

Голышева Анастасия Анатольевна

**МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ПОЧВЕННЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ
РОДА *RHODOCOCCLUS* К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ
ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ПРИМЕРЕ МОЛИБДЕНА И РТУТИ**

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2026

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:

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.

Турковская Ольга Викторовна, доктор биологических наук, заслуженный деятель науки Российской Федерации, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук».

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (42008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18).

Защита состоится «17» декабря 2026 г. в 12.00 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, г. 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, д. 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<https://permisc.ru>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Интенсивное развитие металлургической, химической и горнодобывающей промышленности привело к масштабному накоплению отходов, содержащих тяжелые металлы (ТМ). Современные источники загрязнения становятся все более биодоступными, что сопряжено с повышенной подвижностью токсичных ионов и их биомагнификацией на различных уровнях трофических цепей. ТМ относятся к числу наиболее распространенных эмерджентных экополлютантов, особенно в регионах с продолжительной индустриальной историей (Tchounwou *et al.*, 2012). Источниками опасных металлических эмиссий в биосферу выступают практически все отраслевые комплексы – от металлургии до агропромышленного сектора (Ondrasek *et al.*, 2025). Согласно данным современного экомониторинга, техногенный перенос ТМ затрагивает даже удаленные заповедные территории (He *et al.*, 2023). Среди широкого спектра ТМ особый экотоксикологический статус имеет ртуть (Hg) – глобальный приоритетный поллютант первого класса опасности. Чрезвычайно высокая токсичность, способность к биомагнификации в виде нейротоксичной метилртути, а также масштабные выбросы от химических (хлорщелочных) производств и горнодобывающей отрасли делают проблему демеркуризации критически важной на международном уровне, что законодательно закреплено Минаматской конвенцией (AMAP/UN Environment, 2019; Priyadarshane *et al.*, 2022). Контрастным примером экополлютанта выступает молибден (Mo) – переходный металл, существующий в водных средах преимущественно в форме оксианиона (молибдата). Будучи в наномолярных количествах эссенциальным кофакторным микроэлементом, в высоких концентрациях молибден индуцирует выраженный токсический стресс. Интенсивное использование молибдена в металлургии жаропрочных сплавов и нефтепереработке (в частности, накопление отработанных алюмокобальтмолибденовых катализаторов гидроочистки) приводит к его чрезвычайно опасному локальному накоплению в почвах и водоемах, что нарушает биогеохимическое равновесие аборигенной микрофлоры (Боярко, Хатьков, 2021; Yakasai *et al.*, 2021).

Комплексное исследование механизмов адаптации микроорганизмов к столь различным по химической природе и биологическому действию стрессорам – тиоловому яду ртути и металлоидному оксианиону молибдену – имеет фундаментальное значение для понимания границ толерантности прокариотической клетки. Традиционные физико-химические подходы к детоксикации водной среды часто сопряжены со значительными энергетическими затратами, малоэффективны при субмикромольных концентрациях загрязнителей и приводят к образованию вторичных токсичных шламов. В этой связи приоритетным экологически безопасным, избирательным и экономически целесообразным направлением является биоремедиация с использованием метаболического потенциала металлоторерантных микроорганизмов, выработавших специализированные адаптивные механизмы выживания в экстремальных условиях среды (Yadav *et al.*, 2025).

Ведущее положение в загрязненных почвенных и водных эконишах занимают непатогенные актиномицеты, активно вовлекающиеся в нейтрализацию минеральных и органических токсикантов благодаря способности к деструкции углеводородных субстратов и биоаккумуляции ионов ТМ (Ившина и др., 2021; Ivshina *et al.*, 2024a). Актиномицеты проявляют высокую резистентность к ионам металлов, зависящую

от их таксономического статуса и источника углеродного питания, сохраняя физиологическую активность даже в присутствии высоких доз поллютантов, что определяет их перспективность для ремедиации сложных органоминеральных субстратов (Худокормов и др., 2012; Криворучко, 2021). Углеводородокисляющие актиномицеты способны синтезировать поверхностно-активные биосурфактанты, способствующие мобилизации гидрофобных углеводородов и десорбции металлов из техногенных матриц при минимальной экотоксичности по сравнению с традиционными химическими поверхностно-активными веществами, такими как додецилсульфат натрия, полиэтоксилированные алкилфенолы и полисорбаты, продукты распада которых отличаются персистентностью и высокой токсичностью для почвенной микрофлоры (Костина, Куюкина, Ившина, 2010; Костина и др., 2014; Raswa-Płociniczak *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2015). Механизмы защиты актиномицетов включают как внеклеточную преципитацию металлов с участием биополимеров клеточной стенки (сидерофоров, полисахаридов, белков), так и тонко регулируемые внутриклеточные ферментные каскады детоксикации (Широких, Ашихмина, 2022). Вместе с тем, сравнительные аспекты морфологической пластичности и наномеханических перестроек актиномицетов под действием контрастных элементов – высокотоксичного чужеродного ксенобиотика ртути(II) и эссенциального микроэлемента молибдена(VI), а также молекулярная архитектура контролирующих их хромосомных оперонов и кинетика процессов в проточных биореакторах оставались изученными фрагментарно.

Цель настоящей работы – оценка механизмов устойчивости нокардиоформных актиномицетов *Rhodococcus* и *Gordonia* к молибдену (MoO_4^{2-}) и ртути (Hg^{2+}), раскрытие структурно-функциональных и молекулярно-генетических механизмов их инактивации, разработка эффективных биокатализаторов процесса очистки имитированных многокомпонентных сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами.

Основные задачи исследования:

1. Оценить уровень резистентности коллекционных штаммов *Rhodococcus* и *Gordonia* к ионам молибдена и ртути на богатой органической и минеральной питательных средах. Отобрать штаммы, устойчивые к воздействию молибдена и ртути.
2. Исследовать механизмы адаптации бактериальных клеток на уровне их морфометрических аномалий к воздействию молибдена и ртути.
3. Изучить физиолого-биохимические и отдельные молекулярно-генетические механизмы металлоустойчивости, функционирующие у *Rhodococcus* и *Gordonia*.
4. Охарактеризовать организацию и экспрессию основных генов, кодирующих ферменты транспорта и детоксикации молибдена и ртути.
5. Выявить кинетические закономерности извлечения ионов MoO_4^{2-} и Hg^{2+} живыми и инактивированными бактериальными клетками с разграничением процессов биосорбции и биоаккумуляции тяжелых металлов.
6. Разработать эффективные биокатализаторы, оптимальные условия и технологическую схему процесса очистки многокомпонентных сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами.

Научная новизна. На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmc.ru>) впервые показана устойчивость актиномицетов *Rhodococcus* и *Gordonia* к молибдену и ртути. Отобраны наиболее устойчивые к ионам MoO_4^{2-} и Hg^{2+} штаммы, выделенные ранее из нефтезагрязненных почв и промышленных стоков и принадлежащие к трем экологически значимым таксонам *R. rhodochrous*, *R. ruber* и *G. rubripertincta*. Все исследованные штаммы актиномицетов проявляют наибольшую металлоустойчивость при росте в богатой органической среде (в 32 раза превышающую таковую при росте бактериальных клеток в минеральной среде). Использование метода адсорбционной иммобилизации клеток на твердых носителях повышает резистентность бактерий к ионам молибдена и ртути (до > 30 раз по сравнению с нативными клетками). Выявлена значительная разнонаправленность морфометрических и морфофизиологических реакций *Rhodococcus* и *Gordonia* в ответ на стрессовые воздействия молибдена и ртути, свидетельствующая о структурно-функциональной пластичности бактериальных клеток. Наиболее типичными реакциями актиномицетов на токсическое воздействие ртути являются выраженная фрагментация цитоплазмы, уменьшение степени шероховатости и размеров клеток (в 2,0 и 3,5 раза соответственно), а также нарушение структурной целостности клеточной стенки. Адаптивными реакциями бактериальных клеток на воздействие молибдена в повышенных концентрациях являются увеличение размеров и степени шероховатости клеток (в 1,5 и 1,8 раза соответственно), формирование обособленных клеточных конгломератов, а также появление дефектов в виде ячеистых утолщений клеточной стенки. Присутствие как молибдена, так и ртути сопровождалось изменением дзета-потенциала (электрокинетического потенциала) клеток, экранированием клеток экзополисахаридным матриксом, депонированием нейтральных липидов-протекторов внутри цитоплазмы, изменением антибиотикочувствительности клеток, а также критическим падением пула внутриклеточных ионов калия и натрия.

С использованием количественной цифровой ПЦР в присутствии ртути выявлено индуцированное повышение экспрессии гена *merA*, кодирующего НАДФН-зависимую редуктазу ртути(II), что свидетельствует о значимой роли данного фермента в восстановление ионов Hg^{2+} до металлической элементарной ртути Hg^0 . С использованием транскриптомного анализа документирован молекулярный ответ клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 на молибдатный стресс, реализуемый по механизму отрицательной обратной связи через селективную репрессию *mod*-оперона. Установлены различия в кинетике процесса поглощения ртути и молибдена актиномицетами. Извлечение молибдена клетками обусловлено процессами обратимого энергозависимого биоаккумулирования с последующим защитным эффлюксом до достижения плато. Извлечение ртути из среды обеспечивается сопряжением первичной пассивной биосорбции на клеточной стенке и ее необратимым восстановлением до металлической ртути. Процесс пассивной сорбции обоих ионов описывается кинетической моделью псевдовторого порядка.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные сведения расширяют представление о механизмах резистентности *Rhodococcus* и *Gordonia* к ионам молибдена и ртути и возможности их использования в качестве перспективных объектов для очистки промышленных сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами. Отобраны штаммы *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560, характеризующиеся способностью эффективно аккумулировать MoO_4^{2-} и Hg^{2+} из имитированных многокомпонентных сточных вод. Сведения о полных геномах *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (NZ_JAJNDG000000000.1) и *R. ruber* ИЭГМ 560 (NZ_JASHLB000000000.1) внесены в международную базу данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Штаммы *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560 по форме «патентное депонирование» переданы во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номерами Ас-2215 и Ас-2214 соответственно. Разработаны эффективные биокатализаторы, оптимальные условия и технологическая схема процесса очистки сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами. Разработанный способ извлечения ртути и молибдена из сточных вод с помощью устойчивых иммобилизованных биокатализаторов защищен Патентом 2818318 Российской Федерации. Результаты исследования используются в учебных курсах «Биоразнообразие и систематика микроорганизмов» и «Введение в биотехнологию» для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штаммах-биоинактиваторах молибдена и ртути внесена в открытую базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (<http://www.iegmc.ru/strains>).

Методология и методы исследования. Методологическую основу работы составил комплекс микробиологических, физико-химических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов. Анализ физиологических и ростовых характеристик штамма-инактиваторов ТМ проводили с использованием метода двукратных серийных разведений, высокочувствительной респирометрии, измерения электрокинетического потенциала, каталазной активности, солевой агрегации, определения чувствительности к антибиотикам. Микроскопические методы включали фазово-контрастную, флуоресцентную, атомно-силовую, конфокальную лазерную сканирующую, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию, а также рентгеновскую спектроскопию. Биоинформатический анализ геномов проводили на основании функциональных аннотаций с помощью сервера RAST. Оценку уровней экспрессии генов *mer*-оперона проводили при помощи цифровой ПЦР, экспрессию генов при молибдатном стрессе изучали с использованием транскриптомного анализа. Поиск кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов и сидерофоров в геномах штамма-биоинактиваторов осуществляли посредством геномного мининга на онлайн-платформе antiSMASH.

Положения, выносимые на защиту:

1. Коллекционные штаммы актиномицетов *Rhodococcus* и *Gordonia* проявляют выраженную таксоноспецифичную устойчивость к молибдену и ртути. Наибольшую металлоустойчивость актиномицеты проявляют при росте в богатой органической среде, превышающую таковую в 32 раза при росте в минеральной среде. Использование метода адсорбционной иммобилизации клеток на хвойных опилках повышает (в 30 и более раз) резистентность бактерий к ионам молибдена и ртути по сравнению с нативными клетками.

2. Наиболее типичные реакции клеток *Rhodococcus* и *Gordonia* на токсическое воздействие ртути: фрагментация цитоплазмы, уменьшение размеров клеток, снижение степени шероховатости клеточной оболочки, а также плазмоллиз и нарушение структурной целостности клеточной стенки. Адаптивные реакции клеток на присутствие молибдена: выраженное изменение рельефа клеток, увеличение их размеров, формирование многоклеточных конгломератов, а также появление дефектов в виде ячеистых утолщений клеточной стенки.

3. Механизмы устойчивости бактериальных клеток на воздействие Mo и Hg включают изменение дзета-потенциала, активацию экранирующего экзополисахаридного матрикса, повышение синтеза нейтральных липидов, изменение антибиотикочувствительности и критическое падение пула внутриклеточного калия и натрия, а также активацию каталазы при дозозависимой блокаде клеточного дыхания катионами ртути.

4. Процесс детоксикации ртути регулируется индуцибельным *mer*-опероном, экспрессия которого носит выраженный дозозависимый характер. Молекулярный ответ бактериальных клеток на молибдатный стресс реализуется по механизму отрицательной обратной связи через селективную репрессию *mod*-оперона.

5. Извлечение молибдена клетками *Rhodococcus* и *Gordonia* контролируется процессами обратимого энергозависимого биоаккумулирования с последующим защитным эффлюксом, тогда как удаление ртути обеспечивается сочетанием процессов первичной пассивной биосорбции клеточной стенкой и необратимой редукции металла.

6. Разработанные стабильные иммобилизованные биокатализаторы на основе металлоустойчивых штаммов *Gordonia* и *Rhodococcus* обеспечивают высокоэффективную детоксикацию шести типов многокомпонентных модельных сточных вод. Предложенная технологическая схема процесса очистки предусматривает использование колоночного проточного биореактора и обеспечивает 100%-е удаление Cd, Pb, Zn, Ni, Mo, As и 95%-ую очистку от Hg. Технологическим результатом является прирост эффективности очистки до 42% по сравнению с периодическим культивированием.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов проведенных исследований обеспечивается достаточным объемом экспериментальной выборки, многократной аналитической и биологической повторностью экспериментов. Надежность полученных данных обоснована применением комплекса современных молекулярно-генетических, физико-химических и микроскопических методов на базе сертифицированного оборудования центров коллективного пользования, а также применением корректных методов статистического анализа результатов. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных и всероссийских научных форумах: Международная юбилейная конференция «Микробиология: Вчера, Сегодня, Завтра», Казань, 2021; XIII Международная конференция ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2022», Пермь, 2022; II Всероссийская научная конференция «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания», Иркутск, 2022; IV Международный биотехнологический форум «BIOAsia Altai 2024», Барнаул, 2024; IV Пущинская школа-конференция молодых ученых «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие», Пущино, 2024; IV Пущинская школа-конференция молодых ученых «Генетические

технологии в микробиологии и микробное разнообразие», Пушкино, 2025; XXI Всероссийская научная конференция молодых ученых с международным участием «Экологическая безопасность в условиях антропогенной трансформации природной среды», Пермь, 2026; XIII Российский форум биотехнологий с международным участием «OpenBio-2026», Кольцово, 2026.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз, а также получен Патент на изобретение Российской Федерации.

Объем и структура научно-квалификационной работы. Научно-квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 212 страницах машинописного текста, включает 23 таблицы, 36 рисунков, 2 приложения. Список литературы содержит 167 источников, из них 37 отечественных и 130 зарубежных авторов.

Связь работы с научными программами и личный 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, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций (Соглашения № 075-15-2021-1051, 075-15-2025-485), Госзаданий Минобрнауки РФ (FSNF-2025-0013, 124020500028-4), гранта Российского научного фонда (18-14-00140), а также при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям по договору № 18214ГУ/2022 в рамках программы «УМНИК – 2022». Научные положения, выводы и практические рекомендации 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 просвечивающей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии с элементным картированием проводили на базе Центра коллективного пользования «Коллекция UNIQEM» (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.) Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочая коллекция бактериальных культур. В работе использовали 220 штаммов актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекции культур 285, реестровый номер УНУ 73559, ЦКП 780868, <http://www.iegmc.ru>), которые представлены следующими видами: *G. alkanivorans* (2 штамма), *G. amarae* (1 штамм), *G. amicalis* (2 штамма), *G. paraffinivorans* (1 штамм), *G. rubripertincta* (13 штаммов), *G. terrae* (3 штамма), *R. corynebacterioides* (2 штамма), *R. erythropolis* (49 штаммов), *R. fascians* (33 штамма), *R. jostii* (9 штаммов), *R. opacus* (15 штаммов), *R. oxybenzonivorans* (6 штаммов), *R. pyridinivorans* (3 штамма), *R. qingshengii* (5 штаммов), *R. rhodochrous* (8 штаммов), *R. ruber* (66 штаммов), *R. wratislaviensis* (1 штамм) и *R. yunnanensis* (1 штамм).

Условия культивирования. Бактериальные клетки, выращенные в течении 2-х сут на мясопептонном агаре (МПА) (HiMedia, Индия), ресуспендировали в 0,5% р-ре NaCl в соответствии со стандартом мутности БАК-5 (Ормет, Россия) и вносили в среду культивирования в концентрации 1,0 об.%. Определение количественной характеристики резистентности свободных клеток актиномицетов к молибдену и ртути проводили с использованием показателя минимальной подавляющей концентрации (МПК), используя метод двукратных серийных разведений (Performance Standards ... , 2017). В экспериментах использовали две среды: мясопептонный бульон (МПБ) и бедную минеральную среду “*Rhodococcus-surfactant*” (RS). В качестве единственного источника углерода и энергии в среде RS использовали *n*-гексадекан (C₁₆) в концентрации 3,0 об.%. Иммунологические планшеты инкубировали на шейкере Titramax 1000 (Heildolph-Instruments, Германия) при 28°C, 300 об/мин в течение 72 ч. Актиномицеты выращивали в условиях периодического культивирования в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на орбитальном шейкере (120–160 об/мин), при температуре 28°C в течение 24–48 ч в зависимости от условий проведения эксперимента. Физиологическое состояние бактериальных культур контролировали по изменению оптической плотности клеточной суспензии. Оптическую плотность (ОП₆₀₀) измеряли спектрофотометрически ($\lambda = 600$ нм) с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 UV/Vis (Perkin-Elmer, США).

Иммобилизация бактериальных клеток. При исследовании устойчивости и сорбционной активности иммобилизованных клеток в качестве носителя применяли не модифицированный адсорбент на основе древесных пород (хвойные опилки размером 1–3 мм). Культивирование бактериальных клеток осуществляли в МПБ и RS. Степень адсорбции бактериальных клеток на носителе оценивали с помощью спектрофотометра по разнице показателей оптической плотности клеточной суспензии до и после процесса иммобилизации на сорбент.

Минимальные подавляющие концентрации и жизнеспособность бактериальных клеток в присутствии ТМ качественно определяли специфическим окрашиванием бактерий с использованием соли тетразолия – 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенилтетразолиум хлорида (INT, Kuyukina *et al.*, 2006) по появлению INT-формаза, образующего кристаллы с ярко-красной флуоресценцией, а также количественно для детекции живых и мертвых бактериальных клеток бактериальную суспензию окрашивали двухкомпонентным флуоресцентным красителем LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США).

Микроскопические исследования. *Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия.* Визуализацию и измерение размеров клеток 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 $\times 1000$.

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

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС) с картированием элементов. Ультратонкие срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония). ПЭМ с ЭДС и картированием элементов выполняли на микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенный системой энергодисперсионного рентгеновского анализа (Inca Energy-350, Oxford Instruments, Великобритания). ЭДС-спектры и элементные карты получали с использованием программного обеспечения AZtec (Oxford Instruments, Великобритания).

Экзополисахариды детектировали с использованием флуоресцентного красителя Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich, Германия) с помощью оптического микроскопа.

Детекцию внутриклеточных липидных включений проводили путем окрашивания бактериальных клеток раствором красителя Nile Red (Nanjing Dulai Biotechnology Co., Китай) в ДМСО, как описано ранее (Mrunalini, Girisha, 2017) с дальнейшей визуализацией с помощью оптического микроскопа.

Гидрофобность клеточной поверхности определяли с помощью теста солевой агрегации (Salt Aggregation Test, SAT) по методу Lindahl и соавт. (1981) с модификациями, предложенными Mattos-Guaraldi и соавт. (1999). Агрегацию клеток оценивали визуально под световым микроскопом AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия).

Респираторная активность. Оценку количества (мкл) и скорости (мкл/час) поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа регистрировали с помощью высокочувствительного 10-канального респирометра непрямого цикла MicroOxymax® (Columbus Instruments, США). Параметры респираторной активности регистрировали автоматически каждые 24 мин в течение 7 сут.

Каталазную активность актиномицетов в присутствии ТМ определяли по методике, описанной в работе (Gogoleva *et al.*, 2012).

Определение электрокинетического потенциала проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZetaSizer v. 2.2.

Модуляцию антибиотикочувствительности под действием ТМ оценивали диско-диффузионным методом (CLSI M02, 2019) с использованием панели из 8 антибиотиков различных классов. Для выявления синергидных или антагонистических эффектов ТМ и исключения влияния ионной силы применяли соответствующие эквимоларные осмотические контроли.

Полногеномное секвенирование штаммов-инактиваторов ТМ проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием высокопроизводительной платформы Illumina NovaSeq (Illumina, США) и метода сборки генома SPAdes v. 3.14.1.

Молекулярно-генетические методы и транскриптомный анализ. Экстракцию ДНК и РНК осуществляли с использованием коммерческих наборов (Евроген, Россия). Учитывая наличие толстой гидрофобной клеточной стенки актиномицетов, усиленной экзополисахаридным матриксом в условиях металлостресса, предварительно проводили разрушение клеток по оптимизированному и валидированному нами протоколу (Krivoruchko *et al.*, 2026*). Концентрацию, чистоту и целостность нуклеиновых кислот оценивали методами флуориметрии, микрообъемной спектрофотометрии и горизонтального электрофореза. Дизайн видоспецифичных праймеров и TaqMan-зондов выполняли с помощью алгоритмов NCBI Primer-BLAST и Gemi v1.5.0. Аннотацию геномов (RAST v2.0), поиск детерминант металлорезистентности и кластеров вторичных метаболитов (Blin *et al.*, 2021) проводили алгоритмами, адаптированными для экстремально GC-богатых геномов (Siegl *et al.*, 2013; Di Salvo *et al.*, 2018). Генетическую локализацию целевых локусов верифицировали лабораторным скринингом внехромосомной ДНК с последующим биоинформатическим поиском плазмидных репликонов (PlasmidFinder 2.1) и анализом синтении фланкирующих областей (SimpleSynteny, NCBI Graphics). Филогенетическую реконструкцию целевых белков (ртуть-редуктаз) осуществляли методом максимального правдоподобия в программе MEGA 11 с оценкой достоверности топологии ветвей с помощью бутстреп-анализа. Детекцию целевых генов резистентности проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Количественный анализ целевых генов (*merA* и *merB*) при воздействии ртути выполняли методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) на биочипах на термоциклере RainSure SG-2000 (Suzhou PreciGenome Co., Ltd., Китай). Профилирование дифференциальной экспрессии генов в ответ на молибдатный стресс осуществляли методом транскриптомного анализа RNA-seq (Illumina NovaSeq, пакет DESeq2, CeGaT GmbH).

Изучение механизма поглощения молибдена и ртути бактериальными клетками. Динамику и механизмы поглощения металлов (активную биоаккумуляцию и пассивную биосорбцию) оценивали в сравнительных экспериментах с интактными и инактивированными автоклавированием бактериальными клетками. Остаточную концентрацию ионов ТМ определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии с зеемановской коррекцией на спектрометре МГА-1000 (Люмэкс, Санкт-Петербург). Кинетику процессов аппроксимировали с использованием математических моделей псевдопервого (модель Лагергрена) и псевдовторого (модель Хо и Маккея) порядков.

Моделирование процессов очистки промышленных сточных вод. Технологический потенциал актиномицетов, иммобилизованных на носителе (в виде монокультур и консорциума), оценивали на 6 типах искусственных многокомпонентных сточных вод (СВ № 1–6), имитирующих реальные неорганические стоки металлургических и химических предприятий. Эффективность извлечения металлов сравнивали в двух типах установок: проточном колонном биореакторе и биореакторе с перемешиванием. Процесс водоочистки проводили в течение 7 сут

* Здесь и далее – ссылка на публикации по теме диссертации

без внесения экзогенных источников углерода и азота. Остаточную концентрацию экополютантов анализировали на атомно-абсорбционном спектрометре с зеемановской коррекцией МГА-1000 (Люмэкс, Санкт-Петербург). Сохранение жизнеспособности и высокой метаболической активности биокатализатора по завершении рабочего цикла подтверждали колориметрическим тестом с индикатором INT.

Статистическая обработка данных. Оценку достоверности результатов проводили методами параметрической (t -критерий Стьюдента) и непараметрической (критерии Уилкоксона и Фридмана) статистики в зависимости от характера распределения выборки (критерий Шапиро–Уилка). Первичный сбор и табличную структуризацию данных выполняли в программе Excel 2016 (Microsoft Inc., США). Математическую обработку больших массивов фенотипических данных, нелинейную аппроксимацию кинетических параметров и визуализацию результатов выполняли с использованием скриптов на языке Python 3.14. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение устойчивости свободных и иммобилизованных актиномицетов к ТМ. В результате скрининга 220 коллекционных штаммов нокардиоформных актиномицетов установлена их высокая таксоноспецифическая толерантность к ТМ. Наряду с *Rhodococcus*, в финальную выборку в качестве референтных и контрастных объектов были включены представители близкородственного рода *Gordonia*. Их отбор обоснован лидирующими показателями выживаемости в бедных минеральных средах и необходимостью межродового сравнения механизмов адаптации. Отбор конкретных штаммов для углубленного анализа проводили с учетом максимального уровня их толерантности и интенсивности синтеза каротиноидных пигментов, выступающих одним из факторов антиоксидантной защиты (Saubenova *et al.*, 2024). Исследованные штаммы проявляли способность к росту на органической и минеральной питательных средах. Жизнеспособность культур в присутствии хлорида ртути сохранялась в диапазоне концентраций от 0,0025 до 1,25 мМ хлорида ртути (эквивалентно 0,0005–0,2507 г/л Hg^{2+}). Устойчивость бактерий к гептамолибдату аммония варьировала в широком диапазоне – от 0,04 до 40,00 мМ (эквивалентно 0,027–26,90 г/л молибдена) (Ivshina *et al.*, 2024b*). По интегральным медианным показателям МПК исследованные виды образовали следующие ряды устойчивости к ионам Hg^{2+} и MoO_4^{2-} соответственно: *R. rhodochrous* > *R. ruber* > *G. rubripertincta* > *R. fascians* > *R. erythropolis* и *R. rhodochrous* > *R. ruber* > *G. rubripertincta* > *R. fascians* > *R. erythropolis*. Наибольшим биоремедиационным потенциалом обладали представители вида *R. rhodochrous*. Выявлено выраженное влияние состава среды на уровень металлотолерантности: в минеральной среде RS резистентность бактерий к молибдату снижалась в 2–8 раз, к ртути – до 32 раз по сравнению с органической средой, что связано со связыванием токсикантов белково-пептидными компонентами МПБ.

Для защиты клеток от токсического шока был применен метод адсорбционной иммобилизации бактериальных клеток на древесных опилках, степень адгезии достигала 88,7% (Голышева и др., Патент РФ 2818318, 2023*). Перевод культур в иммобилизованное состояние обеспечил формирование неспецифического защитного барьера, что привело к резкому скачку резистентности к ТМ: в среде МПБ МПК ртути

и молибдена возрастали до 31 и 8 раз, а в RS – до 16 и 4 раз соответственно по сравнению со свободными клетками (рисунок 1).

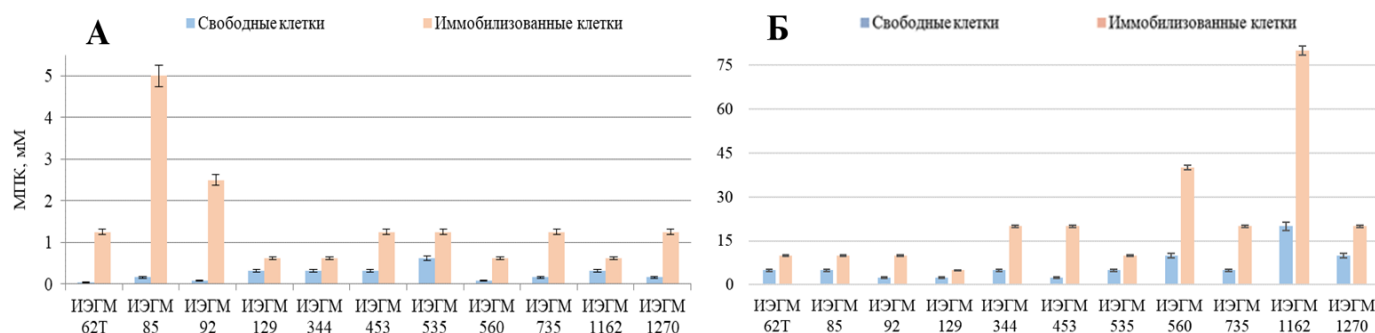


Рисунок 1 – Влияние адсорбционной иммобилизации на уровень устойчивости (МПК) актиномицетов к ионам ртути (А) и молибдена (Б) в среде МПБ (Голышева и др., Патент РФ 2818318, 2023*)

Изменение морфометрических характеристик и ультраструктуры клеток под воздействием металлов. С помощью комплекса методов (КЛСМ, АСМ, ПЭМ) и энергодисперсионного рентгеновского микроанализа выявлена значительная разнонаправленность морфометрических реакций актиномицетов при металлострессе. Воздействие сублетальных доз ртути индуцировало переход палочковидных форм в укороченные кокковидные с уменьшением длины клеток более чем в 3,5 раза (рисунок 2Б), снижение среднеквадратичной шероховатости поверхности в 2 раза, а также нарушение структурной целостности клеточной стенки. В цитоплазме клеток детектировались полифосфатные гранулы, липидные капли и мембранные микровезикулы (рисунок 3Б, В). Элементное картирование поврежденной фракции клеток в присутствии ртути подтвердило резкую утечку внутриклеточных ионов калия и натрия на фоне локального перераспределения фосфора и серы (рисунок 4). Ртуть детектировалась преимущественно дискретными сигналами во внеклеточном пространстве и на периферии клеток.

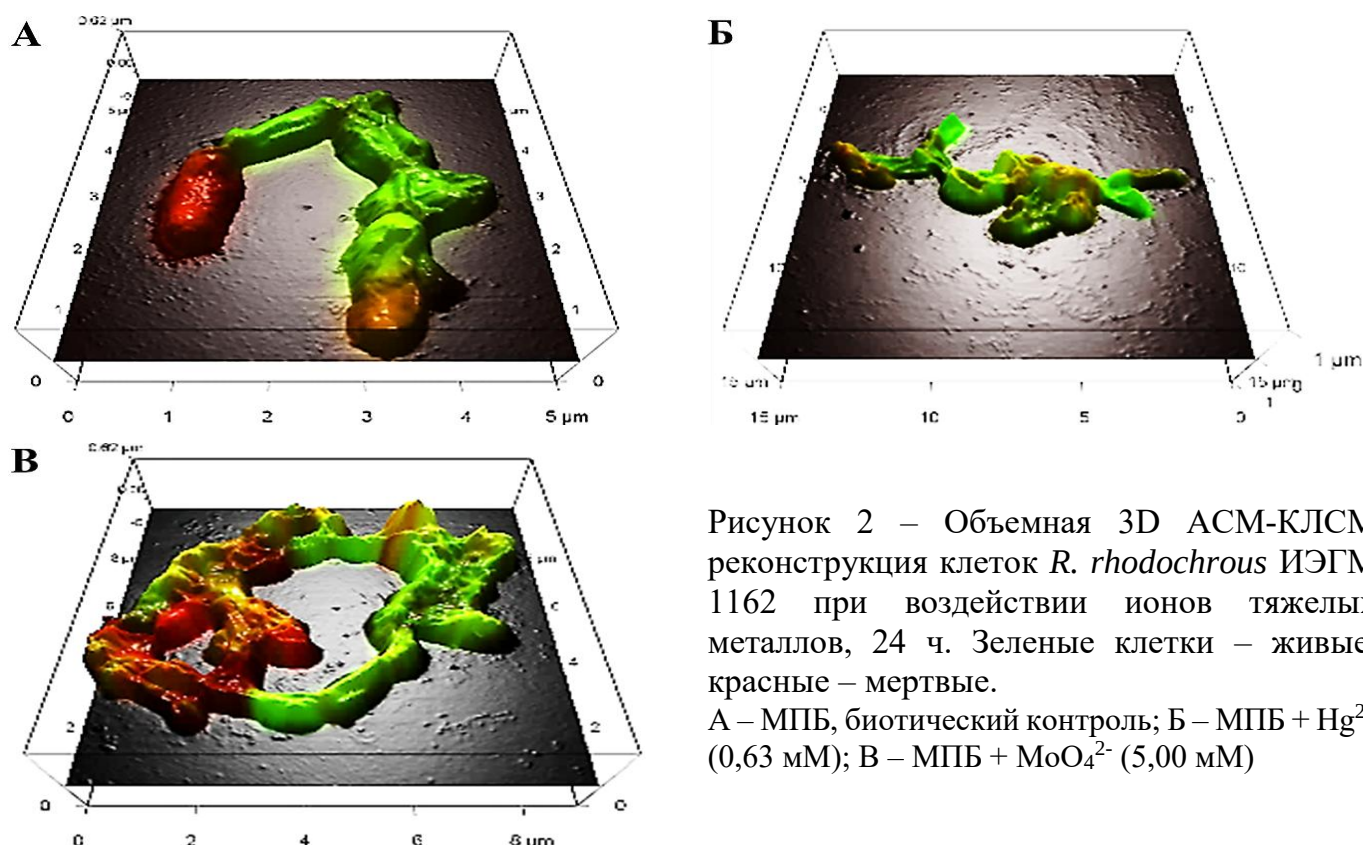


Рисунок 2 – Объемная 3D АСМ-КЛСМ реконструкция клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 при воздействии ионов тяжелых металлов, 24 ч. Зеленые клетки – живые, красные – мертвые.

А – МПБ, биотический контроль; Б – МПБ + Hg^{2+} (0,63 mM); В – МПБ + MoO_4^{2-} (5,00 mM)

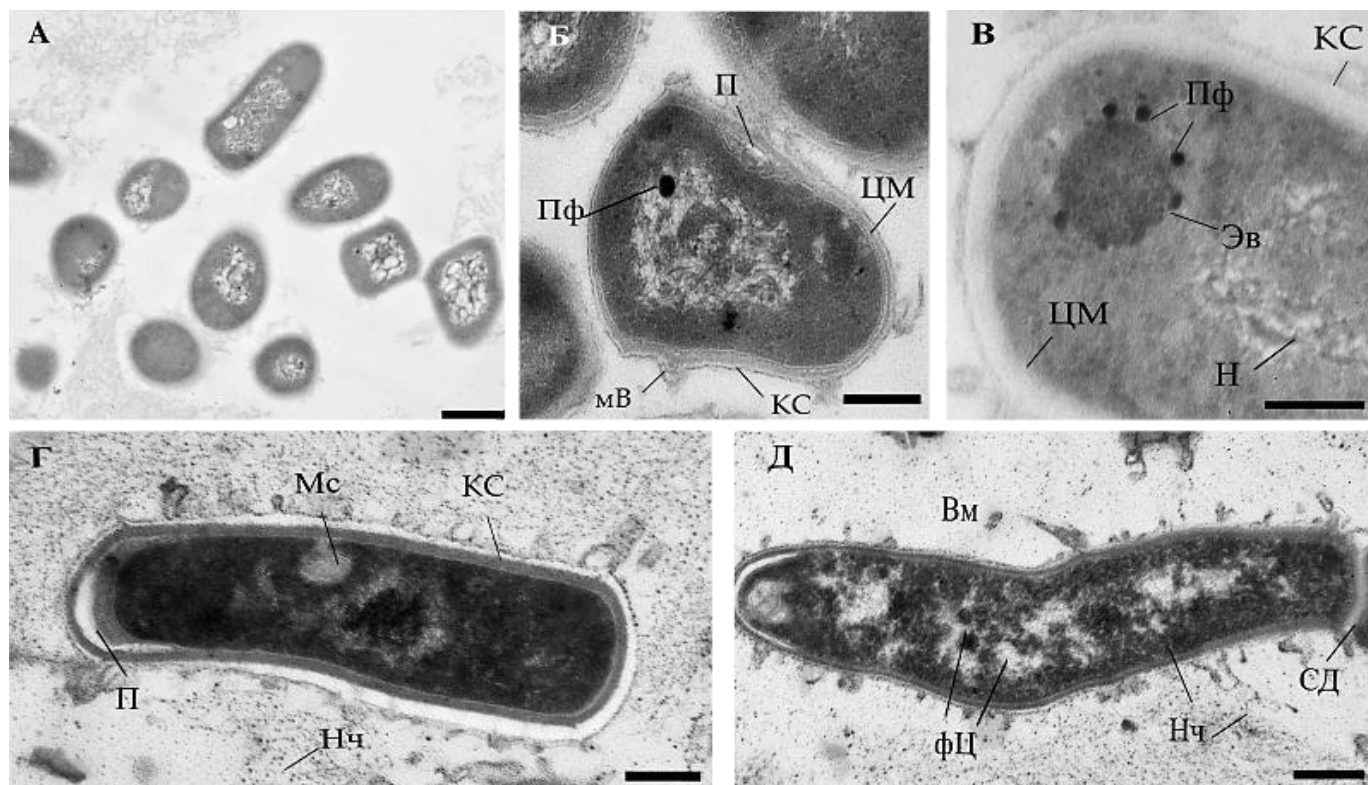


Рисунок 3 – ПЭМ изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 в присутствии ртути (Б–В) и молибдена (Г–Д) по сравнению с контролем (А). Масштаб: 500 нм (А); 200 нм (Б–Д).

КС – клеточная стенка; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; Пф – гранулы полифосфатов; СД – формирующаяся септа деления; Мс – мезосомоподобные структуры; Н – нуклеоид; Нч – наночастицы; Вм – внеклеточный матрикс; фЦ – фрагментация цитоплазмы; Эв – электронно-плотные включения; П – плазмоллиз; мВ – микровезикулы

Напротив, адаптивными реакциями бактериальных клеток на воздействие молибдат-ионов являлись увеличение размера (до 1,5 раз) и степени шероховатости клеток (до 1,8 раз), их объединение в обособленные клеточные конгломераты (рисунок 2В), а также появление дефектов в виде ячеистых утолщений клеточной стенки и формирование мезосомоподобных инвагинаций мембраны (рисунок 3Г, Д). В цитоплазме и экзополимерном матриксе обнаружены многочисленные электронно-плотные наноразмерные включения, вероятно, представляющие собой восстановленные формы молибдена. По данным элементного картирования (рисунок 4), утечка калия и натрия происходила только у поврежденной фракции клеток, тогда как плотные устойчивые клетки сохраняли нормальный электролитный баланс. Молибден ассоциировался с капсульным полисахаридным слоем и внешними наночастицами, что свидетельствует о биосорбционной и барьерной роли внеклеточного матрикса актиномицетов. Сходные морфологические перестройки и механизмы адаптации к молибдату были ранее доказаны нами при исследовании других представителей рода *Rhodococcus* (Ivshina *et al.*, 2024b*).

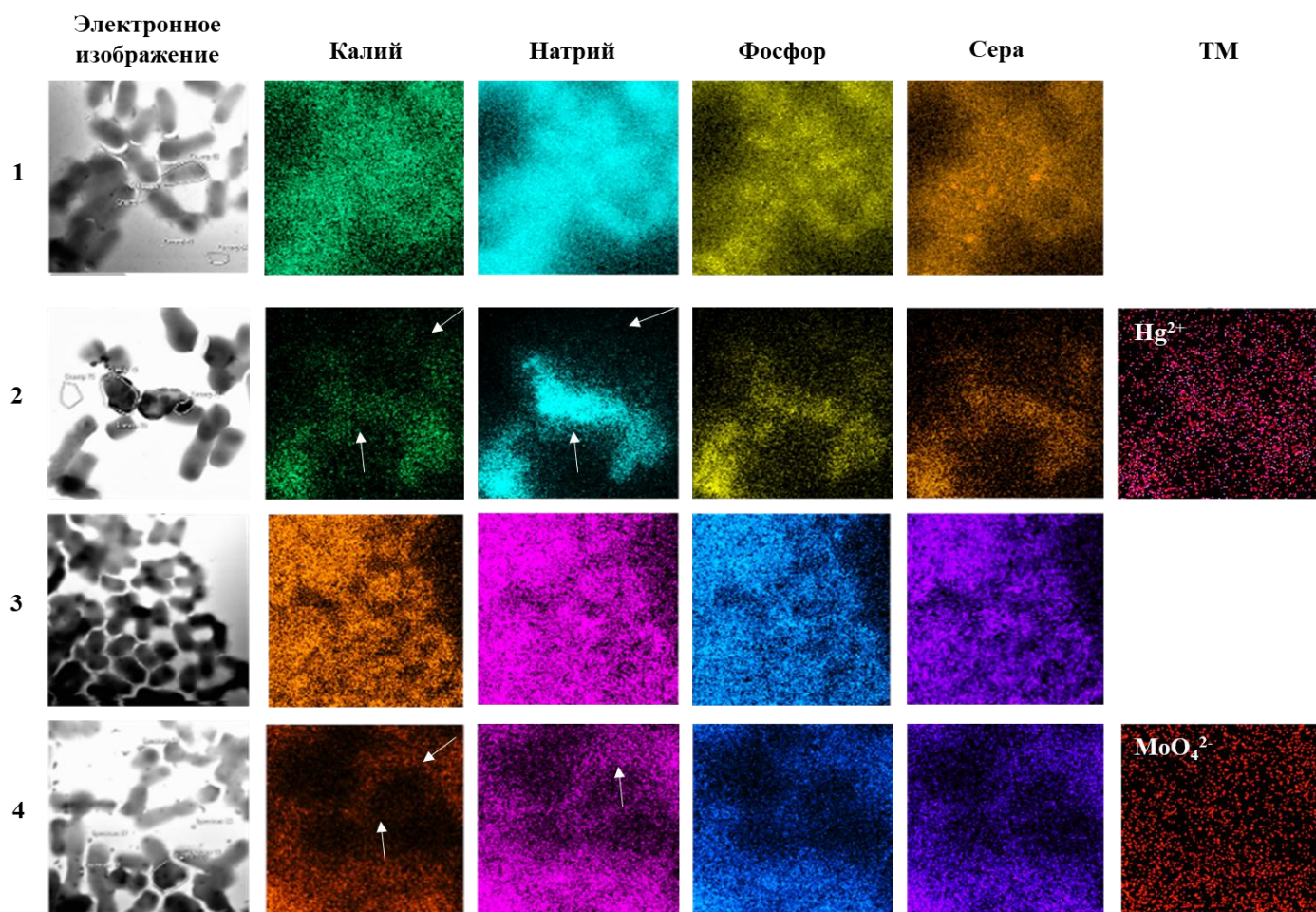


Рисунок 4 – Элементный состав клеток *R. ruber* ИЭГМ 560, определенный путем картирования элементов с помощью ЭДС. 1,3 – МПА, биотический контроль; 2 – МПА + Hg^{2+} (0,16 мМ); 4 – МПА + MoO_4^{2-} (1,25 мМ). Стрелкой обозначены клетки с выходом элементов (Ivshina et al., 2024b*)

Контрастные изменения микрорельефа обусловлены спецификой воздействия металлов. Сглаживание поверхности при ртутном стрессе связано с деструкцией миколового слоя и потерей тургора. Возрастание шероховатости под действием молибдена отражает адаптивную модификацию клеточной стенки: стимуляцию синтеза экзополимеров, липидов и осаждение электронно-плотных агрегатов металла. Однонаправленность этих реакций у *Rhodococcus* и *Gordonia* доказывает универсальный характер поверхностного ответа актиномицетов. Общим вектором адаптации к ТМ являлось утолщение клеточной стенки, усиление синтеза экзополимерного матрикса и внутриклеточных липидов. Анализ наномеханических характеристик выявил таксоноспецифичный ответ адгезивного потенциала. У *Rhodococcus* сила адгезии в присутствии обоих ТМ возрастала (до 2,3 раз) в кластерах, топографически ассоциированных с зонами синтеза экзополимеров, тогда как у *Gordonia* наблюдалось двукратное ингибирование адгезии вследствие дезорганизации поверхностного липофильного слоя.

Влияние металлов на физиолого-биохимические характеристики актиномицетов. Анализ физиолого-биохимических механизмов металлоустойчивости позволил выявить металл- и штамм-специфичные сдвиги электрокинетического потенциала клеточной поверхности. Установлено, что присутствие ртути в среде культивирования индуцирует сильное отрицательное смещение потенциала, тогда как

высокие дозы молибдена вызывают противоположный эффект, снижая электроотрицательность клеток (рисунок 5). Выявленные изменения коррелируют с результатами оценки гидрофобности и антибиотикочувствительности. Показано, что миколовый слой родококков сохраняет высокую структурную стабильность при металлострессе, в то время как клетки гордоний проявляют фенотипическую лабильность, деградируя и коагулируя даже в отсутствие высаливающего агента. Дестабилизация внешнего липофильного барьера обуславливала синергидное цитотоксическое действие ТМ и антимикробных препаратов, в результате чего у *Rhodococcus* наблюдалась выраженная генерализованная сенсibilизация к большинству протестированных антибиотиков, а у *Gordonia* кумулятивное действие токсикантов вызывало тотальный коллапс защитных систем и полное подавление роста.

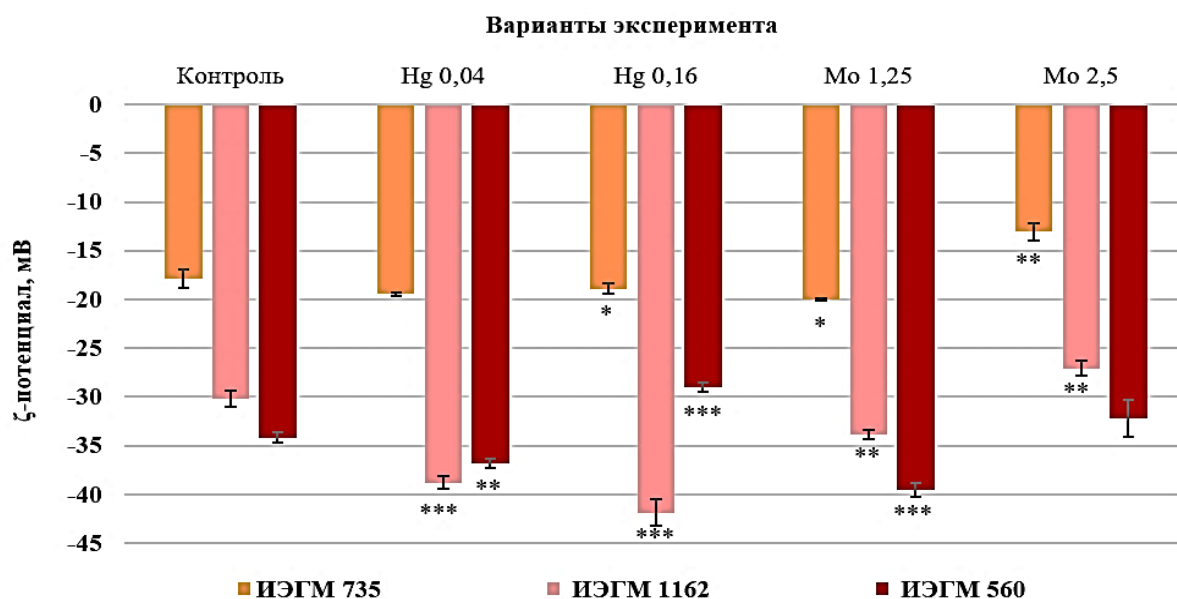


Рисунок 5 – Электрокинетический потенциал клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 и *R. ruber* ИЭГМ 560. $M \pm SD$, $n = 3$. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Учитывая, что параметры дыхательной активности в условиях молибдатного стресса были детально охарактеризованы нашим научным коллективом ранее (Ivshina *et al.*, 2024b*), в рамках данного этапа оценка катаболического статуса методом непрерывной микрореспирометрии была сфокусирована на изучении ртутного стресса. Полученные данные доказали резкое дозозависимое ингибирование дыхания (эмиссии CO_2) при воздействии ртути (рисунок 6). Воздействие концентрации 0,63 мМ $HgCl_2$ вызывало критическую блокаду электрон-транспортных цепей у исследованных штаммов. При этом биохимическая адаптация бактерий к индуцированному металлами окислительному стрессу сопровождалась фазовыми колебаниями активности ключевого антиоксидантного фермента – каталазы. Первоначальное резкое ингибирование ферментативной активности на начальных этапах культивирования сменялось ее выраженным компенсаторным ростом по мере адаптации популяции к токсиканту и перехода к экспоненциальной фазе роста, что отражает интенсивные энергозатраты клеток на нейтрализацию активных форм кислорода.

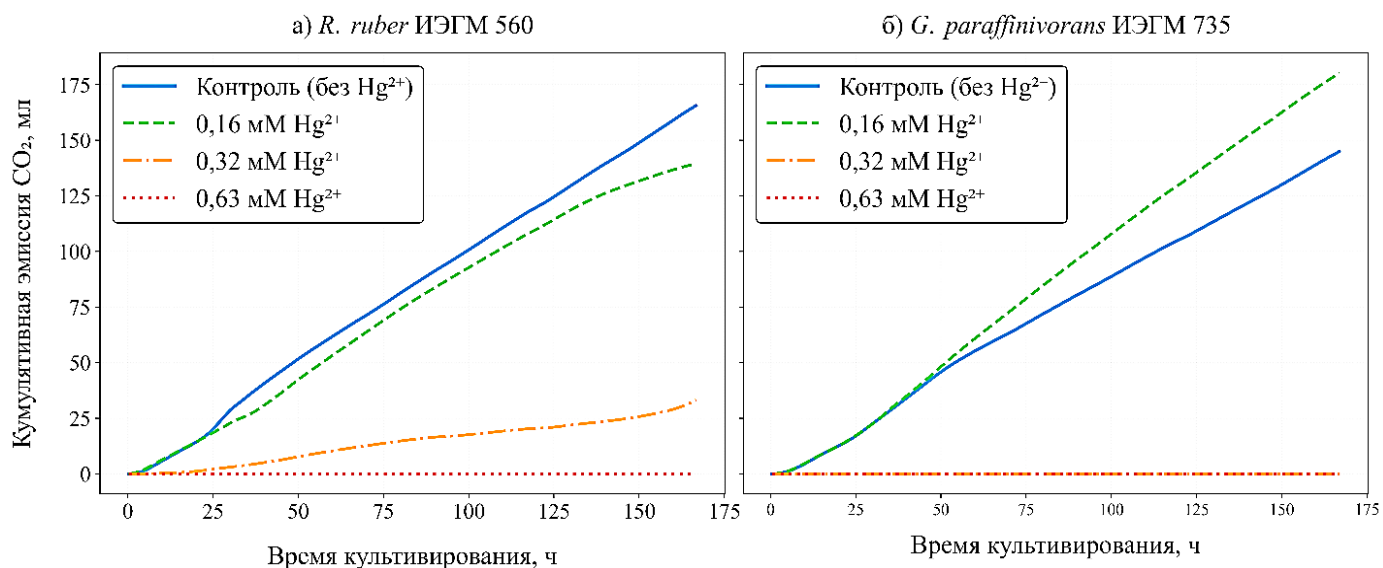


Рисунок 6 – Динамика кумулятивного выделения CO₂ клетками *R. ruber* ИЭГМ 560 (а) и *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (б) в среде МПБ в присутствии различных концентраций HgCl₂

Сопряженный флуоресцентный анализ подтвердил гетерогенность выживаемости популяций при металлострессе. Установлено, что на фоне гибели части клеток выжившая фракция активировала двухконтурный механизм неспецифической защиты (рисунки 7, 8).

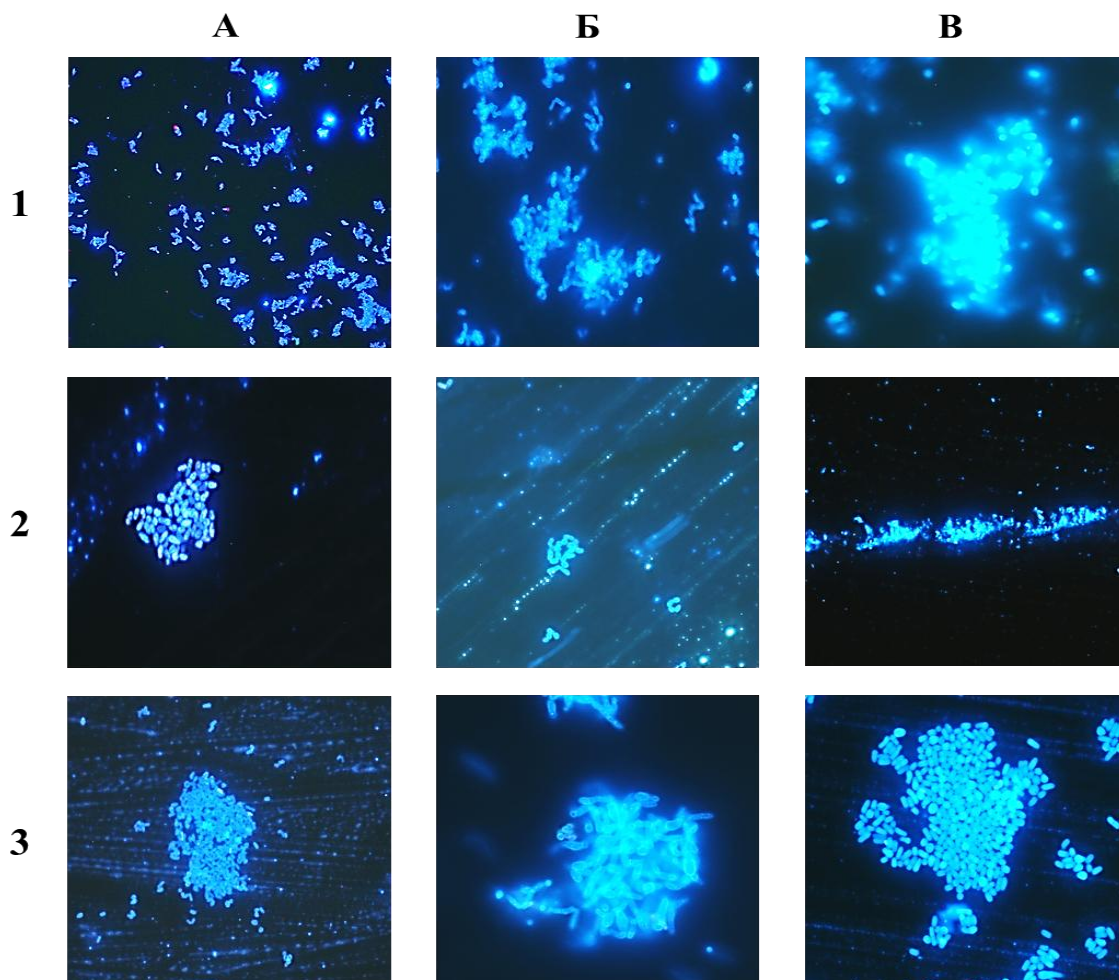


Рисунок 7 – Флуоресцентная микроскопия внеклеточных полисахаридов *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 (2) и *R. ruber* ИЭГМ 560 (3).

А – биотический контроль; Б – клетки в присутствии 0,32 mM HgCl₂; В – клетки в присутствии 2,5 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O

Установлено, что внешний контур защиты обеспечивается усиленным синтезом экзополисахаридного матрикса, оптически плотно экранирующего многоклеточные конгломераты при ртутном и молибдатном стрессе (рисунок 7Б, В) (Golysheva *et al.*, 2025*). Внутренняя стабилизация цитоплазмы и мембран реализуется за счет массивированного накопления нейтральных липидов (триацилглицеринов), выступающих в роли внутриклеточных протекторов и энергетических депо (рисунок 8).

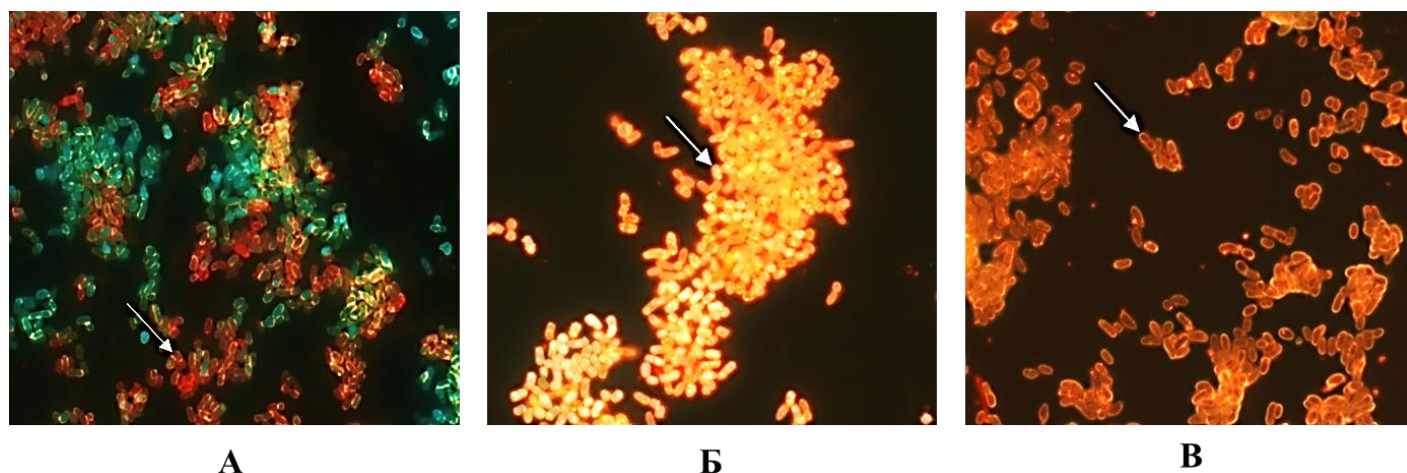


Рисунок 8 – Флуоресцентная микроскопия *R. ruber* ИЭГМ 560 в присутствии 0,32 мМ HgCl₂ (Б) и 2,5 мМ (NH₄)₆Mo₇O₂₄ • 4H₂O (В), А – биотический контроль. Стрелкой обозначены липидные включения

Молекулярно-генетическая организация систем металлоустойчивости и клеточной защиты. Полногеномное профилирование и биоинформатический анализ выявили интеграцию детерминант металлорезистентности в состав консервативных хромосомных островов (Golysheva *et al.*, 2026*). Отсутствие плазмидных репликонов (по результатам скрининга *in vitro* и *in silico*) гарантирует высокую эволюционную закрепленность и биотехнологическую стабильность защитных систем в промышленных условиях.

Центральным функциональным модулем детоксикации ртути выступает индуцибельный *mer*-оперон (рисунок 9А). Установлено, что штаммы широкого спектра устойчивости к ртути обладают классической полицистронной структурой, кодирующей как ртуть-редуктазу (*merA*), так и органортутную лиазу (*merB*), тогда как штаммы с узким спектром имеют редуцированную моноцистронную организацию (Golysheva *et al.*, 2025*). Абсолютный количественный анализ пула транскриптов, проведенный с использованием оптимизированного нами протокола выделения РНК (Krivoruchko *et al.*, 2026*), доказал функциональную состоятельность оперонов. Присутствие в среде Hg²⁺ вызывало мощную дозозависимую индукцию экспрессии генов *merA* и *merB* (до 361 раза относительно контроля) (рисунок 9Б). Молекулярная филогения фермента MerA выявила мозаичный характер формирования хромосомных островов и свидетельства межродового горизонтального переноса генов между *Rhodococcus* и *Gordonia*.

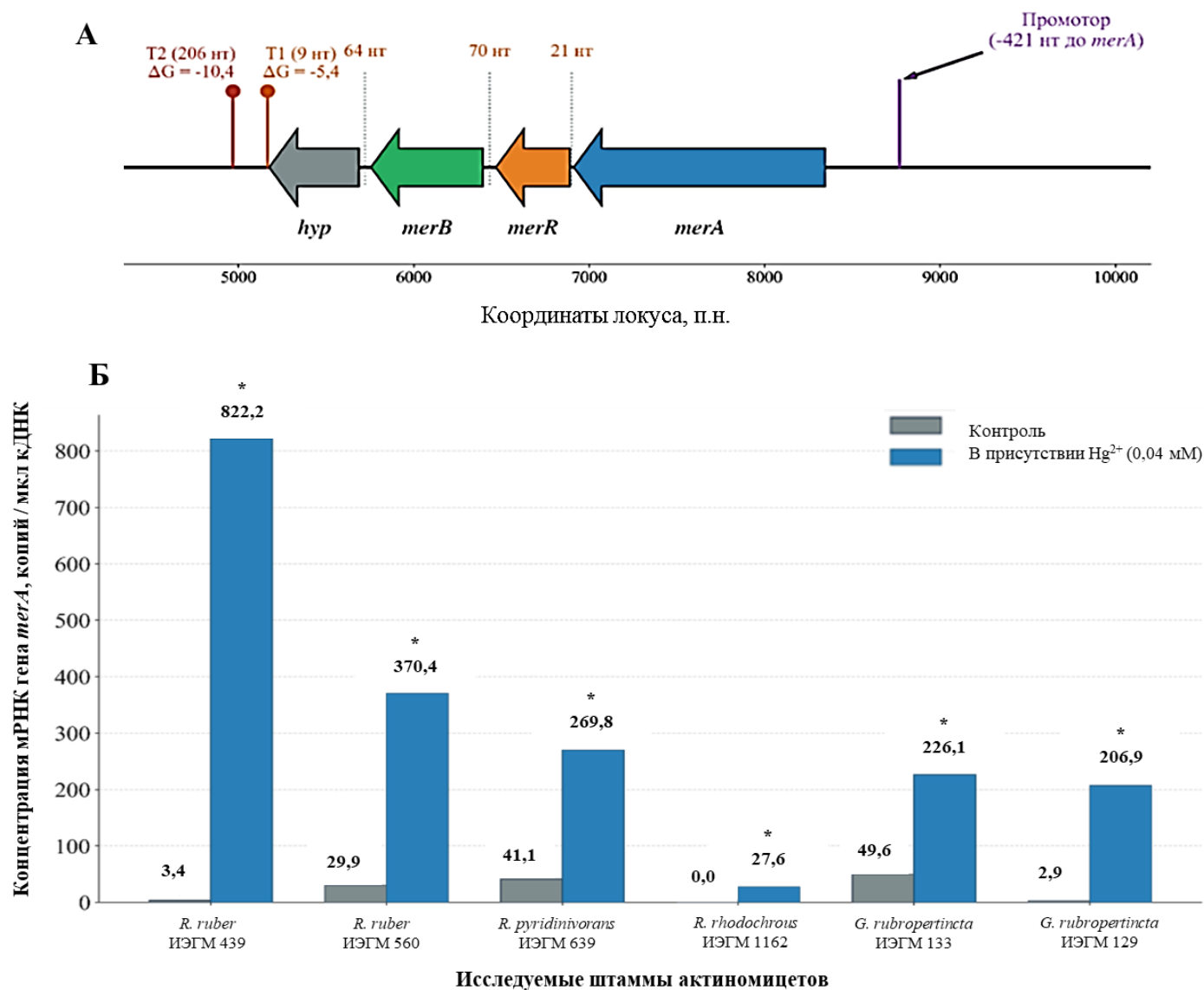


Рисунок 9 – Структурно-функциональная характеристика системы детоксикации ртути. А – *in silico* модель генетической организации *mer*-оперона у *R. ruber* ИЭГМ 560; Б – количественная оценка экспрессии гена *merA* у исследуемых штаммов при ртутном стрессе по данным цкПЦР

Установлено, что ранее аннотированные в геноме *R. ruber* гены системы импорта молибдена (*modB*, *modC*) и синтеза молибдоптеринового кофактора (MoCo) (Ivshina *et al.*, 2024b*), совместно с генами *modA* и *modE*, организованы в высококонсервативный четырехкомпонентный *mod*-оперон (рисунок 10А). Детальный биоинформатический анализ выявил, что данный оперон физически сопряжен с локусами ассимиляции азота. Анализ RNA-seq *R. ruber* ИЭГМ 560 при молибдатном стрессе выявил срабатывание защитного механизма отрицательной обратной связи: зафиксирована критическая репрессия гена *modC* (падение уровня экспрессии до 46 раз) на фоне индукции генов сборки MoCo (*moaCB*) и эффлюкс-помп (рисунок 10Б). Выключение каталитической помпы ModC блокирует энергозависимый перенос молибдата внутрь клетки, предотвращая токсический шок.

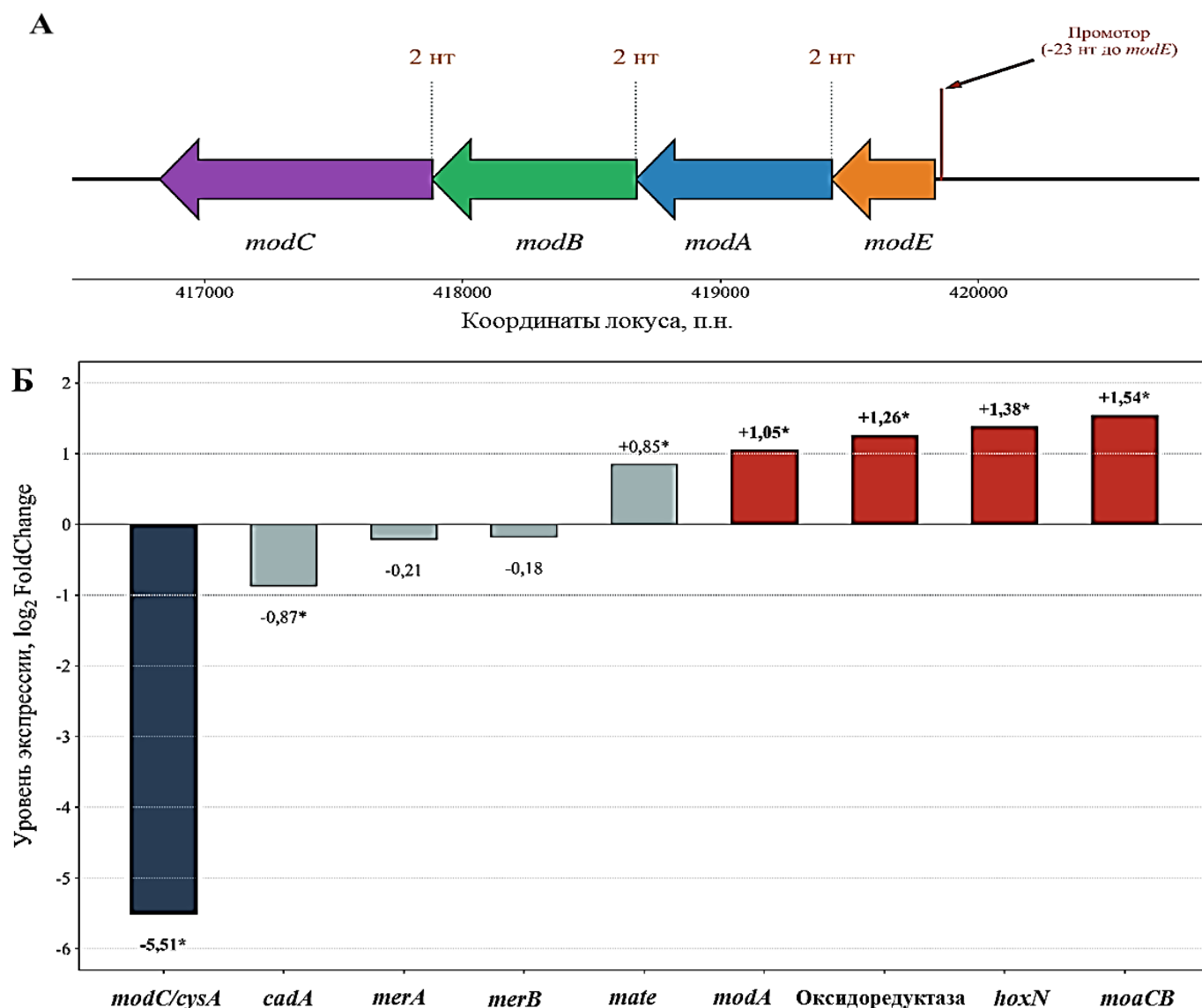


Рисунок 10 – Структурно-функциональная характеристика системы транспорта молибдена у *R. ruber* ИЭГМ 560.

А – *in silico* модель генетической организации *mod*-оперона; Б – профиль дифференциальной экспрессии генов по данным RNA-seq

Наряду со специфическими механизмами, полногеномный скрининг BGCs-кластеров выявил родоспецифичную дискриминацию альтернативных систем связывания металлов. У *Rhodococcus* верифицированы локусы гибридного металлофора гетеробактина, а у *Gordonia* – мадурастатина. Дополнительную неспецифическую защиту актиномицетам обеспечивают консервативные кластеры синтеза сорбционного биополимера ϵ -полилизина и осмопротектора эктоина (Golysheva *et al.*, 2026*).

Механизмы и кинетика аккумуляции тяжелых металлов актиномицетами. Для разграничения механизмов энергозависимого внутриклеточного биоаккумуляирования и пассивной поверхностной биосорбции проведена оценка сравнительной кинетики поглощения металлов интактными и термически инактивированными клетками родококков. Установлено, что извлечение молибдата живыми клетками носит пульсационный характер (Ivshina *et al.*, 2024b*), при котором стремительное поглощение токсиканта (до 83,0% к 6 ч) сменяется активным десорбционным эффлюксом, стабилизирующим удержание металла на уровне 24,9%

к 48 ч (рисунок 11). Подобный выброс выступает защитной гомеостатической реакцией на метаболическое пересыщение цитоплазмы. Пассивная сорбция молибдата мертвой биомассой оставалась минимальной (7,2–11,6%) вследствие электростатического отталкивания ионов MoO_4^{2-} от одноименно заряженной клеточной стенки. В противоположность этому, извлечение высокотоксичных ионов Hg^{2+} на начальном этапе (до 9 ч) протекало исключительно за счет пассивной сорбции, после чего у живой культуры регистрировался резкий скачок активности (извлечение до 32,0% к 48 ч), тогда как утилизация мертвой биомассой выходила на плато (рисунок 11Б). Наличие 9-часовой лаг-фазы отражает период адаптации, необходимый для индукции *mer*-оперона и запуска ферментативного восстановления катионов до летучей элементарной ртути (Golysheva *et al.*, 2025*).

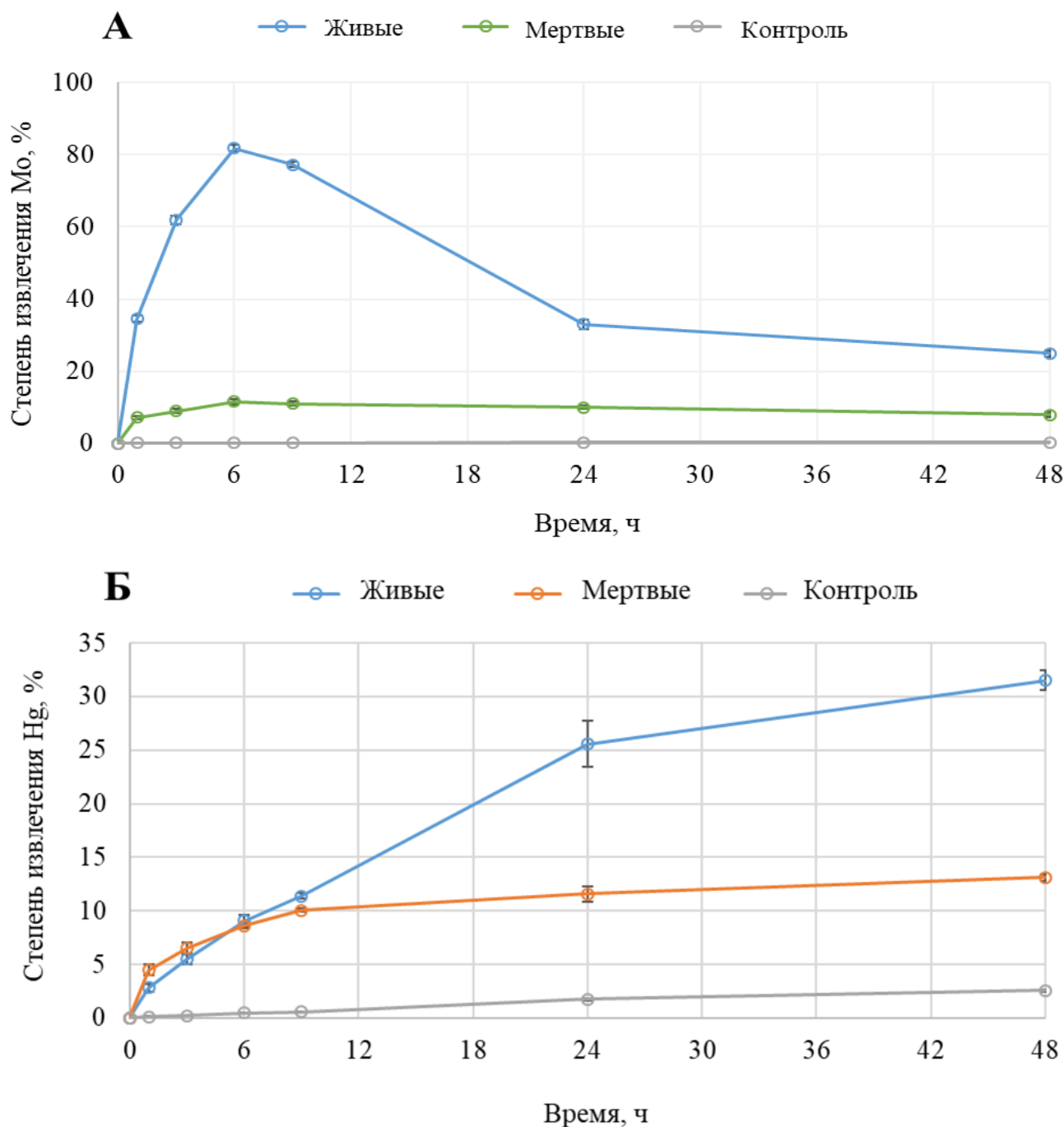


Рисунок 11 – Кинетика извлечения ионов молибдена (А) и ртути (Б) живыми и инактивированными клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162

Математическое моделирование показало, что процесс пассивной поверхностной биосорбции обоих металлов инактивированной биомассой с высокой достоверностью описывается кинетическим уравнением псевдвторого порядка по модели Хо и Маккея (таблица 1). Адекватность данной модели ($R^2 > 0,99$) доказывает, что скорость процесса лимитируется стадией хемосорбции с участием двух активных центров связывания. Расчетная константа скорости для ртути значительно превышала таковую для молибдена, что физико-химически подтверждает экстремальное сродство катионов Hg^{2+} к сульфгидрильным и аминным лигандам поверхностного биоматрикса актиномицетов.

Таблица 1 – Кинетические параметры сорбции ионов молибдена и ртути инактивированной биомассой *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162

Моделируемый процесс	Экспериментальная емкость q_e , мг/г	Модель псевдопервого порядка, R^2	Модель псевдвторого порядка, R^2
Биосорбция Hg^{2+}	8,45	0,912	0,996
Биосорбция MoO_4^{2-}	193,80	0,885	0,991

Конструирование бактериальных ассоциаций и практическая апробация биотехнологии очистки сточных вод. Закономерным итогом проведенного комплекса фундаментальных исследований стало конструирование четырех высокоэффективных металлоторерантных бактериальных ассоциаций, специфически подобранных под различный профиль загрязнений. Для создания запатентованного способа извлечения ртути и молибдена из сточных вод с помощью устойчивых иммобилизованных биокатализаторов (Голышева и др., Патент РФ 2818318, 2023*) был отобран универсальный бинарный консорциум на основе *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560. Он характеризуется высокой скоростью наращивания биомассы, эффективной адгезией на носитель и взаимно усиливающим эффектом детоксикации.

Апробация иммобилизованных биокатализаторов была успешно проведена на 6 типах многокомпонентных модельных сточных вод (СВ № 1–6). Консорциум ИЭГМ 735 и ИЭГМ 560 обеспечил эффективную очистку трех типов СВ. Три другие ассоциации прошли успешное тестирование каждая на одном специфическом типе стоков. В результате экспериментальной работы достигнута глубокая очистка имитированных СВ: Cd, Pb, Zn, Ni, Mo и As извлекались практически в полном объеме (до 99–100%), максимальное извлечение высокотоксичной ртути достигало 95,3%. Поддержание метаболизма бактерий в столь жестких условиях (подтвержденное колориметрическим INT-тестом после процесса очистки) обеспечивалось утилизацией ранее накопленных внутриклеточных липидных включений.

Сопоставление гидродинамических режимов доказало технологическое преимущество проточного колоночного биофильтра над периодическим реактором с перемешиванием (рисунок 12). В колоночном биореакторе зафиксирован достоверный прирост степени извлечения трудноудаляемых элементов: до +41,8% для марганца, +34,1% для меди и +25,8% для ртути. Преимущество проточной системы обусловлено отсутствием деструктивных сдвиговых нагрузок на экзополисахаридный матрикс биопленки и многократной рециркуляцией растворов через поры сорбента.

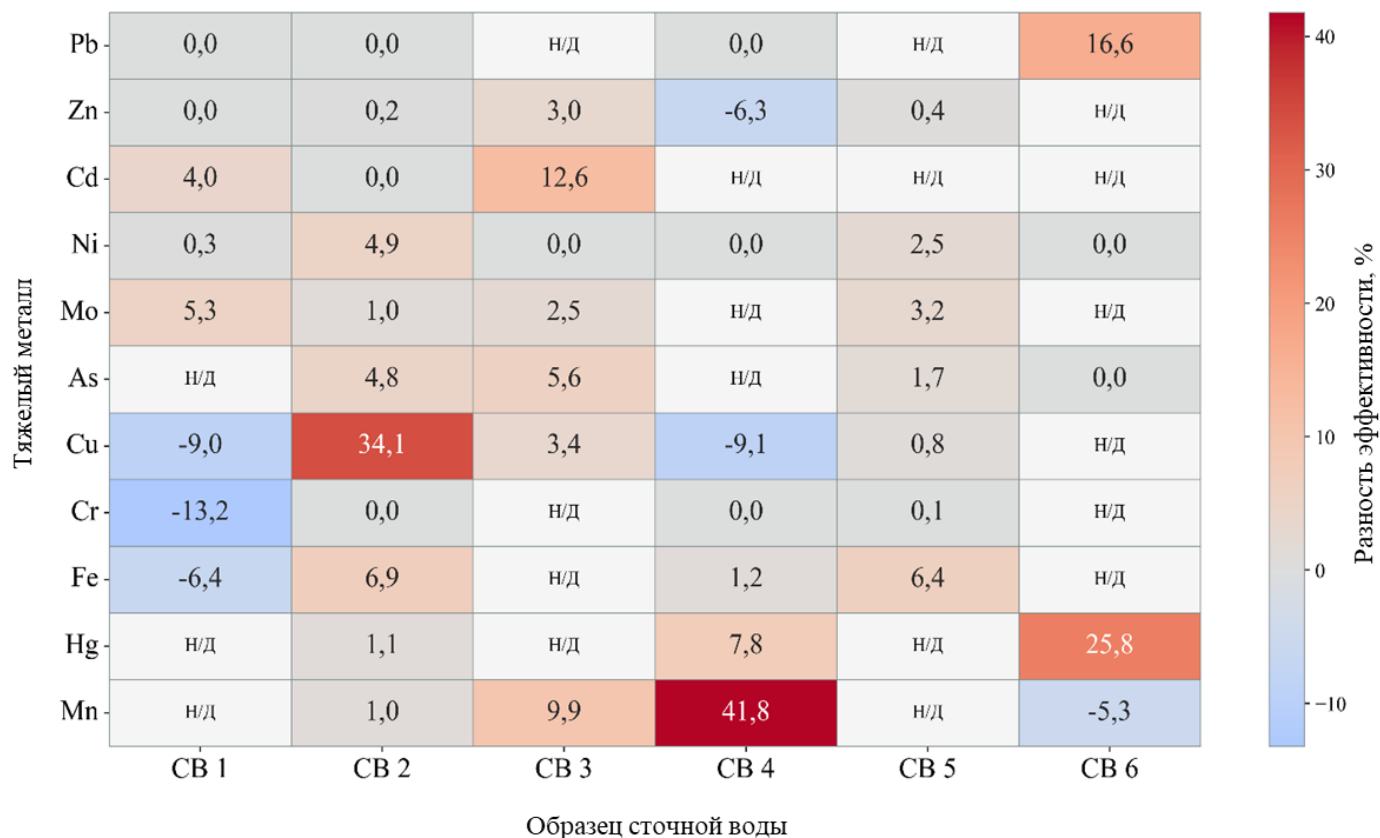


Рисунок 12 – Тепловая карта разности эффективности извлечения тяжелых металлов (ΔE , %) в проточном колоночном биореакторе по сравнению с реактором с перемешиванием. Н/Д – металл не входил в состав сточной воды. Красные оттенки соответствуют приросту очистки в проточной колонке

На базе полученных технологических и кинетических параметров предложена принципиальная 5-стадийная схема биоремедиации промышленных стоков (Голышева и др., Патент РФ 2818318, 2023*). Она включает: 1) предварительную физико-химическую коррекцию (pH 5,5–6,5); 2) формирование биокаталитического слоя; 3) проточную замкнутую биофильтрацию; 4) химическую регенерацию биосорбента слабыми кислотами или комплексонами для обеспечения 3–4 рабочих циклов; 5) финальную термическую минерализацию (озоление) отработанного носителя с утилизацией токсичных концентратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований экспериментально обоснована высокая эффективность использования нокардиоформных актиномицетов родов *Rhodococcus* и *Gordonia* в качестве биокатализаторов для глубокой очистки водных сред от тяжелых металлов. Раскрыт каскадный механизм адаптации бактерий к металлострессу. Установлено, что неспецифический физиологический ответ включает изменение наномеханических параметров клеточной стенки, защитный синтез экзополисахаридного матрикса и внутриклеточных липидных депо, а также контрастные морфологические перестройки. На молекулярно-генетическом уровне впервые детально охарактеризована хромосомная архитектура систем металлорезистентности. Доказано, что детоксикация ртути контролируется индуцибельным *mer*-опероном (фермент MerA), а гомеостаз молибдена регулируется

консервативным *mod*-опероном по механизму отрицательной обратной связи. Хромосомная локализация данных детерминант в составе островов мультиметаллорезистентности гарантирует их высокую биотехнологическую стабильность.

Практическая значимость фундаментальных результатов реализована в разработке иммобилизованного биопрепарата на основе бактериальных консорциумов и лигноцеллюлозных матриц (Голышева и др., Патент РФ 2818318, 2023*). Адсорбционная иммобилизация повысила толерантность клеток к экстремальным дозам металлов более чем в 30 раз. Апробация технологии в проточных колоночных биореакторах на модельных многокомпонентных стоках доказала ее высокую эффективность: достигнуто извлечение широкого спектра поллютантов (Cd, Pb, Zn, Ni, Mo, As, Hg) на уровне 95,3–100%, что удовлетворяет строгим нормативным требованиям ПДК. Перспективы дальнейших исследований связаны с масштабированием технологии проточной биофильтрации до опытно-промышленных испытаний на реальных объектах, изучением потенциала иммобилизованных актиномицетов для направленного биосинтеза металлических наночастиц, а также с конструированием сложных поливидовых консорциумов для сопряженной детоксикации тяжелых металлов и деструкции органических ксенобиотиков.

ВЫВОДЫ

1. Коллекционные штаммы актиномицетов *Rhodococcus* и *Gordonia* проявляют выраженную таксоноспецифичную устойчивость к молибдену (МПК от 0,04 до 40,0 мМ) и ртути (МПК от 0,0025 до 1,25 мМ). Наибольшую устойчивость к металлам бактериальные культуры проявляют при росте в богатой органической среде, превышающую в 32 раза таковую при росте в минеральной среде. Использование метода адсорбционной иммобилизации клеток на твердом носителе (хвойных опилках) повышает в 30 и более раз резистентность бактерий к ионам молибдена и ртути по сравнению с нативными клетками.

2. Выявлены наиболее типичные реакции клеток *Rhodococcus* и *Gordonia* на токсическое воздействие ртути: фрагментация цитоплазмы, уменьшение размеров клеток, снижение степени шероховатости клеточной оболочки, а также плазмолиз и нарушение структурной целостности клеточной стенки. Адаптивные реакции клеток на присутствие молибдена включали выраженное изменение рельефа клеток, увеличение их размеров, формирование многоклеточных конгломератов, а также появление дефектов в виде ячеистых утолщений клеточной стенки.

3. Выявленные механизмы устойчивости бактериальных клеток на воздействие Mo и Hg обусловлены изменением дзета-потенциала, активацией экранирующего экзополисахаридного матрикса, повышением синтеза нейтральных липидов, изменением антибиотикочувствительности и критическим падением пула внутриклеточного калия и натрия, а также активацией каталазы при дозозависимой блокаде клеточного дыхания катионами ртути.

4. Экспериментально обосновано, что процесс детоксикации ртути контролируется индуцибельным *mer*-опероном, экспрессия которого носит выраженный дозозависимый характер. Молекулярный ответ бактериальных клеток на молибдатный стресс реализуется по механизму отрицательной обратной связи через репрессию транспортера импорта молибдена *modC* при индукции аппарата MoCo и помп эффлюкса.

5. Установлено, что извлечение молибдена клетками *Rhodococcus* и *Gordonia* контролируется процессами обратимого энергозависимого биоаккумуляирования с последующим защитным эффлюксом, тогда как удаление ртути обеспечивается сочетанием процессов первичной пассивной биосорбции клеточной стенкой и необратимой редукции металла. Процесс пассивной сорбции обоих ионов описывается кинетической моделью псевдвторого порядка.

6. Разработаны иммобилизованные биокатализаторы на основе металлоустойчивых штаммов *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560 для использования в проточном колоночном биореакторе. Предложена технологическая схема процесса очистки, обеспечивающая полную (100%) детоксикацию кадмия, свинца, цинка, никеля, молибдена, мышьяка и 95,3%-ю детоксикацию ртути в шести типах модельных многокомпонентных сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами. При переходе от периодического культивирования к проточному достигнуто повышение эффективности очистки стоков от тяжелых металлов на 42%.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

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

1. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Litvinenko L.V., **Golysheva A.A.**, Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L. Bioaccumulation of molybdate ions by actinobacterial genera *Dietzia*, *Gordonia*, and *Rhodococcus* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2024. – V. 274. – Article 116190. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116190 (WoS, Scopus, IF 6,6, Q1).

2. **Golysheva A.A.**, Litvinenko L.V., Ivshina I.B. Diversity of mercury-tolerant microorganisms // *Microorganisms*. – 2025. – V. 13, No. 6. – Article 1350. DOI: 10.3390/microorganisms13061350. (Scopus, WoS, IF 4,7, Q2).

3. **Golysheva A.A.**, Krivoruchko A.V., Ivshina I.B. Draft genome sequence of a promising bioremediation agent *Gordonia paraffinivorans* IEGM 735 // *Microbiology Resource Announcements*. – 2026. – V. 15, No. 3. – Article e0105925. DOI: 10.1128/mra.01059-25. (WoS, Scopus, IF 0,6, Q3).

4. Krivoruchko A.V., Komarova L.P., Maltseva P.Y., Tyan S.M., **Golysheva A.A.**, Plotnitskaya N.A., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Cell disruption and RNA extraction from *Rhodococcus* and *Gordonia* bacteria grown in the presence of hydrophobic organic compounds and heavy metal salts // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2026. – V. 27, No. 17. – Article 7890. DOI:10.3390/ijms27177890. (WoS, Scopus, IF 5,6, Q1).

Патенты

Патент РФ 2818318. Голышева А.А., Литвиненко Л.В., Ившина И.Б. Иммобилизованная микробная ассоциация *Gordonia paraffinivorans* и *Rhodococcus ruber* – активный аккумулятор тяжелых металлов. Приоритет изобр. 13.12.2023. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 02.05.2024. Бюл. № 13.

Публикации в других журналах и сборниках

1. **Голышева А.А.**, Литвиненко Л.В. Влияние источника углерода на устойчивость актинобактерий *Rhodococcus ruber* к хлориду ртути // Труды Международной юбилейной конференции “Микробиология: вчера, сегодня, завтра”, посвященной 100-летию основания кафедры микробиологии в КФУ, Казань, 20–21 декабря 2021 г. – С. 36.

2. **Голышева А.А.**, Литвиненко Л.В., Ившина И.Б. Адаптационный потенциал устойчивости *Rhodococcus* spp. к хлориду ртути // Материалы научной конференции “Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания”, Иркутск, 28 февраля–06 марта 2022 г. – С. 241–244.
3. **Голышева А.А.**, Литвиненко Л.В., Ившина И.Б. Адаптационный потенциал *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 455 к ртути // Труды XIII Международной конференции ученых-биологов, Пермь, 24–25 октября 2022 г. – С. 28–32.
4. Калининченко Е.М., **Голышева А.А.**, Литвиненко Л.В. Консорциум актиномицетов для очистки сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами // Труды Всероссийской научно-практической конференции “Химия. Экология. Урбанистика”, Пермь, 17–19 апреля 2024 г. – Т. 1. – С. 251–256.
5. Мартина А.О., **Голышева А.А.**, Литвиненко Л.В. Влияние кадмия на свободные и иммобилизованные клетки актиномицетов // Труды Всероссийской научно-практической конференции “Химия. Экология. Урбанистика”, Пермь, 17–19 апреля 2024 г. – Т. 1. – С. 288–292.
6. Николаева С.В., **Голышева А.А.**, Литвиненко Л.В. Устойчивость свободных и иммобилизованных клеток родококков к ртути // Труды Всероссийской научно-практической конференции “Химия. Экология. Урбанистика”, Пермь, 17–19 апреля 2024 г. – Т. 1. – С. 306–311.
7. **Голышева А.А.**, Литвиненко Л.В., Ившина И.Б. Бактериальная ассоциация актиномицетов – активный биоаккумулятор тяжелых металлов // Труды IV Международного биотехнологического форума “BIOAsia-Altai 2024”, Барнаул, 23–28 октября 2024 г. – С. 53–59.
8. **Голышева А.А.** Ген ртутной редуктазы *merA*, кодирующий устойчивость *Actinomycetes* к HgCl_2 // Материалы IV Пушкинской школы-конференции молодых ученых, аспирантов и студентов “Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие”, Пушкино, 3–5 декабря 2024 г. – С. 13–14.
9. **Голышева А.А.** Геномная характеристика резистентных к ртути коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. // Материалы V Пушкинской школы-конференции молодых ученых, аспирантов и студентов “Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие”, Пушкино, 2–4 декабря 2025 г. – С. 14–15.
10. **Голышева А.А.** Устойчивые к молибдену и ртути актиномицеты, перспективные для биоремедиации загрязненных сред // Материалы XXI Всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием “Экологическая безопасность в условиях антропогенной трансформации природной среды”, Пермь, 15–17 апреля 2026 г. – С. 254–259.
11. Гилева С.С., Бахирева О.И., **Голышева А.А.** Изучение возможности биологической очистки сточных вод от ионов ртути // Труды Всероссийской научно-практической конференции “Химия. Экология. Урбанистика”, Пермь, 15–17 апреля 2026 г. – Т. 1. – С. 191–194.
12. **Голышева А.А.** Сравнительная характеристика устойчивости актиномицетов к молибдену и ртути и их биотехнологический потенциал для очистки сточных вод // Материалы конференции молодых ученых в рамках XIII Российского форум биотехнологий с международным участием “OpenBIO-2026”, Кольцово, 22–25 сентября 2026 г. – С. 199–201.

Голышева Анастасия Анатольевна

**МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ПОЧВЕННЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ РОДА
RHODOCOCCLUS К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ НА ПРИМЕРЕ МОЛИБДЕНА И РТУТИ**

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

