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1110-6>
 24. 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* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. № 3. P. 307. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0718-1>
 25. HELCOM. BASE project 2012-2014: Pilot activity to identify sources and flow patterns of pharmaceuticals in St. Petersburg to the Baltic Sea. 2014. P. 121.
 26. Мухутдинова А.Н., Тюмина Е.А., Рычкова М.И., Вихарева Е.В. Фармацевтические соединения на основе азотсодержащих гетероциклов – новый класс загрязнителей окружающей среды. Обзор // Вестн. Перм. ун-та Сер. Биол. 2015. № 1. С. 65.
 27. Карпенко Ю.Н., Селянинов А.А., Мухутдинова А.Н., Рычкова М.И., Баранова А.А., Вихарева Е.В., Ившина И.Б. Хроматографическое определение дротаверина гидрохлорида и кинетическое моделирование процесса его биодеструкции в культуральной жидкости *R. rhodochrous* // Журн. аналит. химии. 2014. Т. 69. № 7. С. 750. (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 // J. Anal. Chem. 2014. V. 69. № 7. P. 681. <https://doi.org/10.1134/S1061934814070077> <https://doi.org/10.7868/S004445021407007X>
 28. Селянинов А.А., Осипенко М.А., Баранова А.А., Вихарева Е.В., Хренков А.Н. Числовые характеристики кинетически моделируемого простого нестационарного случайного процесса // Прикладная математика и вопросы управления. 2019. № 3. С. 65.

29. Плотников А.Н., Карпенко Ю.Н., Вихарева Е.В., Тюмина Е.А., Рычкова М.И., Селянинов А.А. Определение кодеина фосфата в культуральной жидкости родококков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Вестн. Моск. ун-та Сер. Хим. 2018. Т. 59. № 1. С. 50. (Plotnikov A.N., Karpenko Yu.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 // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2017. V. 72. № 6. P. 328.) <https://doi.org/10.3103/S0027131418010054>
30. Вихарева Е.В., Карпенко Ю.Н., Селянинов А.А., Бажутин Г.А., Тюмина Е.А. Хроматографический анализ мелоксикама и его метаболитов в процессе бактериальной деструкции // Изв. Акад. наук. сер. хим. 2022. № 11. С. 2358. (Vikhareva E.V., Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Bazhutin G.A., Tyumina E.A. Chromatographic analysis of meloxicam and metabolites of its biodegradation // Russ. Chem. Bull. 2022. V. 71. № 11. P. 2358.) <https://doi.org/10.1007/s11172-022-3663-3>
31. Вихарева Е.В., Селянинов А.А., Бажутин Г.А., Тюмина Е.А. Хроматографическое определение ибупрофена в культуральных средах родококков и кинетическое моделирование процесса его биодеструкции // Журн. аналит. химии. 2023. Т. 78. № 2. С. 187. (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 // J. Anal. Chem. 2023. V. 78. № 2. P. 241. <https://doi.org/10.1134/S1061934823010136> <https://doi.org/10.31857/S0044450223010140>
32. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. URL: <http://www.iegmc-col/strains/index.html> (дата обращения 17.04.2022).
33. Селянинов А.А., Вихарева Е.В., Ившина И.Б., Баранова А.А., Карпенко Ю.Н. Стохастический анализ повторяемости процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида // Рос. журн. биомех. 2013. Т. 17. № 1 (59). С. 41.
34. Селянинов А.А., Баранова А.А., Вихарева Е.В., Рычкова М.И. Биодеструкция дротаверина гидрохлорида как случайный нестационарный процесс // Биофарм. журн. 2017. Т. 9. № 1. С. 26.