

На правах рукописи

Тюмина Елена Александровна

**БИОДЕСТРУКЦИЯ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ
АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCUS***

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2019

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета и лаборатории алканотрофных микроорганизмов “Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук”, Пермь

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
академик РАН **Ившина Ирина Борисовна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Ефременко Елена Николаевна,

доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала АО “НПО Микроген” в г. Перми Пермское НПО “Биомед”

Несчисляев Валерий Александрович

Ведущая организация:

Институт фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет” (420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18).

Защита диссертации состоится ____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7 (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permisc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке “ИЭГМ УрО РАН” и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permisc.ru>).

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы наблюдается нарастание фундаментального интереса к изучению степени биодоступности и токсического воздействия фармполлютантов на природные микроорганизмы, играющие роль системы первичного реагирования и инициирующие адаптивные реакции. Данное исследование основывается на предположении о том, что среди микроорганизмов, участвующих в процессах самоочищения природных экосистем, важную экологическую роль в биологической детоксикации и деконтаминации почв и воды могут играть актинобактерии рода *Rhodococcus* – устойчивые обитатели загрязненных почв, водоемов, активных илов, сточных вод, обладающие высокой активностью оксидоредуктаз, богатыми адаптивными возможностями в отношении различных токсических соединений, а также высоким потенциалом для биоремедиации загрязненных объектов (Larkin *et al.*, 2006; Ivshina *et al.*, 2017; de Carvalho, 2019; Krivoruchko *et al.*, 2019). Актуальность использования метаболического потенциала родококков для биодеградации фармвеществ подтверждается всё возрастающим числом их исследований (Kim *et al.*, 2007; Evangelista *et al.*, 2008; O’Grady *et al.*, 2009; Gauthier *et al.*, 2010; Larcher, Yargeau, 2011; Maia *et al.*, 2018; Thelusmond *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2019). Ранее подтверждена способность коллекционных родококков к полной биодеструкции фармпрепаратов группы обезболивающих и спазмолитических средств, в том числе парацетамола (Ivshina *et al.*, 2006), дротаверина гидрохлорида (Ivshina *et al.*, 2012, 2015). В настоящей работе интерес представлял анализ возможного участия их в качестве биоокислителей фармпрепаратов группы полициклических нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), наиболее часто детектируемых в окружающей среде (aus der Beek *et al.*, 2016; Márta *et al.*, 2018).

Одним из таких антропогенных микрозагрязнителей является диклофенак натрия (ДН), широкодоступное и часто применяемое в мировой медицинской практике и в ветеринарии НПВС из группы производных фенилуксусной кислоты. Количественные характеристики ежегодно потребляемого ДН выражаются тысячами тонн (Асуña *et al.*, 2015).

Диапазон фактических концентраций часто детектируемого ДН в грунтовых (Sui *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017), поверхностных (в том числе морских) (Huebner *et al.*, 2015; Nebot *et al.*, 2015; Alygizakis *et al.*, 2016; UNESCO, HELCOM, 2017), сточных водах (Singh *et al.*, 2014; Vieno, Sillanpää, 2014; Dasenaki, Thomaidis, 2015; Agunbiade, Moodley, 2016; Kot-Wasik *et al.*, 2016; Rivera-Jaimes *et al.*, 2018) и даже питьевых водах (Khan, Nicell, 2015; Simazaki *et al.*, 2015) по всему миру варьирует от 0,02 нг/л до 110 мкг/л. Помимо неметаболизируемого ДН в сточных водах и речных отложениях детектированы его метаболиты (4'-гидроксидиклофенак, 5-гидроксидиклофенак и *p*-бензохинонимин 5-гидроксидиклофенака) (Gröning *et al.*, 2007; Bouju *et al.*, 2016).

Поскольку коэффициент распределения ДН в системе *n*-октанол-вода ($\log K_{ow}$) равен 4,51 (Barra Caracciolo *et al.*, 2015), липофильность этого химического вещества может способствовать его потенциальной биоаккумуляции в живых организмах и прежде всего в объектах гидробиоты. Значения индекса опасности (Hazard Quotient, HQ), рассчитанные для обнаруженного в пресной воде ДН, намного выше 1 (HQ 155,22) (González-Alonso *et al.*, 2017). Это свидетельствует о том, что данное фармацевтическое вещество представляет собой источник неблагоприятных эффектов для гидробиоты и человека (Oaks *et al.*, 2004; Асуña *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Mezzelani *et al.*, 2018; Yokota *et al.*, 2018). ДН входит в список веществ, подлежащих особому вниманию (the Watch List) в Европейском союзе, и признан фармацевтическим веществом, представляющим наибольший потенциальный риск для окружающей среды (European Commission, 2015).

Использование традиционных физико-химических технологий удаления фармацевтических загрязнителей из водных растворов экологически не безопасно, поскольку ограничено возможностью образования побочных продуктов деструкции фармполлютантов, и весьма затратно в связи с высокими эксплуатационными расходами и энергозатратами (Fischer *et al.*, 2015; Márquez Brazón *et al.*, 2016; Schröder *et al.*, 2016). Приоритет по

показателям эффективности, безопасности и экономичности признается за биотехнологическими способами конверсии этих экологических стрессоров. Однако работы по биоконверсии ДН пока немногочисленны и в основном проведены с использованием эукариотных организмов, в частности базидиомицетов (*Bjerkandera*, *Trametes*, *Phanerochaete*), зигомицетов (*Cunninghamella*) и энтомопатогенных (*Beauveria*) грибов (Domaradzka *et al.*, 2015). Мало известно о бактериальной деградации ДН, за исключением опубликованных ранее единичных примеров биотрансформации ДН Грамположительными бактериями *Actinoplanes* (Osorio-Lozada *et al.*, 2008) и *Brevibacterium* (Bessa *et al.*, 2017), а также микроорганизмами активного ила (Tiehm *et al.*, 2011; Langenhoff *et al.*, 2013). Совсем недавно I.S. Moreira с соавторами (2018) впервые сообщили о полной биоконверсии ДН альфапротеобактериальным штаммом *Labrys portucalensis* F11 в присутствии ацетата и предложили возможные метаболические пути разложения ДН. При этом существует явный недостаток информации о механизме и эффективности запускаемых защитных реакций бактериальной клетки на присутствие этого экотоксиканта.

Цель настоящей работы – оценка способности актинобактерий рода *Rhodococcus* к биодеструкции ДН и исследование механизмов запускаемых защитных реакций родококков на присутствие экотоксиканта.

Основные задачи исследования

1. Исследовать каталитическую активность родококков в отношении ДН. Отобрать штаммы – активные биодеструкторы ДН. Рассчитать параметры динамики процесса биодеструкции ДН методом математического моделирования.
2. Изучить ответные реакции родококков на воздействие ДН.
3. Определить основные продукты и возможные пути разложения ДН. Оценить степень токсичности продуктов биодеструкции ДН.

Научная новизна. С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов впервые показана способность родококков к биодеструкции ДН (50 мкг/л и 50 мг/л) в присутствии глюкозы (0,5 %) и кратковременной адаптации клеток в присутствии 5 мкг/л ДН. Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми к ДН (МПК \geq 200 мг/л) оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам родококков *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, преимущественно выделенные ранее из муниципальных сточных вод, родниковых и грунтовых вод. Изучены специфические особенности проявления токсического эффекта ДН для *R. ruber* ИЭГМ 346. Наиболее типичными реакциями родококков на воздействие ДН являются изменение дзета-потенциала бактериальных клеток; повышение степени их гидрофобности и содержания суммарных клеточных липидов; формирование многоклеточных конгломератов в жидкой среде; изменение клеточной поверхности относительно объема клеток (относительная площадь клеточной поверхности); изменение каталазной активности. Полученные данные рассматриваются в качестве механизмов адаптации родококков и, как следствие, повышения их устойчивости к токсическому воздействию фармполлютанта. Установлено, что процесс биодеструкции ДН катализируется ферментными комплексами, локализованными в цитоплазме клеток, а также мембранносвязанными ферментами. В процессах начального окисления молекулы ДН задействованы цитохром Р450-зависимые монооксигеназы. Описаны возможные пути бактериальной метаболизации ДН. Впервые получены сведения, подтверждающие разрыв связи С-N и раскрытие ароматического кольца в молекуле ДН с образованием нетоксичных конечных метаболитов. Спрогнозирована биоактивность отдельных продуктов метаболизации ДН.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные сведения расширяют представление о биодеструктурирующем потенциале актинобактерий рода *Rhodococcus* и их возможном вкладе в нейтрализацию и детоксикацию фармполлютантов. Отобран штамм *R. ruber* ИЭГМ 346, способный к полной биодеградации ДН (50 мкг/л) в течение 6 сут. Определены основные пути разложения ДН через метаболизацию первичных

гидроксилированных производных, приводящих к разрыву связи C-N в структуре ДН с образованием фенилуксусной кислоты и раскрытию хинонового цикла с образованием фумарилацетоуксусной кислоты и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной и фумаровой кислот, которые могут считаться продуктами детоксикации ДН. Штамм *R. ruber* ИЭГМ 346 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ Ас-2106. Получено Положительное решение о выдаче патента на изобретение РФ “Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия” (заявка № 2018132086/10(052377)) от 23.09.2019. Результаты исследования используются в лекционных курсах “Биоразнообразие и систематика микроорганизмов” и “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков” для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штамме-биодеструкторе ДН внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет (www.iegmcol.ru).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Актинобактерии рода *Rhodococcus* способны к использованию ДН в качестве единственного источника углерода и энергии. Наиболее выраженной (МПК ≥ 200 мг/л) устойчивостью к ДН характеризуются представители экологически значимых видов *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*. Полное разложение 50 мкг/л ДН с использованием штамма *R. ruber* ИЭГМ 346 достигается на 6 сут эксперимента в присутствии глюкозы (0,5 %) и кратковременной адаптации клеток в присутствии 5 мкг/л ДН. Кинетическое моделирование, параллельное проводимым экспериментам, позволяет определить продолжительность процесса биодеструкции ДН.

2. Воздействие ДН на родококки сопровождается образованием многоклеточных агрегатов в жидкой среде, изменением морфометрических параметров и дзета-потенциала клеточной поверхности, увеличением содержания суммарных клеточных липидов и степени гидрофобности клеточной стенки, а также изменением каталазной активности. Процесс биодеструкции ДН катализируется цитоплазматическими и мембранносвязанными ферментными комплексами. В процессах начального окисления молекулы ДН задействованы цитохром P450-зависимые монооксигеназы.

3. Биодеструкция ДН клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 сопровождается разрывом связи C-N в структуре фармполлютанта с образованием фенилуксусной кислоты и раскрытием хинонового цикла с образованием фумарилацетоуксусной кислоты и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной и фумаровой кислот, которые могут считаться продуктами детоксикации ДН.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Школе кадрового резерва российской науки и экономики “Развитие науки как средство достижения целей устойчивого развития”, Москва, 2015; II Всероссийском научном форуме “Наука будущего – наука молодых”, Казань, 2016; Региональной студенческой научной конференции “Фундаментальные исследования в биологии и экологии”, Пермь, 2015, 2017, 2018; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”, Пермь, 2016; IV Международной конференции “Микробное разнообразие: ресурсный потенциал (ICOMID)”, Москва, 2016; 7th Congress of European Microbiologists “FEMS–2017”, Valencia, Spain, 2017; II Международной (XV Региональной) научной конференции “Техногенные системы и экологический риск”, Обнинск, 2018; 2nd International Conference „Smart Bio“, Kaunas, Lithuania, 2018; II Международной научно-практической конференции “Высокие технологии, определяющие качество жизни”, Пермь, 2018; XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием “Симбиоз–Россия 2019”, Пермь, 2019; 8th Congress of European Microbiologists “FEMS–2019”, Glasgow, UK, 2019.

По теме диссертации опубликованы 12 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, входящих в международные системы научного цитирования Web of Science и Scopus

(Scientific Reports, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, Microbiology Australia).

Объем и структура научно-квалификационной работы. Работа изложена на 182 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц и 43 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 355 наименований работ, в том числе 29 отечественных и 326 зарубежных авторов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Работа выполнена в соответствии с планами НИР кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета и “Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН”, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций (2016, 2017) и Госзаданий 01201353246, 01201353247, 6.1194.2014/К, 6.3330.2017/ПЧ Минобрнауки РФ, Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект 15-12-4-10, 18-4-8-21), гранта Российского научного фонда (проект 18-14-00140), и поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-44-590567), а также стипендиальными программами Неправительственного экологического фонда имени В.И. Вернадского (2015, 2016) и благотворительного фонда “Норпексаль Фонд” (2019). Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора. Исследования с использованием системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования проводили на базе кабинета микроскопии *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочая коллекция бактериальных культур. В работе использовали 104 штамма родококков из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекций культур, www.iegmc.ru; реестровый номер Уникальной научной установки www.ckprf.ru/usu/73559). Культуры принадлежали к десяти видам *Rhodococcus*: *R. cercidiphylli* (1 штамм), *R. corynebacterioides* (2 штамма), *R. erythropolis* (41 штамм), *R. jostii* (3 штамма), *R. koreensis* (1 штамм), *R. pyridinivorans* (2 штамма), *R. qingshengii* (4 штамма), *R. rhodochrous* (8 штаммов), *R. ruber* (41 штамм), *R. wratislaviensis* (1 штамм). Выбор штаммов обоснован географией и источником выделения, а также известной каталитической активностью родококков по отношению к сложным органическим соединениям.

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) ДН в отношении родококков проводили стандартным методом двукратных серийных разведений (Performance Standards..., 2017).

Условия культивирования актинобактерий. В экспериментах по биодеструкции ДН применяли минеральную среду RS (www.iegmc.ru/strains). При выборе исходной концентрации (50 мг/л и 50 мкг/л) ДН исходили из фактической концентрации ДН, детектируемой в водных и почвенных средах. Клетки, предварительно выращенные в течение 2-х сут в мясопептонном бульоне (Sigma-Aldrich, США) и отмытые дважды фосфатным буфером (рН 7,0), вносили в среду культивирования до конечной концентрации $3,8 \times 10^7$ кл/мл. В отдельных экспериментах родококки предварительно выращивали в присутствии низкой (5 мкг/л) концентрации ДН. Для оценки содержания хлоридов в среде культивирования клетки выращивали в бесхлорной среде RS. В качестве дополнительного источника углерода использовали D-глюкозу (0,5 %). Процесс биодеструкции проводили при температуре 28 °С. Во избежание фотоиницированного окисления ДН содержимое колб защищали от действия света с помощью светонепроницаемого материала. В качестве контролей использовали (1) стерильный раствор ДН в минеральной среде (для оценки

абиотической деструкции фармвещества); (2) стерильный раствор ДН в минеральной среде с инактивированными клетками родококков (для оценки степени адсорбции ДН на бактериальных клетках); (3) минеральную среду, содержащую глюкозу с бактериальными клетками, без лекарственного вещества (контроль для разграничения метаболитов, появляющихся в результате разложения ДН). В экспериментах по исследованию влияния ингибиторов оксигеназ на деградирующую активность родококков использовали специфические ингибиторы цитохром Р450-зависимых монооксигеназ (1-аминобензотриазол, амиодарона гидрохлорид, имидазол, кетоконазол, проадифен), которые вносили в среду до конечной концентрации 5 мМ (Marco-Urrea *et al.*, 2010).

Иммобилизация бактериальных клеток. В качестве носителей использовали адсорбент на основе гидрофобизованных (Podorozhko *et al.*, 2008) древесных пород из отходов деревообрабатывающей промышленности; полипропиленовые диски (“Wuhu Ecotech Trade Co”, Китай) и макропористый гетерофазный криогель на основе поливинилового спирта (ОАО “Невинномысский азот”, Россия).

Получение отдельных фракций актинобактериальных клеток осуществляли по (Tarasova *et al.*, 2017). В работе использовали супернатант с цитоплазматическими ферментами, супернатант с экстрагированными мембранносвязанными ферментами и ресуспендированный соникат с неэкстрагируемыми ферментами.

Микроскопические исследования. Фотодокументирование изображений бактериальных клеток, полученных с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста, а также измерение размеров клеточных агрегатов осуществляли с помощью фотокамеры PRO-150ES (Pixera, США) и компьютерной программы ВидеоТест, Размер 5.0 (Аконд, Россия). Для исследования бактериальных клеток с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (Asylum Research, США), клеточную суспензию (15–20 мкл) окрашивали флуоресцентным красителем LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе со скоростью 0,2 Гц с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и константой жесткости 0,5–4,4 Н/м и радиусом кривизны зонда 9 нм. Измеряли среднеквадратичную шероховатость клеточной поверхности, длину, ширину клеток. Объем и площадь поверхности клеток рассчитывали по формулам (Neumann *et al.*, 2005).

Жизнеспособность бактериальных клеток определяли микрометодом точечных высевов (Веслополова, 1995) и специфическим окрашиванием бактерий йодонитротетразолия хлоридом (Sigma-Aldrich, США) (Kuyukina *et al.*, 2006).

Определение дыхательной активности актинобактерий проводили с использованием высокочувствительного 6-канального респирометра Micro-Oxymax[®] (Columbus Instruments, США). Параметры респираторной активности (количество (мкл), скорость (мкл/мин) потребляемого O₂) регистрировали автоматически каждые 42 мин.

Измерение электрокинетического потенциала бактериальных клеток проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZetaSizer, v. 2.2. Отобранные в процессе биодеструкции ДН бактериальные клетки дважды отмывали и ресуспендировали в 10 мМ KNO₃ (рН 7,0) до достижения оптической плотности ОП₆₀₀ 0,2.

Определение гидрофобных свойств родококков осуществляли с использованием метода Salt Aggregation Test (Lindahl *et al.*, 1981). Оценку степени гидрофобности бактериальных клеток проводили по шкале, описанной в работе (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999).

Определение общего содержания липидов. Количество общих липидов определяли гравиметрически, выражая количество в процентах от сухой массы клеток.

Измерение каталазной активности родококков проводили по методике, описанной в работе (Gogleva *et al.*, 2012).

Содержание глюкозы в среде культивирования определяли глюкозооксидазным методом с использованием набора реагентов “Фотоглюкоза” (Импакт, Россия). Измерения проводили с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 500 нм.

Содержание хлоридов в среде культивирования определяли тиоцианатным методом с использованием набора реагентов “Хлориды ДДС” (Диакон-ДС, Россия) с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 480 нм.

Анализ ДН проводили методом ВЭЖХ с помощью хроматографа LC Prominence (Shimadzu, Япония), оборудованного колонкой с обращенно-фазовым сорбентом Phenomenex Jupiter® 5u C₁₈ 300 A, 250 × 4,60 mm 5 micron (Phenomenex, США) и диодноматричным детектором. Подвижная фаза: фосфатный буферный раствор (рН 3,5) – ацетонитрил в соотношении 60:40. Режим элюирования изократический, скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин, длина волны детектирования – 273 нм; объем вводимой пробы – 20 мкл; температура термостата колонки – 40 °С. Время удерживания ДН 18,70±0,02 мин. Подготовку проб для данного анализа осуществляли посредством их центрифугирования в течение 5 мин при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр (Whatman, Великобритания) с диаметром пор 0,20 мкм.

Состав продуктов разложения ДН анализировали на базе Центра коллективного пользования “ИЭГМ УрО РАН” методом ГХ-МС на хроматографе Agilent 6890-5973N (Agilent Technologies, США), оборудованном капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм и работавшем в режиме ионизации электронным ударом при 70 эВ. В качестве газа-носителя использовали гелий (1 мл/мин). Температура инжектора и интерфейса составляла 260 и 290 °С, соответственно. Температура колонки программировалась от 130 до 300 °С с повышением температуры со скоростью 10 °С/мин. Ввод хлороформного экстракта в количестве 1 мкл осуществляли без деления потока газа-носителя. Масс-спектрометр работал в режиме снятия масс-спектров в диапазоне от 40 до 500 m/z. Полученные масс-спектры сравнивали с масс-спектрами библиотеки NIST 98 Mass Spectral Library with Windows Search Program (Version 1,7). Масс-спектры считали идентифицированными при совпадении масс-спектров исследуемого вещества с библиотечными с коэффициентом подобия, превышающим 90 %. Для выделения ДН и его возможных метаболитов среду ферментации подкисляли 10 % водным раствором HCl до рН 2,0 и трижды экстрагировали эквивалентным объемом хлороформа. Объединенные экстракты сушили над Na₂SO₄, растворитель удаляли на ротаторном испарителе (Heidolph, Германия). Расшифровку хроматограмм и масс-спектров продуктов биодеструкции ДН проводили на базе кафедры аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии (зав. кафедрой – д.фарм.н., проф. Вихарева Е.В.).

Идентификацию фенилуксусной и фумаровой кислот методом ТСХ проводили в системе бензол – 95 % этанол – ледяная уксусная кислота (45:8:4) с использованием пластин Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ (Россия). ИК-спектры сухих остатков, полученных после выпаривания смеси продуктов биодеструкции ДФС, сняты в таблетках KBr на ИК-спектрофотометре SPECORD M-80 (Carl Zeiss Jena, Германия).

Фитотоксичность ДН и его метаболитов в отношении овса посевного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). Токсичной концентрацией вещества считали таковую, вызывающую угнетение морфометрических (длина корней) параметров растений на ≥ 20 %.

Математическое моделирование процесса биодеструкции ДН. В анализе экспериментальных данных использовали метод наименьших квадратов и данные о динамике процесса биодеструкции ДН клетками *R. ruber* ИЭГМ 346. Кинетическое моделирование проводили на базе кафедры вычислительной математики, механики и биомеханики Пермского национального политехнического университета (зав. кафедрой – д.т.н., профессор Столбов В.Ю.).

In silico анализ биоактивности метаболитов ДН проводили с использованием компьютерной программы PASS online (Prediction of Activity Spectra of Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). В качестве выходной информации применяется список прогнозируемых видов активности с оценками вероятности наличия каждого вида активности P_a и вероятности его отсутствия P_i , которые могут принимать значения в диапазоне от нуля до единицы. Наибольшая вероятность обнаружения активности в программе принималась за 1. Список биологических спектров метаболитов ДН ограничивали теми видами активности, для которых $P_a > 0,7$.

Экотоксичность ДН и его метаболитов рассчитывали с помощью компьютеризированной системы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationships), доступной в программном пакете EPI Suite TM (The Estimation Programs Interface, EPA, США). Программа ECOSAR подсчитывает острую и хроническую токсичность химических веществ в отношении водных и наземных организмов с учетом структурно-функциональной взаимосвязи в молекулах.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трех- и десятикратной повторности, математическую обработку результатов – с использованием программы Statistica 13 (StatSoft, 2018). Достоверность различий между средними величинами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для решения отдельных задач использовали кластерный анализ данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение устойчивости родококков к ДН. Подавляющее большинство исследованных коллекционных культур сохраняли жизнеспособность в присутствии ДН в диапазоне концентраций от 50 до 100 мг/л. Дендрограмма на рисунке 1 иллюстрирует распределение исследованных бактериальных штаммов по кластерам в зависимости от МПК ДН. Устойчивыми к относительно высоким (МПК ≥ 200 мг/л) концентрациям ДН оказалось сравнительно небольшое (18) число штаммов (рисунок 1). Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам родококков *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, преимущественно выделенные ранее из муниципальных сточных вод (*R. erythropolis* ИЭГМ 211, ИЭГМ 213, ИЭГМ 250, ИЭГМ 712; *R. ruber* ИЭГМ 343, ИЭГМ 346), родниковых вод (*R. erythropolis* ИЭГМ 199, ИЭГМ 201; *R. ruber* ИЭГМ 231, ИЭГМ 237) и грунтовых вод (*R. ruber* ИЭГМ 341, ИЭГМ 342, ИЭГМ 369) (<http://www.iegmcoll.ru/strains/index.html>).

В водных экосистемах, как правило, обнаруживается смесь фармпрепаратов разных терапевтических групп, в том числе НПВС (Dasenaki, Thomaidis, 2015). При исследовании ДН в смеси с ибупрофеном и мелоксикамом установлено, что коктейль этих веществ даже в более низких концентрациях оказывает более выраженное подавляющее действие на клетки *R. ruber* ИЭГМ 346, чем эти отдельные соединения. МПК ДН составляла 200 мг/л, а в смеси с ибупрофеном и мелоксикамом данный показатель снижался в 8 раз – до 25 мг/л (таблица 1).

Таблица 1 – Минимальные подавляющие концентрации (МПК) отдельных НПВС и их смесей

| Штамм | МПК, мг/л | | | | | |
|--------------------------|------------|-----|------------|----------------|----------|----------|
| | ДН | ИБП | МЛК | ДН + ИБП + МЛК | ДН + ИБП | ДН + МЛК |
| <i>R. ruber</i> ИЭГМ 346 | ≥ 200 | 500 | ≥ 300 | 25 | 50 | 100 |

Примечание. ДН – диклофенак, ИБП – ибупрофен, МЛК – мелоксикам.

Для исследований ДН как фактора изменения метаболизма у родококков был выбран штамм *R. ruber* ИЭГМ 346 (GenBank KF155234), характеризующийся выраженной эмульгирующей и биодеструктивной способностью в отношении *n*-алканов, устойчивостью к Cu^{2+} , Mo^{6+} , Pb^{2+} (5,0 мМ), а также стабильной активностью в условиях экстремальной кислотности (рН 2–6) и засоленности (2–6 % NaCl) среды.

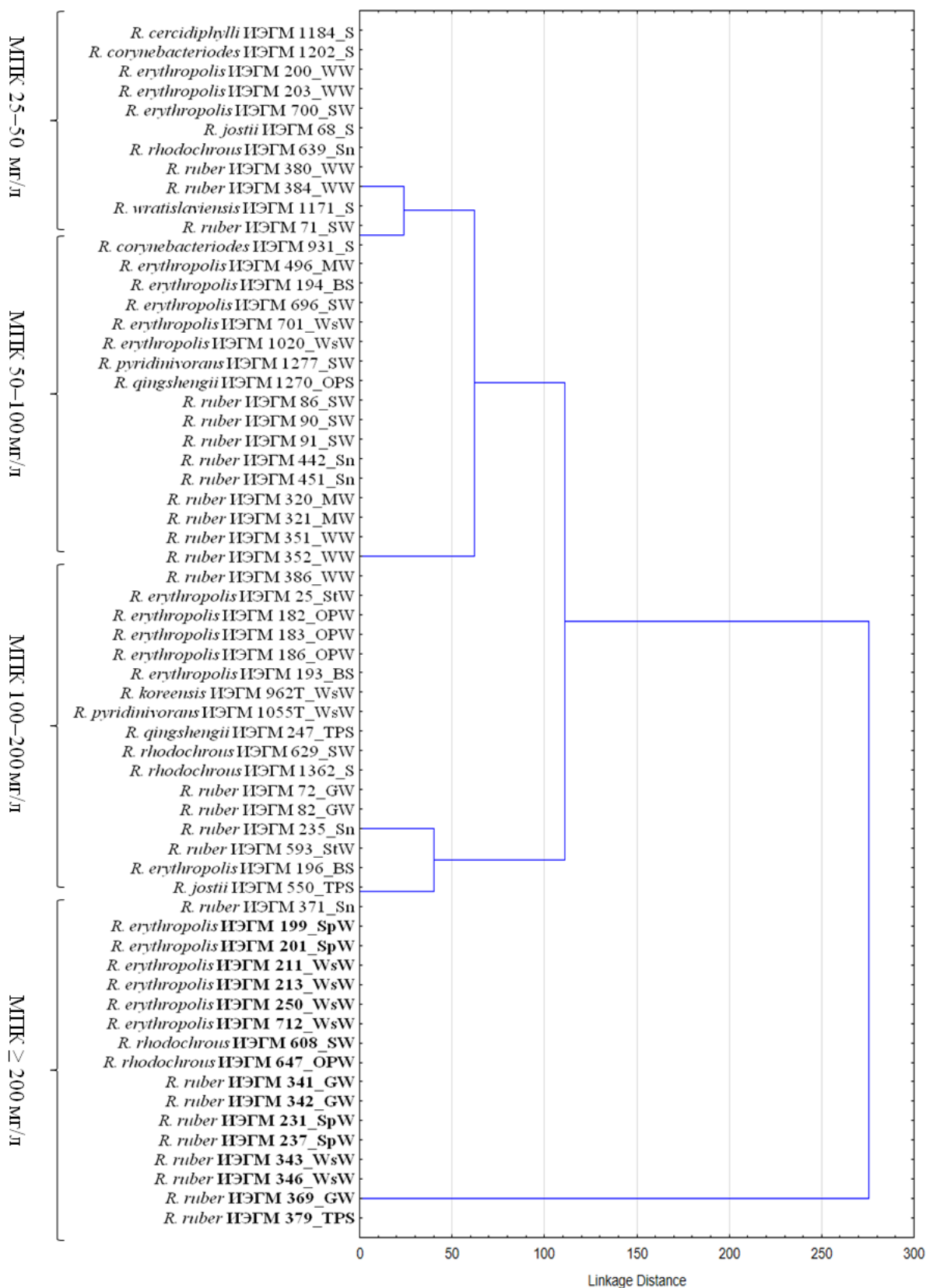
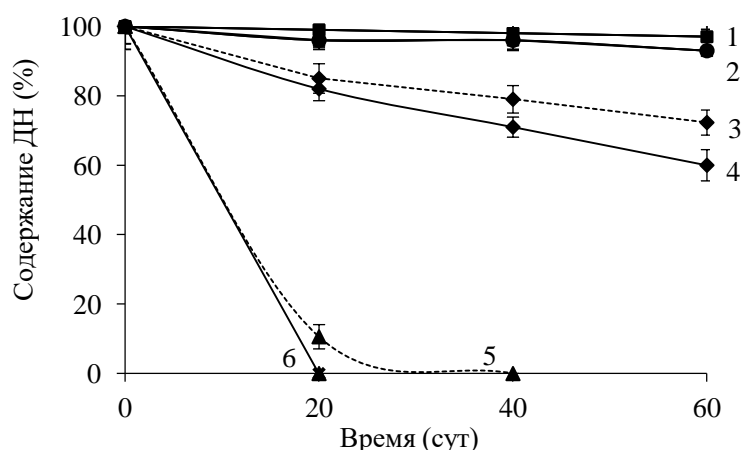


Рисунок 1 – Дендрогамма, иллюстрирующая устойчивость к ДН родококков, выделенных из различных экологических систем. BS – донные отложения, GW – подземная вода, MW – минеральная вода, OPS – нефтезагрязненная почва, OPW – нефтезагрязненная вода, S – почва, Sn – снег, SW – поверхностная вода, SpW – родниковая вода, StW – пластовая вода, TPS – техногенно загрязненная почва, WW – колодезная вода, WsW – сточная вода.

Биодеструкция ДН. Родококки способны использовать ДН в качестве единственного источника углерода, однако процесс биодеструкции его протекал крайне медленно (рисунок 2). Остаточное содержание ДН в высокой (50 мг/л) концентрации на 60 сут эксперимента составляло еще более 70 %, что свидетельствовало о высокой химической устойчивости молекулы исходного экотоксиканта. Полное разложение ДН в низкой (50 мкг/л) концентрации регистрировали на 30 сут. В контроле абиотической деструкции исходная концентрация ДН варьировала в пределах от 2 до 5 %. В контрольном варианте с инактивированными клетками зафиксировано незначительное (до 7 %) снижение исходной концентрации ДН, что свидетельствовало о частичной сорбции вещества на поверхности бактериальных клеток.



Для повышения деградирующей способности родококков использовали прединкубацию клеток в присутствии низкой (5 мкг/л) концентрации ДН; введение в инкубационную среду глюкозы в качестве дополнительного энергетического субстрата (Marchlewicz *et al.*, 2017); иммобилизацию клеток на разных носителях (Ivshina *et al.*, 2012).

Как видно из рисунка 2, прединкубация родококков ускоряла процесс биодеструкции ДН: при использовании низкой (50 мкг/л) концентрации ДН на 20 сут эксперимента наблюдалась его полная деструкция, тогда как в случае высокой концентрации (50 мг/л) ДН остаточное содержание его на 60 сут эксперимента составляло еще 60,1 %.

Как видно рисунка 3, в условиях внесения глюкозы остаточное содержание ДН в постферментационной культуральной среде на 60 сут сохранялось еще на уровне 50 %.

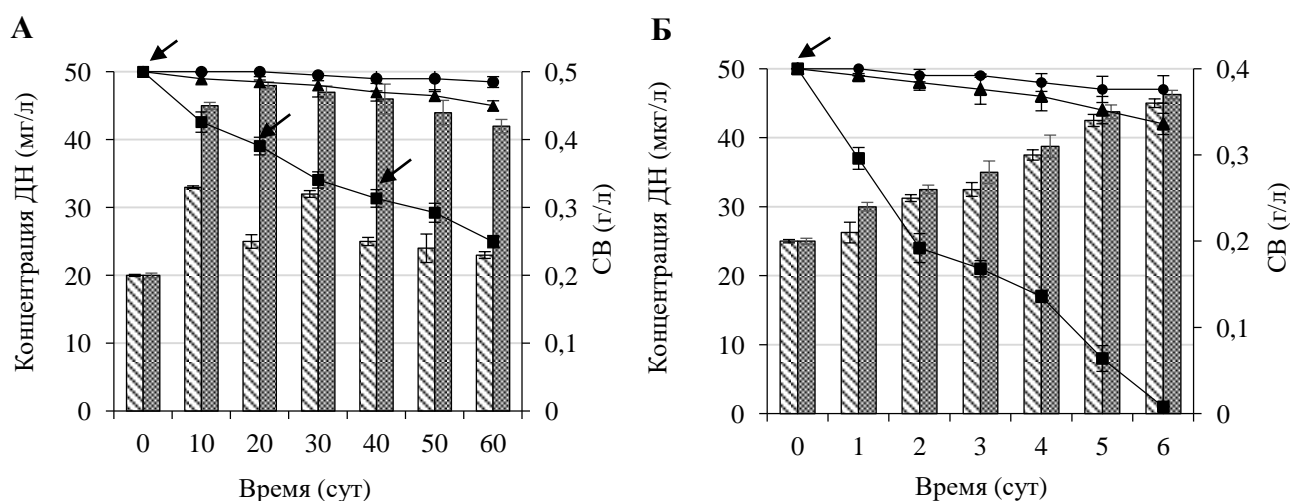


Рисунок 3 – Динамика биодеструкции 50 мг/л (А) и 50 мкг/л (Б) ДН прединкубированными клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 (■) в присутствии глюкозы. (●) контроль абиотической деструкции, (▲) контроль биосорбции, (▨) сухой вес биомассы родококков в присутствии ДН и глюкозы, (▩) сухой вес биомассы родококков в присутствии глюкозы. Стрелками обозначено дробное внесение глюкозы.

Средняя скорость биодegradации ДН на протяжении эксперимента составляла 0,4 мг/сут. Максимальные (0,7 мг/сут) показатели скорости биодegradации наблюдались в первые 10 сут эксперимента. Максимальная удельная скорость дegradации ДН (мг ДН/мг СВ/сут) составляла 0,02 сут⁻¹. На 10 сут регистрировалось увеличение роста родококков и постепенное снижение концентрации ДН при условии дробного внесения глюкозы в качестве легко деструктируемого источника углерода.

Другая картина наблюдалась в случае использования ДН в низкой концентрации. При этом значительную убыль ДН регистрировали в первые 2 сут (рисунок 3Б). Средняя скорость биодеструкции составляла 8,3 мкг/сут. Максимальная удельная скорость дegradации ДН составляла 0,0005 сут⁻¹. На фоне достижения максимальной (13 мкг/сут) скорости биодegradации ДН происходил постепенный стабильный прирост клеточной биомассы. На 5-е сут увеличение численности родококков сопровождалось значительной убылью ДН, полное разложение которого достигалось на 6 сут эксперимента.

Полученные данные подтверждены результатами определения дыхательной активности родококков (рисунок 4). Рассчитанные средние показатели (18,9 мкл/мин) скорости потребления O₂ родококками в процессе биодеструкции ДН в 1,5 раза превалировали таковые показатели (12,6 мкл/мин) в контроле (рисунок 4А).

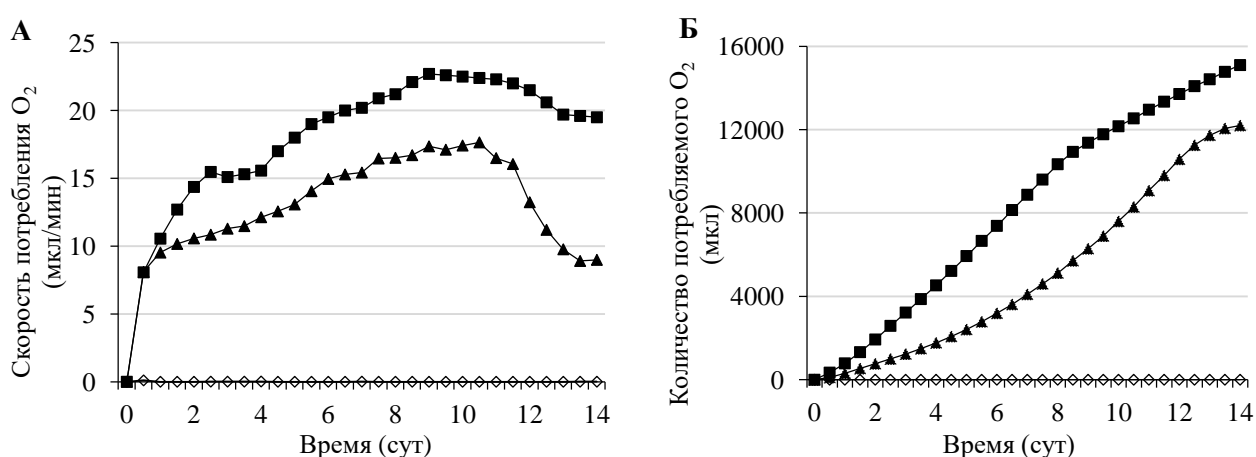


Рисунок 4 – Респираторная активность *R. ruber* ИЭГМ 346 в процессе биодеструкции 50 мг/л ДН. А – скорость потребления кислорода, Б – количество потребляемого кислорода. (■) в присутствии ДН и глюкозы, (▲) биотический контроль в присутствии глюкозы, (◇) контроль абиотической деструкции.

Максимальные значения (22,7 мкл/мин) скорости потребления O₂ клетками в присутствии ДН регистрировались на 10 сут эксперимента. После 10 сут в контрольном варианте фиксировалось значительное снижение скорости поглощения O₂, в то время как в присутствии ДН отмечался лишь небольшой спад. В процессе биодеструкции ДН через 14 сут эксперимента клетки поглощали 15930 мкл O₂, тогда как в присутствии только глюкозы бактерии потребляли 12095 мкл O₂ (рисунок 4Б).

Как видно из рисунка 5, иммобилизованные на твердых носителях и в криогель клетки сохраняли способность к биодеструкции ДН. Однако ни один из использованных приемов иммобилизации актинобактерий не привел к существенному ускорению биоразложения ДН.

Сведения, полученные в экспериментах по биодеструкции ДН, были использованы для математического прогноза продолжительности этого процесса. По нашим данным, процесс биодеструкции ДН идет по интенсивному типу, поскольку максимум скорости биодеструкции наблюдается в начальный период времени. Поэтому в качестве математической модели изменения концентрации ДН во времени можно использовать классическое кинетическое уравнение первого порядка $dx / dt = - kx$ при концентрации вещества $x_0 = 100 \%$ в качестве начального условия и при постоянной величине параметра скорости биодеструкции $k = \text{const}$.

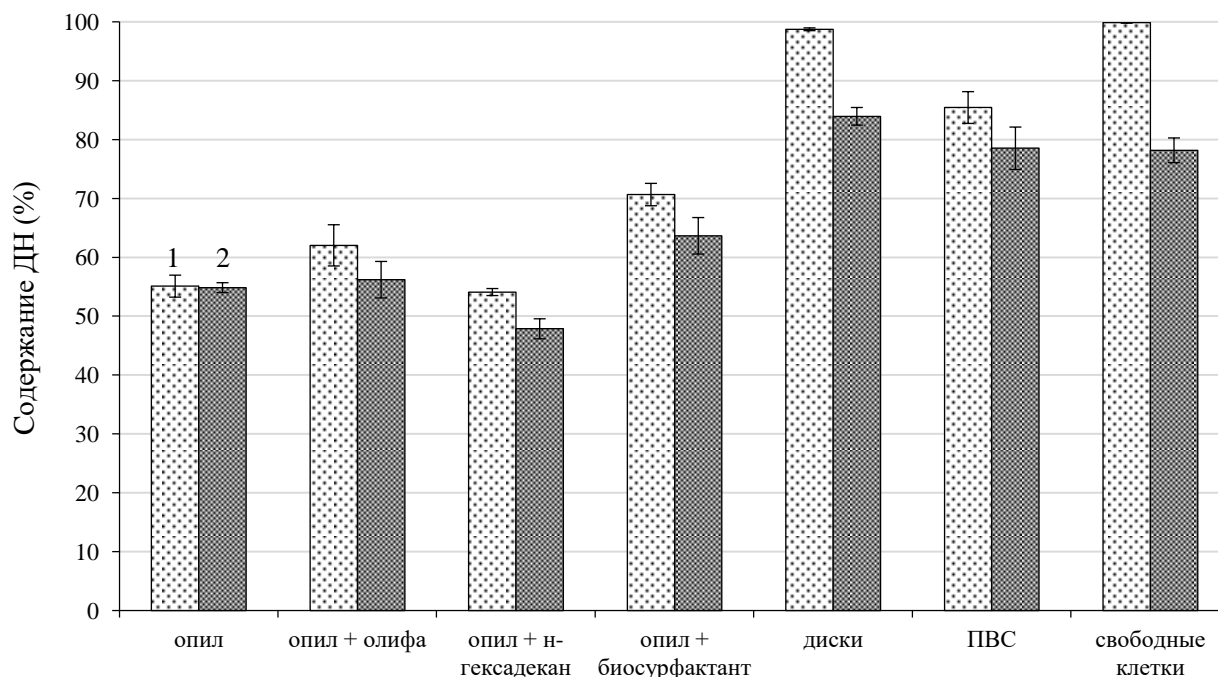


Рисунок 5 – Биодеструкция 50 мг/л ДН клетками свободными и иммобилизованными клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 (2). 1 – контроль абиотической деструкции. Приведены данные после 20 сут эксперимента.

Для прогноза времени уменьшения в 100 раз концентрации 50 мг/л ДН с заданной вероятностью 95 % использовали верхнюю границу доверительного интервала изменения его концентрации с соответствующей вероятностью. Согласно методике (Селянинов и др. 2013, 2016), найдены значения k^- и k^+ , определяющие нижнюю 2 и верхнюю 1 границы доверительного интервала. Для логнормального закона распределения получили значения $k^- = 0,0390 \text{ сут}^{-1}$ и $k^+ = 0,0088 \text{ сут}^{-1}$, для нормального – $k^- = 0,0260 \text{ сут}^{-1}$ и $k^+ = 0,0082 \text{ сут}^{-1}$. Близкие значения параметра k^+ для верхней границы при использовании логнормального и нормального законов распределения позволяют заранее предположить незначительное различие в прогнозах времени уменьшения в 100 раз концентрации ДН с заданной вероятностью (рисунок 6). Для определения времени уменьшения концентрации в определенное число раз на оси ординат откладывали соответствующее значение концентрации ДН (%) и по кривой 1 на рисунке 6 определяли прогноз времени. Прогноз времени уменьшения концентрации ДН в процессе бактериальной деструкции в 100 раз с вероятностью 95 % с применением логнормального закона распределения параметра математической модели составляет 526 сут, а с нормальным – 562 сут. Разница составила 6,4 %, что означает правомерность применения обоих законов распределения для данного процесса.

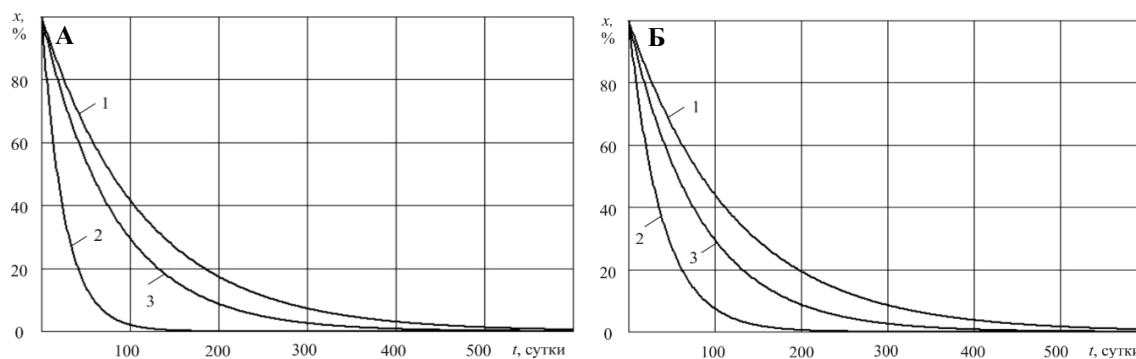


Рисунок 6 – Доверительный интервал для изменения концентрации ДН (50 мг/л) с вероятностью 95 % при логнормальном (А) и нормальном (Б) законах распределения. 1 – верхняя граница; 2 – нижняя граница; 3 – выборочный аналог математического ожидания.

Адаптивные реакции родококков на воздействие ДН. Наиболее типичной реакцией родококков в ответ на действие ДН оказалось формирование обособленных многоклеточных агрегатов разного размера и неправильной формы (рисунок 7В,Г). “Кооперативная клеточная система”, по-видимому, обеспечивает согласованное функционирование многочисленных ассоциированных клеток, позволяет популяции адаптироваться и расти в жестких условиях, при которых отдельные клетки не способны к размножению и биодеструкции ДН.

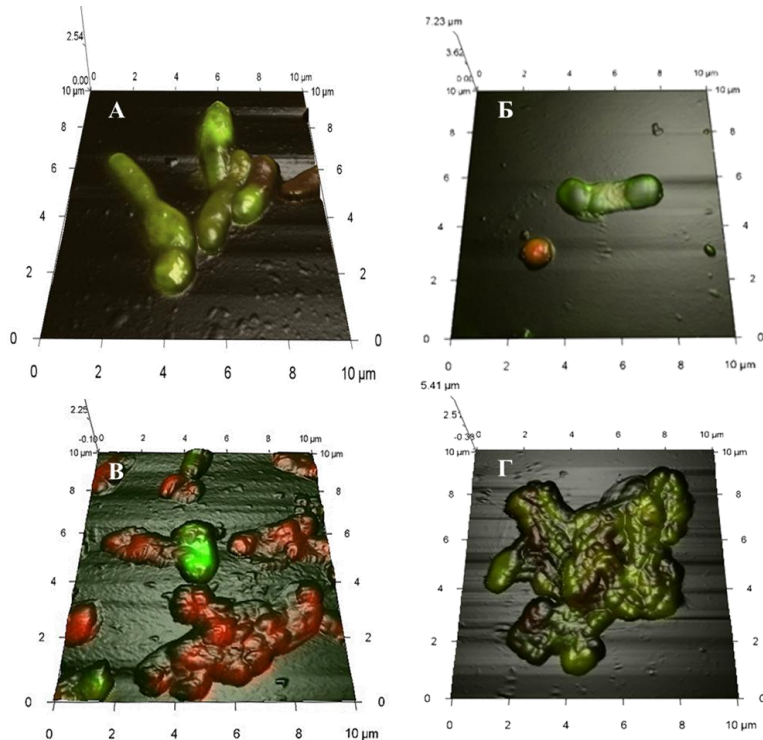


Рисунок 7 – Совмещенные 3D АСМ/КЛСМ-изображения *R. ruber* ИЭГМ 346. Клетки, выращивали в минеральной среде в присутствии глюкозы (А); в присутствии 50 мкг/л ДН и глюкозы (Б,Г); в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы (В) в течение 10 сут. Поврежденные клетки отмечены красным свечением.

В присутствии высоких концентраций ДН на 10 сут экспериментов отмечалась более объемная агрегация клеток, максимальный уровень искажения их морфологической структуры: от изменения формы до укрупнения средних размеров клеток (рисунок 7В), а также изменение площади клеточной поверхности по сравнению с контрольными показателями (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительные морфометрические характеристики клеток *R. ruber* ИЭГМ 346, выращенных в минеральной среде в присутствии глюкозы (контроль) и ДН

| Условия | Длина, мкм | Ширина, мкм | Объем (V), мкм ³ | Площадь (S), мкм ² | Относительная площадь (S/V), мкм ⁻¹ | Шероховатость, нм |
|-----------------------|------------|-------------|-----------------------------|-------------------------------|--|-------------------|
| Контроль | 3,0±0,02 | 0,9±0,05 | 1,9±0,03 | 5,5±0,05 | 2,9±0,02 | 197,8±2,30 |
| 50 мг/л ДН + глюкоза | 3,5±0,13 | 1,1±0,02 | 3,3±0,05 | 7,9±0,10 | 2,4±0,08 | 216,1±5,51 |
| 50 мкг/л ДН + глюкоза | 2,2±0,05 | 0,8±0,01 | 1,0±0,02 | 3,6±0,03 | 3,6±0,02 | 249,6±6,64 |

Примечание. Родококки выращивали в течение 10 сут.

У одиночных клеток нередко отмечалось повреждение целостности пептидогликанового слоя, сопровождающееся выходом компонентов цитоплазмы во внешнюю среду, и накопление в образце мертвых клеток (рисунок 8Б). Деструктивное действие ДН на морфологическом уровне для *R. ruber* ИЭГМ 346 проявлялось в достоверном ($p < 0,001$) уменьшении относительной площади (S/V) бактериальных клеток. Уменьшение поверхности относительно объема клеток, по-видимому, играет важную роль в

“противостоянии” бактерий токсическому воздействию загрязнителя за счет уменьшения открытой поверхности клеток для контакта с экострессором (Neumann *et al.*, 2005). Полученные результаты косвенно подтверждают токсичное влияние ДН в отношении родококков.

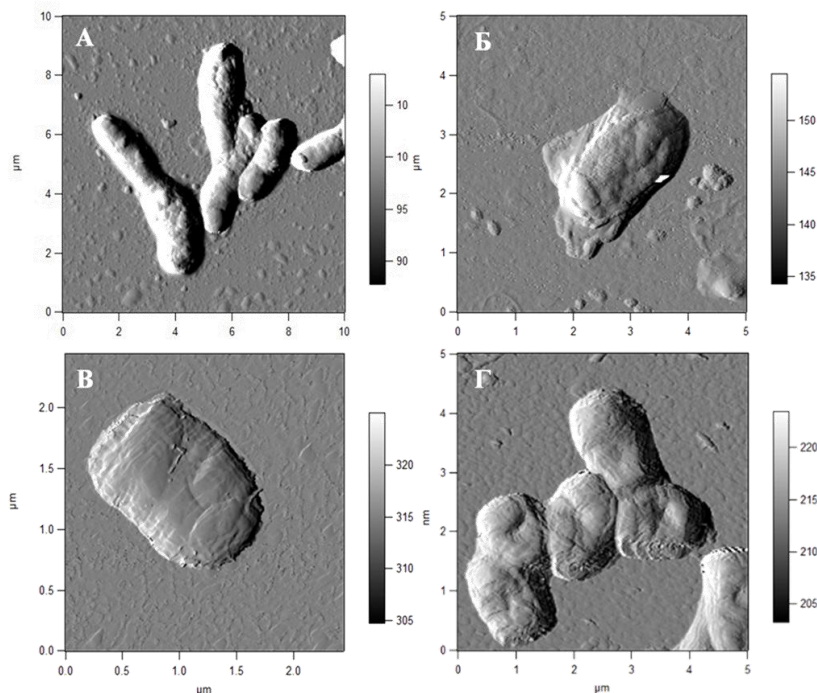


Рисунок 8 – АСМ-изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 346. Клетки, выращивали в минеральной среде в присутствии глюкозы (А); в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы (Б); в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы (В,Г) в течение 10 сут.

При воздействии более низких (50 мкг/л) концентраций ДН показатели S/V бактериальных клеток свидетельствовали об обратном: в условиях дефицита по углероду увеличивалась площадь контакта родококков с ДН для лучшего его поглощения и потребления. При этом наблюдалось значительное (> 60 %) увеличение степени шероховатости их клеточной поверхности (таблица 2). В условиях низких концентраций ДН увеличивается число разнородных по морфологическим признакам клеток: клетки уменьшаются, некоторые очень значительно, приобретают более овальную, нередко сильно раздутую или бобовоподобную форму с выпуклыми краями (рисунок 7Б). Большинство клеток со структурными неровностями (рисунок 8Г).

Результатом взаимодействия ДН и родококков является изменение их физико-химических характеристик, в том числе величины дзета-потенциала (ζ -потенциал), отражающего количественно электроповерхностные свойства клетки (рисунок 9). Культивирование клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 в течение первых 10 сут в данных условиях приводило к смещению значения ζ -потенциала с $-35,27 \pm 2,33$ (контроль) до $-31,32 \pm 0,83$ мВ ($p < 0,05$).

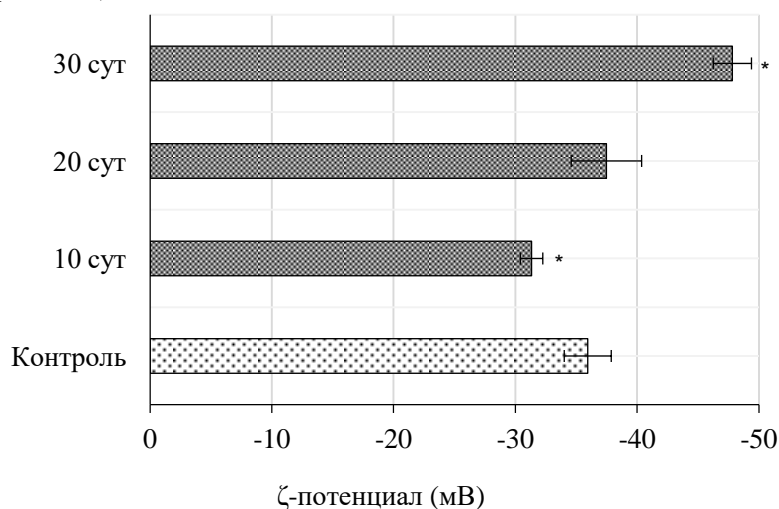


Рисунок 9 – Изменение ζ -потенциала клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 в процессе биодеградации 50 мг/л ДН. (□) клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы в течение 10 сут (контроль); (■) клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии ДН и глюкозы. * Данные достоверно отличаются от контрольных значений ($p < 0,05$).

Известно, что сдвиг электрокинетического потенциала в сторону нейтральности может приводить к дестабилизации клеточных оболочек и лизису клеток (Halder *et al.*, 2015). В этот период отмечается появление значительного числа инволюционных и лизирующихся клеточных форм (см. рисунок 8Б). Еще одним подтверждением нахождения клеток в угнетенном состоянии в присутствии ДН могут служить показатели окислительного стресса, в частности изменение каталазной активности (рисунок 10).

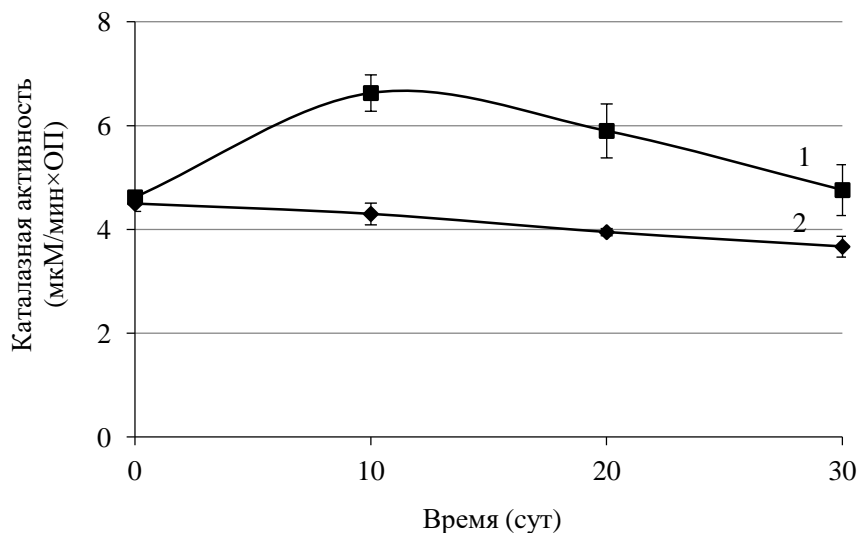


Рисунок 10 – Динамика каталазной активности *R. ruber* ИЭГМ 346 в процессе биодеструкции 50 мг/л ДН (1). 2 – биотический контроль.

Начальные показатели каталазной активности клеток штамма *R. ruber* ИЭГМ 346 составляли $4,5 \pm 0,15$ мкМ/мин×ОП. На 10-е сут эксперимента регистрировали значительное увеличение каталазной активности родококков до $6,6 \pm 0,21$ мкМ/мин×ОП. По-видимому, в это время интенсификация каталазной активности связана с тем, что в условиях окислительного стресса клетка расходует энергию на ферментативные защитные реакции, поскольку неферментные антиоксидантные системы (гликоген, полисахариды, миколаты трегалозы) не осуществляют эффективную защиту от активных форм кислорода ввиду дестабилизации клеточных оболочек и нарушения целостности мембран (см. рисунок 8Б) (Гоголева, 2012). В контрольных образцах регистрировали незначительное снижение активности каталазы. На 20–30 сут экспозиции в присутствии ДН наблюдалось снижение каталазной активности родококков.

В это же время регистрировался последовательный сдвиг ζ -потенциала в сторону более отрицательных значений (смещение потенциала в более отрицательную область) – $-37,47 \pm 2,33$ и $-47,81 \pm 2,57$ мВ соответственно. Следует отметить, что чем дольше по времени клетки контактировали с ДН, тем более отрицательным становился их заряд (рисунок 9). Клетки, выращенные в присутствии низких (50 мкг/л) концентраций ДН, достоверно не отличались по величине ζ -потенциала от клеток, выращенных при высоких концентрациях ДН: численные значения распределялись в том же диапазоне величин ζ -потенциала.

По данным проведенных экспериментов, присутствие ДН индуцировало существенное повышение процентного содержания общих клеточных липидов родококков ($70,83 \pm 4,46$ % от веса сухой биомассы), по сравнению с таковым ($43,40 \pm 1,72$ % от веса сухой биомассы) клеток, выращенных в присутствии глюкозы (таблица 3). Увеличение липидного компонента родококков, культивируемых в присутствии ДН, очевидно, способствует сохранению целостности клеточной мембраны и повышению ее стабильности. О стабилизации клеточной мембраны в том числе может свидетельствовать выявленное снижение каталазной активности родококков (см. рисунок 10), указывая на приоритет неферментативной антиоксидантной системы (клеточная оболочка) над ферментативной. Полученные данные свидетельствуют о том, что структура развивающейся популяции родококков пластично изменяется по мере биодеградации ДН в сторону более устойчивых к токсичному действию ДН особей.

Таблица 3 – Содержание совокупных липидов в клетках *R. ruber* ИЭГМ 346, выращенных в минеральной среде в присутствии глюкозы (контроль) и ДН

| Вариант | Сухая биомасса, г/л | Суммарные липиды, % от сухого веса |
|----------------------|---------------------|------------------------------------|
| Контроль | 2,1±0,08 | 43,4±1,72 |
| 50 мг/л ДН + глюкоза | 0,4±0,02 | 70,8±4,46 |

Примечание. Родококки выращивали в течение 15 сут.

По мере первоначального сдвига ζ -потенциала в процессе биодеструкции ДН наблюдалось интенсивное формирование клеточных агрегатов. Это согласуется с литературными данными (Kłodzińska *et al.*, 2010) о том, что уменьшение численного значения ζ -потенциала у Грамположительных бактерий усиливает феномен клеточной агрегации. Важную роль в формировании бактериальных агрегатов играет не только свойства ДН и состав бактериальной поверхности, но и степень ее гидрофобности. Как видно из рисунка 11, родококки продуцировали стабильные микроагрегаты под действием сравнительно низкой (0,6 М) концентрации сульфата аммония, что указывает на высокую гидрофобность их клеточной поверхности (рисунок 11Б).

Следует отметить, что в присутствии разных начальных концентраций ДН у родококков наблюдалась четкая тенденция к клеточной агломерации: к росту в жидкой минеральной среде в виде дискретных (распределенных по всему объему среды и обзриваемых визуально) биоконгломератов (глобул) разного размера и консистенции. Полученные результаты согласуются с данными (Bouchez-Naïtali *et al.*, 2001) о высокой степени гидрофобности флокулообразующих родококков в условиях роста на гидрофобных субстратах и способности высокогидрофобных клеток к самопроизвольной агрегации. Подобные образования гидрофобных клеток, по-видимому, способствуют ускорению (облегчению) кооперативного воздействия окислительных ферментов на экотоксикант.

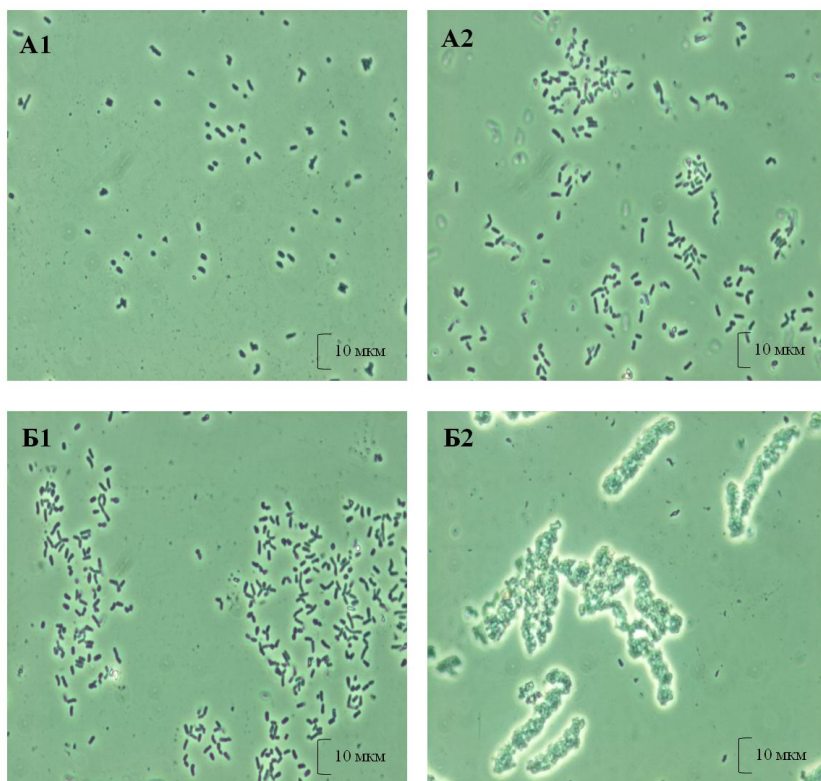


Рисунок 11 – Микрофотографии клеток *R. ruber* ИЭГМ 346. А – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы в течение 15 сут; Б – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы в течение 15 сут. 1 – без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 – в присутствии 0,6 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ув.×1000.

В процессах бактериального окисления фармацевтических поллютантов участвуют ферменты, локализованные преимущественно в цитоплазме или связанные с клеточной мембраной (Karigar, Rao, 2011; Żur *et al.*, 2018). В экспериментах с использованием отдельных клеточных фракций установлено, что в биодеструкции диклофенака на разных ее этапах

участвуют как цитоплазматические, так и мембранносвязанные ферменты с образованием первичных гидроксипроизводных диклофенака (4'-гидрокси- и 5-гидроксидиклофенак) и фенилуксусной кислоты соответственно (таблица 4).

Известно, что в реакции окисления НПВС у микроорганизмов участвуют цитохром P450-зависимые монооксигеназы (Klenk *et al.*, 2017). По нашим данным, достоверное ($p < 0,05$) ингибирование процесса биоразложения ДН отмечается в присутствии 1-аминобензотриазола и амиодарона. В присутствии других ингибиторов уровень биодеструкции экотоксиканта существенно не изменялся.

Таблица 4 – Биодеструкция 50 мг/л ДН с использованием отдельных фракций клеток *R. ruber* ИЭГМ 346

| Клеточная фракция | Остаточное содержание ДН, % | Метаболиты, % |
|---|-----------------------------|---|
| Цельноклеточный комплекс | 82,1±1,03 | 4'-гидроксидиклофенак 3,3±0,47 5-гидроксидиклофенак 1,8±0,71 |
| Супернатант с цитоплазматическими ферментами | 77,3±3,12 | 4'-гидроксидиклофенак 4,5±0,56 5-гидроксидиклофенак 1,9±0,32 |
| Супернатант с Тритон-экстрагированными мембранносвязанными ферментами | 85,3±2,74 | Фенилуксусная кислота 3,1±0,71 |
| Соникат клеток с неэкстрагируемыми ферментами | 100,0 | – |

Примечание. Приведены результаты после 10 сут инкубирования клеточных фракций с ДН.

Пути биодеструкции ДН родококками. На рисунке 12 представлена схема разложения ДН (соединение **1**) клетками *R. ruber* ИЭГМ 346. В первые 5–10 сут инкубации родококков в присутствии высоких (50 мг/л) концентраций ДН среди продуктов биодеструкции ДН (соединение **2**) детектировались первичные моногидроксиметаболиты ДН – 2-[4'-гидрокси-2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота (4'-ОН-ДН, соединение **3**), 5-гидрокси-2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота (5-ОН-ДН, соединение **4**), а также соединение **5** бензохиониминовой структуры и его дигидроксипроизводное (соединение **16**). Позднее в среде инкубации обнаруживались моно- и дигидроксипроизводные 2,6-дихлоранилина (соединения **6** и **8**), образующиеся в результате разрушения связи С-N у второго атома углерода в нехлорированном ароматическом кольце соединений **3** и **4**; а также фенилуксусная кислота (соединение **7**) и ее гидроксильное производное – 3-гидроксифенилуксусная кислота (соединение **9**).

При использовании более низкой (50 мкг/л) концентрации ДН вышеперечисленные продукты обнаруживались в первые 2 сут инкубации родококков. На 4-е сут в среде регистрировались метаболиты со спектроскопическими характеристиками гомогентизиновой (2,5-дигидроксифенилуксусной) кислоты, $m/z=168$ (соединение **10**) и продукта ее окисления 2-(*p*-бензохион-2)-уксусной кислоты, $m/z=166$ (соединение **11**), а также фумарилацетоуксусной кислоты, $m/z=200$ (соединение **12**) и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной, $m/z=102$ и фумаровой кислот, $m/z=116$ (соединения **13**, **14** соответственно). С помощью ТСХ подтверждено присутствие в составе метаболитов ДН фенилуксусной кислоты (R_f 0,64) на промежуточных этапах процесса биодеградаци ДН и фумаровой кислоты (R_f 0,83) в конце процесса биодеградаци.

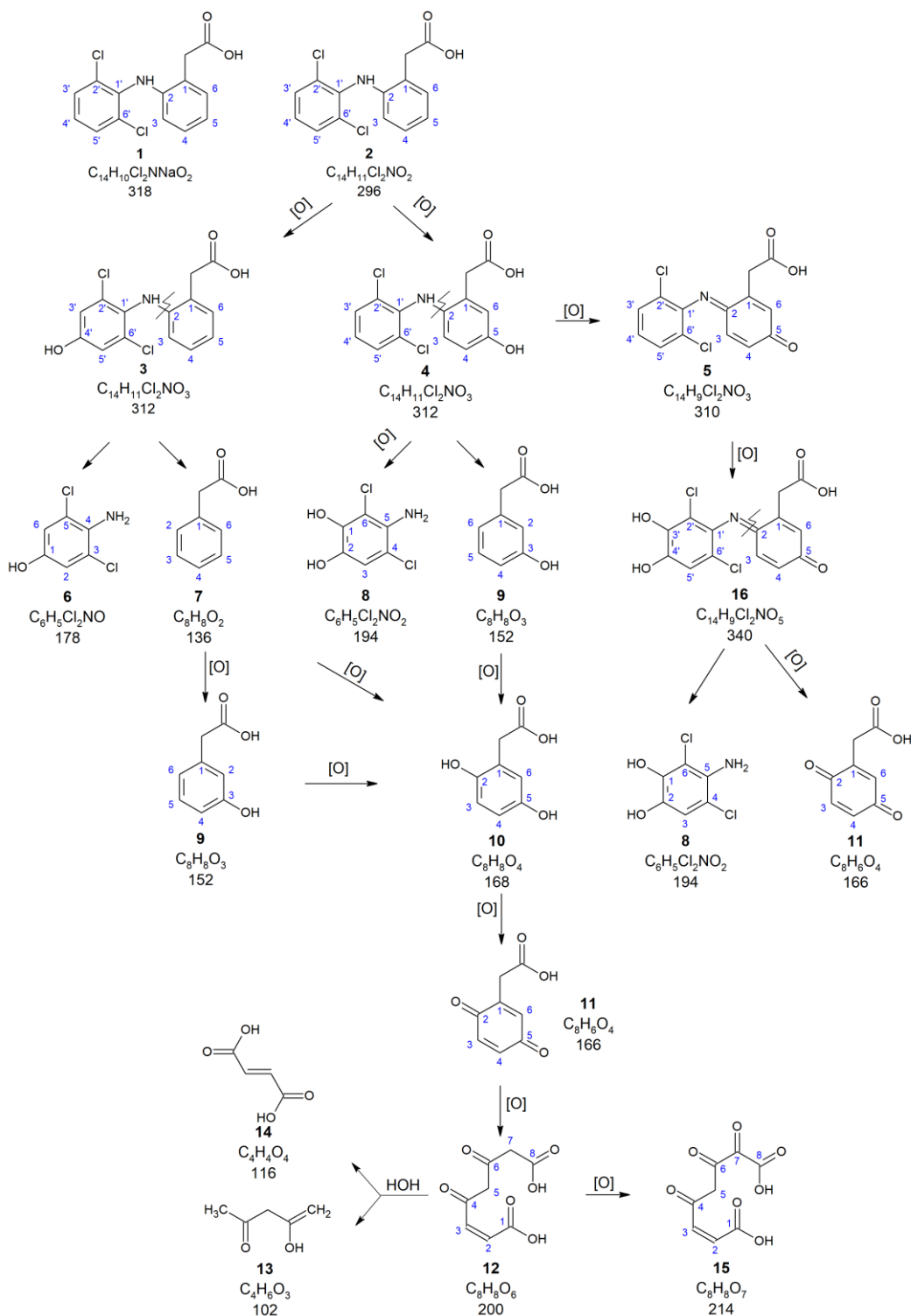


Рисунок 12 – Пути биодеструкции ДН клетками *R. ruber* ИЭГМ 346. **1** – натриевая соль 2-(2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусной кислоты; **2** – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота; **3** – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил-4'-гидрокси]-амино)-фенилуксусная кислота; **4** – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил-5-гидрокси]-амино)-фенилуксусная кислота; **5** – 2-(1-(5-оксо-циклогекса-1,3-диенил-2-(2',6'-дихлор-фенилимино)-уксусная кислота; **6** – 4-амино-3,5-дихлорфенол; **7** – фенилуксусная кислота; **8** – 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диол; **9** – 3-гидроксифенилуксусная кислота; **10** – 2,5-дигидрокси-фенилуксусная кислота (гомогентизиновая кислота); **11** – 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусная кислота; **12** – 4,6-диоксо-окт-2-*транс*-ендиовая кислота (фумарилацетоуксусная кислота); **13** – 3-оксобутановая кислота (ацетоуксусная кислота); **14** – *транс*-бутендиовая кислота (фумаровая кислота); **15** – 4,6,7-триоксоокт-2-ендиовая кислота; **16** – 2-[1-(5-оксоциклогекса-1,3-диенил-2-(3',4'-дигидрокси-2',6'-дихлорфенил)-имино)]-уксусная кислота.

О процессе дегалогенирования 4-амино-3,5-дихлорфенола (соединение **6**) и 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диола (соединение **8**) свидетельствовали результаты качественного анализа содержания свободных хлоридов в среде (рисунок 13). Наблюдалось выраженное увеличение содержания хлорид-ионов в среде в первые 20 сут эксперимента (от 0 до 18,7 мМ/л). Наиболее высокие (25,4 мМ/л) показатели содержания хлорид-ионов достигались на 40 сут эксперимента, после чего регистрировали резкое падение до 12,5 мМ/л к 50 сут эксперимента. Высвобождение хлорид-ионов, возможно, приводило к формированию HCl, о чем свидетельствовало снижение показателя рН среды (с 6,9 до 6,5).

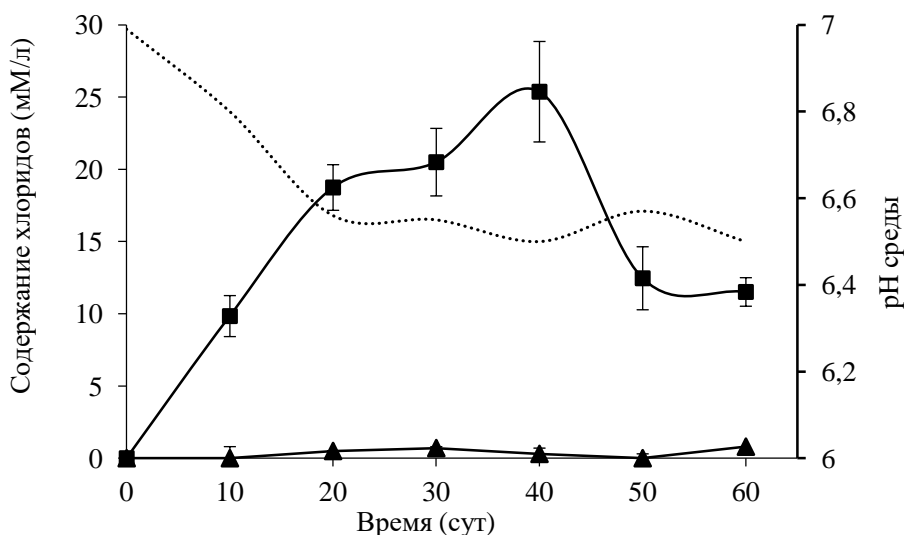


Рисунок 13 – Изменение содержания хлоридов в среде в процессе биодеструкции 50 мг/л ДН клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 (■). (▲) контроль абиотической деструкции, (•••) рН среды.

Токсичность продуктов биодеструкции ДН в отношении овса *Avena sativa* L. не выявлена (рисунок 14). Согласно расчетам, фитозффект, оказываемый продуктами биодеструкции ДН, составлял 0,7 %, в то время как ДН в концентрациях от 5 до 500 мг/л ингибировал развитие корневой системы овса от 23,1 до 100 %, т.е. являлся токсичным в отношении растения.

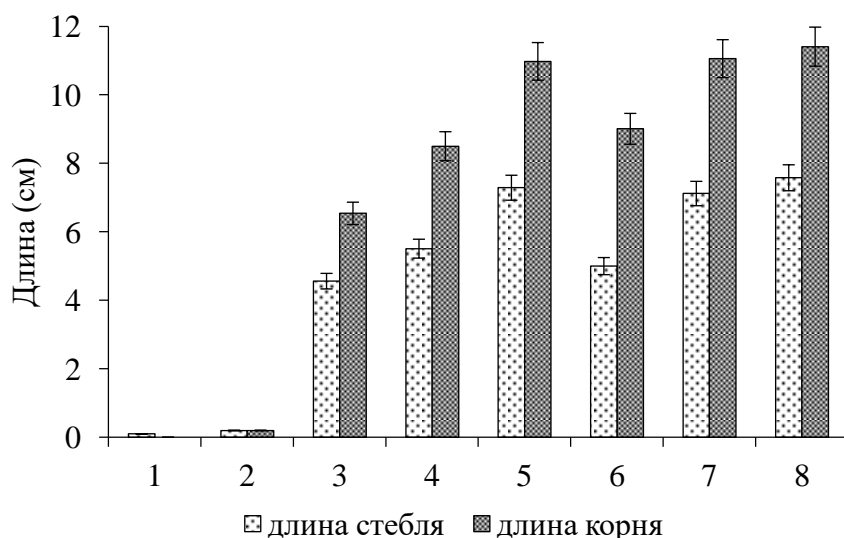


Рисунок 14 – Изменение морфометрических показателей овса посевного *Avena sativa* L. под воздействием ДН и продуктов его биодеструкции. 1 – 500 мг/л ДН; 2 – 50 мг/л ДН; 3 – 25 мг/л ДН; 4 – 5 мг/л ДН; 5 – продукты биодеструкции ДН; 6 – биотический контроль; 7 – абиотический контроль (вода); 8 – контроль среды RS.

По данным *in silico* анализа, проведенного с использованием программы ECOSAR, показатели острой и хронической токсичности конечных продуктов биодеструкции ДН (фумарилацетоуксусная, ацетоуксусная и фумаровая кислоты) составляют более 100 и 1000 мг/л соответственно, что, согласно Глобальной гармонизированной системе классификации и маркировки химических веществ (United Nations, 2011), свидетельствует о нетоксичности данных метаболитов для водных организмов.

Согласно проведенному PASS-анализу, бензохинонимин (рисунок 12, соединение **5**) является субстратом CYP2J, GST A (коэффициент вероятности более 0,9) и обладает

широкими ингибирующими свойствами (коэффициент вероятности более 0,8), может проявлять достаточно высокую антисеборейную активность и использоваться в лечении ринита, а также фобических расстройств (коэффициент вероятности более 0,7). Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего более углубленного исследования биоактивности этого метаболита ДН.

Заключение. В результате скрининга большого числа (104) штаммов, принадлежащих к роду *Rhodococcus* и поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов, отобран штамм *R. ruber* ИЭГМ 346, характеризующийся высокой толерантностью (МПК 200 мг/л) к ДН. Данный штамм способен в течение 6 сут к полной деструкции экотоксичного ДН в концентрации 50 мкг/л при добавлении глюкозы (0,5 %) для обеспечения значительного роста клеток и прединкубации родококков в присутствии низкой (5 мкг/л) концентрации ДН для стимуляции многоцелевого оксигеназного комплекса.

Показано, что изменение функционирования родококков под влиянием ДН ведет к появлению морфологических аномалий клеток, что выражается в изменении их формы и размеров, параметров шероховатости клеточной поверхности. В присутствии ДН происходила значительная агрегация клеток, а также изменение ζ -потенциала, повышение гидрофобности и содержания общих клеточных липидов, изменение каталазной активности. Экспериментально обосновано, что процесс биодеструкции ДН катализируется ферментными комплексами, локализованными в цитоплазме клеток, а также мембранносвязанными ферментами. В процессах начального окисления молекулы ДН задействованы цитохром Р450-зависимые монооксигеназы.

Родококки разлагают ДН в присутствии глюкозы по трем путям метаболизации первичных гидроксиметаболитов. Путь первый: 4'-ОН-ДН (соединение 3) разлагается в результате разрыва связи С-N у второго (его) атома углерода в нехлорированном ароматическом кольце с образованием 4-амино-3,5-дихлорфенола (соединение 6) и фенилуксусной кислоты (соединение 7). Фенилуксусная кислота (соединение 7) гидроксилируется в положениях 2 и 5 ароматического кольца до гомогентизиновой (2,5-дигидроксифенилуксусной) кислоты (соединение 10), которая окисляется до 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусная кислоты (соединение 11). В результате последующего окисления соединения 11 разрывается кольцо хинона в положении 5–6 с образованием фумарилацетоуксусной кислоты (соединение 12), которая гидролизует с образованием ацетоуксусной (соединение 13) и фумаровой кислот (соединение 14). Второй путь: 5-ОН-ДН (соединение 4) в результате разрыва связи С-N у второго (его) атома углерода в нехлорированном ароматическом кольце разрушается с образованием 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диола (соединение 8) и 3-гидроксифенилуксусной кислоты (соединение 9). Соединение 9 окисляется с образованием гомогентизиновой кислоты (соединение 10), которая преобразуется далее до 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусной кислоты (соединение 11). Соединение 11 претерпевает последующие превращения по первому пути с образованием ацетоуксусной (соединение 13) и фумаровой кислот (соединение 14). Третий путь: 5-ОН-ДН (соединение 4) окисляется с образованием бензохинонимина (соединение 5), который гидроксилируется с образованием дигидроксипроизводного (соединение 16). Азотетинная связь в соединении 16 гидролизует с образованием соединения 8, а также хинона (соединение 11) при одновременном окислении структуры по второму атому углерода. Соединение 11 претерпевает вышеописанные изменения по первому пути.

Особо следует особо отметить два события: (1) разрыв связи С-N в структуре ДН с образованием фенилуксусной кислоты и (2) раскрытие хинонового цикла с образованием фумарилацетоуксусной кислоты и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной и фумаровой кислот, которые могут считаться продуктами детоксикации ДН.

Из выявленных 16 метаболитов 4 (4'-ОН-ДН, 5-ОН-ДН и два соединения бензохинониминового структуры) аналогичны таковым, обнаруженным ранее при изучении метаболизма ДН (1,7 и 34 мкМ) у альфапротеобактерий *Labrys portucalensis* F11 (Moreira *et al.*, 2018), и 2 метаболита (4'-ОН-ДН и 5-ОН-ДН) аналогичны полученным ранее с использованием

Грамположительных бактерий *Actinoplanes* (Osorio-Lozada *et al.*, 2008). Следует отметить, что во всех обнаруженных ранее метаболитах сохранялась связь C-N при втором атоме углерода в нехлорированном ароматическом кольце ДН. При этом отсутствовали сведения, подтверждающие факт раскрытия ароматического цикла в структуре образующихся соединений.

Полученные фундаментальные данные дают представление об экологической роли актинобактерий рода *Rhodococcus* в детоксикации фармполлютантов и создают предпосылки для реализации технических решений процессов доочистки сточных вод фармацевтических предприятий и обезвреживания опасных фармотходов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показана способность актинобактерий рода *Rhodococcus* к деструкции диклофенака натрия в присутствии глюкозы и кратковременной адаптации клеток в присутствии низкой концентрации диклофенака. Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми к диклофенаку (МПК ≥ 200 мг/л) оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам родококков *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, преимущественно выделенные ранее из муниципальных сточных вод, родниковых и грунтовых вод. Отобран штамм *R. ruber* ИЭГМ 346, способный к полной биодеструкции диклофенака (50 мкг/л) в течение 6 сут.

2. Наиболее типичными реакциями родококков на воздействие диклофенака являются изменение дзета-потенциала бактериальных клеток; повышение их гидрофобности и содержания суммарных клеточных липидов; формирование многоклеточных конгломератов в жидкой среде; изменение относительной клеточной поверхности. Полученные данные рассматриваются в качестве механизмов адаптации родококков и, как следствие, повышения их устойчивости к токсическому воздействию фармполлютанта. Процесс биодеструкции диклофенака катализируется цитоплазматическими и мембранносвязанными ферментами. В процессе начального окисления молекулы диклофенака участвуют цитохром P450-зависимые монооксигеназы.

3. Описаны пути метаболизации диклофенака натрия с использованием штамма *R. ruber* ИЭГМ 346. Впервые получены сведения, подтверждающие разрыв связи C-N и раскрытие ароматического кольца в молекуле диклофенака с образованием нетоксичных конечных метаболитов (фумарилацетоуксусная, ацетоуксусная и фумаровая кислоты).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Ivshina, I.B. Biodegradation of emerging pollutants: focus on pharmaceuticals / I.B. Ivshina, E.A. Tyumina, E.V. Vikhareva // *Microbiology Australia*. – 2018. – V. 39, № 3. – P. 117–122. doi: 10.1071/MA18037 (Scopus, Web of Science).

2. Tyumina, E.A. Diclofenac as a factor in the change of *Rhodococcus* metabolism / E.A. Tyumina, G.A. Bazhutin, E.V. Vikhareva, A.A. Selyaninov, I.B. Ivshina // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – 2019. – V. 487, № 1. – P. 1–6. Article 012027. doi: 10.1088/1757-899X/487/1/012027 (Scopus, Web of Science).

3. Ivshina, I.B. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 / I.B. Ivshina, E.A. Tyumina, M.V. Kuzmina, E.V. Vikhareva // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9. – P. 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-45732-9. (Scopus, Web of Science).

4. Тюмина, Е.А. Нестероидные противовоспалительные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей / Е.А. Тюмина, Г.А. Бажутин, А.д.П. Картагена Гомез, И.Б. Ившина // *Микробиология*. – 2020. – Т. 89, № 2.

Публикации в других журналах и сборниках

5. Тюмина, Е.А. Биодеструкция фармполлютантов свободными клетками родококков / Е.А. Тюмина, К.А. Мигачева // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Наукоёмкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”, Пермь. – 2016. – С. 38–39.

6. Тюмина, Е.А. Биодеструкция фармполлютантов с использованием актинобактерий / Е.А. Тюмина // Сборник тезисов участников II Всероссийского научного форума “Наука будущего – наука молодых”, Казань. – 2016. – Т. 2. – С. 165–169.
7. Солодянкина, Е.С. Использование тонкослойной хроматографии для обнаружения диклофенака натрия и продуктов и его биодеструкции в культуральных жидкостях родококков / Е.С. Солодянкина, Е.А. Тюмина, Е.В. Вихарева, И.И. Мишенина // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2017. – № 19. – С. 131–132.
8. Ivshina, I.B. Mechanisms of bacterial conversion and degradation of pharma pollutants from nonsteroidal anti-inflammatory drugs / I.B. Ivshina, E.A. Tyumina, E.V. Vikhareva // Abstract Book of 7th Congress of European Microbiologists “FEMS-2017”, Valencia, Spain. – 2017. – P. 2041
9. Тюмина, Е.А. Биодegradация опасных эмерджентных загрязнителей группы нестероидных противовоспалительных средств / Е.А. Тюмина, Г.А. Бажутин, И.Б. Ившина // Тезисы докладов II Международной (XV Региональной) научной конференции “Техногенные системы и экологический риск”, Обнинск. – 2018. – С. 324–325.
10. Кузьмина, М.В. Фитотоксичность диклофенака натрия и продуктов его биодеструкции / М.В. Кузьмина, Е.А. Леденева, Е.В. Вихарева, Е.А. Тюмина, М.И. Рычкова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2018. – № 22. – С. 64–67.
11. Tyumina, E.A. Structural and functional features of rhodococci exposed to NSAID-based pharma pollutants / E.A. Tyumina, G.A. Bazhutin, I.B. Ivshina, E.V. Vikhareva // Abstract book of 2nd International Conference „Smart Bio“, Kaunas, Lithuania. – 2018. – P. 71.
12. Tyumina, E.A. Biodegradation of diclofenac by rhodococci: metabolism and cell adaptation / E.A. Tyumina, A. Cartagena Gomez, I.B. Ivshina // Abstract Book of 8th Congress of European Microbiologists “FEMS-2019”, Glasgow, Scotland. – 2019. – P. 361.

Патенты

Ившина И.Б., Тюмина Е.А., Вихарева Е.В. Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия. Получено Положительное решение о выдаче патента на изобретение РФ от 23.09.2019 по заявке № 2018132086/10(052377).

Тюмина Елена Александровна

**БИОДЕСТРУКЦИЯ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ
АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCUS***

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный.

Отпечатано в “ИЭГМ УрО РАН”

614081, г. Пермь, ул. Голева, 13