На правах рукописи

Бажутин Григорий Андреевич

БИОДЕСТРУКЦИЯ ИБУПРОФЕНА АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА *RHODOCOCCUS*

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2025

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» – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь

Научный руководитель:

Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

Официальные оппоненты:

Несчисляев Валерий Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Коршунова Татьяна Юрьевна, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Уфимского института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, заведующая лабораторией биотехнологий Уфимского института биологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18).

Защита состоится «13» ноября 2025 г на заседании диссертационного совета 24.1.201.03 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 614081, Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (https://permsc.ru)

Автореферат разослан «____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук **Максимова Юлия Геннадьевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Интенсивное развитие фармакологической индустрии и нарастающее бесконтрольное потребление лекарственных препаратов населением и в ветеринарии сформировали новую разновидность особо опасных эмерджентных контаминантов–загрязнителей природной среды, объединяемых общим термином “фармполлютанты”. Фармполлютанты, представляющие собой высокостабильные соединения с разнообразной химической природой и выраженной биоактивностью, оказывают вредное влияние на окружающую среду, имея (даже в незначительных концентрациях) высокую токсичность. Одним из наиболее часто встречающихся в окружающей среде фармполлютантов является ибупрофен – широко применяемый в медицине и ветеринарии лекарственный препарат с противовоспалительным, жаропонижающим и анальгезирующим эффектом. Ибупрофен повсеместно встречается в поверхностных, грунтовых и очищенных сточных водах в концентрациях от нескольких нг/л до 6000 мкг/л, а также регулярно обнаруживается в образцах питьевой воды (aus der Beek T. *et al.*, 2016; Koumaki, Mamais, 2017; Biel-Maeso *et al.*, 2018; Česen *et al.*, 2018; Guruge *et al.*, 2019; Moreau *et al.*, 2019; Chopra, Kumar, 2020; Singh, Sutar, 2021).

Высокая липофильность молекулы ибупрофена определяет его способность проходить через биологические мембраны, в связи с этим ибупрофен склонен к биоаккумуляции в живых организмах, в частности, в морских (Mezzelani *et al.*, 2018; Ericson *et al.*, 2010) и пресноводных (Xie *et al.*, 2015; Ikkere *et al.*, 2018; Parolini, 2020) моллюсках, рыбах (UNESCO HELCOM 2017; Xie *et al.*, 2019), млекопитающих (Richards *et al.*, 2011), растениях (Pi, Ng, Kelly, 2017), а также к биомагнификации в пищевых цепях (Richmond *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2015). Накапливаясь в организме растений и животных ибупрофен вызывает негативные эффекты – окислительный стресс, повреждение структуры ДНК, подавление активности отдельных ферментов, нитрование белков, нарушение работы митохондрий и пероксидирование липидов (Gonzales-Gonzales *et al.*, 2014; Gonzales-Naranjo, Boltes, 2014; Ortiz de Garcia *et al.*, 2014; Ogueji *et al.*, 2017; Parolini, 2020). Понимание механизмов биологической трансформации ибупрофена крайне важно для определения его экологической “судьбы” и эффективной нейтрализации.

Одними из наиболее перспективных микроорганизмов, осуществляющих процессы естественного самоочищения от антропогенных ксенобиотиков, являются актиномицеты. Документирована эффективная актиномицетальная деструкция антибиотиков, гормонов, антиэпилептиков, анальгетиков и отдельных представителей группы нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) (Yoshimoto *et al.*, 2004; Gauthier *et al.*, 2010; Plotnikov *et al.*, 2017; Thelusmond *et al.*, 2018, Żur *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019), подтверждена способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к полной биодеструкции фармпрепаратов группы обезболивающих и спазмолитических средств, в том числе парацетамола (Ivshina *et al.*, 2006), дротаверина гидрохлорида (Ivshina *et al.*, 2012, 2015), диклофенака натрия (Ivshina *et al.*, 2019; Tyumina *et al.*, 2019). В настоящей работе интерес представлял анализ возможного использования *Rhodococcus* в качестве биоокислителей ибупрофена.

Цель настоящей работы – исследование способности актиномицетов к биодеструкции ибупрофена и адаптивных реакций бактериальных клеток на присутствие фармполлютанта.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать каталитическую активность коллекционных культур актиномицетов в отношении ибупрофена. Отобрать штаммы – активные биодеструкторы ибупрофена. Сравнить потенциал биодеструкции ибупрофена актиномицетами в присутствии различных источников углерода и энергии.
2. Изучить динамику процесса биодеструкции ибупрофена с использованием математических моделей.
3. Определить основные метаболиты, пути разложения и оценить степень токсичности продуктов бактериальной деструкции ибупрофена.
4. Выявить механизмы адаптации бактериальных клеток к воздействию ибупрофена на уровне их морфофизиологических аномалий.

Научная новизна. С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, реестровый номер УНУ/ЦКП 73559/480868, http://www.iegmcol.ru) впервые показана способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к направленной биодеструкции высоких (100 мг/л) концентраций ибупрофена в присутствии глюкозы и *н*-гексадекана. Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми к ибупрофену оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам актиномицетов рода *Rhodococcus*: *R. cerastii, R. cercidiphyllii* и *R. erythropolis,* выделенные ранее из почвы, ризосферы растений и природного водоёма соответственно. На примере *R. cerastii* ИЭГМ 1243 изучены специфические особенности проявления токсического эффекта ибупрофена на бактериальные клетки. Установлено, что наиболее типичными реакциями актиномицетов на воздействие ибупрофена являются изменение дзета-потенциала (электрокинетического потенциала) клеток; формирование многоклеточных конгломератов в жидкой среде; изменение относительной площади клеточной поверхности. Полученные данные рассматриваются в качестве механизмов адаптации актиномицетов и, как следствие, повышения их устойчивости к токсическому воздействию фармполлютанта. Установлено, что процесс биодеструкции ибупрофена катализируется ферментными комплексами, локализованными в цитоплазме клеток. Описаны пути бактериальной метаболизации ибупрофена. Подобраны условия, значительно ускоряющие метаболизм ибупрофена и сокращающие продолжительность *lag*-фазы. Проведена оценка и прогнозирование экотоксичности отдельных продуктов метаболизации ибупрофена.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные сведения расширяют представление о биодеструктирующем потенциале актиномицетов и их возможном вкладе в нейтрализацию и детоксикацию фармполлютантов. Отобран штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243, способный к полной биодеструкции ибупрофена (100 мг/л) в течение 4–8 сут. Определены основные пути разложения ибупрофена через метаболизацию первичных гидроксилированных производных. Полученная информация о штамме-активном биодеструкторе ибупрофена защищена Патентом Российской Федерации 2762007. Сведения о полном геноме *R. cerastii* ИЭГМ 1243 внесены в международную базу данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAJNDD000000000). Результаты проведенных исследований используются в лекционном курсе “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков” для студентов Пермского государственного

национального исследовательского университета. Информация о штамме-биодеструкторе ибупрофена внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет (www.iegmcol.ru/strains/).

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена с применением классических методов микробиологии, таких как получение чистых культур микроорганизмов и их культивирование. Анализ физиологии и ростовых характеристик биодеструкторов проводили с использованием высокочувствительной респирометрии, оценки электрокинетического потенциала и каталазной активности. Структуру бактериальных клеток исследовали с помощью современных методов атомно-силовой, конфокальной лазерной сканирующей, просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии, а также рентгеновской спектроскопии. Локализацию ферментных систем, участвующих в биодеструкции ибупрофена, проводили путем выделения отдельных клеточных фракций родококков. Полногеномное секвенирование нового поколения и биоинформатический анализ использовали для выявления генов-кандидатов биодеструкции ибупрофена. Детекцию производных ибупрофена осуществляли методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и жидкостной хроматографии-масс спектрометрии. Математическое моделировние производилось при консультативном участии сотрудников кафедры вычислительной математики и биомеханики ПНИПУ. *In silico* и *in vitro* оценка экотоксичности и биоразлагаемости полученных производных ибупрофена проводилась с использованием программного пакета EPI Suite и растительной тест-культуры *Avena sativa* L. (овёс посевной).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Актиномицеты рода *Rhodococcus* способны к биодеструкции ибупрофена в условиях косубстратного культивирования. Наиболее выраженной устойчивостью (МПК ≥ 1000 мг/л) к ибупрофену характеризуются представители трех экологически значимых видов *R. erythropolis, R. cercidiphyllii* и *R. cerastii*. Полное разложение ибупрофена (100 мг/л) с использованием клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 достигается в течение 36 ч эксперимента в присутствии *н*-гексадекана (0,1 об. %) и глюкозы (1 г/л). Кинетическое моделирование, параллельное во времени проводимым экспериментам, позволяет определить продолжительность процесса биодеструкции ибупрофена.

2. Начальный этап процесса биодеструкции ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 сопровождается реакцией гидроксилирования бензольного кольца в структуре фармполлютанта с последующим образованием декарбоксилированных производных. Процесс биодеструкции ибупрофена катализируется цитоплазматическими ферментами семейства CYP450-зависимых оксигеназ.

3. Воздействие ибупрофена на бактериальные клетки сопровождается образованием обособленных многоклеточных агрегатов в жидкой среде, выраженным изменением морфометрических параметров и дзета-потенциала клеточной поверхности, а также увеличением содержания суммарных клеточных липидов.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на 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; XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-

биологов с международным участием “Симбиоз–Россия 2020”, Пермь, 2020; Международной конференции “Пермский международный форум Наука и глобальные вызовы XXI века”, Пермь, 2021; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Химия, Экология, Урбанистика”, Пермь, 2022; Всероссийской научной молодежной конференции “Геномика и биотехнология микроорганизмов”, Владивосток, 2022; 10th Congress of European Microbiologists “FEMS 2023”, Hamburg, Germany, 2023.

По теме диссертационной работы опубликовано 18 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз, а также 1 патент РФ.

Объем и структура научно-квалификационной работы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 22 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 258 наименований работ, в том числе 43 отечественных и 215 зарубежных.

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» − филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, является частью исследований, выполненных в рамках Госзаданий Минобрнауки РФ (АААА-А19-119112290008-4, 124020500028-4, FSNF-2023-0004), поддержана грантом Российского научного фонда (проект 21-14-00132). Научные положения и выводы работы 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. Исследования с использованием методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии проводили на базе Центра коллективного пользования «Коллекция UNIQEM» Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.). Анализ продуктов биодеструкции ибупрофена проводили на базе кафедры аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии (рук. – д.ф.н., проф. Вихарева Е.В.). Математическое моделирование процесса биодеструкции ибупрофена выполнено на базе кафедры вычислительной математики, механики и биомеханики Пермского государственного национального политехнического университета (зав. кафедрой – д.т.н., проф. Столбов В.Ю.).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочая коллекция бактериальных культур. В работе использовали 190 бактериальных штаммов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, УНУ/ЦКП 480868/73559, http://www.iegmcol.ru), принадлежащих к родам *Agromyces* (1 штамм), *Brachybacterium* (2 штамма), *Clavibacter* (1 штамм), *Corynebacterium* (1 штамм), *Curtobacterium* (1 штамм), *Dietzia* (15 штаммов), *Gordonia* (7 штаммов), *Micrococcus* (2 штамма), *Microbacterium* (1 штамм), *Nocardioides* (2 штамма), *Rhodococcus* (156 штаммов) и *Williamsia* (1 штамм).

Условия культивирования. В экспериментах по биодеструкции ибупрофена применяли минерально-солевые среды RS, К и К модифицированную с добавлением раствора микроэлементов (Романенко, Кузнецов, 1974). Ибупрофен вносили в виде стерильного концентрированного (100 г/л) водного раствора натриевой соли (Sigma Aldrich, США) до конечной концентрации 100 мг/л или 100 мкг/л. В качестве дополнительного источника углерода и энергии испытывали 10 различных косубстратов: ацетат натрия, глюкозу, олеаноловую, фенилуксусную и гуминовые кислоты (0,1%), мясопептонный бульон (МПБ, 1,3%), глицерин, пентанол-1, гексанол-1, *н*-гексадекан (0,01–0,1 об.%). В качестве инокулята использовали суспендированные в физиологическом растворе актиномицеты ($ОП_{600}$ 1,0), предварительно выращенные в течение 1, 2, 3 или 4 сут в МПБ (Oxoid, Великобритания) и отмытые дважды фосфатным буфером (pH 7,0). Эксперименты по биодеструкции ибупрофена проводили в условиях периодического культивирования (160 об/мин, 28°С) в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с объемом среды 100 мл.

В экспериментах по оценке влияния факторов культивирования на процесс биодеструкции применяли среду К с добавлением *н*-гексадекана (0,1; 1,0; 10, 50 мл/л), глюкозы (0,1; 0,5; 1,0; 2,5 г/л), фиксированном значении pH (4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0) и бактериального инокулята (10, 50, 100, 200% от концентрации клеток, эквивалентной по степени мутности БАК5 международным единицам мутности). Доведение pH осуществляли 5М р-рами HCl и NaOH в деионизированной воде.

Определение МПК ибупрофена в отношении коллекционных штаммов определяли методом двукратных серийных разведений (Wiegand *et al*., 2008) с использованием 96-луночных полистироловых планшетов.

Масштабирование процесса биодеструкции ибупрофена проводили в условиях лабораторного ферментера BioFlo/CelliGen 115 (Eppendorf, New Brunswick, USA) в объеме среды 4 л при температуре 28ºС с дополнительной аэрацией 0,3 л/мин и скоростью перемешивания 160 об/мин.

Качественный и количественный анализ содержания ибупрофена и продуктов биодеструкции проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония), оборудованного хроматографической колонкой с обращено-фазным сорбентом Phenomenex Jupiter® 5u C18 300 A, 250×4.60 mm 5 micron (Phenomenex, США) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Регистрацию и обработку хроматографической информации осуществляли с помощью программы LCSolution (v/1.25 rus). Нормализация хроматографических пиков осуществлялась по методу внешнего стандарта.

Продукты биодеструкции ибупрофена анализировали с использованием жидкостного тройного квадрупольного хроматографа LCMS-8050 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором с двойным источником ионизации (электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении). Разделение метаболитов осуществляли на хроматографической колонке (Luna 3u C18(2) 100A, LC Column 100x0.5 mm) с обращенно-фазным сорбентом (Phenomenex, USA).

Математическое моделирование процесса биодеструкции ибупрофена проводили с использованием кинетического уравнения минус первого порядка $dx/dt = – k\, x^{-1}$ с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$. Значения параметра скорости биодеструкции k в реализациях определяли по полученным методом ВЭЖХ экспериментальным данным, отражающим динамику изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции с применением метода наименьших квадратов.

Получение отдельных клеточных фракций осуществляли по (Tarasova *et al*., 2017). В работе использовали супернатант с цитоплазматическими ферментами, супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами и ресуспендированный соникат с неэкстрагируемыми мембранно-связанными ферментами.

Жизнеспособность бактериальных клеток определяли специфическим окрашиванием йодонитротетразолия хлоридом (Sigma-Aldrich, США) или двухкомпонентным флуоресцентным красителем Live/Dead® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США).

Детекцию внутриклеточных липидных включений проводили путем окрашивания клеток красителем Nile Red в ДМСО по (Mrunalini, Girisha, 2017).

Определение электрокинетического потенциала бактериальных клеток в присутствии и без ибупрофена осуществляли с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Для этого бактериальные клетки отмывали и ресуспендировали в 10 мМ KNO_3 до $ОП_{600}$ 0,2.

Микроскопические исследования. *Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия*. Визуализацию и измерение размеров осуществляли с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия), оснащенного фотокамерой Axiocam 506 Color и флуоресцентным источником света HXP 120 V (Zeiss, Германия), в режиме фазового контраста или флуоресценции (светофильтры FS 106) с увеличением ×1000.

Атомно-силовая (*АСМ*) *и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия* (*КЛСМ*). Использовали систему совмещенного сканирования, состоящую из атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D (Asylum Research, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония).

Сканирующая (*СЭМ*) *и просвечивающая* (*ПЭМ*) *электронная микроскопия*. Ультратонкие срезы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония), целые клетки – в сканирующем электронном микроскопе JSM-IT200 (Jeol, Япония).

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС) **с картированием элементов**. Использовали микроскоп JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенный системой энергодисперсионного рентгеновского анализа (Inca Energy-350, Oxford Instruments, Великобритания), работающей при ускоряющем напряжении 80 кэВ (угол наклона

15°). ЭДС-спектры и элементные карты получали с помощью программы AZtec (Oxford Instruments, Великобритания).

Респираторная активность. Оценку скорости (мкл/ч) и общего количества (мкл) поглощения кислорода и выделения углекислого газа осуществляли с использованием высокочувствительного 10-канального респирометра непрямого цикла MicroOxymax® (Columbus Instruments, США).

Полногеномное секвенирование проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием секвенатора Illumina NovaSeq (Illumina, США) и метода сборки генома SPAdes v. 3.14.1.

Биоинформатический анализ. Поиск функциональных генов, кодирующих ферменты семейства CYP450, проводили в международной базе данных NCBI на основе автоматически аннотированных полных геномов штаммов *Rhodococcus* spp.

***In silico* анализ продуктов биотрансформации ибупрофена**. Токсичность, растворимость и биодоступность ибупрофена и его производных рассчитывали с помощью программного пакета EPI Suite™ (The Estimation Programs Interface, EPA, США).

Определение фитотоксичности в отношении овса посевного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). В экспериментах использовали семена, всхожесть которых составляла 95%.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трех-, восьми- или десятикратной повторности. Математическую обработку результатов проводили с использованием R (RStudio), Statistica 13 (StatSoft, 2018), MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование способности коллекционных штаммов актиномицетов к биодеструкции ибупрофена. Наиболее высокую (МПК ≥ 1000 мг/л) резистентность к ибупрофену проявили штаммы, принадлежащие к видам *Agromyces mediolanus*, *Brachybacterium faecium*, *B. paraconglomeratum*, *Corynebacterium variabile*, *Curtobacterium citreum*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *D. maris*, *G. terrae*, *R. cerastii*, *R. cercidiphylli*, *R. corynebacterioides*, *M. luteus*, *M. lylae*, *N. albus*, *N. jensenii*, *R. opacus*, *R. erythropolis*, *R. ruber*. Для проведения дальнейших экспериментов были отобраны 15 штаммов, наиболее устойчивые к воздействию ибупрофена.

Использованные в работе штаммы актиномицетов показали способность к метаболизму ибупрофена исключительно в условиях косубстратного культивирования. Это может объясняться тем, что молекула ибупрофена не является достаточным источником углерода и энергии. Инкубация бактериальных клеток с ибупрофеном в минеральной среде в присутствии глицерина показала, что наиболее перспективными биодеструкторами в данных условиях оказались штаммы *R. cerastii* ИЭГМ 1378, ИЭГМ 1243, *R. cercidiphylli* ИЭГМ 1184 и *R. erythropolis* ИЭГМ 501: на 7 сут эксперимента биодеструкция ибупрофена составляла 14,1, 21,6 и 18,6% соответственно. Наиболее высокая убыль фармполлютанта наблюдалась в присутствии 0,1% *н*-гексадекана при использовании клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 (Таблица 1). При использовании глицерина, МПБ и пентанола-1 в качестве дополнительных субстратов биодеструкция ибупрофена была значительно ниже – от 14,1 до 27,4%. В присутствии остальных косубстратов биотрансформация ибупрофена не происходила.

Таблица 1 – **Биодеструкция 100 мг/л ибупрофена в присутствии дополнительных источников углерода**

Штамм	Убыль ибупрофена, %									
	Глюкоза	Глицерин	Пентанол	Гексанол	Ацетат	*н*-Гексадекан	МПБ	Фенилуксусная к-та	Олеаноловая к-та	Гуминовые к-ты
R. erythropolis ИЭГМ 501	16,3±4,57	18,6±1,05	0	0	0	46,6±3,16	10,7±3,11	0	0	0
R. cercidiphyllii ИЭГМ 1184	31,9±1,22	21,6±1,18	0	0	0	84,6±2,29	12,3±0,85	0	0	0
R. cerastii ИЭГМ 1243	0	14,1±3,25	22,7±6,31	0	0	95,4±5,49	27,4±2,68	0	0	0

Примечание. Представлены результаты после 7 сут эксперимента.

Наиболее эффективно процесс биодеструкции ибупрофена протекал в минеральной среде RS в присутствии 0,1% *н*-гексадекана с использованием клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, предварительно выращенных в МПБ в течение 3 сут (Рисунок 1В). В данных условиях полная биодеструкция ибупрофена наблюдалась на 6 сут эксперимента.

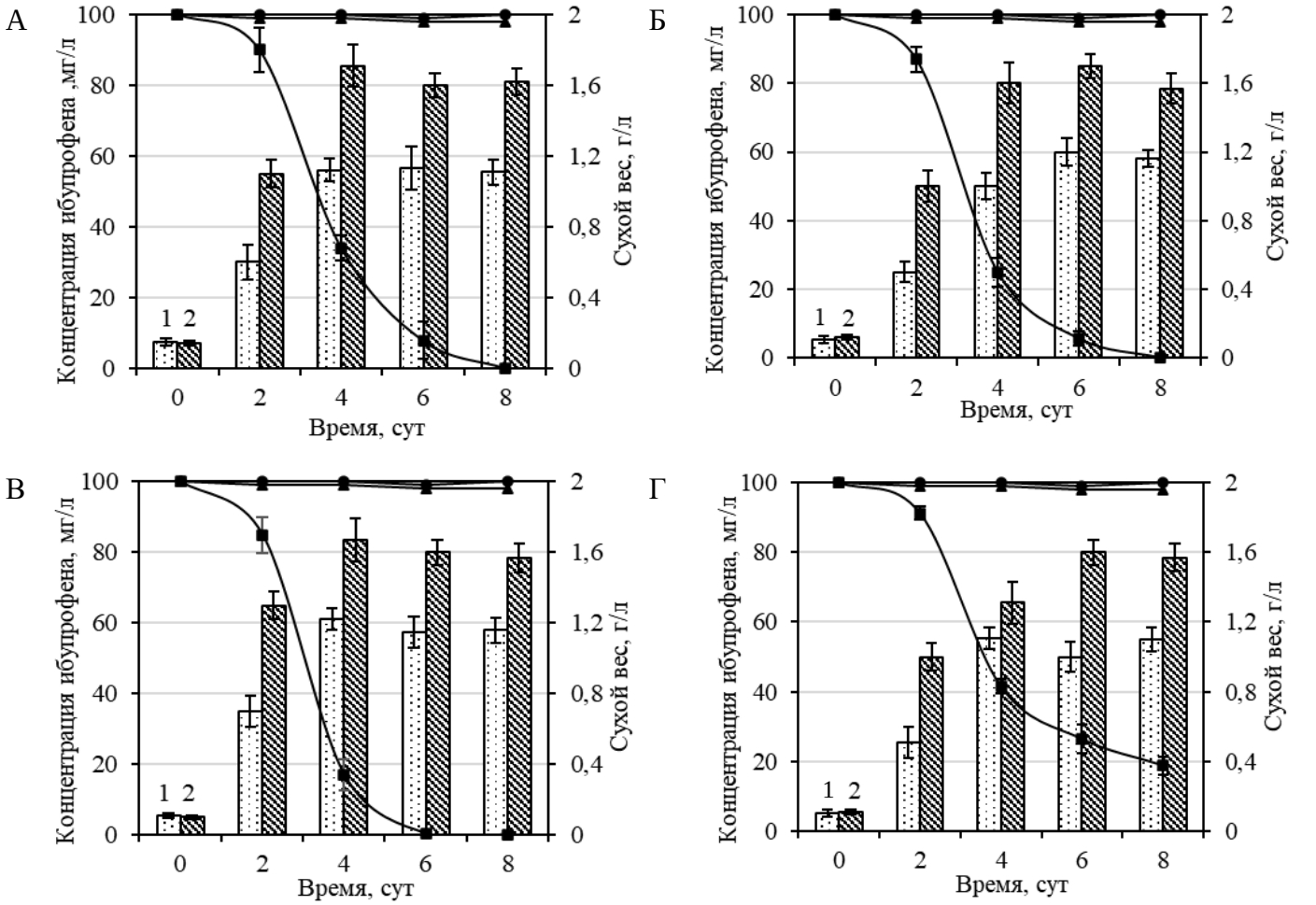


Рисунок 1 – **Динамика биодеструкции 100 мг/л ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 (■) в присутствии *н*-гексадекана**. Клетки предварительно выращивали в МПБ в течение 1 (А), 2 (Б), 3 (В) и 4 (Г) сут. (●) контроль абиотической деструкции; (▲) контроль биосорбции; 1 – сухой вес биомассы актиномицетов в присутствии ибупрофена и *н*-гексадекана; 2 – сухой вес биомассы актиномицетов в присутствии *н*-гексадекана.

Средняя скорость биодеструкции ибупрофена составляла 14,3 мг/сут, максимальное значение которой достигалось на 4 сут и составляло 21,65 мг/сут. В это же время регистрировали максимум продуктов деструкции ибупрофена (Рисунок 2). Максимальная удельная скорость биодеструкции ибупрофена составляла 0,031 сут. При этом в присутствии ибупрофена значительно (в 1,4 раза) угнетался рост актиномицетов по сравнению с контрольными вариантами опыта ($p<0,05$).

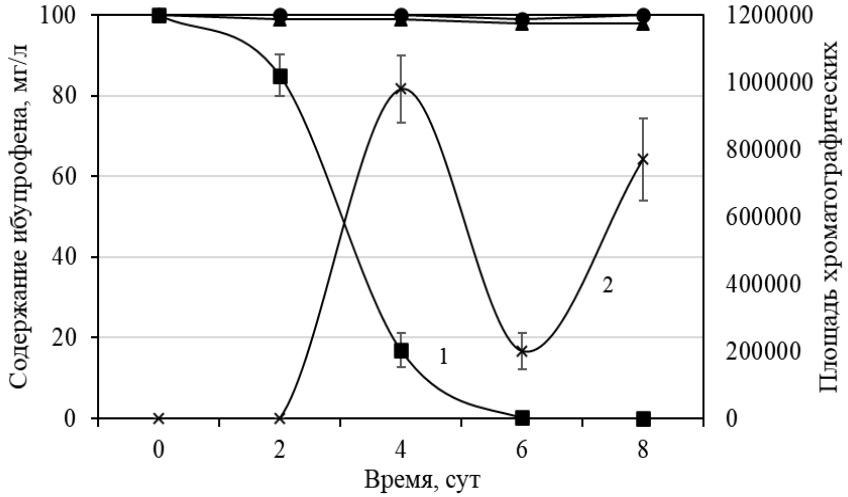


Рисунок 2 – **Динамика изменения содержания ибупрофена** (1) **и его метаболитов** (2) **в процессе биодеструкции клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243**. ● – контроль абиотической деструкции, ▲ – контроль биосорбции.

Для оценки каталитической активности бактерий в процессе биодеструкции ибупрофена использовался метод респирометрического анализа. Максимум активности актиномицетов в присутствии только *н*-гексадекана приходился на 30–32 ч эксперимента (Рисунка 3А,В) и затем резко снижался вследствие исчерпания субстрата в среде. В это время максимальные значения скорости потребления O_2 и выделения CO_2 достигали 66673 и 250,6 мкл/ч соответственно. В присутствии ибупрофена регистрировали замедление роста и активности бактериальных клеток. В первые сут эксперимента: продолжительность lag-фазы составляла порядка 70 ч. Максимум метаболической активности (поглощение O_2 2581,2 мкл/ч и выделение CO_2 197,2 мкл/ч) клеток ИЭГМ 1243 в присутствии фармвещества наблюдали на 82–86 ч эксперимента, что соответствовало максимальной скорости биодеструкции ибупрофена (см. Рисунок 1В). Дальнейший спад газообмена в клетках можно объяснить не только исчерпанием ибупрофена в среде, но и накоплением продуктов его метаболизма (см. Рисунок 4). Рассчитанные средние показатели скорости поглощения кислорода клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии ибупрофена и без него составляли 1015,0 и 1230,0 мкл/ч соответственно. Общее количество потребленного кислорода в присутствии ибупрофена составляло 824801 мкл, а в контроле 690152 мкл.

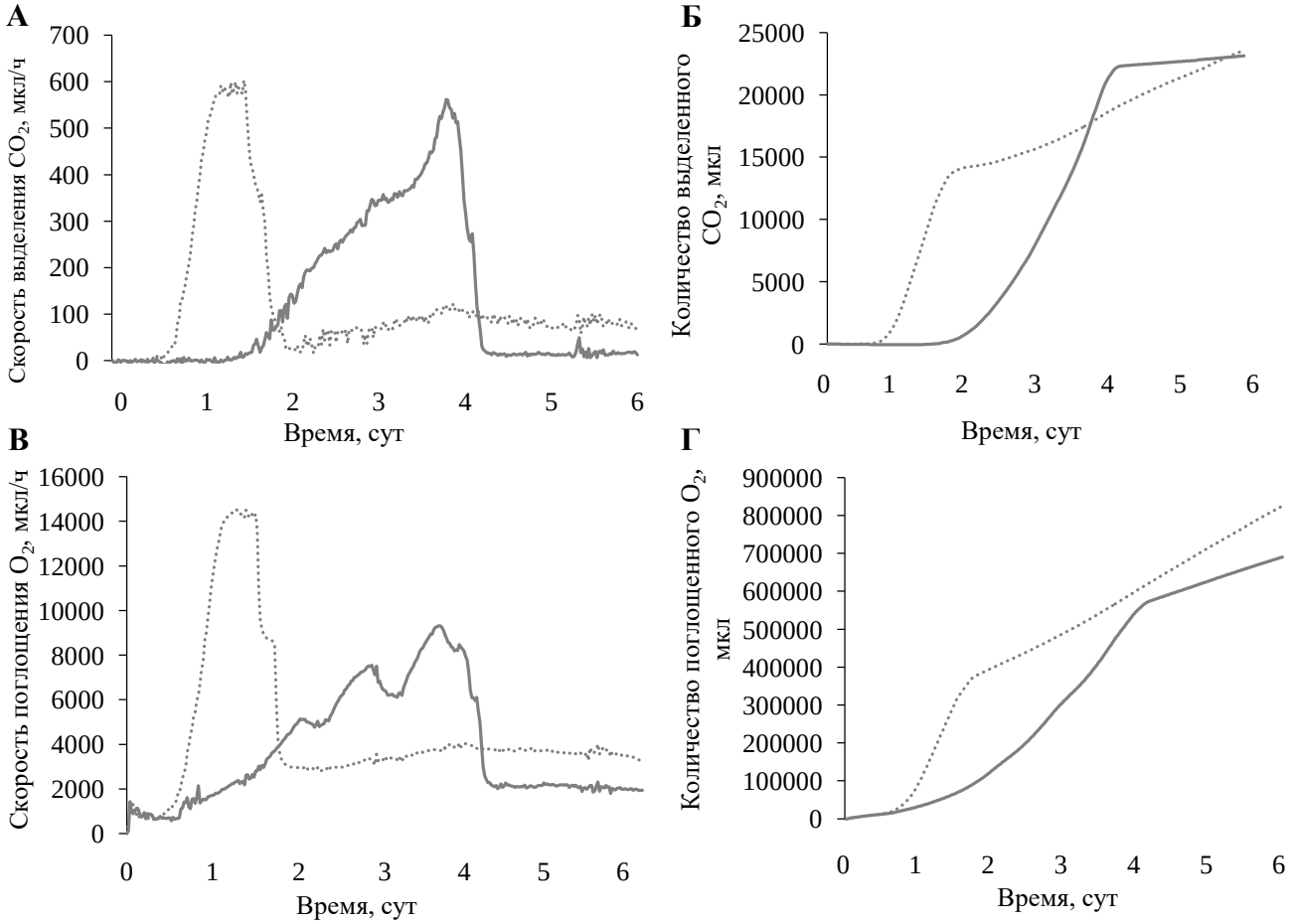


Рисунок 3 – **Респирометрические показатели метаболической активности клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в процессе биодеструкции ибупрофена**. Выделение (А) и аккумуляция (Б) CO_2; поглощение (В) и аккумуляция (Г) O_2. Клетки выращивали в присутствие *н*-гексадекана (пунктирная линия) или *н*-гексадекана с добавлением 100 мг/л ибупрофена (сплошная линия).

Средняя скорость выделения углекислого газа в присутствии ибупрофена была значительно (в 1,5 раза) выше, чем в контроле – 36,3 и 23,8 мкл/ч соответственно. Общее количество выделенного CO_2 актиномицетов составляло 4396,0 и 3857,4 мкл в

присутствии ибупрофена и без него соответственно. Таким образом, по показателям выделения углекислого газа можно заметить, что метаболическая активность актиномицетов значительно выше в присутствии ибупрофена.

В условиях лабораторного биореактора наблюдалось замедление убыли ибупрофена: на 20 сут остаточное содержание составляло более 30%. Уровень биоконверсии коррелировал (-0,92) с уменьшением концентрации растворенного кислорода. Поглощение кислорода снижалось с накоплением продуктов биодеструкции ибупрофена (Рисунок 4), что свидетельствовало о подавляющем влиянии их высокой концентрации на респирацию активно растущей бактериальной биомассы.

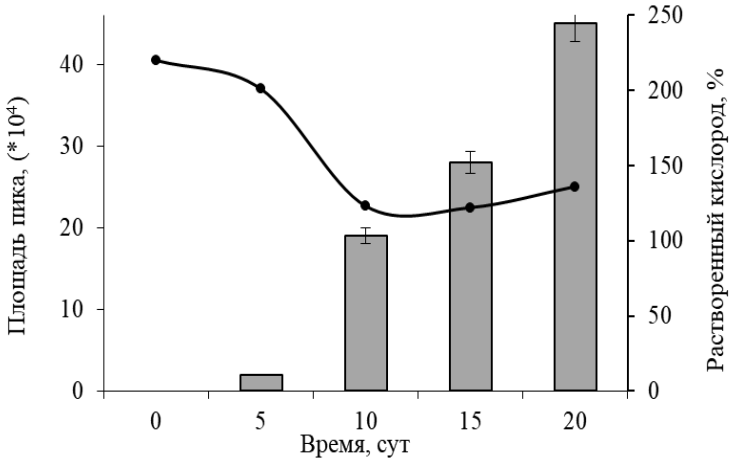


Рисунок 4 – **Совокупная площадь ВЭЖХ-пиков продуктов биодеструкции ибупрофена в условиях лабораторного биореактора**. ● – содержание растворенного кислорода в среде

Поскольку ибупрофен в окружающей среде чаще всего обнаруживается в концентрациях порядка десятков и сотен мкг/л, важным показателем биотехнологического потенциала биодеструктора является способность к окислению поллютанта в экологически релевантных концентрациях. По нашим данным, при добавлении 100 мкг/л ибупрофена одновременно с инокулятом (нативные клетки) 100%-ная биодеструкция ибупрофена протекала в течение 48 ч эксперимента (Рисунок 5). В условиях предварительной инкубации актиномицетов в течение 2 сут в присутствии *н*-гексадекана полную биоконверсию фармполлютанта регистрировали на 30 ч. В течение эксперимента отмечали прирост биомассы, в контрольных вариантах (без ибупрофена) количество биомассы достоверно не отличалось от таковой в присутствии экотоксиканта.

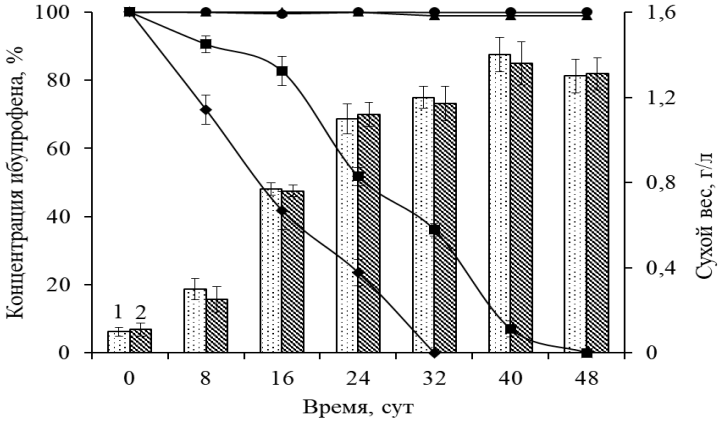


Рисунок 5 – **Динамика биодеструкции 100 мкг/л ибупрофена нативными (■) и прединкубированными (◆) клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии *н*-гексадекана**. ● – контроль абиотической деструкции, ▲ – контроль биосорбции. 1 – сухой вес (СВ) биомассы в присутствии ибупрофена и *н*-гексадекана; 2 – сухой вес биомассы в присутствии *н*-гексадекана.

Для оценки воздействия различных факторов инкубации на процесс биодеструкции ибупрофена использовали среду К модифицированную, с добавлением 0,01% *н*-гексадекана и 0,1 г/л глюкозы с pH 6,7, инокулированную клетками,

выращенными в течение 3 сут на МПБ, и внесенными до концентрации, соответствующей стандарту мутности БАК5. Каждый из факторов (концентрации косубстратов, pH, концентрация инокулята) варьировался в отдельном эксперименте (Таблица 2).

Варьирование концентраций глюкозы и *н*-гексадекана сокращало процесс при использовании в количестве 1,0 г/л и 10,0 мл/л соответственно. При увеличении концентрации глюкозы с 0,1 до 1,0 г/л или *н*-гексадекана с 0,1 до 10,0 мл/л наблюдалось сокращение продолжительности процесса с 5 до 3 сут, но дальнейшее увеличение концентрации не способствовало ускорению процесса. Установлено, что снижение концентрации клеток ниже 50% от стандарта мутности БАК5 снижает эффективность биодеструкции ибупрофена. Увеличение объема инокулята выше концентрации по БАК5 не влияет на продолжительность процесса. Наиболее значимым из факторов оказалось значение pH. При изменении pH в щелочную сторону (с 6,0 до 8,0) продолжительность процесса составляла более 5 сут. При pH 5,0 и менее биодеструкция ибупрофена практически не происходила, тогда как при варьировании значений pH от 5,5 до 7,0 с шагом в 0,5 время завершения процесса составляло 2 сут при pH 6,5. При pH 5,0 на 2-е сут процесса биодеструкции ибупрофена наблюдался обильный рост биомассы с образованием осадка в виде крупных рыхлых агрегатов. При pH 6,0 наблюдались обособленные конгломераты клеток кремового цвета. Наравне с белыми тяжами начали формироваться плотные агрегаты яркой окраски, мутность культуральной среды снижалась. При pH 6,5 на 2-е сут бактериальная культура была полностью организована в плотные клеточные агрегаты ярко оранжевого цвета. подосадочная жидкость становилась прозрачной.

Таблица 2 – **Влияние факторов инкубирования клеток на процесс биодеструкции ибупрофена**

Фактор инкубирования	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	4	5
Концентрация глюкозы, г/л	Содержание ибупрофена*, %					
0,5	100,0	78,7	31,3	26,4	9,7	0,0
1,0	**100,0**	**86,5**	**8,3**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
2,5	100,0	84,8	3,5	2,1	0,0	0,0
Концентрация *н*-гексадекана, мл/л						
1,0	100,0	87,6	26,2	5,1	0,0	0,0
10,0	**100,0**	**86,5**	**8,3**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
50,0	100,0	83,6	2,7	0,0	0,0	0,0
Количество инокулята, % от БАК5						
0,5	100,0	96,3	79,2	73,1	63,6	57,2
1,0	**100,0**	**90,8**	**73,7**	**65,8**	**63,1**	**59,9**
2,0	100,0	91,2	71,5	69,1	67,6	65,9
Значение pH						
6,0	100,0	66,6	1,9	0,0	0,0	0,0
6,5	**100,0**	**56,9**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
7,0	100,0	71,6	31,1	1,8	0,0	0,0

Примечание. *Начальная концентрация ибупрофена принята за 100%.

В результате многофакторного анализа были определены оптимальные значения факторов, сочетание которых позволило сократить процесс биодеструкции 100 мг/л

ибупрофена с 4 сут до 36 ч. Оптимальными условиями оказались: минеральная среда К модифицированная, с добавлением глюкозы (1,0 г/л), и *н*-гексадекана (10,0 мл/л), при pH среды (6,5), и инокулированная 3-суточной культурой, предварительно выращенной на МПБ до мутности стандарта БАК5 (см. Таблицу 2).

Для уточнения динамики процесса биодеструкции ибупрофена в интервале (30–36 ч), применяли кинетическое моделирование. Скорость уменьшения концентрации ибупрофена оказалась обратно пропорциональной таковой в процессе биодеструкции, поэтому для моделирования использовали кинетическое уравнение минус первого порядка dx/dt = – k x-1 с начальным условием x0 = 100% при t = 0. После интегрирования уравнение кинетической кривой принимало вид:

$$x = (x_0^2 - 2kt)^{\frac{1}{2}}$$

Значения параметра скорости биодеструкции k в реализациях определяли с применением метода наименьших квадратов по полученным экспериментальным данным (см. Таблица 11). Период полураспада ибупрофена определяли согласно выражению $t_{1/2} = \frac{0{,}75x_0^2}{(2k)}$, а время окончания (при 100-кратном уменьшении начальной концентрации) по выражению $t_{1/100} = \frac{0.9999x_0^2}{(2k)}$

Кинетические кривые, характеризующие изменение концентрации ибупрофена (Рисунок 6), соответствуют полученным экспериментальным данным (см. Таблица 2).

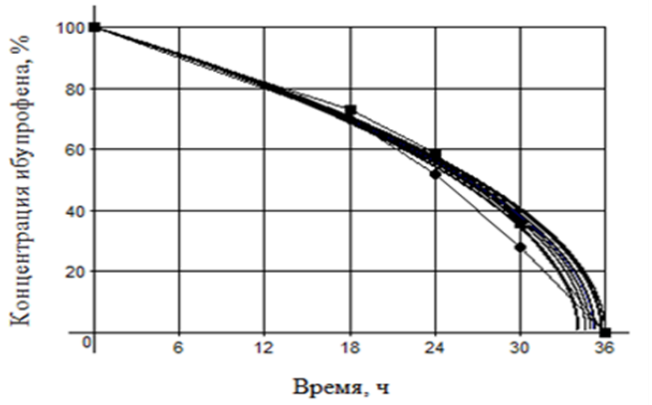


Рисунок 6 – **Кинетические кривые изменения концентрации 0,1 г/л ибупрофена в процессе биодеструкции клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 со стабилизацией pH среды** (точками показаны экспериментальные значения пределов концентрации)

Значения параметра k скорости процесса биодеструкции находятся в пределах 138,88÷146,84 $\%^2$ /ч, период полураспада $t_{1/2}$ – 25,54÷27,00 ч, время окончания процесса $t_{1/100}$ – 34,05÷36,00 ч. Доверительные интервалы для выборочных средних значений параметра скорости, периода полураспада и времени окончания процесса, установленные с применением критического значения коэффициента Стьюдента для доверительной вероятности P = 95% и числа степеней свободы (n – 1) = 8, составляют (142,44 ± 2,28) $\%^2$ /ч, (26,34 ± 0,42) ч и (35,11 ± 0,56) ч соответственно. Полученное значение (2,08%) относительного стандартного отклонения свидетельствует о приемлемой воспроизводимости процесса биодеструкции ибупрофена.

С помощью ВЭЖХ-МС идентифицировали метаболиты биодеструкции ибупрофена *R. cerastii* ИЭГМ 1243 (Рисунок 7). Детектирование веществ проводили в режиме мониторинга выбранных ионов (SIM), используя характеристические ионы предполагаемых продуктов биодеструкции ибупрофена. В первые 2 сут инкубации бактерий в присутствии высоких (100 мг/л) концентраций ибупрофена (соединение **2**) регистрировали образование первичных гидроксиметаболитов (соединения **3**–**5**). Позднее, на 4-е сут эксперимента, в среде инкубации обнаруживали

карбоксилированные производные описанных выше гидроксиметаболитов (соединения **6**–**8**).

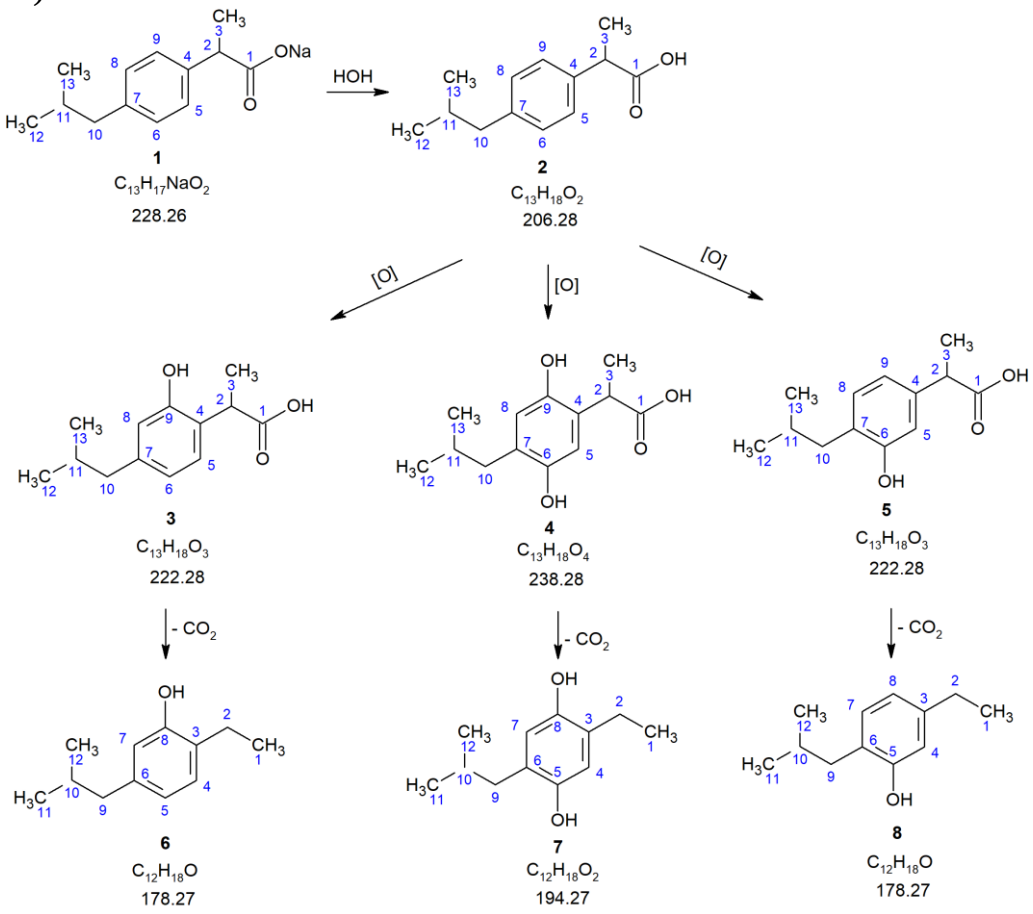


Рисунок 7 – **Схема биодеструкции ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243. 1** – натриевая соль ибупрофена; **2** – ибупрофен; **3** – 9-гидроксиибупрофен; **4** – 6,9-дигидроксиибупрофен; **5** – 6-гидроксиибупрофен; **6** – декарбоксилированное производное 9-гидроксиибупрофена; **7** – декарбоксилированное производное 6,9-дигидроксиибупрофена; **8** – декарбоксилированное производное 6-гидроксиибупрофена.

Как видно из Рисунка 7, метаболизация ибупрофена сопровождается гидроксилированием молекулы ибупрофена (соединение **1**) с образованием 9-гидроксиибупрофена (соединение **3**), 2,6-дигидроксиибупрофена (соединение **4**) и 6-гидроксиибупрофена (соединение **5**) и их последующим декарбоксилированием (соединения **6**–**8**). Выявление последующих преобразований гидроксилированных и карбоксилированных метаболитов, образующихся в процессе биодеструкции ибупрофена, требует дальнейших исследований.

С целью установления пространственного расположения ферментов, катализирующих биоокисление ибупрофена, была произведена его трансформация различными фракциями, полученными ультразвуковым лизированием клеточной культуры. Установлено, что фракция остатков клеточных мембран не демонстрирует активности в отношении ибупрофена, тогда как цитоплазматическая фракция показала низкую (около 3%) способность к окислению ибупрофена по сравнению с растущей культурой, при этом методом ВЭЖХ регистрировался пик, соответствующий 9-гидроксиибупрофену (Рисунок 7, соединение **3**), что свидетельствует о цитоплазматической локализации ферментов, вовлеченных в начальные стадии окисления ибупрофена.

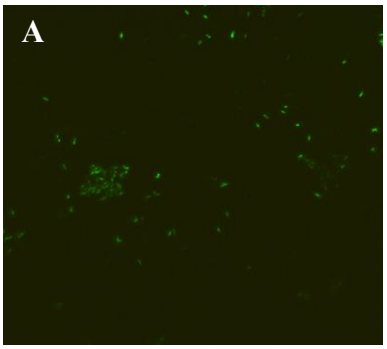
Согласно литературным данным, одной из наиболее значимых групп ферментов, вовлеченных в процесс детоксикации лекарственных средств, в том числе НПВС,

являются цитохром Р450 зависимые оксигеназы (CYP450) (Parke, 1985; Li *et al*., 2023; Kariyawasam *et al*., 2024.). По данным анализа путей биодеструкции ибупрофена, также можно предположить, что основное участие в процессах окисления ибупрофена клетками актиномицетов принимают ферменты группы CYP450. Полногеномное секвенирование *R. cerastii* позволило провести анализ генетического потенциала штамма-биодеструктора. С применением методов биоинформатического анализа составлен перечень генов *R. cerastii* ИЭГМ 1243, кодирующих ферменты семейства CYP450, которые, предположительно, участвуют в процессе биодеструкции ибупрофена. Сравнение генов, кодирующих CYP450, показало, что *R. cerastii* ИЭГМ 1243 имеет 11 генов, характерных для родококков, преимущественно для *R. erythropolis*, и один уникальный ген. Полученные данные создают предпосылки для дальнейшего изучения транскриптома биодеструктора *R. cerastii* ИЭГМ 1243 с целью определения функциональных генов, участвующих в процессе биодеструкции ибупрофена.

Токсичность и свойства продуктов биодеструкции ибупрофена. По данным определения фитотоксичности, ибупрофен (100 мг/л) оказывал подавляющее (фитоэффект 37,2%) воздействие на рост корней *Avena sativa* L. (овес посевной). Однако метаболиты, образующиеся в процессе биодеструкции ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1278, обладали более выраженной (фитоэффект 47,3%) фитотоксичностью по сравнению с исходным субстратом. Разбавление (10–1000 кратное) продуктов биодеструкции ибупрофена снижало оказываемый фитоэффект в отношении тест-растения до 5,6–18,8%.

С использованием пакета компьютерных программ EPISuit спрогнозирована экотоксичность ибупрофена и продуктов его биодеструкции. Согласно проведенному анализу, конечные метаболиты (соединение **6**–**8**, см. Рисунок 7) ибупрофена являются высокотоксичными соединениями для водных организмов (рыбы, беспозвоночные, водоросли), поскольку, согласно Глобальной гармонизированной системе классификации и маркировки химических веществ, показатели острой и хронической токсичности продуктов трансформации ибупрофена в отношении гидробионтов составляют менее 1 мг/л (United Nations GHS, 2011). По нашим данным, декарбоксированные продукты (соединение **6**–**8**) биодеструкции ибупрофена характеризуются высокими (log K_{ow}>4) показателями липофильности и, соответственно, значительными (4999; 6552 л/кг) показателями почвенной сорбции и биоконцентрации в живых организмах (431, 208 л/кг). Наиболее высокие показатели биоаккумуляции выявлены для ибупрофена (437 л/кг сырого веса) и карбоксилированных соединений **6** и **8** (133 л/кг сырого веса).

Ответные реакции актиномицетов на токсическое воздействие ибупрофена. Одной из основных ответных реакций актиномицетов на негативное воздействие ибупрофена является переход клеток к сцепленному состоянию с формированием обособленных многоклеточных конгломератов неопределенной формы размером до 1,5 мм (Рисунок 8). Это, по-видимому, является адаптационным механизмом актиномицетов. Аналогичный переход клеток *Rhodococcus* из одного состояния в другое за счет внешних условий среды (присутствия токсиканта и его метаболитов), подобное формирование сцепленных клеточных ансамблей отмечено ранее в процессе биодеструкции полициклического НПВС диклофенака (Tyumina *et al.*, 2019).



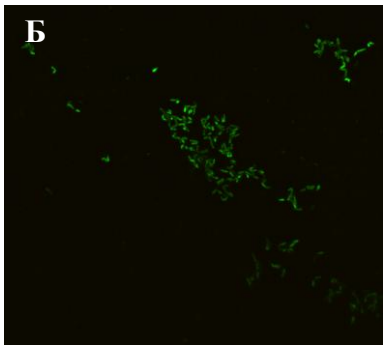
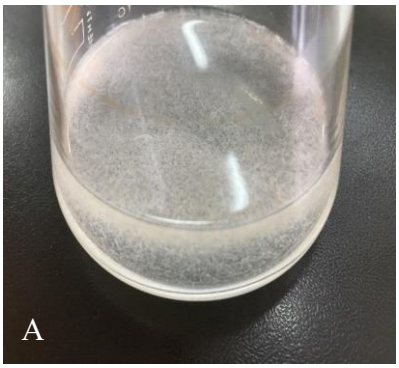


Рисунок 8 – **КЛСМ-изображения *R. cerastii* ИЭГМ 1243.** А – клетки выращивали в течение 3 сут в присутствии *н*-гексадекана, Б – 100 мг/л ибупрофена и *н*-гексадекана. Жизнеспособные клетки окрашены флуоресцентным красителем Syto9 (зеленое свечение)

Процесс агрегации клеток инициируется на 3 сут эксперимента и, вероятно, связан с началом процесса активной биодеструкции ибупрофена. В первые двое суток наблюдается помутнение среды, увеличение оптической плотности за счет активного планктонного роста клеточной биомассы. Наиболее характерной особенностью роста клеток *R. cerastii* в присутствии ибупрофена является формирование рыхлых, игольчатых агрегатов палевого цвета на 3 сут эксперимента (Рисунок 9А). Отсутствие яркой пигментации оранжевого цвета, присущей представителям вида *R. cerastii*, можно объяснить токсическим действием ибупрофена, которое выражается в ингибировании биосинтеза пигментов каротиноидов (Wijaya *et al.*, 2020). Агрегаты представляют собой плотные скопления клеток, окруженные полимерным собранным в тяжи внеклеточным матриксом (Рисунок 9Б). Аналогичные структуры наблюдали другие исследователи при росте грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* (Gilbertie *et al.*, 2019). В биотическом контроле в ответ на присутствие *н*-гексадекана наблюдали планктонный рост культуры. На 4–6 сут эксперимента по мере образования продуктов его окисления в процессе биодеструкции, исчерпания *н*-гексадекана в среде, и выхода бактерий на стационарную фазу роста, агрегация клеток усиливалась, сопровождаясь образованием ярко-оранжевых бактериальных “комков” размером до 15 мм. В биотическом контроле по мере потребления *н*-гексадекана на 5 сут эксперимента наблюдали образование яркоокрашенных мелких плотных агрегатов на фоне значительного количества одиночных клеток.



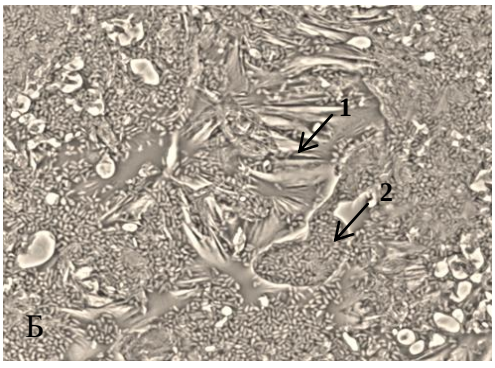


Рисунок 9 – **Агрегаты клеток, формирующиеся в среде культивирования *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии *н*-гексадекана и 100 мг/л ибупрофена на 3 сут эксперимента.** А – внешний вид культуральной среды; Б – увеличение ×1000 (фазовый контраст). 1 – тяжи; 2 – бактериальные клетки

Использование системы совмещенного атомно-силового и лазерного сканирующего микрокопирования позволило получить точные дифференцированные данные о размерных параметрах и особенностях рельефа живых и мертвых клеток актиномицетов в присутствии ибупрофена. Наиболее интересными оказались сведения о состоянии клеток на 4 сут эксперимента, что связано с активным процессом бактериальной деструкции ибупрофена и накоплением продуктов его деструкции в среде культивирования. В первые сутки эксперимента отмечалось выраженное увеличение среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности (Таблица 3).

На 4-е сут эксперимента клетки сильно изменяли свою форму за счет укорочения (в 1,5 раза) длины и увеличения (в 1,7 раз) ширины. При этом отмечалось значительное (в 1,7 раза) уменьшение соотношения площади поверхности клетки к ее объему (S/V), что, по-видимому, является механизмом защиты на присутствие в среде токсичных метаболитов ибупрофена. В это же время регистрировали снижение показателей степени шероховатости клеточной поверхности, открытой для прямого контакта с экострессором.

Таблица 3 – **Морфометрические параметры клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, выращенных в присутствии ибупрофена и *н*-гексадекана** (контроль)

Вариант	**Длина, мкм**	**Ширина, мкм**	**Объем, V, мкм^3**	**Площадь, S, мкм^2**	**S/V, мкм$^{-1}$**	**Шероховатость, нм**
1 сут						
Контроль	3,8±0,28	1,0±0,14	3,0±0,12	13,5±0,17	4,5±0,15	133,5±18,49
Ибупрофен 100 мг/л + *н*-гексадекан	3,2±0,21	1,1±0,09	3,0±0,10	13,0±0,09	4,3±0,11	169,6±25,54
4 сут						
Контроль	3,5±0,42	0,6±0,21	1,0±0,14	7,2±0,15	7,2±0,17	136,2±27,33
Ибупрофен 100 мг/л + *н*-гексадекан	2,4±0,57	1,0±0,13	1,7±0,09	7,5±0,10	4,2±0,05	121,6±36,17

С целью дальнейшего изучения влияния ибупрофена на клетки актиномицетов были получены данные сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Рисунок 10А,Б). Во всех случаях клетки были интактны, без выраженных внешних изменений из-за воздействия ибупрофена. Углубленный анализ ультраструктуры клеток актиномицетов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показал наличие электронно-прозрачных включений внутри клеток, предположительно липидных капель (Рисунок 10В).

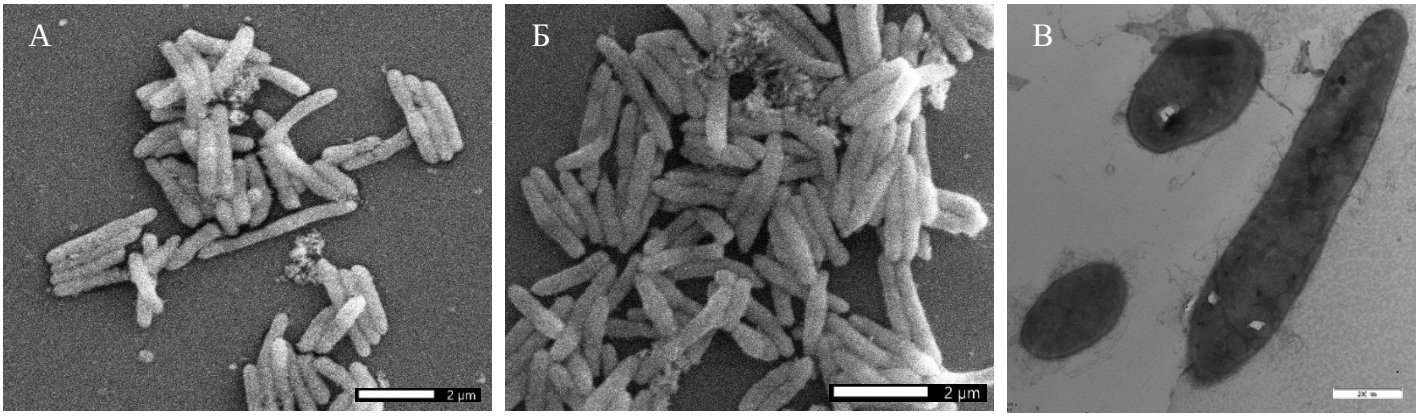


Рисунок 10 – **СЭМ** (А, Б) **и ПЭМ** (В) **изображения клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, выращенных в условиях МПБ в отсутствии** (А) **и в присутствии** (Б, В) **ибупрофена**

Для расширения представления о формировании адаптивных реакций *Rhodococcus* на присутствие ибупрофена фиксировали ζ-потенциал поверхности клеток. Изначальные значения электрокинетического потенциала клеточной поверхности клеток равнялись -25,1±1,4. На 4-е сут культивирования ζ-потенциал бактерий (-35,3±2,4) был значительно (на 10 единиц) ниже в сравнении с биотическим контролем (-25,5±0,7). Смещение ζ-потенциала в область более отрицательных

значений может свидетельствовать о защитном механизме клеток на присутствие более токсичных продуктов метаболизации ибупрофена. Известно, что увеличение отрицательных значений электрокинетического потенциала свидетельствует об усиленной клеточной агрегации бактериальных клеток в ответ на присутствие токсичного и устойчивого диклофенака (Ivshina *et al.*, 2019). В данном случае также отмечалась тенденция к образованию клеточных агрегатов.

Полученные данные о формировании обособленных клеточных агрегатов и смещении ζ-потенциала в область более отрицательных значений рассматриваются нами в качестве механизмов адаптации актиномицетов и, как следствие, повышения их устойчивости к повреждающему воздействию ибупрофена.

Значимую роль антиоксидантных механизмах бактерий играет каталаза, которая является индикатором их способности к биодеструкции ксенобиотиков, в том числе фармполлютантов. Актиномицеты хорошо известны высокой каталазной активностью. По нашим данным, культивирование актиномицетов в присутствии ибупрофена приводило к изменению их каталазной активности (Рисунок 11).

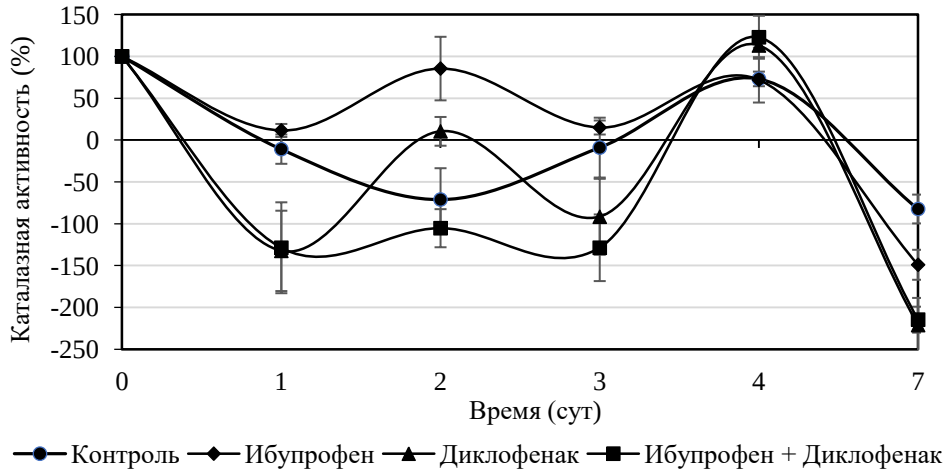


Рисунок 11 – **Каталазная активность *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии НПВС**

В течение первых суток во всех тестируемых вариантах наблюдалось снижение активности каталазы. Наиболее значимые изменения каталазной активности клеток наблюдались в присутствии диклофенака и смеси НПВС. Снижение активности каталазы в данных условиях в течение первых 3 дней можно объяснить тем, что клетки дольше находятся в лаг-фазе роста. На 2-е сутки отмечалось повышение активности каталазы в присутствии НПВС, тогда как в контрольной группе активность фермента продолжала снижаться. Обратная картина наблюдалась на третий день. Увеличение активности каталазы в образцах с НПВС на 4-е сутки можно объяснить вступлением бактерий в фазу экспоненциального роста, активной деградацией НПВС и возможным накоплением метаболитов. Снижение активности каталазы во всех образцах биомассы на 7-е сутки, по всей вероятности, связано с переходом к стационарной фазе роста.

Заключение. В результате масштабного (190 штаммов) скрининга актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, http://www.iegmcol.ru) отобран штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243, характеризующийся наиболее высокой (МПК ≥ 1000 мг/л) резистентностью к ибупрофену. Данный штамм способен к полной биодеструкции ибупрофена в концентрации 100 мг/л в минеральной среде в присутствии *н*-гексадекана (0,1 об.%) и глюкозы (1 г/л) в течение 36 ч, причем к биодеструкции более чем 50% от начальной концентрации 100 мг/л ибупрофена за первые сутки эксперимента. Установлено, что в процессе окисления ибупрофена задействованы

цитоплазматические ферментные комплексы. В условиях лабораторного биореактора показано существенное снижение скорости биодеструкции ибупрофена, при этом уровень биодеструкции поллютанта находится в прямой зависимости от поглощения кислорода растущей биомассой. Под влиянием ибупрофена и его метаболитов наблюдался переход актиномицетов от одиночного состояния к агрегатному существованию, сопровождающийся выраженной морфологической аномалией клеток (изменение их формы и размеров, параметров шероховатости клеточной поверхности), смещением ζ-потенциала в область более отрицательных значений.

ВЫВОДЫ

1. С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, http://www.iegmcol.ru) показана способность бактерий рода *Rhodococcus* к биотрансформации ибупрофена. Обнаружены штаммы *R. cerastii, R. cercidiphyllii* и *R. erythropolis,* проявляющие в присутствии глюкозы и *н*-гексадекана выраженную активность в отношении фармполлютанта. Отобран наиболее устойчивый (МПК ≥ 1000 мг/л) штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243, способный в присутствии смеси *н*-гексадекана (0,1%) и глюкозы (1 г/л) при значении pH 6,5 минеральной среды к полной биодеструкции ибупрофена (100 мг/л) в течение 36 ч.

2. В результате кинетического моделирования результатов исследований определены доверительный интервал (35,11±0,56 ч) для константы скорости реакции, а также продолжительность (1,5 сут) течения процесса с заданной вероятностью.

3. Описаны пути метаболизации ибупрофена с использованием клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243. Среди продуктов биодеструкции идентифицированы 7-гидроксиибупрофен, 10-гидроксибупрофен, 7,10-дигидроксиибупрофен и их декарбоксилированные производные, обладающие выраженной токсичностью. Полученные данные свидетельствуют о химической устойчивости молекулы ибупрофена и потенциальной опасности данного экотоксиканта для естественных экосистем.

4. Выявлены наиболее характерные адаптивные реакции бактериальных клеток на повреждающее воздействие ибупрофена: снижение скорости роста клеток, искажение их морфометрических параметров, изменение ζ-потенциала клеточной поверхности, активности каталаз, формирование обособленных многоклеточных агрегатов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз:

1. **Бажутин** Г.А., Тюмина Е.А., Селянинов А.А., Вихарева Е.В. Интенсификация процесса биодеструкции ибупрофена с использованием факторного анализа и кинетического моделирования // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2023. – Вып. 4. – С. 328–336. DOI: 10.17072/1994-9952-2023-4-328-336. (ВАК)

2. Tyumina E., **Bazhutin** G., Kostrikina N., Sorokin V., Mulyukin A., Ivshina I. Phenotypic and metabolic adaptations of *Rhodococcus cerastii* strain IEGM 1243 to separate and combined effects of diclofenac and ibuprofen // Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – Article 1275553. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1275553. (Scopus, WoS, IF 4,0. Q1).

3. 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 // Frontiers in Microbiology. – 2022. – V. 13. – Article 967127. DOI: 10.3389/fmicb.2022.967127. (Scopus, WoS, IF 4,0. Q1).

4. Ivshina I., **Bazhutin** G., Polygalov M., Subbotina M., Tyumina E., Tyan S. Cellular modifications of *Rhodococci* exposed to separate and combined effects of pharmaceutical pollutants // Microorganisms. – 2022. – V. 10, No. 6. – Article 1101. DOI: 10.3390/microorganisms10061101. (Scopus, WoS, IF4,1. Q2).

5. Ivshina I.B., Tyumina E.A., **Bazhutin** G.A., Polygalov M.A., Krivoruchko A.V. Draft genome sequence of a ketoprofen degrader, *Rhodococcus erythropolis* IEGM 746 // Microbiology Resource Announcements. – 2022. – V. 11, No. 12. – Article e01070-22. DOI: 10.1128/mra.01070-22 (Scopus, WoS, Q3).

6. 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, No. 11. – Article e0260032. DOI: 10.1371/journal.pone.0260032. (Scopus, WoS, Q1).

7. Тюмина Е.А., **Бажутин** Г.А., Картагена Гомез А.д.П., Ившина И.Б. Нестероидные противовоспалительные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей // Микробиология. – 2020. – Т. 89, № 2. – С. 152–168 (ВАК).

Переводная версия: Tyumina, E.A., **Bazhutin**, G.A., Cartagena Gómez, A.d.P., Ivshina I.B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as emerging contaminants // Microbiology. – 2020. – V. 89. – P. 148–163. DOI: 10.1134/S0026261720020125. (Scopus, WoS IF 1,3. Q4).

Патенты:

Патент РФ 2762007. Ившина И.Б., Тюмина Е.А., **Бажутин** Г.А., Вихарева Е.В. Биодеструктор ибупрофена. Приоритет изобр. от 25.05.2021. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 14.12.2021. Бюл. № 35. Патентообладатель: ПФИЦ УрО РАН.

Публикации в других журналах и сборниках:

1. 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 // Журнал аналитической химии. – 2023. – Т. 78, № 2. – С. 187–192. DOI: 10.31857/S0044450223010140.

2. 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 // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2022. – Т. 71, № 11. – С. 2358–2364.

3. **Bazhutin** G.A., Polygalov M.A., Tyumina E.A., Tyan S.M., Ivshina I.B. Cometabolic bioconversion of ketoprofen by *Rhodococcus erythropolis* IEGM 746 // Lecture Notes in Networks and Systems. – 2022. – V. 342 LNNS. – P. 404–410. DOI: 10.1007/978-3-030-89477-1_40.

4. Tyumia E.A., **Bazhutin** G.A., Ivshina I.B. Cell adaptations of rhodococci to pharmaceutical pollutants // KnE Life Sciences. – 2022. – P. 443–455. DOI: 10.18502/kls.v7i1.10154.

5. **Бажутин** Г.А., Тюмина Е.А., Ившина И.Б. Адаптация родококков к токсическому воздействию фармполлютанта ибупрофена // Тезисы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 28 февраля – 06 марта 2022). – С. 228–230.

6. **Bazhutin** G.A., Tymina E.A., Subbotina M.V., Tyan S.M. Biotransformation of ibuprofen and meloxicam by *Rhodococcus cerastii* IEGM 1243 and *Gordonia amicalis* IEGM 1277 cells // Материалы Всероссийской научно-практической конференции (с международным участием) «Химия. Экология. Урбанистика» (Пермь, 28–29 апреля 2022). – Vol. 2. – P. 199–202.

7. Ившина И.Б., Тюмина Е.А., **Бажутин** Г.А., Полыгалов М.А., Вихарева Е.В. Механизмы защиты и адаптации стресс-толерантных родококков при повреждающих воздействиях экополлютантов // В кн.: Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Минск: «Белоруская навука», 2021. – Т. 13. – С. 329–347.

8. **Бажутин** Г.А., Тюмина Е.А., Ившина И.Б. Респираторная активность *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 в процессе биотрансформации ибупрофена // Сборник XVI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии – 2021» (Гродно, 22–24 сентября 2021) – С. 192.

9. Ившина И.Б., Тюмина Е.А., **Бажутин** Г.А., Селянинов А. А., Вихарева Е.В. Механизм бактериальной конверсии и деградации фармполлютантов группы нестероидных противовоспалительных средств // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2020. – Т. 3. – С. 6–22. DOI: 10.7242/2658-705X/2020.3.1.

10. **Бажутин** Г.А., Тюмина Е. А., Ившина И.Б. Биотрансформация ибупрофена клетками *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2020» (Пермь, 28–30 сентября 2020). – С. 42–47.

Бажутин Григорий Андреевич

БИОДЕСТРУКЦИЯ ИБУПРОФЕНА АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА *RHODOCOCCUS*

1.5.11. 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