

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Голышева Анастасия Анатольевна

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Пермь – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
ГЛАВА 1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕТОКСИКАЦИИ И БИОСОРБЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	16
1.1. Экотоксикологическая характеристика тяжелых металлов в биосфере.....	16
1.1.1. Ртуть: формы нахождения в окружающей среде и механизмы клеточной токсичности.....	18
1.1.2. Молибден: биогеохимическая роль, оксианионные формы и экологические риски	19
1.2. Морфофизиологические и структурные перестройки бактериальных клеток под воздействием металлов	20
1.3. Биохимические и генетические механизмы устойчивости бактерий к тяжелым металлам	23
1.3.1. Генетические детерминанты и ферментные системы детоксикации ртути	24
1.3.2. Молекулярная организация систем транспорта и гомеостаза молибдена	29
1.3.3. Роль сидерофоров в адаптации микроорганизмов к средам, обогащенным металлами.....	30
1.4. Нокардиоформные актиномицеты родов <i>Rhodococcus</i> и <i>Gordonia</i> как агенты биоремедиации.....	34
1.5. Биотехнологические подходы к очистке металлсодержащих сточных вод...	36
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Рабочая коллекция и условия выращивания бактериальных культур	43
2.2. Химические реагенты.....	63
2.3. Контрольные эксперименты.....	65
2.4. Иммобилизация бактериальных клеток	66
2.5. Жизнеспособность свободных и иммобилизованных бактериальных клеток	67

2.6. Минимальные подавляющие концентрации молибдена и ртути	69
2.7. Микроскопические исследования	70
2.7.1. Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия	70
2.7.2. Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия ..	70
2.7.3. Просвечивающая электронная микроскопия	71
2.8. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия с картированием элементов	71
2.9. Внутриклеточные липидные включения	72
2.10. Гидрофобность клеток	72
2.11. Респираторная активность	74
2.12. Каталазная активность	74
2.13. Электрокинетический потенциал	75
2.14. Оценка влияния металлов на антибиотикочувствительность актиномицетов	76
2.15. Полногеномное секвенирование	78
2.16. Биоинформатический анализ и аннотирование геномов	78
2.17. Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов	81
2.18. Выделение нуклеиновых кислот	83
2.19. Детекция нуклеиновых кислот	84
2.20. ПЦР с обратной транскрипцией и ПЦР в реальном времени	85
2.21. Цифровая капельная ПЦР на биочипах	86
2.22. Филогенетический анализ	87
2.23. Подготовка образцов и проведение транскриптомного анализа	88
2.24. Определение генетической локализации генов металлорезистентности	90
2.25. Изучение механизма поглощения молибдена и ртути бактериальными клетками	91
2.26. Постановка экспериментов по извлечению тяжелых металлов из имитированных сточных вод	93
2.27. Статистическая обработка результатов	97

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ МОЛИБДЕНА И РТУТИ НА КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ. ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕТАЛЛОВ	99
3.1. Изучение устойчивости свободных и иммобилизованных актиномицетов к тяжелым металлам	99
3.2. Изменение морфометрических характеристик актиномицетов под воздействием молибдена и ртути	107
3.3. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимические характеристики актиномицетов	121
ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ ДЕТОКСИКАЦИИ И ИНАКТИВАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	137
4.1. Геномная организация хромосомного острова мультиметаллорезистентности у актиномицетов	137
4.2. Архитектура, филогения и транскрипционная активность детерминант устойчивости к ртути	140
4.2.1. Структурно-функциональная организация <i>mer</i> -оперона	140
4.2.2. Молекулярная филогения ртуть-редуктазы и свидетельства горизонтального переноса генов	144
4.2.3. Количественный анализ экспрессии генов <i>merA</i> и <i>merB</i> методом цифровой капельной ПЦР	147
4.3. Организация и регуляторный аппарат системы транспорта молибдена	150
4.3.1. Архитектура <i>mod</i> -оперона	150
4.3.2. Синтения молибденового кластера с локусами ассимиляции азота и биосинтеза Мо-кофактора	152
4.3.3. Сравнительный анализ <i>mod</i> -локусов у представителей родов <i>Rhodococcus</i> и <i>Gordonia</i>	154
4.3.4. Транскриптомный профиль ответа на молибденовый стресс	156
4.4. Профили биосинтетических кластеров вторичных метаболитов и систем металлохелатирования	159

4.5. Верификация генетической локализации детерминант металлорезистентности	163
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ АККУМУЛИРОВАТЬ И ИНАКТИВИРОВАТЬ ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ	165
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ К ОЧИСТКЕ ИСКУССТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД.....	170
6.1. Эффективность извлечения тяжелых металлов чистыми культурами и бактериальными консорциумами.....	170
6.2. Сравнительный анализ колоночного биореактора и системы с перемешиванием	173
6.3. Технологическая схема и принципиальные этапы биоремедиации.....	175
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	177
ВЫВОДЫ	180
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	182
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	184
ПРИЛОЖЕНИЕ А. УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ К ИОНАМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	201
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. ОЧИСТКА ИМИТИРОВАННЫХ СТОЧНЫХ ВОД.....	209

ВВЕДЕНИЕ

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 тяжелых металлов 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 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 металлоторолерантных микроорганизмов, выработавших специализированные адаптивные механизмы выживания в экстремальных условиях (Yadav *et al.*, 2025).

Ведущее положение в загрязненных почвенных и водных эконических 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 органо-минеральных субстратов (Худокормов и др., 2012; Криворучко, 2021).

Угледородокисляющие 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, полиэтоксифирированные алкилфенолы (Тритон Х-100) и полисорбаты, продукты

распада которых отличаются персистентностью и высокой токсичностью для почвенной микрофлоры (Костина, Куюкина, Ившина, 2010; Костина и др., 2014; Pacwa-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 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.iegmcsl.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 нефтезагрязнённых 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 (от 2,0 до 3,5 раз 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

(от 1,5 до 1,8 раз 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 внутриклеточного 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 (National Center for Biotechnology Information, 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 (Rapid Annotations using Subsystems Technology). 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 плазмолиз 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 биоаккумуляирования 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); Финал конкурса «УМНИК-2022» (Пермь, 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» (Пущино, 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» (наркоград Кольцово, 2026).

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» Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.).

Обзор литературы

Глава 1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕТОКСИКАЦИИ И БИОСОРБЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

1.1. Экотоксикологическая характеристика тяжелых металлов в биосфере

Интенсивная антропогенная деятельность привела к повсеместному накоплению в окружающей среде токсичных соединений тяжелых металлов (ТМ). Основными техногенными источниками эмиссии металлов выступают предприятия металлургического комплекса, химической и нефтехимической промышленности, машиностроения, горнодобывающей отрасли, гальванические производства, а также сбросы недостаточно очищенных промышленных и хозяйственно-бытовых сточных вод (Войтюк, Кураева, Локтионова, 2017; Tchounwou *et al.*, 2012). Дополнительный вклад в миграцию металлов вносят природные геохимические процессы, включая вулканическую деятельность, выветривание и гидротермальные выходы (Maret, 2016). С экологической и токсикологической точек зрения ТМ представляют особую опасность благодаря ряду специфических характеристик (Теплая, 2013; Парамонова и др., 2023; Young, 2012, Rai *et al.*, 2019):

- высокая персистентность: металлы не разрушаются биологическим или термическим путем, их период полувыведения из экосистем исчисляется десятилетиями;
- биомагнификация: способность концентрироваться в трофических цепях с коэффициентом биологического накопления, превышающим 10^3 ;
- миграционная мобильность: формирование подвижных комплексных и гидратированных форм, свободно мигрирующих в водоносных горизонтах и почвенных профилях;
- мутагенный и канцерогенный потенциал: способность индуцировать окислительный стресс, повреждать структуру ДНК и блокировать каталитические центры ферментов даже в субмикромольных концентрациях.

В соответствии с ГОСТ Р 70281-2022 (ГОСТ, 2022) и санитарно-гигиеническими нормативами (Санитарные правила и нормы ..., 2022) металлы классифицируют по степени токсичности на три класса опасности: 1 класс (*высокоопасные*) – As, Cd, Hg, Pb, Se; 2 класс (*умеренно опасные*) – Mo, Cu, Ni, Co, Cr, Zn; и 3 класс (*малоопасные*) – Ba, Mn, V, W.

Присутствие металлов в микробных ценозах индуцирует окислительный шок, подавляет регенеративный потенциал микробиома и способствует ко-селекции детерминант антибиотикорезистентности (Gullberg *et al.*, 2014; Chakraborty *et al.*, 2020). Накопление тяжелых металлов вызывает образование активных форм кислорода (АФК), что в свою очередь приводит к серьезным повреждениям структуры ДНК клеток и нарушает их способность к регенерации (Maitra, 2022).

В настоящей работе приоритетными объектами исследования выбраны элементы с контрастными химическими свойствами и биологической ролью: высокотоксичный тиоловый яд ртуть (Hg) и металлоид-оксиданион молибден (Mo). Нормативные показатели их содержания в природных средах приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Предельно допустимые концентрации Hg и Mo в разных средах

Объект	Hg	Mo	Источник
Вода водных объектов хоз.-питьевого назначения, мг/л	0,0005	0,05	Гигиенические нормативы ..., 2017; Санитарные правила и нормы ..., 2022
Вода рыбохозяйственных водоемов, мг/л	0,00001	0,0012	Приказ Минсельхоза № 552
Атмосферный воздух (среднесуточная), мг/м ³	0,0003	0,002	Гигиенические нормативы ..., 2017; Санитарные правила и нормы ..., 2022
Почва населенных мест (валовое содержание), мг/кг	0,5	—*	Санитарные правила и нормы ..., 2022

Примечание: * – ПДК молибдена в почве населенных мест и сельскохозяйственных угодий не установлена как отдельный норматив, что связано

с его относительно низкой токсичностью и отсутствием значительного риска при типичных концентрациях (Санитарные правила и нормы ..., 2022).

1.1.1. Ртуть: формы нахождения в окружающей среде и механизмы клеточной токсичности

Ртуть относится к глобальным приоритетным токсикантам 1-го класса опасности (AMAP/UN Environment, 2019; Priyadarshane *et al.*, 2022). В биосфере ртуть существует в трех термодинамических состояниях:

- элементарная ртуть Hg^0 – металлическая форма, обладающая высокой летучестью при стандартных температурах и способная к трансконтинентальному атмосферному переносу (Mousavi *et al.*, 2011);
- неорганическая двухвалентная ртуть Hg^{2+} – наиболее распространенная форма в почвах и поверхностных водах, существует в виде HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgS (Mousavi *et al.*, 2011);
- органическая ртуть (монометилртуть CH_3Hg^+ и диметилртуть $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) образуется в анаэробных донных отложениях в результате микробного метилирования сульфатредуцирующими и метаногенными бактериями (Wang *et al.*, 2019; Gworek, Dmuchowski, Baczewska-Dąbrowska, 2020).

Токсичность химических форм ртути возрастает в ряду: $\text{Hg}^0 < \text{Hg}_2^{2+} < \text{Hg}^{2+} < \text{CH}_3\text{Hg}^+$. Основной молекулярный механизм цитотоксичности иона Hg^{2+} обусловлен его высоким химическим сродством к тиоловым ($-\text{SH}$) и сульфгидрильным группам цистеиновых остатков белков (Rehman *et al.*, 2018; Balali-Mood *et al.*, 2025). Связывание ртути вызывает конформационную инактивацию ферментов дыхательной цепи, разобщение окислительного фосфорилирования, истощение пула глутатиона и генерацию АФК. Органические формы (метилртуть) обладают выраженной липофильностью, беспрепятственно диффундируют сквозь гидрофобный барьер цитоплазматической мембраны и индуцируют необратимые повреждения нуклеиновых кислот (Rice *et al.*, 2014; Outridge *et al.*, 2018).

Международные природоохранные инициативы (Минаматская конвенция о ртути, вступившая в силу в 2017 г.) регламентируют поэтапное сокращение

использования и сбросов ртутьсодержащих соединений (Al-Sulaiti *et al.*, 2022). Традиционные методы демеркуризации (термодесорбция, сульфидное осаждение, цементация) сопряжены со значительными финансовыми затратами и риском вторичной эмиссии токсичных паров. В связи с этим особое значение приобретают биотехнологические подходы, базирующиеся на бактериальном восстановлении катионов Hg^{2+} до элементарной формы Hg^0 с последующей ее контролируемой сорбцией (Hussein *et al.*, 2007; Priyadarshane *et al.*, 2022).

1.1.2. Молибден: биогеохимическая роль, оксианионные формы и экологические риски

Молибден представляет собой переходный металл с переменной валентностью (от +2 до +6), широко используемый в металлургии жаропрочных сплавов, химическом катализе, производстве смазочных композиций, антикоррозионных покрытий и минеральных удобрений. Значительным источником загрязнения поверхностных вод и почв молибденом является нефтеперерабатывающая промышленность, где гидроочистка сырья сопровождается отработкой алюмокобальтмолибденовых и алюмоникельмолибденовых катализаторов (Боярко, Хатьков, 2021; Khalid *et al.*, 2016). Наряду с растворимыми соединениями, существенный экологический риск представляет нанотоксичность двумерных наноматериалов на основе дисульфида молибдена (MoS_2). Попадание таких наноструктур в окружающую среду оказывает негативное воздействие на полезные почвенные бактерии (Bae *et al.*, 2021).

В кислородсодержащих водных средах при нейтральных и слабощелочных значениях pH молибден стабильно существует в форме легкорастворимого мономолибдат-аниона MoO_4^{2-} (степень окисления +6) (Масакбаева и др., 2021). По своему ионному радиусу и заряду молибдат является структурным аналогом сульфат-аниона SO_4^{2-} , что определяет его способность проникать в микробные клетки по каналам сульфатного транспорта (Peng *et al.*, 2018).

В наномолярных концентрациях молибден является эссенциальным биогенным микроэлементом, входящим в качестве кофактора (MoCo ,

молибдоптерина) в активные центры более чем 50 жизненно важных металлоэнзимов: нитрогеназ, ассимиляционных нитратредуктаз, ксантиноксидаз, диметилсульфоксидредуктаз и сульфитоксидаз (Громова и др., 2019; Leimkuhler, Iobbi-Nivol, 2016; Presentato *et al.*, 2020). Однако превышение пороговых концентраций молибдата индуцирует токсический стресс. Избыточные концентрации MoO_4^{2-} вызывают конкурентное ингибирование серного метаболизма, неспецифически связываются с гидроксильными и карбоксильными лигандами мембранных белков и приводят к дестабилизации цитоплазматической мембраны (Lopes *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2022).

Метаболический ответ бактерий на токсические дозы молибдена включает временную аккумуляцию металла в периплазме, выключение систем неспецифического импорта и запуск восстановительных ферментных путей с образованием нерастворимых коллоидных соединений восстановительного ряда («молибденового синего»), что формирует основу для разработки методов микробной ремедиации (Presentato *et al.*, 2020; Yakasai *et al.*, 2021). Для селективной защиты от избыточных концентраций оксианионов бактерии выработали высокоспецифичные транспортные системы, контролируемые *mod*-опероном, молекулярная организация которого детально обсуждена в разделе 1.3.2.

Рассмотренные физико-химические различия между ртутью (катионогенный тиоловый токсикант) и молибденом (анионогенный кофакторный микроэлемент) определяют необходимость комплексного сопоставления клеточных и генетических систем адаптации микроорганизмов к обоим экополлютантам.

1.2. Морфофизиологические и структурные перестройки бактериальных клеток под воздействием металлов

Воздействие сублетальных и токсических концентраций ТМ индуцирует глубокую реорганизацию структурно-функционального состояния прокариотической клетки, где первым физическим и электростатическим барьером на пути диффузии ксенобиотиков выступает клеточная оболочка микроорганизмов (Gauthier *et al.*, 2014; Ivshina *et al.*, 2024a). Токсическое действие катионов и анионов переходных металлов сопровождается рассогласованием процессов

биосинтеза макромолекул, роста и бинарного деления, что приводит к выраженным полиморфным сдвигам формы и размеров клеток (Багаева, 2013; Бузолева, 2013). Характер морфологического отклика строго зависит от химической природы токсиканта: тиоловые яды, такие как катионы ртути, блокируют сульфгидрильные группы структурных белков цитоскелета и ферментов септации, провоцируя преждевременное деление, фрагментацию нитей и микроколоний на укороченные кокковидные формы, а также локальный лизис пептидогликана (Presentato *et al.*, 2018; Priyadarshane *et al.*, 2022). Напротив, оксианионный стресс (в частности, индуцированный молибдатом или хроматом) нередко вызывает задержку клеточного деления без немедленного ингибирования роста биомассы, что ведет к удлинению палочковидных форм и утолщению слоев клеточной стенки (Chen *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2022). Подобное изменение линейных параметров и снижение соотношения площади поверхности к объему клетки (S/V) рассматривается как важная адаптивная реакция, минимизирующая доступную удельную площадь контакта биомассы с растворенным поллютантом (Мухаматдырова, 2023).

Применение высокоразрешающих методов микроскопии показывает, что присутствие ТМ кардинально меняет наномеханические параметры микробной стенки: ее среднеквадратичную шероховатость (R_q), модуль упругости Юнга и профили сил неспецифической адгезии (Gauthier *et al.*, 2014; Alvarez *et al.*, 2017). Непосредственным следствием токсического действия металлов выступает также дестабилизация барьерных функций цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Электростатическое взаимодействие металлов с полярными головками мембранных фосфолипидов провоцирует фазовое разделение липидного бислоя, рост его микровязкости и порозности (Teitzel, Parsek, 2003; Vanella, Verma, 2006; Lopes *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2018).

Важнейшим рубежом неспецифической защиты бактерий от проникновения токсикантов служит продукция внеклеточных полимерных соединений (ВПС), формирующих полидисперсный гидрогелевый матрикс из кислых полисахаридов, гликопротеинов, липополисахаридов и внеклеточной ДНК (Henson *et al.*, 2018;

Presentato *et al.*, 2020). Наличие в составе полисахаридного чехла свободных карбоксильных, фосфатных, гидроксильных и аминогрупп передает поверхности клеток стойкий отрицательный электрокинетический потенциал (дзета-потенциал, ζ) (Kawamura, Esposito, 2010; El Baz *et al.*, 2015). Именно эти функциональные группы выступают основными сайтами пассивного связывания (биосорбции) токсичных катионов металлов как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий (Zango *et al.*, 2020). Комплексообразование и координационная хемосорбция токсичных катионов металлов в толще полисахаридного матрикса задерживают их диффузию к мембранным транспортерам, выполняя роль барьера (Chen *et al.*, 2014; Nocelli *et al.*, 2016). ВПС служат важнейшим защитным барьером против индуцированного металлами окислительного стресса, смягчая повреждения от активных форм кислорода (Meziane *et al.*, 2026). Для миколосодержащих актиномицетов ключевую защитную функцию несут высокомолекулярные разветвленные миколовые кислоты и трегалозодимиколаты клеточной стенки, сообщающие оболочке выраженную гидрофобность (Ившина и др., 2021; Ivshina *et al.*, 2024a). Под действием металлостресса бактериальные клетки активно перестраивают липидный обмен, формируя в цитоплазме электроноплотные включения нейтральных липидов (триацилглицеридов и восков) (Alvarez *et al.*, 2017; Cappelletti *et al.*, 2019). Эти липиды выступают не только в роли энергетического депо, но и внутриклеточных гидрофобных резервуаров для секвестрации токсичных металлоорганических комплексов. Кроме того, секреция экзополимеров стимулирует агрегацию клеток и переход к биопленочному росту (Teitzel, Parsek, 2003; Henson *et al.*, 2018). В составе биопленок микроорганизмы проявляют многократно возросшую устойчивость к металлам по сравнению с планктонной культурой, что создает биологическую основу для их иммобилизации на пористых носителях (Ефременко, 2009; Kuuyukina, Krivoruchko, Ivshina, 2018).

Особый фундаментальный и прикладной интерес представляет феномен взаимосвязи металлоторерантности и множественной антибиотикорезистентности бактерий (Gullberg *et al.*, 2014; Chakraborty *et al.*, 2020). Длительная селекция

микроорганизмов в металл-загрязненных биотопах стимулирует сопряженную устойчивость к антибактериальным препаратам за счет ко-резистентности, когда гены детоксикации металлов и гены устойчивости к антибиотикам локализуются на общих подвижных элементах или островах патогенности и резистентности (Barkay, Miller, Summers, 2003; Sone *et al.*, 2013; Piacenza *et al.*, 2020). Вторым механизмом (кросс-резистентность) обусловлен функционированием полиспецифических эффлюксных систем (семейств RND, MFS, MATE и АТФаз Р-типа), способных одновременно откачивать из цитоплазмы как ионы ТМ, так и антибиотики различных химических классов против градиента концентрации (Fagorzi *et al.*, 2018; Presentato *et al.*, 2020).

1.3. Биохимические и генетические механизмы устойчивости бактерий к тяжелым металлам

Микроорганизмы выработали многокомпонентные специализированные и неспецифические механизмы защиты от токсического действия ТМ, обеспечивающие поддержание внутриклеточного элементного гомеостаза (Vanella, Verma, 2006). Ключевыми биохимическими стратегиями адаптации выступают активный эффлюкс ионов металлов из цитоплазмы, их внутриклеточная и внеклеточная секвестрация металлосвязывающими белками и низкомолекулярными метаболитами, а также энзиматическая биотрансформация токсикантов в менее растворимые, химически инертные или летучие формы (Ledin, 2000; Teitzel, Parsek, 2003; Presentato *et al.*, 2020).

Среди грамположительных бактерий представители порядка Actinomycetales (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Streptomyces*) выделяются наличием крупных GC-богатых геномов и протяженных хромосомных островов резистентности, нередко дополненных линейными и кольцевыми мегаплазмидами (Cappelletti *et al.*, 2019; Piacenza *et al.*, 2020). Высокий адаптивный потенциал актиномицетов определяется сочетанием индуцибельных оперонов детоксикации с разветвленными биосинтетическими кластерами вторичных метаболитов (Biosynthetic Gene Clusters, BGCs).

1.3.1. Генетические детерминанты и ферментные системы детоксикации ртути

Клеточный механизм устойчивости к Hg чаще всего включает (рисунок 1) снижение поглощения ионов Hg из среды, транспорт ионов ртути из клетки, внеклеточную секвестрацию и биоаккумуляцию (Priyadarshane *et al.*, 2022; Golysheva, Litvinenko, Ivshina, 2025*). Наличие уникальных физиологических свойств у определенной группы устойчивых к Hg бактерий повышает их биоремедиационный потенциал.

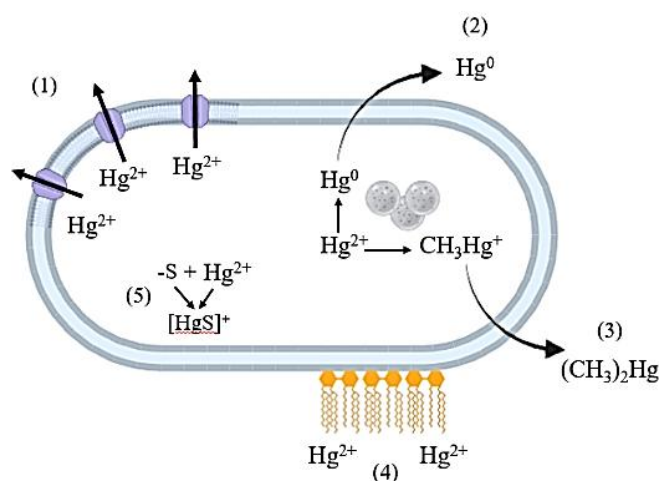


Рисунок 1 – Механизмы устойчивости бактериальных клеток к ртутным соединениям (Golysheva, Litvinenko, Ivshina, 2025*)

1 – транспорт ионов Hg^{2+} из клетки через ионные каналы; 2 – восстановление до элементарной Hg^0 ; 3 – метилирование до летучих соединений; 4 – внеклеточное связывание с биомолекулами на поверхности клетки; 5 – образование нерастворимых соединений с последующим отложением в клетке

Наиболее детально охарактеризованным молекулярным аппаратом бактериальной инактивации соединений ртути выступает индуцибельный *mer*-оперон (Boyd, Barkay, 2012; Christakis, Barkay, Boyd, 2021). Кластер обеспечивает ферментативную трансформацию токсичных катионов неорганической и ртутьорганических форм металла.

* Здесь и далее – ссылка на публикации по теме диссертации

Центральным структурным цистроном оперона является ген *merA*, кодирующий цитоплазматическую флавин-зависимую НАДФН-дисульфидоксидоредуктазу MerA (Barkay, Miller, Summers, 2003). Данный гомодимерный фермент катализирует восстановление ионов Hg^{2+} до металлической элементарной ртути Hg^0 , которая в силу гидрофобности и летучести пассивно диффундирует сквозь клеточную мембрану в газовую фазу (Barkay *et al.*, 2010; Dash *et al.*, 2017). Наличие одного фермента MerA определяет узкий спектр толерантности бактерий, распространяющийся исключительно на неорганические соли ртути (Boyd, Barkay, 2012). Широкий спектр устойчивости к соединениям ртути обусловлен наличием дополнительного цистрона *merB*, кодирующего органортутную лиазу MerB. Фермент MerB осуществляет протон-зависимое расщепление ковалентных углерод-ртутных связей (C–Hg) в молекулах алкил-, алкенил- и арилртутных токсикантов (включая метилртуть), высвобождая органический радикал и ион Hg^{2+} , который затем восстанавливается редуктазой MerA (Lafrance-Vanasse *et al.*, 2009; Maynaud *et al.*, 2014; Balali-Mood *et al.*, 2025).

Транспортный аппарат оперона включает гидрофобные мембранные белки MerT, MerC, MerE, MerF, а также периплазматический шаперон MerP, содержащий консервативные остатки цистеина для первичного связывания Hg^{2+} и его транслокации к активным центрам редуктазы (Barkay, Miller, Summers, 2003; Boyd, Barkay, 2012). Транскрипция структурных генов находится под строгим контролем белка-регулятора MerR (Brown *et al.*, 2003). В отсутствие ионов металла димер MerR связывается с операторно-промоторной зоной, изгибая двойную спираль ДНК и репрессируя посадку РНК-полимеразы; при связывании катионов Hg^{2+} конформация белка изменяется, снимая репрессию и иницилируя полицистронную транскрипцию (Gionfriddo *et al.*, 2020).

Гены устойчивости *mer* обладают высокой мобильностью и могут локализоваться как в составе резидентных хромосом, так и на конъюгативных плазмидах и транспозонах (Barkay, Miller, Summers, 2003; Sone *et al.*, 2013). Согласно данным международного скрининга базы данных GenBank NCBI,

у представителей типа *Actinomycetota* идентифицирован широкий спектр гомологов ключевых генов и белков ртутной детоксикации (таблица 2).

Таблица 2 – Наиболее распространенные гены устойчивости к ртути у представителей Actinomycetota (по данным базы данных NCBI)

№	Символ гена	Аннотируемый белковый продукт	Тэг локуса NCBI	Организм-носитель	Локализация в геноме	Длина гена, п.н.	Длина белка, а.о.
1.	<i>merA</i>	Редуктаза ртути	C5O27_RS02895	<i>Gordonia alkanivorans</i> YC-RL2	Хромосома	1422	473
			BCM27_RS13490	<i>Gordonia terrae</i> 3612	Хромосома	1437	478
			IHQ52_RS14160	<i>Gordonia amicalis</i> CEGA1	Хромосома	1437	478
			ABWI03_RS31730	<i>Rhodococcus baikonurensis</i> NPDC097667	Хромосома	1437	478
			F1734_RS25830	<i>Rhodococcus ruber</i> C1	Плазмида	1437	478
			VYL96_RS16955	<i>Dietzia cinnamea</i> 55	Плазмида	1401	466
			VYL96_RS00490	<i>Dietzia cinnamea</i> 55	Хромосома	1395	464
			JOE55_RS10340	<i>Kocuria palustris</i> TAGA27	Хромосома	1425	584
			O4162_RS16800	<i>Dietzia maris</i> ИЭГМ 44	Хромосома	1401	466

Продолжение таблицы 2

№	Символ гена	Аннотируемый белковый продукт	Тэг локуса NCBI	Организм-носитель	Локализация в геноме	Длина гена, п.н.	Длина белка, а.о.
2.	H351_RS26335	Регулятор транскрипции семейства MerR	H351_RS26335	<i>Rhodococcus erythropolis</i> R138	Хромосома	426	141
3.	NFA_RS29315	ДНК-связывающий белок семейства MerR	NFA_RS29315	<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	Плазмида pNF2	402	341
4.	Y013_RS03165	ДНК-связывающий транскрипционный регулятор семейства MerR	Y013_RS03165	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> SB3094	Хромосома	840	279
5.	NFA_RS28365	Катион-транслоцирующая АТФаза Р-типа	NFA_RS28365	<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	Плазмида pNF1	1965	654
6.	<i>merH</i>	Транспортер ртути MerH	MAB_RS00055	<i>Mycobacteroides abscessus</i> ATCC 19977	Плазмида pMAB23	513	170
7.	MAB_RS00040	Транспортер ртути MerT	MAB_RS00040	<i>Mycobacteroides abscessus</i> ATCC 19977	Плазмида pMAB23	435	144

1.3.2. Молекулярная организация систем транспорта и гомеостаза молибдена

В отличие от ртути, для молибдена у бактерий сформированы высокоаффинные системы направленного импорта, обеспечивающие клетку микроэлементом для биосинтеза молибдоптеринового кофактора (MoCo) (Presentato *et al.*, 2020, Ivshina *et al.*, 2024a). Поглощение оксианионов молибдата MoO_4^{2-} из внешней среды осуществляется специализированным ABC-транспортером ModABC, структурные гены которого организованы в полицистронный *mod*-оперон (Maupin-Furlow *et al.*, 1995; Hollenstein, Frei, Locher, 2007; Yang *et al.*, 2020):

- *modA* кодирует периплазматический (или связанный с наружной поверхностью мембраны у грамположительных бактерий) субстрат-связывающий белок ModA, обладающий субнанолярным сродством к MoO_4^{2-} ;
- *modB* кодирует интегральный мембранный пермеазный белок ModB, формирующий трансмембранный канал;
- *modC* кодирует цитоплазматическую нуклеотид-связывающую субъединицу ModC, гидролизующую АТФ для сопряженного переноса аниона внутрь клетки.

Транскрипционный контроль оперона осуществляется регуляторным белком ModE (Grunden, Shanmugam, 1997; Yang *et al.*, 2020). ModE выступает сенсором внутриклеточной концентрации металла. При насыщении цитоплазмы молибдатом формируется металло-белковый комплекс [ModE– MoO_4^{2-}], который связывается с операторным участком (*modE*-box) в промоторной зоне оперона и стерически блокирует транскрипцию по механизму отрицательной обратной связи, предотвращая токсическое пересыщение клетки (Maupin-Furlow *et al.*, 1995; Presentato *et al.*, 2020).

Поступивший молибдат немедленно включается в сложный многостадийный метаболический путь биосинтеза молибдоптерина (MoCo),

контролируемый ферментами MoaA-E, MogA и MoeA (Peng *et al.*, 2018). Молибдоптериновый кофактор встраивается в активные центры молибдоэнзимов бактериальной клетки (ассимиляционной нитратредуктазы NasA, оксидоредуктаз, формиатдегидрогеназ), катализирующих перенос кислорода и электронов в реакциях азотного и углеродного обмена (Magalon, Mendel, 2015; Presentato *et al.*, 2020; Yakasai *et al.*, 2021). В условиях избытка токсиканта в ряде бактериальных культур включаются альтернативные оксидоредуктазные пути восстановления растворимого молибдата Mo(VI) до нерастворимых коллоидных осадков фосфомолибденового синего Mo(V), что также рассматривается как потенциальный ферментативный путь детоксикации среды (Yakasai *et al.*, 2021).

1.3.3. Роль сидерофоров в адаптации микроорганизмов к средам, обогащенным металлами

Важнейшим инструментом поддержания элементного гомеостаза и защиты от металлического стресса у прокариот выступает продукция сидерофоров – низкомолекулярных органических лигандов (молекулярная масса 500–1500 Да), секретируемых во внешнюю среду (Rošková, Škarohlíd, McGachy, 2022). Первичная (каноническая) физиологическая функция данных метаболитов заключается в мобилизации и селективном связывании нерастворимого трехвалентного железа Fe^{3+} из почвенных минералов и водной толщи с последующей доставкой комплекса в клетку (Schalk, 2025). Процесс секвестрации металлов микроорганизмами дифференцируется на два базовых уровня: экзогенный (связывание токсикантов во внешнем матриксе или периплазматическом пространстве) и эндогенный (внутриклеточная изоляция посредством полифосфатных структур и цистеин-насыщенных металлотионеинов). Современные исследования показывают, что низкомолекулярные хелаторы, традиционно ассоциируемые исключительно с метаболизмом железа, обладают широкой субстратной специфичностью. Данные метаболиты проявляют свойства поливалентных «металлофоров», образуя стабильные координационные связи с ионами

кобальта, меди, никеля, цинка, свинца, ртути, а также с токсичными металлоидами (Johnstone, Nolan, 2015; Arnold, 2024). В частности, для актиномицетов *R. erythropolis* и *R. rhodochrous* доказана способность хелатировать не только Fe(III) и As(III), но и такие элементы, как хром, галлий, индий и ванадий (Hofmann *et al.*, 2021). Тем не менее, данное комплексообразование подчиняется законам конкурентного вытеснения: при повышении концентрации доступного трехвалентного железа происходит замещение нецелевых металлов в активном центре сидерофора (Schalk, Hannauer, Braud, 2011; Hofmann *et al.*, 2021; Schalk, 2025).

Образование прочных металлофорных комплексов снижает концентрацию свободных токсичных ионов в растворе, препятствуя их пассивной неконтролируемой диффузии через порины и пермеазы цитоплазматической мембраны внутрь цитоплазмы. Кроме того, связывание редокс-активных переходных металлов сидерофорами блокирует реакции типа Фентона–Габера–Вейса, нивелируя генерацию АФК и защищая клеточную оболочку от перекисного окисления липидов (Rošková, Škarohlíd, McGachy, 2022).

По своей химической природе сидерофоры разделяют на четыре основных класса в зависимости от типа хелатирующих функциональных группировок: гидроксаматы, катехолаты, α -гидроксикарбоксилаты и лиганды смешанного типа (Hider, Kong, 2010; Rošková, Škarohlíd, McGachy, 2022). Для наиболее прочного удержания катионов молекулы сидерофоров формируют октаэдрическую координационную сферу с гексадентатным центром, в котором донорами неподеленных электронных пар выступают атомы депротонированного кислорода (Hider, Kong, 2010). Сродство сидерофоров к конкретным ионам определяется фундаментальным физико-химическим принципом жестких и мягких кислот и оснований (Butler, Theisen, 2010). Жесткие основания Льюиса (кислородсодержащие катехолатные и гидроксаматные группы) проявляют наибольшее термодинамическое сродство к жестким кислотам Льюиса – катионам с высоким соотношением

заряда к радиусу: Fe^{3+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , а также оксианионам молибдена MoO_4^{2-} . При этом константы стабильности комплексов могут достигать экстремальных величин. Так, например, для трискатехолата азотохелина с Mo(VI) величина стабильности комплекса составляет 35,0, что сопоставимо со связыванием железа $\sim 32,0$ (Johnstone, Nolan, 2015; Rošková, Škarohlíd, McGachy, 2022). Наличие же в структуре лигандов более мягких донорных атомов (азота или серы) существенно усиливает координацию ионов с более мягкими характеристиками: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+} (Schalk, Hannauer, Braud, 2011; Rošková, Škarohlíd, McGachy, 2022).

У актиномицетов порядка Actinomycetales описаны специализированные системы продукции металлофоров, адаптированные к выживанию в полиметаллических биотопах (Cappelletti *et al.*, 2019; Hofmann *et al.*, 2021). Для представителей рода *Rhodococcus* характерны смешанные катехолатно-гидроксаматные сидерофоры – гетеробактины (heterobactins), идентифицированные у *R. erythropolis*, и родобактин (rhodobactin) у *R. rhodochrous* (Carran *et al.*, 2001; Dhungana *et al.*, 2007). В геномах непатогенных видов *Rhodococcus* преобладают именно смешанные катехолат-гидроксаматные сидерофоры. Такое сочетание нескольких донорных групп не только повышает способность родококков связывать железо, но и позволяет им адаптироваться к средам с колеблющимся уровнем pH и острой конкуренцией за микроэлементы. Более того, экспериментально подтверждена способность гетеробактина селективно связывать высокотоксичный мышьяк As(III) посредством тиоловых групп, переводя его в менее токсичные формы, что подчеркивает колоссальный потенциал сидерофоров родококков в процессах биоремедиации (Retamal-Morales *et al.*, 2021). Экспериментально доказано, что гетеробактины способны наряду с Fe^{3+} прочно координировать широкий ряд ионов: As^{3+} , V^{5+} , Ga^{3+} , In^{3+} и Cr^{3+} (Hofmann *et al.*, 2021; Retamal-Morales *et al.*, 2021). В свою очередь, у бактерий родственного рода *Gordonia* и ряда родственных актиномицетов экспрессируются альтернативные биосинтетические кластеры, ответственные

за продукцию редких азолиновых металлофоров – мадурастатинов (*madurastatins*), обладающих высоким сродством к катионам никеля и других двухвалентных переходных металлов (Gomes *et al.*, 2024).

Биосинтез бактериальных сидерофоров контролируется мультиферментными комплексами нерибосомальных пептидсинтаз (NRPS) либо независимыми NIS-синтазами, а их экспорт во внешнюю среду осуществляется транспортными помпами суперсемейств MFS, RND или ABC-типа. Проникновение металлокомплексов через внешний барьер бактериальной клетки сопряжено с затратами энергии и опосредуется рецепторным аппаратом (Sandy, Butler, 2009; Pals *et al.*, 2024), тогда как транслокация внутрь цитоплазмы реализуется посредством ABC-переносчиков (Liu *et al.*, 2022; Miranda-CasoLuengo *et al.*, 2008). Альтернативным механизмом, выявленным у ряда грамположительных таксонов, является модель «iron shuttle», предполагающая непосредственное участие поверхностного рецептора в дестабилизации комплекса и извлечении иона (Endicott *et al.*, 2020). Внутриклеточная диссоциация происходит преимущественно путем ферментативного восстановления трехвалентного железа до двухвалентного, что позволяет апо-сидерофору вновь участвовать в транспортном цикле (Roosenberg *et al.*, 2000; Schalk, 2025). Таким образом, продукция сидерофоров у актиномицетов обеспечивает двойной физиологический эффект: предотвращает железодефицит и снижает токсическую нагрузку за счет внеклеточной иммобилизации ТМ (Sharma *et al.*, 2022).

На генетическом уровне транскрипция кластеров биосинтеза металлофоров у родококков ингибируется специфическими металлосенсорными белками (IdeR и Fur), которые при высокой внутриклеточной концентрации Fe(II) блокируют соответствующие промоторы (Boland, Meijer, 2000; Letek *et al.*, 2010).

1.4. Нокардиоформные актиномицеты родов *Rhodococcus* и *Gordonia* как агенты биоремедиации

Представители порядка *Mycobacteriales*, в особенности родов *Rhodococcus* и *Gordonia*, занимают одно из ключевых мест среди прокариот, привлекаемых для решения задач промышленной и экологической биотехнологии. В отличие от большинства грамотрицательных бактерий, традиционно применяемых в биodeградации, актиномицеты сочетают выраженную метаболическую лабильность в отношении гидрофобных органических субстратов с экстремальной толерантностью к токсическим неорганическим ионам. Это обеспечивает их стабильное выживание и биокаталитическую активность в условиях полиметаллических и нефтесодержащих техногенных загрязнений (Ившина и др., 2021; Ivshina *et al.*, 2024a).

Уникальные адаптационные свойства данных микроорганизмов в значительной степени обусловлены особой архитектурой их клеточной оболочки. Она представлена многослойным комплексом, ковалентно связанным с внешним липофильным барьером из высокомолекулярных разветвленных миколовых кислот, длина углеродной цепи которых у родококков достигает C_{34} – C_{66} , а у представителей рода *Gordonia* варьирует в пределах C_{48} – C_{66} (Ившина и др., 2021; Cappelletti *et al.*, 2019). Наличие миколатного слоя, дополненного свободными гликолипидами, определяет гидрофобный характер клеточной поверхности, препятствуя неконтролируемой диффузии полярных гидрофильных токсикантов и обеспечивая высокий уровень мембранной стабильности (Alvarez *et al.*, 2017; Kuyukina, Krivoruchko, Ivshina, 2018).

Наряду со структурными липидами клеточной стенки нокардиоформные актиномицеты продуцируют комплекс поверхностно-активных соединений биологического происхождения (биосурфактанты). Секреция биосурфактантов выполняет двойную биотехнологическую функцию: с одной стороны, снижая поверхностное и межфазное натяжение, они эмульгируют

нерастворимые углеводородные субстраты, переводя их в биодоступное для клеточного метаболизма состояние (Костина, Куюкина, Ившина, 2010; Костина и др., 2014); с другой стороны, благодаря наличию свободных карбоксильных и гидроксильных функциональных групп молекулы биосурфактантов выступают эффективными внеклеточными комплексообразователями, способными связывать катионы ТМ, способствуя их десорбции из твердых матриц или последующему осаждению в виде нерастворимых солей (Kuyukina, Krivoruchko, Ivshina, 2018). Синергетическое действие сидерофоров и биосурфактантов родококков обеспечивает двойной эффект: биосурфактанты эмульгируют гидрофобные загрязнители, а сидерофоры параллельно связывают тяжелые металлы, препятствуя их проникновению внутрь клетки, что делает их идеальными агентами для комплексной очистки почв со смешанным загрязнением (Ivshina *et al.*, 2024a). Кроме того, поставляемое сидерофорами железо косвенно стимулирует каталитическую активность родококков, так как оно критически необходимо для работы оксигеназ, окисляющих сложные алифатические и ароматические углеводороды (Zampolli *et al.*, 2022).

Процесс извлечения ТМ биомассой бактерий реализуется через два скоординированных механизма:

- пассивная биосорбция – метаболически независимый процесс. Быстрое связывание ионов клеточной поверхностью, не требующее затрат энергии АТФ и протекающее с одинаковой эффективностью как на живых, так и на инактивированных клетках. Стенка актиномицетов насыщена отрицательно заряженными функциональными группировками тейхоевых кислот, карбоксильными группами пептидогликана, обуславливающими стабильный отрицательный электрокинетический потенциал (Kawamura, Esposito, 2010; Medina-Armijo *et al.*, 2024). Катионы металлов сорбируются по механизмам ионного обмена, координационного связывания и физической адсорбции, предотвращая мгновенное токсическое поражение цитоплазмы.

- активная биоаккумуляция – метаболически зависимый процесс. Энергозависимый трансмембранный перенос ионов внутрь жизнеспособной клетки с участием специализированных пермеаз и АВС-транспортеров, сопровождающийся внутриклеточной компартментализацией, хелатированием эндогенными лигандами или ферментативной редукцией (Ledin, 2000; Wang *et al.*, 2019).

Угледородоокисляющие актиномицеты проявляют способность функционировать в условиях экстремального элементного давления, сохраняя деструктивную активность в отношении сырой нефти, мазута и полициклических ароматических углеводородов даже в присутствии токсических доз металлов (Худокормов и др., 2012; Криворучко, 2021). Широкий профиль адаптации, отсутствие патогенности, способность к синтезу адгезивных биополимеров и склонность к автоагрегации и образованию биопленок делают бактерии родов *Rhodococcus* и *Gordonia* оптимальной биологической платформой для очистки сложных многокомпонентных сточных вод промышленных предприятий (Ivshina, Peshkur, Korobov, 2002; Litvinenko, 2019; Ivshina *et al.*, 2024a).

1.5. Биотехнологические подходы к очистке металлсодержащих сточных вод

Постоянное возрастание объемов промышленных стоков, содержащих токсичные ионы ТМ и металлоидов, ставит задачу разработки эффективных, экономически оправданных и экологически безопасных методов водоочистки. Классические физико-химические технологии детоксикации водных сред (химическое осаждение, реагентная коагуляция, ионный обмен, электродиализ, обратный осмос и адсорбция на активных углях) обладают рядом существенных технологических и экономических ограничений (таблица 3).

Таблица 3 – Преимущества и недостатки физико-химических методов удаления ТМ из водных растворов

Метод очистки	Основные преимущества	Технологические и экологические ограничения	Доминирующий механизм	Источник
Ионный обмен	Удаляет многие загрязнения, имеет высокую эффективность	Требует периодического ухода за ионообменными смолами, большие временные затраты	Обратимая химическая реакция	Fu, Wang, 2011;
Осаждение	Простота в эксплуатации, дешевизна, высокая избирательность	Производство большого количества шлама	Химическая реакция	Ahmaruzzaman, 2011
Мембранная фильтрация	Высокая эффективность, производство менее токсичных отходов, удаление многокомпонентных загрязнителей	Дорогостоящий метод и техническое обслуживание, производство отходов, потеря огромного количества воды	Избирательная проницаемость мембраны	Bessbousse <i>et al.</i> , 2010
Адсорбция	Более дешевое сырье, высокоэффективное простое управление	Высокая стоимость регенерации сорбента, различная неконтролируемая способность удаления адсорбентов	Физическая или химическая адсорбция	Gunatilake <i>et al.</i> , 2015

Применение указанных методов для глубокой доочистки стоков сопряжено с высоким расходом химических реагентов, высокими энергозатратами и рисками вторичного загрязнения природных водотоков трудноутилизируемыми осадками. Традиционные физико-химические методы экономически невыгодны и не являются экологически чистыми (Maitra, 2022). Химическое осаждение производит значительные объемы токсичного ила, требующего дорогостоящей утилизации, тогда как микробная биоремедиация предлагает устойчивую альтернативу, позволяя безопасно иммобилизовать металлы *in situ* (Meziane *et al.*, 2026). В связи с этим особое значение приобретают биотехнологические методы очистки, базирующиеся на естественных процессах микробной биосорбции, биоаккумуляции и ферментативной биотрансформации токсикантов (Молдагулова и др., 2016; Sharma, Sanghi, Mudhoo, 2012). Биологическая очистка позволяет микроорганизмам трансформировать и разлагать сопутствующие загрязнители до нейтральных продуктов, снижая капитальные вложения и эксплуатационные расходы водоочистных станций (Ступин, 2009; Максимов, Алексеев, 2014). Использование микробной биомассы экономически оправдано в долгосрочной перспективе, поскольку не только обеспечивает глубокое извлечение катионов металлов, но и сокращает размер экологических выплат предприятий за сброс неочищенных вод (Лыков, Гаранин, Петрухина, 2018). Среди ограничений биологической детоксикации отмечаются более продолжительное время обработки стока по сравнению с реагентными технологиями, а также необходимость предварительного подбора штаммов и оптимизации технологических режимов под конкретный компонентный состав сточных вод (Янкевич, Хадеева, Мурыгина, 2015; Suman *et al.*, 2018).

В процессах биологического извлечения металлов апробированы различные группы живых систем: сообщества микроводорослей и цианобактерий, удаляющие металлы одновременно с биогенными элементами – азотом и фосфором (Wu *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2017; Yadav

et al., 2020), мицелиальные грибы родов *Aspergillus* и *Trichoderma* (Алимова, 2006; Filipovic-Kovacevic, Sipos Lbriski, 2000), а также углеводородокисляющие дрожжи *Yarrowia lipolytica*, способные связывать до 50% ртути клеточной стенкой и сферопластами (Bankar, Zinjarde, Karadnis, 2012; Oyetibo *et al.*, 2016a; Oyetibo *et al.*, 2016b). Однако наибольшую технологическую гибкость проявляют бактериальные культуры. Бактерии характеризуются коротким временем генерации, что позволяет быстро наращивать биомассу в промышленных масштабах (Пищик и др., 2016; Santhy, Selvarathy, 2004). С физико-химической точки зрения бактериальные клетки представляют собой высокоэффективные биосорбенты благодаря малому размеру и высокому соотношению площади поверхности к объему, что обеспечивает максимальный контакт с растворенными токсикантами и ускоряет кинетику межфазного обмена. При этом элиминация металлов осуществляется как живой, так и инактивированной биомассой за счет пассивной биосорбции, биоаккумуляции и специализированных ферментных каскадов, включая восстановление катионов Hg^{2+} до Hg^0 ферментом MerA (François *et al.*, 2012).

Вместе с тем практическое использование свободных (суспензионных) бактериальных культур в проточных промышленных установках ограничено их высокой уязвимостью к залповым токсическим нагрузкам, гидравлическим сдвиговым напряжениям, а также трудностями сепарации и утилизации мелкодисперсной биомассы после цикла водоочистки. Преодоление данных затруднений достигается методом искусственной иммобилизации микробных клеток на твердых носителях (Патент RU2298033C2 РФ, 2007; Патент 2818318 РФ, 2023*; Ефременко, 2009).

Закрепление биомассы на матрицах обеспечивает ряд фундаментальных технологических преимуществ (Ефременко, 2009; Sharma, Sanghi, Mudhoo, 2012; Suman *et al.*, 2018):

- формирование искусственных поливидовых биопленок, защищенных слоем экзополисахаридного матрикса от прямого токсического шока;
- многократное увеличение минимальных подавляющих концентраций (МПК) токсикантов;
- предотвращение биомассового уноса (вымывания) бактерий из реакционной зоны при непрерывной подаче сточных вод;
- возможность многократного повторного использования биосорбента в циклических процессах фильтрации и регенерации.

В качестве матриц для иммобилизации микробных ассоциаций перспективно использование крупнотоннажных отходов лесоперерабатывающего комплекса – лигноцеллюлозных материалов (хвойных опилок). Использование сельскохозяйственных и древесных отходов в качестве недорогих биосорбентов имеет огромный потенциал для адсорбции тяжелых металлов благодаря наличию в них лигнина и целлюлозы, что полностью отвечает современным мировым трендам (Патент RU 2298033 С2 РФ, 2007; Патент 2818318 РФ, 2023*; Zango *et al.*, 2020). Древесный носитель обладает развитой пористой поверхностью, высокой механической прочностью, нейтральным водным балансом и наличием собственных функциональных группировок (гидроксильных, карбоксильных, метоксильных групп лигнина и целлюлозы), вносящих сорбционный вклад в первичное связывание ионов металлов (Zango *et al.*, 2020). Физико-химическая совместимость липофильной клеточной стенки актиномицетов с лигниновыми структурами древесины стимулирует быструю необратимую адгезию клеток и формирование стабильного биокаталитического покрова. Как детально показано в исследованиях биофизических и молекулярных механизмов адгезии, углеводородокисляющие родококки обладают высокой специфической аффинностью к лигноцеллюлозным матрицам. За счет гидрофобных взаимодействий и электростатического связывания они обеспечивают

надежную первичную иммобилизацию на древесных носителях и проявляют устойчивость к десорбции даже при гидравлических сдвиговых напряжениях в проточных системах (Криворучко, 2021).

Оптимальной инженерно-аппаратурной формой для реализации технологии биологической очистки выступают колоночные биореакторы проточного типа с неподвижным слоем иммобилизованного сорбента (фильтр-колонок) (Ефременко, 2009; Zango *et al.*, 2020). В отличие от аппаратов с механическим перемешиванием (где абразивное воздействие суспензии и лопастей мешалки разрушает клетки и истирает древесную матрицу), в колоночных биореакторах восходящий или нисходящий поток жидкости с ламинарным гидродинамическим режимом исключает повреждение биопленок и обеспечивает долгосрочную операционную стабильность (Flemming, Wingender, 2010; Meziane *et al.*, 2026).

Проточный режим обеспечивает непрерывный градиент концентраций по высоте сорбционного слоя: нижние слои принимают на себя основной удар концентрированного стока, а верхние осуществляют глубокую полировочную доочистку воды до нормативных требований (Hawari, Mulligan, 2006; Zango *et al.*, 2020). Сочетание высокой биосорбционной емкости иммобилизованных клеток с барьерными свойствами растительного носителя в колоночных проточных системах позволяет проводить одновременную детоксикацию полиметаллических стоков сложного фазового состава, обеспечивая высокую степень извлечения катионогенных и анионогенных поллютантов (Zango *et al.*, 2020; Meziane *et al.*, 2026). Современные тенденции развития биотехнологий включают использование генной инженерии для модификации штаммов с целью целенаправленного внутриклеточного поглощения специфических металлов, таких как мышьяк или кадмий (Maitra, 2022). Кроме того, перспективным направлением повышения эффективности биоремедиации является создание гибридных био-нанокомпозитов, объединяющих микроорганизмы с наночастицами, что ускоряет детоксикацию и облегчает извлечение отработанной биомассы (Meziane *et al.*, 2026). В частности,

использование магнитных наночастиц (например, Fe_3O_4) для иммобилизации бактериальных клеток не только повышает их сорбционную емкость за счет улучшения адгезии и электронного переноса, но и позволяет легко выделять отработанный сорбент из водной фазы с помощью магнитного поля (Meziane *et al.*, 2026). Так, инкапсулирование микробной биомассы совместно с наночастицами оксида железа сохраняет высокую эффективность поглощения ТМ (в частности, свинца) на протяжении нескольких последовательных циклов очистки (Maitra, 2022). Дополнительно микроорганизмы способны самостоятельно синтезировать биогенные металлические наночастицы в процессе восстановления ионов, что выступает как механизм детоксикации и открывает пути для зеленого синтеза наноматериалов (Maitra, 2022; Meziane *et al.*, 2026).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Рабочая коллекция и условия выращивания 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.iegmcoll.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), *R. yunnanensis* (1 штамм) (таблица 4).

Таблица 4 – Коллекционные штаммы актиномицетов, использованные в работе*

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
<i>G. alkanivorans</i>		
ИЭГМ 748	Нефтезагрязненная почва, Оса, Пермский край, Россия, 2002г.	Pb^{2+} (10,0 мМ), CrO_4^{2-} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1277	Нефтезагрязненные отходы, Сосногорск, Республика Коми, Россия, 2014 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
<i>G. amarae</i>		
ИЭГМ 720 ^{T**}	Пена на активированном иле, Андовер, Майами, Флорида, США, 1999 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (20,0 мМ); Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
<i>G. amicalis</i>		
ИЭГМ 1275	Нефтезагрязненная почва, Удмуртская Республика, Россия, 2014 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1279	Нефтезагрязненные отходы, Сосногорск, Республика Коми, Россия, 2014 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ); CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
<i>G. paraffinivorans</i>		
ИЭГМ 735	Пена с установки с активированным илом, Ирвин, Шотландия, Великобритания, 1999 г.	CrO_4^{2-} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (40,0 мМ); Cd^{2+} (20,0 мМ); Pb^{2+} (10,0 мМ)
<i>G. rubripertincta</i>		
ИЭГМ 96	Загрязненная нефтью почва, Украина, 1980 г.	Cu^{2+} , Ni^{2+} , VO^{2+} , VO_4^{2+} (2,50 мМ)
ИЭГМ 101	Почва, Украина, 1980 г.	—***
ИЭГМ 112	Почва, Украина, 1980 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 120	Почва, Украина, 1980 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 124	Загрязненная нефтью почва, Украина, 1980 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 126	Загрязненная нефтью почва, Украина, 1980 г.	Pb^{2+} (40,0 мМ), CrO_4^{2-} (5,0 мМ)
ИЭГМ 129	Загрязненная нефтью почва, нефтяное месторождение, Украина, 1980 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 132 ИЭГМ 133	Загрязненная нефтью почва, нефтяное месторождение, Украина, 1980 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 142	Почва, Украина, 1980 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 761	Нефтезагрязненная почва, Ижевск, Удмуртская Республика, Россия, 2002 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 1388 ИЭГМ 1392	Нефтезагрязненная почва, Удмуртская Республика, Россия, 2019 г.	—
<i>G. terrae</i>		
ИЭГМ 136	Загрязненная нефтью почва, Украина, 1980 г.	—
ИЭГМ 144	Загрязненная нефтью почва, Украина, 1980 г.	VO^{2+} (25,0 мМ), VO_4^{3-} (25,0 мМ), VO^{3-} (125,0 мМ)
ИЭГМ 145	Вода, р. Днепр, Украина, 1980 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
<i>R. corynebacterioides</i>		
ИЭГМ 929 ^T	Загрязнитель воздуха культуральной среды, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1202	Прибрежная почва, озеро Гольцовое, Ямало-Ненецкий автономный округ, Россия, 2011 г.	Zn^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ); Cd^{2+} (5,0 мМ)
<i>R. erythropolis</i>		

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 183	Вода, Камское водохранилище, Пермский край, Россия, 1986 г.	Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 203	Вода, наблюдательная гидрогеологическая скважина, Юрчукский нефтедобы-вающий комбинат, Пермский край, Россия, 1988 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ); Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 212	Сточные воды, Харбин, Китай, 1990 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 215	Минеральная вода, Сургутский район, Тюменская область, Россия, 1987 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ); Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 216	Загрязненные нефтью воды, водохранилище р. Кама, Пермский край, Россия, 1987 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 250	Снег, Якутия, Республика Саха, Россия, 1979 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 251	Снег, Якутия, Республика Саха, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 266	Загрязненная нефтью почва, нефтедобывающее предприятие, Пермский край, Россия, 1988 г.	CrO_4^{2-} (20,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO^{3-} (>250,0 мМ)
ИЭГМ 268	Загрязненная нефтью почва, нефтедобывающее предприятие, Пермский край, Россия, 1988 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ); Pb^{2+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO^{3-} (>250,0 мМ)
ИЭГМ 270	Загрязненная нефтью почва, нефтедобывающее предприятие, Пермский край, Россия, 1988 г.	CrO_4^{2-} (20,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO^{3-} (150,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 274	Нефтезагрязненная почва, нефтедобывающее предприятие, Пермский край, Россия, 1988 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 344	Муниципальные воды, Харбин, Китай, 1990 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ).
ИЭГМ 486	Вода, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1991 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ).
ИЭГМ 487	Вода, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1991 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 507	Почва, район заправки дизельным топливом, Пермский край, Россия, 1995 г.	CrO_4^{2-} , (10,0 мМ), Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ).
ИЭГМ 509	Почва, район заправочной станции, Пермский край, Россия, 1994 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 658	Ризосфера одуванчика обыкновенного <i>Taraxacum officinale</i> , почва, шоссе, г. Новосибирск, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 659	Почва, шоссе, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	CrO_4^{2-} (20,0 мМ), Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 661	Целинная почва, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 662	Почва, Новосибирск, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ)
ИЭГМ 758	Образец осадка, взятого из-под резервуара для хранения тетрахлорэтилена, 1994 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Cd^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 770	Техногенно загрязненные почвы, Губаха, Пермский край, Россия, 2000 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 784	Почва, Новосибирск, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (20,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 785	Целинная почва, Академгородок, Новосибирск, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 786 ИЭГМ 787	Почва, Новосибирск, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 788	Нефтезагрязненная почва, Новосибирская область, Россия, 2009 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1017	Ризосфера ежи сборной <i>Dactylis glomerata</i> , Пермь, Пермский край, Россия, 2010 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1018	Ризосфера мать-и-мачехи <i>Tussilago farfara</i> , автозаправочная станция, Пермь, Пермский край, Россия, 2010 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1020	Вода, предприятие по производству парацетамола, Пермский край, Россия, 2013 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1167	Ризосфера горца птичьего <i>Polygonum aviculare</i> , автозаправочная станция, Пермь, Пермский край, Россия, 2010 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1178	Ризосфера мятлика лугового <i>Poa pratensis</i> , шоссе к соляному отвалу, Соликамск, Пермский край, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1179	Ризосфера мятлика лугового <i>Poa pratensis</i> , берега реки Черная, Соликамск, Пермский край, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} , Zn^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1180	Почва, берег р. Черная, Соликамск, Пермский край, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} , Zn^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 1182	Почва соляного отвала, Соликамск, Пермский край, Россия, 2011 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (20,0 мМ), Ni^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1188	Почва соляного отвала, Соликамск, Пермский край, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1192	Нефтезагрязненная почва, Пермский край, Россия, 2011 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (20,0 мМ), Ni^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1199	Загрязненная нефтью почва, автозаправочная станция, Пермский край, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} , Ni^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1204	Почва, пос. Ягельный, Тюменская область, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1205	Почва, берег оз. Гальцовое, полуостров Мамонтова, Тюменская область, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1232	Нефтезагрязненная почва, Пермский край, Россия, 2013 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1245	Почва около оз. Безымянное, Тюменская область, Россия, 2013 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1247	Ризосфера, берега оз. Энтльлор, Тюменская область, Россия, 2013 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1249	Ризосфера, Тюменская область, Россия, 2013 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} , Ni^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 1268	Нефтезагрязненная почва, Удмуртская Республика, Россия, 2014 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1303	Вода, оз. Цингинский сор, Тюменская область, Россия, 2014 г.	CrO_4^{2-} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1321	Донные отложения ручья, остров Кейн, Земля Франца-Иосифа, Новая Земля, Архангельская область, Россия, 2016 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1353	Ni-загрязненная почва, территория металлургического предприятия, Пермь, Россия, 2017 г.	Ni^{2+} (20,0 мМ), Cd^{2+} , CrO_4^{2-} , Zn^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1389	Почва, Удмуртская Республика, Россия, 2019 г.	—
<i>R. fascians</i>		
ИЭГМ 34	Кожа карпа, 1980 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 35 ИЭГМ 36	Пластовая вода нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1979 г.	Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 37	Пластовая вода нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1979 г.	Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 38	Пластовая вода нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1979 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (25,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 39	Пластовая вода нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1979 г.	Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ), накапливает никель

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 40 ИЭГМ 41 ИЭГМ 42	Пластовая вода нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1979 г.	Ni^{2+} (10,0 мМ), CrO_4^{2-} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 43	Загрязненная нефтью почва нефтегазового месторождения, Украина, 1980 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 173	Загрязненная нефтью вода, водохранилище реки Кама, Пермский край, Россия, 1986 г.	Ni^{2+} (10,0 мМ), Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 177	Загрязненная нефтью вода, р. Кама, Пермский край, Россия, 1986 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (10,0 мМ), Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 178	Загрязненная нефтью вода, водохранилище реки Кама, Пермский край, Россия, 1986 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Ni^{2+} (10,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 276	Почва, 1980 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ), CrO_4^{2-} , Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 277	Кишечный тракт карпа, 1980 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 278	Речная вода, Тюменская область, Россия, 1987 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 279	Загрязненная нефтью вода, Тюменская область, Россия, 1987 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Ni^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 280	Загрязненная нефтью вода, Тюменская область, Россия, 1987 г.	CrO_4^{2-} (20,0 мМ), Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} (10,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 281	Вода, нефтедобывающее предприятие, Пермская область, Россия, 1987 г.	CrO_4^{2-} (20,0 мМ), Ni^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 288	Горная порода Пермского края, Россия, 1987 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ), CrO_4^{2-} , Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 289	Почва, 1980 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 414 ^T	2011 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Ni^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 524	Почва, Краснокамскнефть, Пермский край, Россия, 1994 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 529	Почва, Краснокамскнефть, Пермский край, Россия, 1994 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 531	Почва, Ножовка, Краснокамскнефть, НГДУ, Пермский край, Россия, 1994 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 535	Техногенно загрязненные почвы, Губаха, Пермский край, Россия, 2008 г.	Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1072	Ризосфера полыни обыкновенной <i>Artemisia vulgaris</i> , территория автозаправочной станции, Пермь, Пермский край, Россия, 2010 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 1159	Ризосфера тысячелистника <i>Achillea</i> , почвы, бывшей свалки, Пермь, Пермский край, Россия, 2009 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 1168	Ризосфера полыни обыкновенной <i>Artemisia vulgaris</i> , почвы, автозаправочной станции, Пермь, Пермский край, Россия, 2010 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1213	Ризосфера, почва, Свердловская область, Россия, 2011 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1218	Ризосфера, почва, Свердловская область, Россия, 2011 г.	CrO_4^{2-} , Ni^{2+} , Pb^{2+} (10,0 мМ), Zn^{2+} (10,0 мМ), Cd^{2+} , Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1226	Вода, Лысьвенский пруд, Пермский край, Россия, 2011 г.	Cd^{2+} , CrO_4^{2-} , Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1233	Ризосфера пырея ползучего <i>Elytrigia repens</i> , нефтяное месторождение, Пермский край, Россия, 2013 г.	CrO_4^{2-} , Zn^{2+} (10,0 мМ), Pb^{2+} (5,0 мМ)
<i>R. jostii</i>		
ИЭГМ 33	Загрязненная нефтью почва, нефтяное месторождение, Украина, 1980 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 60	Загрязненная нефтью почва, нефтяное месторождение, Украина, 1982 г.	—
ИЭГМ 458	Загрязненная нефтью почва, нефтегазовое месторождение, 1994 г.	—
ИЭГМ 508	Почва, район заправочной станции, Пермский край, Россия, 1994 г.	—
ИЭГМ 550	Техногенное загрязнение почвы, Губаха, Пермский край, Россия, 2008 г.	—
ИЭГМ 589	Почва, Украина, 1994 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 951 ^Т	Бедренная кость из останков в средневековой могиле, Брно, Чешская Республика, 2011 г.	—
ИЭГМ 1170	Ризосфера одуванчика обыкновенного <i>Taraxacum officinale</i> , район газопровода, Пермь, Пермский край, Россия, 2010 г.	—
ИЭГМ 1193	Нефтезагрязненная почва, биологическая станция, Соликамск, Пермский край, Россия, 2011 г.	—
<i>R. oracus</i>		
ИЭГМ 56	Почва лесополосы, Украина, 1980 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO_4^{3-} (25,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 57	Загрязненная нефтью почва, Украина, 1982 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO_4^{3-} (25,0 мМ)
ИЭГМ 58	Почва, Украина, 1982 г.	Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 59	Почва, Украина, 1982 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 248	Почва производства лавсана, Беларусь, 1989 г.	—
ИЭГМ 261	Почва производства лавсана, Беларусь, 1989 г.	CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 262 ИЭГМ 263 ИЭГМ 264	Почва производства лавсана, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 488	Загрязненная нефтью вода, река Уньва, Пермский край, Россия, 1988 г.	—
ИЭГМ 716 ^Т	Дефектная труба муниципального газового завод, 1995 г.	VO_4^{3-} (25,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 717	Почва, 1995 г.	VO_4^{3-} (12,5мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 765	Загрязненная нефтью почва, Пермский край, Россия, 1995 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1157	Ризосфера подорожника, почва бывшей свалки, Пермь, Пермский край, Россия, 2009 г.	—
ИЭГМ 2226	Нефтезагрязненная почва, Пермский край, Россия, 2014 г.	—
<i>R. oxybenzonivorans</i>		
ИЭГМ 28	Почва, берег пруда, Днепропетровская область, Украина, 1980 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (100,0 мМ), VO_3^- (150,0 мМ)
ИЭГМ 29	Загрязненная нефтью почва, нефтегазовое месторождение, Украина, 1980 г.	VO^{2+} (25,0 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 30	Загрязненная нефтью почва, нефтяное месторождение, Украина, 1980 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 31	Загрязненная нефтью почва, нефтегазовое месторождение, Украина, 1980 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO^{2+} (25,0 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 32	Почва, Полтавская область, Украина, 1980 г.	VO^{2+} (25,0 мМ), VO_4^{3-} (50,0мМ), VO_3^- (100,0 мМ)
ИЭГМ 68	Почва, нефтедобывающий комбинат «Полазна», Пермский край, Россия, 1988 г.	VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (100,0 мМ), VO_3^- (>250,0мМ)
<i>R. pyridinivorans</i>		
ИЭГМ 639	Снег, нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1997 г.	CrO_4^{2-} (40,0 мМ), Zn^{2+} (20,0 мМ), Cd^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 1055 ^T	Промышленные сточные воды, Северная Корея, 2011 г.	Pb ²⁺ (20,0 мМ), CrO ₄ ²⁻ (10,0 мМ), Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ (5,0 мМ)
ИЭГМ 1142	Ризосфера, Свердловская область, Россия, 2012 г.	CrO ₄ ²⁻ (40,0 мМ), Zn ²⁺ (20,0 мМ), Cd ²⁺ (5,0 мМ)
<i>R. qingshengii</i>		
ИЭГМ 247	Почва производства полиэфирного волокна лавсан, Открытое акционерное общество “Могилевхимволокно”, Могилев, Беларусь, 1989 г.	Zn ²⁺ (20,0 мМ), CrO ₄ ²⁻ , Pb ²⁺ (5,0 мМ)
ИЭГМ 267	Загрязненная нефтью почва, нефтедобывающее предприятие, Пермский край, Россия, 1988 г.	CrO ₄ ²⁻ (5,0 мМ), VO ²⁺ (12,5 мМ), VO ₄ ³⁻ (50,0 мМ), VO ₃ ⁻ (250,0 мМ)
ИЭГМ 1016 ^T	Загрязненный карбендазимом образец почвы с овощного поля, провинция Цзянсу, Китай, 2011 г.	Pb ²⁺ (20,0 мМ), Cd ²⁺ , CrO ₄ ²⁻ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ (5,0 мМ)
ИЭГМ 1262	Нефтяной шлам, Удмуртская Республика, Россия, 2014 г.	Zn ²⁺ (20,0 мМ), CrO ₄ ²⁻ (5,0 мМ)
ИЭГМ 1270	Нефтяной шлам, Удмуртская Республика, Россия, 2014 г.	Zn ²⁺ (40,0 мМ), Ni ²⁺ (20,0 мМ), CrO ₄ ²⁻ (10,0 мМ)
<i>R. rhodochrous</i>		
ИЭГМ 62 ^T	1980 г.	Pb ²⁺ (40,0 мМ), CrO ₄ ²⁻ (20,0 мМ), Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ (10,0 мМ), VO ²⁺ (25,0 мМ)
ИЭГМ 64	1980 г.	CrO ₄ ²⁻ (5,0 мМ), VO ²⁺ (12,5 мМ), VO ₄ ³⁻ (50,0 мМ), VO ₃ ⁻ (>250,0 мМ), накапливает никель

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 629	Вода, Березники, Пермский край, Россия, 1994 г.	CrO_4^{2-} (40,0 мМ), Zn^{2+} (20,0 мМ)
ИЭГМ 646	Вода, Березники, Пермский край, Россия, 1994 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (100,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 647	Вода, Межевское нефтяное месторождение, Пермский край, Россия, 1994 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO_3^- (250,0 мМ)
ИЭГМ 1137	Нефтезагрязненная почва, Соликамск, Пермский край, Россия, 2011 г.	CrO_4^{2-} (40,0 мМ), Zn^{2+} (20,0 мМ), Cd^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1162	Ризосферп аттриплекса, почва бывшей свалки, Пермь, Пермский край, Россия, 2009 г.	CrO_4^{2-} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (40,0 мМ), Cd^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1298	Вода, оз. Арантур, Россия, 2014 г.	—
<i>R. ruber</i>		
ИЭГМ 77	Вода, родник, контурная зона нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1986 г.	VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (100,0 мМ), VO_3^- (>250,0 мМ)
ИЭГМ 81	Песчаная почва, Гомельская область, Беларусь, 1985 г.	Cd^{2+} (10,0 мМ), Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 85	Вода поверхностного водохранилища, полуостров Таймыр, Красноярский край, Россия, 1984 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Cd^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 90	Вода поверхностного водохранилища, полуостров Таймыр, Красноярский край, Россия, 1984 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 91	Вода поверхностного водохранилища, полуостров Таймыр, Красноярский край, Россия, 1984 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 92	Вода поверхностного водохранилища, полуостров Таймыр, Красноярский край, Россия, 1984 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 93	Песчаная почва, Иркутская область, Восточная Сибирь, Россия, 1986 г.	VO^{2+} (25,0 мМ), накапливает никель
ИЭГМ 231	Вода, родник, Ольховский маслоэкстракционный комбинат, Пермский край, Россия, 1988 г.	VO^{2+} (25,0 мМ), накапливает никель
ИЭГМ 232	Почва, Полазنانского нефтедобывающего предприятия, Пермский край, Россия, 1988 г.	—
ИЭГМ 233	Почва, Полазنانского нефтедобывающего предприятия, Пермский край, Россия, 1988 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 241	Меловая порода, глубина 80 м, Беларусь, 1986 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 337	Глина с 18 м, Беларусь, 1987 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 376	Вода, Федоровское нефтяное месторождение, Тюменская область, Россия, 1977 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 377	Загрязненные нефтью воды, Западно-Сургутское нефтяное месторождение, Тюменская область, Россия, 1977 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ), CrO_4^{2-} (5,0 мМ)
ИЭГМ 378	Почва, Иркутск, Россия, 1987 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 379	Почва, загрязненная промышленными стоками завода химических волокон, Могилев, Беларусь, 1989 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 380	Вода, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 381	Вода, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 382	Донные отложения, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1991 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 383	Донные отложения, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1991 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 384	Донные отложения, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1991 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 385 ИЭГМ 386	Донные отложения, оз. Байкал, Иркутская область, Россия, 1991 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 387	Торф, почва, берег р. Печора, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 436	Почва, берег реки Печора, Россия, 1989 г.	Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 437	Загрязненная нефтью вода, р. Уньва, район добычи нефти, Пермский край, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 438	Загрязненная нефтью вода, район нефтедобывающего предприятия, Пермский край, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 439	Вода, Пермский край, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 440 ИЭГМ 441	Загрязненный нефтью песок, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 442	Снег, нефтяное месторождение, Пермский край, Россия, 1989 г.	Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 443	1989 г.	CrO_4^{2-} , Pb^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 445	Пластовая вода нефтяного месторождения, Пермский край, Россия, 1989 г.	Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 446	Плохо обработанная супесчаная почва, река Чона, Якутия, Республика Саха, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 447	Почва, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 449 ИЭГМ 452	Песок, Беларусь, 1989 г.	Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 450	Песок, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 453	Вода, Ольховский нефтедобывающий комбинат, Пермский край, Россия, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 454 ИЭГМ 455	Песок, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (40,0 мМ); CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 456	Песок, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (40,0 мМ); CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 457	Песок, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ), Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 468 ИЭГМ 472	Нефтезагрязненный песок, Мозырь, Гомельская область, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 471	Почва, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (40,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 474	Нефтезагрязненная почва, Беларусь, 1989 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 475	Песок с глубины 6 м, Беларусь, 1989 г.	—
ИЭГМ 476	Песок с глубины 80 м, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (40,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
ИЭГМ 478	Почва, Беларусь, 1989 г.	—
ИЭГМ 480	Меловая порода с глубины 60 м, Беларусь, 1989 г.	Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 560 ИЭГМ 561	Песок с глубины 6 м, Беларусь, 1989 г.	CrO_4^{2-} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 565	Песок с глубины 6 м, Беларусь, 1989 г.	—
ИЭГМ 583 ИЭГМ 584	Песок с глубины 6 м, Беларусь, 1989 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 612	Почва, Пермь, Пермский край, Россия, 2000 г.	Ni^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 657	Почва, Лестер, Англия, 1995 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 759	Отходы химического завода, Германия, 1995 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 896	Почва, ризосфера мятлика лугового <i>Poa pratensis</i> , завод ГАЛОГЕН, Пермский край, Россия, 1997 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1126	Почва, ризосфера лебеды <i>Atriplex</i> , Пермский край, Россия, 2012 г.	Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1127	Ризосфера крапивы двудомной <i>Urtica dioica</i> , газопроводная зона, Пермь, Россия, 2012 г.	CrO_4^{2-} (10,0 мМ), Pb^{2+} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1129 ИЭГМ 1130	Ризосфера крапивы двудомной <i>Urtica dioica</i> , почвы, газопроводной зоны, Пермь, Пермский край, Россия, 2012 г.	Pb^{2+} (20,0 мМ), CrO_4^{2-} (5,0 мМ)
ИЭГМ 1217	Ризосфера, почва, Свердловская область, Россия, 2011 г.	Pb^{2+} (10,0 мМ)
ИЭГМ 1352	Ni-загрязненная почва, территория металлургического предприятия, Пермь, Пермский край, Россия, 2017 г.	CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ)

Продолжение таблицы 4

Номер штамма	Источник выделения, географическое положение, год выделения	Характеристика штаммов: известная устойчивость к ТМ в МПБ
<i>R. wratislaviensis</i>		
ИЭГМ 1171	Ризосфера крапивы двудомной <i>Urtica dioica</i> , почва, автозаправочная станция, Пермь, Пермский край, Россия, 2010 г.	—
<i>R. yunnanensis</i>		
ИЭГМ 1323	Почва, остров Гукера, Земля Франца-Иосифа, Архангельская область, Россия, 2016 г.	CrO_4^{2-} (5,0 мМ)

Примечание: * – данные с сайта <http://www.iegmc.ru/strains/index.html> (доступ от 21 апреля 2025 г.); ** – типовой штамм; *** – нет данных.

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 ртути и молибдену проводили с использованием показателя МПК, используя метод двукратных серийных разведений (Performance Standards..., 2017). В экспериментах использовали две среды: *богатую* питательную – 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 течении 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).

2.2. Химические реагенты

В работе использовали химические реактивы отечественного и зарубежного производства квалификации «химически чистый» (х.ч.) и «особо чистый» (ос.ч.).

Соли тяжелых металлов и металлоидов. Для моделирования элементного стресса и приготовления растворов использовали неорганические

соли аналитической чистоты: дигидрат ацетата кадмия, гептагидрат сульфата цинка, хлорид ртути(II), нитрат свинца(II), хромат калия, гептамолибдат(VI) тетрагидрат аммония, гептагидрат сульфата никеля(II), пентагидрат сульфата меди(II), тетрагидрат хлорида марганца(II) (Реахим, Россия), оксид мышьяка(III) (Sigma-Aldrich, США). Исходные маточные растворы солей готовили на дистиллированной воде, стерилизовали мембранной фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США, Advantec, Япония) и хранили в герметичной светонепроницаемой посуде при температуре 4 °C не более 3 месяцев.

Компоненты питательных сред и буферных систем.

Для культивирования микроорганизмов использовали сухие питательные среды: мясопептонный агар (МПА, Оболенск, Россия) и МПБ (Sigma-Aldrich, США). Минеральную основу среды RS составляли неорганические соли (г/л): KH_2PO_4 – 2,0; K_2HPO_4 – 2,0; CaCl_2 – 0,02; MgSO_4 – 0,2; KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; FeCl_3 – 0,01 с добавлением микроэлементов (м/э) по Постгейту (0,1 об.%) (Postgate, 1959). В качестве гидрофобного источника углерода и энергии применяли *n*-гексадекан ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}$), чистота $\geq 99,0\%$, Экос-1, Россия). Для отмывки и суспендирования биомассы применяли 0,05 М фосфатный буфер (pH 7,0) следующего состава (г/л): Na_2HPO_4 – 3,53; KH_2PO_4 – 3,39.

Красители и флуорохромы. Оценку метаболического статуса и ультраструктурных компонентов клеток проводили с использованием специализированных флуоресцентных и колориметрических маркеров:

- 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенилтетразолий хлористый (INT, 0,2% водный раствор; Sigma-Aldrich, США);
- набор двухкомпонентного витального флуоресцентного окрашивания LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (SYTO 9 и пропидий йодид; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США);

- флуоресцентный маркер β -гликанов клеточной стенки и полисахаридного матрикса Calcofluor White Stain (со флуорохромом Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich, США);
- липофильный флуоресцентный зонд для нейтральных липидов Нильский красный (Nile Red; Sigma-Aldrich, США).

2.3. Контрольные эксперименты

Для обеспечения достоверности полученных результатов, нивелирования фоновых физико-химических факторов среды и корректной интерпретации биологического действия ТМ во всех сериях опытов использовали систему независимых контролей.

Биотический контроль (отрицательный контроль токсичности). Бактериальные культуры инкубировали в тех же средах (МПБ или RS) при идентичных параметрах аэрации и температуры, но без добавления солей ТМ. Данный контроль служил базовым эталоном интактного состояния клеток при оценке МПК, параметров дыхания (респирометрии), каталазной активности, антибиотикочувствительности, морфометрических параметров и электрокинетического потенциала.

Абиотический контроль (контроль стабильности токсикантов). Стерильные питательные среды (МПБ, RS), а также растворы имитированных сточных вод (СВ № 1–6), содержащие расчетные концентрации солей исследуемых металлов, инкубировали при тех же условиях без внесения бактериального инокулята. Контроль позволял количественно учесть спонтанную убыль ионов за счет их физико-химического осаждения, сорбции на стеклянных и полипропиленовых стенках лабораторной посуды, а также естественного испарения при аэрации.

Сорбционный абиотический контроль носителя (контроль матрицы иммобилизации). Стерильный лигноцеллюлозный носитель (хвойные опилки фракции 1–3 мм) в эквивалентной навеске (2,0 г на 100 мл жидкой фазы) экспонировали в растворах модельных сточных вод в идентичных режимах

перемешивания (шейкер) и проточной фильтрации (колоночный биореактор) в отсутствие бактериальной биомассы. Контроль служил для разграничения сорбционной емкости матрицы и истинного биокаталитического вклада иммобилизованных клеток актиномицетов.

Инактивированный биологический контроль (контроль пассивной биосорбции). В кинетических исследованиях поглощения молибдена и ртути использовали микробную биомассу, термически инактивированную автоклавированием. Это позволяло дифференцировать пассивное физико-химическое связывание ионов функциональными группами клеточной стенки от активного энергозависимого биоаккумуляирования живыми клетками.

Аналитический (холостой) контроль приборных измерений. При определении концентраций металлов на атомно-абсорбционном спектрометре «МГА-1000» в качестве холостых проб использовали деионизированную воду (удельное сопротивление 18,2 Мом·см), прошедшую полную процедуру пробоподготовки (кислотную минерализацию концентрированной HNO_3) аналогично опытным пробам.

При постановке ПЦР и цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) отрицательным контролем служили пробы без матрицы ДНК/кДНК для исключения контаминации реакционной смеси.

2.4. Иммобилизация бактериальных клеток

В экспериментах по изучению устойчивости иммобилизованных бактериальных клеток в качестве носителя использовали адсорбент на основе древесных пород (хвойные опилки размером 1–3 мм) из отходов деревообрабатывающей промышленности. Культивирование осуществлялось в МПБ и RS с добавлением микроэлементов и *n*-гексадекана C_{16} .

Процедуру иммобилизации проводили в стеклянных пробирках. В пробирки вносили 0,02 г древесных опилок, закрывали ватно-марлевыми пробками и автоклавировали при 105°C в течение 15 мин. После этого вносили 1 мл готовой бактериальной суспензии, разведенной в стерильном физиологическом растворе.

В экспериментах по изучению способности клеток актиномицетов к адсорбции и их окисляющей активности адсорбент на основе хвойных опилок (размер частиц 0,1–0,3 см) 2 г помещали в 100 мл клеточной суспензии с ОП₆₀₀ 1,0 в фосфатном буфере. Бактериальные клетки предварительно выращивали в МПБ. Через 48 ч культивирования клеточную суспензию центрифугировали при 3500 об/мин в течение 15 мин для удаления остаточного субстрата. Осажденную биомассу дважды отмывали фосфатным буфером. Перед использованием носитель автоклавировали.

Степень адсорбции бактериальных клеток на носителе оценивали с помощью спектрофотометра по разнице показателей оптической плотности клеточной суспензии до и после нанесения на сорбент.

Процесс адсорбции осуществляли при перемешивании 120 об/мин и температуре 28 °С в течение 2–4 сут. Степень адсорбции бактериальных клеток на поверхности носителя вычисляли по формуле (1):

$$S = \frac{(S_{исх} - S_{равн}) \times 100\%}{S_{исх}} \quad (1),$$

где S – степень адсорбции, %; S_{исх} – оптическая плотность суспензии до иммобилизации; S_{равн} – оптическая плотность после иммобилизации.

По истечению срока культивирования промывали адсорбент от неприкрепленных клеток фосфатным буфером.

В качестве контроля использовали неинокулированный носитель.

2.5. Жизнеспособность свободных и иммобилизованных бактериальных клеток

Жизнеспособность клеток в присутствии ТМ определяли специфическим окрашиванием бактерий INT (Kuyukina *et al.*, 2006). INT-тест основан на дегидрогеназной активности активно респирлирующих клеток, в результате которой INT является конечным акцептором электронов. Данный краситель действует в качестве конкурентного кислороду акцептора электронов в электрон-транспортной цепи аэробных организмов. В результате

реакции, слабоокрашенное легкорастворимое вещество восстанавливается до нерастворимого в воде красно-фиолетового INT-формазана.

В ходе эксперимента 100 мкл исследуемой суспензии (содержащей бактериальные клетки, питательную среду и раствор металлов) окрашивали непосредственно в полистироловом 96-луночном планшете путем внесения в лунку 50 мкл 0,2% водного раствора INT. В результате восстановления красителя наблюдали красно-фиолетовое окрашивание, что свидетельствовало о присутствии в образце активно респираторных бактериальных клеток.

Для определения жизнеспособности иммобилизованных клеток в пробирки вносили 250 мкл 0,2%-го водного раствора INT. Через 1 ч инкубирования при комнатной температуре развитие красно-фиолетового окрашивания фиксировали визуально непосредственно на поверхности древесного носителя (без предварительной десорбции клеток).

Для детекции живых и мертвых бактериальных клеток суспензию окрашивали двухкомпонентным флуоресцентным красителем LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США). Для дифференциации живых и мертвых клеток из опытных (культивируемых в присутствии ТМ) и контрольных образцов бактериальной суспензии готовили препараты на предметных стеклах. Образцы окрашивали эквивалентным объемом LIVE/DEAD, высушивали на воздухе в темноте в течение 10–15 мин, после чего промывали деионизованной водой для удаления несвязавшегося красителя. Препараты просматривали в свете ртутной лампы с помощью 100х объектива с использованием не флуоресцирующего иммерсионного масла в режиме флуоресценции на микроскопе Axio Imager M2 (Zeiss, Германия). Неповрежденные клетки двухкомпонентный краситель LIVE/DEAD (SYTO9 и PI) окрашивал в зеленый, мертвые – в красный, живые клетки с поврежденными клеточными стенками – в оранжевый цвет.

Количество жизнеспособных клеток в 1 мл исследуемого материала рассчитывали по формуле (2):

$$M = \frac{a \times F \times 10^6}{v \times S}, \quad (2),$$

где M – количество жизнеспособных клеток; a – среднее значение количества клеток, флуоресцирующих зеленым цветом; F – площадь покровного стекла; 10^6 – коэффициент перевода мм^2 в мкм^2 ; v – объем капли; S – площадь просчитываемого поля зрения микроскопа. Соотношение живых, мертвых и клеток с поврежденными клеточными стенками определяли в процентах от общей суммы клеток, подсчитываемых под микроскопом.

2.6. Минимальные подавляющие концентрации молибдена и ртути

МПК ртути и молибдена в отношении актиномицетов определяли методом двукратных серийных разведений (Kuyukina *et al.*, 2006) в МПБ и RS с использованием полистироловых планшетов стандартной конфигурации 8×12 (96) лунок (Медполимер, Россия). В каждую лунку планшета стерильно вносили 100 мкл среды и серийно разводили водные растворы солей ТМ. HgCl_2 вносили в начальной концентрации 5,0 мМ, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 80,0 мМ с последующим двукратным разведением. К полученной смеси добавляли по 100 мкл бактериальной суспензии ($3,0 \times 10^7$ кл/мл). В качестве посевного материала использовали 48 ч культуры, предварительно выращенные на МПА. Бактериальные взвеси готовили в стерильном физиологическом растворе и вносили в лунки планшета, содержащие предельные разведения ТМ. Бактерии инкубировали на протяжении 3 сут при температуре 28 °С в условиях перемешивания. По истечении срока культивирования в каждую лунку вносили по 50 мкл 0,2%-го водного раствора INT, после чего планшеты дополнительно инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1–2 ч (до развития окрашивания в контрольных лунках).

Оценку метаболической активности клеток проводили визуально. В лунках с активно респираторными (жизнеспособными) бактериями наблюдалось восстановление бесцветного красителя с образованием красно-фиолетового преципитата формазана. За МПК принимали наименьшую концентрацию ионов ТМ, при которой визуально полностью отсутствовало

изменение цвета реакционной смеси, что свидетельствовало о полном ингибировании роста и дыхательной активности бактериальной популяции.

2.7. Микроскопические исследования

2.7.1. 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 $\times 1000$.

Для детекции экзополисахаридов использовали флуорохромный краситель Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich, Германия). Калькофлюор белый специфически связывается с β -(1,3) и β -(1,4)-гликозидными связями структурных полисахаридов (пептидогликана клеточной стенки и экзополисахаридов матрикса биопленок).

2.7.2. Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Для получения изображений бактериальных клеток с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV 1000 (КЛСМ, Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D (АСМ, Asylum Research, США), каплю (15–20 мкл) клеточной суспензии помещали на покровное стекло, смешивали с эквивалентным объемом флуоресцентного красителя Live/Dead[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и подсушивали при комнатной температуре в темноте в течение 10–15 мин. Препарат промывали деионизированной водой и сканировали с помощью КЛСМ. Для возбуждения флуоресценции SYTO9 и пропидиум йодида, входящих в состав красителя Live/Dead[®], применяли аргоновый лазер ($\lambda=488$ нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda=543$ нм) с 560/660-нм барьерным фильтром, соответственно. Изображения клеток

(размер $0,12 \times 0,12$ мм, разрешение 1600×1600 пикселей) получали со скоростью 40 нм/пиксель. Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и контактной жесткостью 0,5–4,4 Н/м. Для получения комбинированных изображений АСМ-КЛСМ изображение КЛСМ импортировалось в программное обеспечение АСМ (Igor Pro 6/22A Wave Metrics, Портленд, Орегон, США). Для каждого условия анализировали не менее 5 клеток. Данные представлены как среднее (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD).

2.7.3. Просвечивающая электронная микроскопия

Культуры, выращенные в течение 72 ч на плотных средах без или в присутствии ТМ, фиксировали в 2,5% глутаральдегиде (вес/об.) в 0,1 М буфере какодилата натрия (рН 7,2) в течение 2,5 часов и затем постфиксировали в 1% (вес/об.) четырехоксида осмия в том же буфере. Зафиксированный материал обезвоживали серией растворов этанола, в том числе абсолютным этанолом, насыщенным ацетатом уранила и заливали в аралдит. Тонкие срезы готовили на ультратоме 8800 Ultratome III (LKB-Produkter, Швеция) и окрашивали цитратом свинца. Ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) JEM-1400 (Jeol, Япония).

2.8. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия с картированием элементов

Суспензии клеток в дистиллированной воде (без фиксатора) наносили на покрытые формваром и армированные углеродом медные сетки и сушили на воздухе. ПЭМ с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС) и картированием элементов выполняли на микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенном системой энергодисперсионного рентгеновского

анализа (Inca Energy-350, Oxford Instruments, Великобритания), работающей при ускоряющем напряжении 80 кэВ (угол наклона 15°). ЭДС-спектры и элементные карты были получены с использованием программного обеспечения AZtec (Oxford Instruments, Великобритания).

2.9. Внутриклеточные липидные включения

Для детекции внутриклеточных липидных включений бактериальные клетки окрашивали 0,08 % раствором красителя Nile Red (Nanjing Dulai Biotechnology Co., Китай) в ДМСО, как описано ранее (Mrunalini, Girisha, 2017). Для этого суспензию клеток (1 мл) центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин (центрифуга MiniSpin, Eppendorf, Германия). Осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и добавляли 40 мкл рабочего раствора Nile Red (конечная концентрация 0,3 мкг/мл). Полученную суспензию инкубировали при 28°C в течение 40 мин при постоянном перемешивании (160 об/мин). Клетки отделяли от реакционной среды центрифугированием и ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды. Окрашенную клеточную суспензию (20 мкл) наносили на чистое предметное стекло и регистрировали флуоресценцию при использовании узкополосного светофильтра 450–500 нм на микроскопе Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Германия).

2.10. Гидрофобность клеток

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). Метод основан на том, что при повышении ионной силы раствора гидрофобные взаимодействия между клетками усиливаются, что приводит к их флокуляции (агрегации). Чем выше доля гидрофобных клеток в суспензии, тем при меньшей концентрации соли наблюдается агрегация.

Для проведения теста готовили серию растворов сульфата аммония ((NH₄)₂SO₄, ч.д.а.) в дистиллированной воде в интервале концентраций от 0

до 2,0 М с шагом 0,4 М (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 М). Маточный раствор 2,0 М готовили растворением соли в 100 мл дистиллированной. Рабочие растворы меньших концентраций получали последовательным разбавлением маточного раствора 2,0 М дистиллированной водой согласно таблице 5. pH каждого раствора довели до $6,8 \pm 0,1$ с помощью 0,1 М растворов NaOH или HCl. Контроль pH проводили с помощью pH-метра (Mettler-Toledo, США). Растворы стерилизовали фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США), разливали в стерильные герметичные флаконы и хранили при комнатной температуре. Срок хранения составлял не более 6 месяцев; при появлении помутнения или осадка растворы заменяли свежеприготовленными.

Таблица 5 – Разведение сульфата аммония для теста SAT

Концентрация (NH₄)₂SO₄, М	(NH₄)₂SO₄ 2,0 М, мл	Дистиллированная вода, мл	Конечный объем, мл
0	0	2,0	2,0
0,4	0,4	1,6	2,0
0,8	0,8	1,2	2,0
1,2	1,2	0,8	2,0
1,6	1,6	0,4	2,0
2,0	2,0	0	2,0

Бактериальные клетки, выращенные в соответствующих условиях, дважды отмывали фосфатным буфером (pH 6,8) и ресуспендировали в том же буфере до конечной концентрации клеток 3×10^8 кл/мл. Концентрацию клеток определяли по оптическому стандарту мутности.

На предметное стекло наносили по 10 мкл бактериальной суспензии и 10 мкл раствора сульфата аммония, аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 2 минут при комнатной температуре. Контролем служила смесь клеток с фосфатным буфером (без соли). Агрегацию клеток оценивали визуально под световым микроскопом Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 1000$. За степень гидрофобности принимали минимальную концентрацию (NH₄)₂SO₄, при которой наблюдалось образование видимых клеточных агрегатов (флокулов).

Интерпретацию результатов проводили согласно шкале, предложенной Mattos-Guaraldi и соавт. (1999): высокая гидрофобность – показатель солености раствора сульфата аммония от 0 до 0,8 М; умеренная – при 1,0–2,0 М; слабая – при 2,2–3,8 М. Все измерения выполняли в трех независимых повторностях.

2.11. Респираторная активность

Оценку респираторной активности осуществляли с помощью высокочувствительного 10-канального респирометра непрямого цикла MicroOxymax[®] (Columbus Instruments, США). Эксперименты проводили в колбах Micro-Охумах с объемом 300 мл, содержащих 100 мл среды (МПБ, RS), в условиях постоянного перемешивания (160 об/мин, $28 \pm 2^\circ\text{C}$) с помощью многоместной магнитной мешалки RT 10 (Power IKAMAG, Германия). Количество (мкл) и скорость (мкл/час) поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа регистрировались автоматически каждые 24 мин в течение 7 сут. В качестве контроля использовали абиотический и биотический контроль без добавления ТМ.

2.12. Каталазная активность

Каталазную активность родококков в присутствии ТМ определяли по методике, описанной в работе (Gogoleva *et al.*, 2012). Бактериальные клетки, выращенные в МПБ и RS в присутствии ТМ, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, отмывали фосфатным буфером (рН 7,0) и ресуспендировали в том же буфере до ОП₄₉₂ 0,2. К 200 мкл клеточной суспензии добавляли 1 мл 0,00125 М раствора H₂O₂ и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем вносили 100 мкл 2н раствора HCl для остановки процесса каталазного расщепления пероксида водорода. К полученной смеси добавляли 1 мл 0,025 М раствора KI, аккуратно перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. В контрольных образцах вместо клеточной суспензии использовали дистиллированную воду. Оптическую плотность супернатанта измеряли

с помощью спектрофотометра Lambda EZ201(Perkin-Elmer, США) при длине волны 492 нм. Каталазную активность рассчитывали по формуле (3):

$$A_{\text{кат}} = \frac{12,5(1 - \frac{ОП_0}{ОП_к})}{T \times ОП_6}, \quad (3)$$

где $A_{\text{кат}}$ – каталазная активность, мкМ/мин $\times$ ОП; $ОП_0$ – оптическая плотность супернатанта в опытном образце, е.о.п.; $ОП_к$ – оптическая плотность супернатанта в контрольном образце, е.о.п.; T – время инкубации бактерий в присутствии H_2O_2 (10 мин); $ОП_6$ – оптическая плотность бактериальной суспензии ($ОП_{492}$ 0,2).

2.13. Электрокинетический потенциал

Для измерения электрокинетического (дзета-, или ζ -) потенциала был использован анализатор ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZetaSizer, v. 2.2. Заряд бактериальных клеток определялся методом динамического светорассеяния света. Дзета-потенциал рассчитывали по формуле (4):

$$\zeta = \frac{\eta u}{\epsilon_0 \epsilon_r}, \quad (4)$$

где ζ – дзета-потенциал (V); u – электрофоретическая подвижность (m^2/Vs); η – вязкость (N/m^2s); ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость в вакууме (F/m); ϵ_r – относительная диэлектрическая проницаемость.

Образец помещали в U-образную кювету с позолоченными электродом погруженного типа, на который подавали электрическое поле, напряжением 4 мВ, что приводило к перемещению частиц или молекул (обладающих результирующим ζ -потенциала) к противоположно заряженному электроду со скоростью, пропорциональной напряженности поля и заряду клеток или системы ТМ-клетки. Перед применением опытные и контрольные образцы промывали дважды буферным раствором KNO_3 и осаждали, используя центрифугу HERMLE Z200A (Hermle, Германия).

2.14. Оценка влияния металлов на антибиотикочувствительность актиномицетов

Для оценки влияния ионов молибдата и ртути на чувствительность актиномицетов к антибиотикам был выбран набор из 8 антибиотиков, охватывающих основные механизмы антибактериального действия: ингибирование синтеза клеточной стенки (ампициллин, цефотаксим, ванкомицин), ингибирование синтеза белка на рибосомном уровне (эритромицин – 50S; доксициклин, тетрациклин, гентамицин – 30S) и нарушение репликации ДНК (ципрофлоксацин). Такой набор позволяет не только оценить общий уровень устойчивости, но и выявить специфические механизмы, вовлеченные в ответ на металлический стресс, включая изменения проницаемости клеточной стенки, активности эффлюксных систем и электростатических взаимодействий с катионными антибиотиками.

В экспериментах использовали стандартный метод диффузии дисков в агар согласно рекомендациям CLSI M02 (2019). В качестве питательной среды применяли агар LB по Miller (Диаэм, Россия). В агар для опытных чашек перед разливом добавляли стерильные маточные растворы молибдата аммония (200 мМ) или хлорида ртути (16 мМ) до конечных концентраций, указанных в таблице 6. В контрольные чашки металлы не вносили. Для контроля осмотического эффекта, обусловленного добавлением солей металлов, использовали параллельные чашки с эквимоллярными концентрациями солей, не содержащих токсичных ионов. Для молибдата (соль аммония) осмоконтролем служил сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, что позволяло сохранить ту же концентрацию катионов аммония и имитировать ионную силу без присутствия молибдат-ионов. Для хлорида ртути осмоконтролем служил хлорид натрия (NaCl), что позволяло сохранить ту же концентрацию хлорид-анионов, заменив токсичный катион ртути на физиологический натрий. Выбор солей обоснован необходимостью исключить влияние ионной силы и отдельных ионов (аммония или хлорида) на антибиотикочувствительность,

оставляя единственным переменным фактором присутствие специфического токсичного иона металла.

Таблица 6 – Концентрации металлов и добавок солей металлов в агаре

Условие	Соль ТМ	Контроль осмоса	Конечная концентрация
Контроль	–	–	–
Влияние молибдат-ионов	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Эквимольный $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,25 мМ
Влияние ртуть-ионов	HgCl_2	Эквимольный NaCl	0,04 мМ

Бактериальные суспензии готовили из суточных культур, выращенных на МПА, и доводили до мутности 0,5 по McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Поверхность агара засеивали равномерным газоном. Для проверки антибиотикоустойчивости использовали бумажные диски с антибиотиками (таблица 7). Диски размещали на расстоянии не менее 24 мм друг от друга и 15 мм от края чашки.

Таблица 7 – Использованные антибиотики и их концентрации

Антибиотик	Сокращение	Содержание в диске, мкг	Группа
Ампициллин	AMP	10	Пенициллины
Цефотаксим	CTX	30	Цефалоспорины
Ванкомицин	VAN	30	Гликопептиды
Эритромицин	E	15	Макролиды
Доксициклин	DO	30	Тетрациклины
Гентамицин	GM	10	Аминогликозиды
Тетрациклин	TE	30	Тетрациклины
Ципрофлоксацин	CIP	5	Фторхинолоны

Чашки инкубировали при 28 °С в течение 48 ч. Диаметры зон подавления роста измеряли с точностью до 0,5 мм с помощью штангенциркуля. Для каждого условия использовали по 3 чашки.

Изменение диаметра зоны в присутствии металла по сравнению с контролем интерпретировали как:

- синергизм – увеличение зоны (металл усиливает действие антибиотика);
- антагонизм – уменьшение зоны (металл снижает эффективность антибиотика);
- отсутствие взаимодействия – изменение незначимо ($p \geq 0,05$).

Во избежание ложноположительной интерпретации синергидного эффекта проводили контроль жизнеспособности бактериального газона на агаризованной среде LB, содержащей 1,25 мМ молибдата или 0,04 мМ хлорида ртути, без внесения дисков с антибиотиками.

2.15. Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование штаммов-инактиваторов ТМ проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием высокопроизводительной платформы Illumina NovaSeq (Illumina, США). Первичную сборку геномов *de novo* осуществляли с применением алгоритма SPAdes v. 3.14.1.

Полученные и верифицированные полногеномные последовательности (Whole Genome Shotgun) депонированы в международную базу данных NCBI GenBank со следующими номерами доступа: *G. rubripertincta* ИЭГМ 129, (NZ_JARWLM000000000.1), *G. rubripertincta* ИЭГМ 133 (NZ_JARWLK000000000.1), *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (NZ_JAJNDG000000000.1), *G. terrae* ИЭГМ 136 (JAPWIN000000000.1), *R. pyridinivorans* ИЭГМ 639 (NZ_JAPWIT000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 439 (NZ_JAPWIU000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 560 (NZ_JASHLB000000000.1).

2.16. Биоинформатический анализ и аннотирование геномов

Идентификацию структурных (белок-кодирующих) генов, генов рибосомных РНК и теоретическое предсказание их функций проводили с использованием сервера автоматической аннотации RAST v2.0 (Rapid

Annotation using Subsystem Technology, <https://rast.nmpdr.org/>), а также референсной базы данных NCBI RefSeq. Биоинформатический анализ аннотированных последовательностей, полученных в результате полногеномного секвенирования, включал направленный поиск генов детоксикации и устойчивости к ТМ (компонентов *mer*-оперона устойчивости к ртути, транспортной системы *mod* молибденового типа), а также генов биосинтеза вторичных метаболитов и сидерофоров. Локальный поиск консервативных доменов и сравнение аминокислотных и нуклеотидных последовательностей целевых генов выполняли с помощью алгоритмов локального выравнивания BLASTN и BLASTP на сервере NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) против нередуцированной базы данных нуклеотидов (nt) и белков (nr).

Первичное предсказание оперонной структуры исследуемых локусов осуществляли с помощью веб-сервера Operon-mapper (https://biocomputo.ibt.unam.mx/operon_mapper/). Анализ взаимного расположения генов (синтении) и картирование фланкирующих областей целевых локусов выполняли на основе данных автоматической аннотации сервера RASTv2.0, gff-матриц и графических инструментов NCBIGraphics. Для точной детекции межгенных спейсеров (интервалов) и выявления истинного хронологического порядка транскрипции цистронов проводили трехуровневую сортировку баз данных аннотации по идентификаторам контигов, направлению цепей транскрипции (strand-awarefiltering) и нарастанию геномных координат в табличном процессоре MicrosoftExcel.

Верификацию границ оперонов и направленный поиск регуляторных элементов (upstream и downstream областей) проводили с использованием специализированных подходов, адаптированных для бактерий со смещенным в сторону высокого содержания GC-состава (Actinomycetota). Поиск потенциальных промоторных областей и определение координат точек начала транскрипции (TSS) выполняли с использованием полногеномного нейросетевого предиктора ProPrv2.0 (ProkaryotePromoterPrediction),

нейросетевого алгоритма глобального обучения SAPPHIRE.CNN (на инвертированных реверс-комплементарных матрицах контигов), а также сервера BPROM (Softberry).

Для преодоления ограничений канонических алгоритмов при анализе регуляторных локусов экстремально GC-богатых штаммов дополнительное тотальное сканирование последовательностей осуществляли с помощью специализированного предиктора G4PromFinder, ориентированного на детекцию локальных AT-богатых элементов, сопряженных с формированием вторичных структур G-квадруплексов ДНК (Di Salvo *et al.*, 2018; Siegl *et al.*, 2013). Идентификацию и термодинамическое моделирование вторичной структуры рхo-независимых терминаторов транскрипции в downstream-областях генов проводили на сервере RNAfold (ViennaRNAWebServices) на основе алгоритмов расчета минимальной свободной энергии Гиббса (ΔG). Цифровое моделирование и визуализацию масштабированной молекулярно-генетической архитектуры оперонов осуществляли с использованием программных скриптов на языке Python 3.14 с применением библиотек Matplotlib и BioPython.

Оценку консервативности окружения выполняли путем сопоставления последовательностей, расположенных upstream и downstream от исследуемых кластеров, с референсными хромосомами близкородственных штаммов родококков. Наличие в непосредственной близости от *mer*- и *mod*-оперонов стабильных «генов домашнего хозяйства» (housekeeping genes), кодирующих белки базового метаболизма, репарации и репликации хромосомы, использовали как прямое доказательство их хромосомной локализации и высокой эволюционной стабильности в геноме.

Физическое картирование исследуемых локусов, определение межгенных расстояний и точную локализацию сайтов гибридизации разработанных олигонуклеотидных ПЦР-праймеров и TaqMan-зондов *in silico* осуществляли в программной среде SnapGene Viewer v6.0 (Dotmatics, snapgene.com).

Для детекции, детального картирования и сравнительного анализа кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов и сидерофоров в полногеномных последовательностях штаммов использовали веб-сервер antiSMASH 8.0.4 (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Blin *et al.*, 2021). Анализ проводили в расширенном режиме детекции (relaxed detection strictness) с использованием алгоритмов глубокого профилирования скрытых марковских моделей (HMM).

Направленный поиск гомологов известных генов сидерофорного синтеза, NRPS и специализированных консервативных мотивов (*desA*, *rhbA*, *sid*) осуществляли с помощью модулей встроенного BLAST-сканирования (ClusterBlast, KnownClusterBlast, SubClusterBlast). Функциональную верификацию, аннотирование доменной архитектуры белков и сравнительный синтанейный анализ полученных локусов выполняли на основе специализированного репозитория известных кластеров вторичных метаболитов MIBiG 3.0 (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster), базы данных консервативных белковых семейств Pfam 36.0, а также Киотской энциклопедии генов и геномов KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

2.17. Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов

Подбор пар специфичных олигонуклеотидных праймеров для проведения ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем SYBR Green, а также систем праймеров и гидролизуемых TaqMan-зондов для цкПЦР осуществляли на основе множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *mer*-оперона (*merA*, *merB*) исследуемых штаммов бактерий родов *Rhodococcus* и *Gordonia*.

Конструирование ПЦР-систем выполняли с использованием специализированного программного обеспечения Gemi v1.5.0 (Gel Electrophoresis Simulation and Primer Design) и алгоритмов NCBI Primer-

BLAST. Отбор последовательностей олигонуклеотидов происходил в соответствии со следующими биофизическими критериями:

- расчетная длина ПЦР-продуктов (ампликонов) для качественного анализа от 300 до 500 пар нуклеотидов (п.н.);
- разница температур плавления (T_m) между прямым и обратным праймерами в паре не превышала 1,0 $^{\circ}\text{C}$;
- содержание G-C пар варьировало в пределах оптимального диапазона с максимальным отклонением между праймерами не более ~5%;
- уровень самокомплементарности и склонности к формированию шпилек/димеров праймеров (значение Max Self-Complementarity) строго ограничивался величиной менее 5,00.

Оценку видовой и штаммовой специфичности сконструированных олигонуклеотидов проводили с помощью локального выравнивания алгоритмами BLASTN против нередуцированной базы данных нуклеотидов (nt) NCBI. Теоретическую верификацию сайтов отжига, расчет точных координат гибридизации и проверку на отсутствие неспецифического связывания (mismatches) в структуре ДНК-матрицы штаммов осуществляли *in silico* в интерактивной программной среде SnapGene Viewer v6.0.

В результате биоинформационного скрининга и экспериментальной валидации все разработанные олигонуклеотидные системы продемонстрировали видоспецифичность по отношению к целевым локусам ртути-редуктазы (*merA*) и органортутной лиазы (*merB*) соответствующих таксонов прокариот. Последовательности и характеристики всех синтезированных олигонуклеотидов представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для детекции и скрининга генов устойчивости к ртути методом ПЦР-PB

Целевой ген	Целевой вид	Прямой праймер (5'→3'), FP	Обратный праймер (5'→3'), RP	Длина ампликона (п.н.)
<i>merA</i>	<i>G. rubripertincta</i>	GGCAAGTCG GTGGTGATGA T	GACTCAGGG AGTTCGGTCA G	464

Продолжение таблицы 8

Целевой ген	Целевой вид	Прямой праймер (5'→3'), FP	Обратный праймер (5'→3'), RP	Длина ампликона (п.н.)
<i>merA</i>	<i>G. terrae</i>	GGTCCGTGGT GATGATCGA G	ATCAGGCCCG GAAAATCCA G	172
<i>merA</i>	<i>R. pyridinivorans</i>	TCCTGGACTA CACCACGGTG	TTCAGCGCTT CGGCCATGGT	337
<i>merA</i>	<i>R. ruber</i>	GGTTACCTGA CCTCCACCAC	GAGGCGACG TAGACGAACT G	494
<i>merB</i>	<i>R. ruber</i>	CACCGACACC CAGGACTTC	GTGGATCTCG TTGCAGAAGC	493
<i>16S pPHK</i> (референсный ген)	<i>R. ruber</i>	AGAGTTTGAT CMTGGCTCA G	CGGTTACCTT GTTACGACTT	1465

Таблица 9 – Олигонуклеотидные праймеры и гидролизуемые зонды, использованные для количественного анализа транскриптов методом цифровой ПЦР

Целевой вид	Целевой ген	Тип олигонуклеотида	Последовательность (5'→3')
<i>R. ruber</i>	<i>merA</i>	Forward	TCGACGGCAAGGACAAGCTG
		Reverse	TGTCCGGGCTGCCGGTGAA
		Probe (зонд)	5'-FAM- CGGGCGGAGAAGTACACGGACCT- BHQ1-3'
<i>R. ruber</i>	<i>merB</i>	Forward	ACGACACTCAGGGCCGCGT
		Reverse	GGAAGACCAGGGTGTCGAG
		Probe (зонд)	5'-FAM- CTGACGCTCAACCCACCCCGCA- BHQ1-3'
<i>R. pyridinivorans</i>	<i>merA</i>	Forward	GGAAATCTCGGCCGCGCTC
		Reverse	GTGCGCACGGTCACCACCT
		Probe (зонд)	5'-FAM- CCCACGAGCGCATCGACGTGCTC- BHQ1-3'
<i>G. rubripertincta</i>	<i>merA</i>	Forward	TCCAGGTCGCCGAGGACGA
		Reverse	GGTACCCGGTCTCGTCCAG
		Probe (зонд)	5'-FAM- ACGATCGAGGCCGCGCACTACCT- BHQ1-3'

2.18. Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения тотальной ДНК и РНК предварительно отмытую биомассу бактерий подвергали ферментативному лизису. Учитывая наличие

толстой гидрофобной клеточной стенки родококков, усиленной экзополисахаридным матриксом в условиях металлостресса, разрушение клеток проводили по ранее оптимизированному и валидированному нами протоколу (Krivoruchko *et al.*, 2026*). Бактериальную суспензию инкубировали в растворе лизоцима (Sigma-Aldrich, США), приготовленном на основе ультрачистой воды в концентрации 40 мг/мл. Инкубацию проводили в твердотельном термостате TDB-120 (Biosan, Латвия) при температуре 37 °С в течение 60 мин. Дальнейшую экстракцию и очистку геномной ДНК и тотальной РНК выполняли в соответствии с инструкциями производителей коммерческих наборов реактивов ExtractDNA Blood&Cell и RNASolo (Евроген, Россия) соответственно.

Количественную оценку концентрации и контроль чистоты выделенных препаратов нуклеиновых кислот проводили комплексным методом. Абсолютную концентрацию измеряли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США), а соотношение оптического поглощения (A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230}) оценивали на микрообъемном спектрофотометре NanoPhotometer N50 (Implen, Германия). Препараты нуклеиновых кислот, соответствующие критериям чистоты ($A_{260}/A_{280} \geq 1,8-2,0$), немедленно использовали в последующих реакциях.

2.19. Детекция нуклеиновых кислот

Наличие, целостность и размеры продуктов амплификации, а также препаратов тотальной РНК и кДНК определяли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Электрофоретическое разделение проводили в камере горизонтального электрофореза при постоянном напряжении 70 В в течение 40 мин. В качестве интеркалирующего красителя нуклеиновых кислот использовали реагент GelRed (Диаэм, Россия). Образцы 5 мкл вносили в лунки геля в комплексе с буфером для нанесения 4X Gel Loading Dye, Blue 0,5 мкл (Евроген, Россия). Визуализацию и фотографирование гелей осуществляли с помощью системы гель-документирования Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

В зависимости от типа анализируемых нуклеиновых кислот применяли следующие условия разделения:

- для анализа тотальной РНК: использовали 1,2% агарозный гель (Sigma, США) в 1× ТАЕ-буфере. Образцы РНК и маркеры молекулярного веса РНК (диапазон 50–1000 п.н., New England Biolabs, США) предварительно смешивали с буфером для нанесения, подвергали тепловой денатурации при 70 °С в течение 2 мин, мгновенно охлаждали на льду (1 мин) для предотвращения ренатурации вторичных структур и затем вносили в ячейки геля.
- для анализа препаратов кДНК: использовали 1% агарозный гель в 1× ТВЕ-буфере и маркеры молекулярного веса ДНК в диапазоне от 250 до 3000 п.н. (Диаэм, Россия).
- для анализа ДНК-ампликонов (продуктов ПЦР): использовали 1,5% агарозный гель в 1× ТВЕ-буфере и маркеры молекулярного веса ДНК в диапазоне от 50 до 700 п.н. (Евроген, Россия).

Стоковые растворы буферов готовили на основе солей со степенью чистоты $\geq 95\%$ производства «Sigma-Aldrich» (США). Состав 50× концентрированного буфера ТАЕ (в расчете на 1 л): Tris-base – 97 г, EDTA – 7,5 г, ледяная уксусная кислота – 37 мл (рН 7,6). Состав 10× концентрированного буфера ТВЕ (в расчете на 1 л): Tris-base – 107,8 г, Boric acid – 55,03 г, EDTA – 43,84 г (рН 8,3). рН доводили до нужных значений с помощью внесения уксусной кислоты (0,1 М).

2.20. ПЦР с обратной транскрипцией и ПЦР в реальном времени

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для получения кДНК на матрице РНК проводили с использованием набора реактивов с ревертазой Mint (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Состав реакционной смеси, мкл: РНК-матрица – 6, случайный декануклеотидный праймер – 3, 5х буфер для синтеза первой цепи – 4, смесь дНТФ – 2,

дитиотреитол – 2, ревертаза – 3, деионизированная и свободная от РНКаз вода до общего объема 20 мкл (Евроген, Россия).

Условия ОТ-ПЦР:

этап 1 – 40 °С, 60 мин,

этап 2 – 70 °С, 10 мин.

Полученные ДНК и кДНК использовали для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с готовой смесью qPCRmix-HSSYBR (Евроген, Россия) и праймерами, подобранными в результате биоинформатического анализа, на амплификаторе Real-time CFX Connect (Bio-Rad, США). Положительным контролем служили видо-специфические праймеры на основе гена 16S рРНК к *Rhodococcus ruber*.

Протокол ПЦР-РВ включал следующие стадии и условия:

Стадия 1 95,0 °С; 3 мин

Стадии 2–4 повторяли в количестве 40 циклов амплификации

Стадия 2 95,0 °С; 30 сек

Стадия 3 Градиент 55,0–65,0 °С; 30 сек

Стадия 4 72,0 °С; 1:30 мин

Стадия 5 Кривая плавления от 65,0 до 95,0 °С, шаг 0,5 °С; 5 сек

Стадия 6 72,0 °С; 10 мин

2.21. Цифровая капельная ПЦР на биочипах

Количественный анализ абсолютного числа копий транскриптов целевых генов (*merA* и *merB*) проводили методом цкПЦР с использованием гидролизуемых олигонуклеотидных зондов (TaqMan), модифицированных флуорофором FAM на 5'-конце и гасителем флуоресценции BHQ-1 на 3'-конце (таблица 9).

Реакционную смесь объемом 20 мкл готовили на основе коммерческого набора Digital PCR Mastermix (RainSure, Китай). Итоговый состав смеси включал: мастер-микс – 10 мкл; прямой и обратный праймеры – по 0,9 мМ; флуоресцентно-меченный зонд – 0,25 мМ; матрица кДНК – 2 мкл; деионизированная и свободная от нуклеаз вода – до конечного объема.

Генерацию водно-масляной эмульсии и распределение микрокапель в ячейках специализированных биочипов осуществляли на автоматическом генераторе капель согласно протоколам производителя (PreciGenome, Китай). Амплификацию на биочипах проводили на термоциклере RainSure SG-2000 (Suzhou PreciGenome Co., Ltd., Китай).

Протокол ПЦР включал следующие стадии и условия:

- стадия 1 (первичная денатурация и активация ДНК-полимеразы) – 95,0 °C; 10 мин;

Стадии 2–3 (амплификация, 40 циклов)

- стадия 2 (денатурация) – 94,0 °C; 30 сек;
- стадия 3 (отжиг праймеров и элонгация) – 58,0 °C; 1 мин;
- стадия 4 (финальная стабилизация микрокапель) – 98,0 °C; 10 мин;
- стадия 5 (охлаждение) – 20,0 °C; 2 мин.

Детекцию результатов и считывание флуоресцентного сигнала в капельной эмульсии биочипов проводили с помощью высокочувствительного сканера Dscanner4-1000 (Suzhou PreciGenome Co., Ltd.; Китай) под управлением встроенного программного обеспечения GeneCount v.1. Автоматизированная система анализа осуществляла цифровую обработку флуоресцентных изображений микроструктур биочипа, разделение капель на флуоресцентно-позитивные и негативные события, после чего на основе статистического распределения Пуассона рассчитывала абсолютное количество копий мРНК целевых локусов в 1 мкл исследуемого образца.

2.22. Филогенетический анализ

Филогенетический анализ и изучение эволюционного родства аминокислотных последовательностей ртути-редуктазы (MerA) исследуемых штаммов со сходными белками референсных таксонов прокариот проводили в программном комплексе MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполняли с использованием встроенного алгоритма ClustalW. На этапе предварительной подготовки данных проводили ручную экспертную оптимизацию и тримминг (обрезку) невыровненных N- и C-концевых участков белковых цепей для устранения артефактов шотган-сборок геномов и выравнивания длин анализируемых последовательностей по общим консервативным позициям. Реконструкцию филогенетического дерева осуществляли методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML). В качестве математической модели замещения аминокислот использовали современную матрицу LG с учетом частот аминокислот (+F). Неоднородность скоростей эволюционных замещений среди сайтов моделировали с помощью гамма-распределения (Gamma Distributed, +G) с использованием 5 дискретных категорий. Для обработки прочерков (гэпов) и пропущенных данных применяли режим частичного удаления (Partial deletion) с порогом сохранения сайтов (Site Coverage Cutoff) на уровне 95%, что позволило сохранить биологически значимые внутренние инсерции без внесения математического шума в анализ.

Поиск оптимальной топологии дерева выполняли с использованием эвристического метода обмена ближайшими ветвями (Nearest-Neighbor-Interchange, NNI). Начальное дерево для генерирования ML-топологии строилось автоматически по алгоритму Neighbor-Joining/BioNJ. Статистическую достоверность и надежность топологии ветвления филогенетического древа оценивали с помощью бутстрэп-анализа (Bootstrap method) на основе 1000 случайных реплик (повторов). Полученное филогенетическое дерево визуализировали, укореняли во внешнюю группу и редактировали во встроенном модуле Tree Explorer программы MEGA 11 с последующим экспортом графических данных в векторный формат.

2.23. Подготовка образцов и проведение транскриптомного анализа

Для фиксации профиля экспрессии генов и ингибирования эндогенных РНКаз бактериальные клетки штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 осаждали

из культуральной жидкости центрифугированием (5000 g, 5 мин). Во избежание индукции стрессовых ответов отмывку биомассы не проводили. К осадку немедленно добавляли реагент IntactRNA (Евроген, Россия) в соотношении 8–10 объемов на 1 объем биомассы, гомогенизировали суспензию и инкубировали 1 ч при комнатной температуре (22–24°C), затем 24 ч при +4°C с последующим переносом на глубокую заморозку (–80°C).

Выделение тотальной РНК проводили в трех биологических повторностях для контрольных и индуцированных молибденом образцов. Контроль качества и целостности РНК оценивали флуориметрически и капиллярным электрофорезом, концентрация составляла 138,7–228,8 нг/мкл, индекс целостности $RIN \geq 9,5$, доля фрагментов $DV_{200} > 67\%$.

Подготовку библиотек осуществляли с использованием набора Corall RiboCop (Bacteria) со специфической деплецией рибосомальной РНК (исходное количество РНК – 100 нг). Высокопроизводительное секвенирование выполняли на платформе Illumina NovaSeq X Plus в парноконцевом режиме, средний показатель качества Q30 составлял 96,19%, объем данных – 23,5–58,2 млн пар ридов на библиотеку (CeGaT GmbH, Германия).

Биоинформатическую обработку полученных данных проводили по следующему протоколу: демультиплексирование с извлечением UMI-индексов, удаление адаптерных последовательностей с помощью программы cutadapt v. 4.2 (Martin, 2011), картирование ридов на референсный геном *Rhodococcus ruber* C1 (номер доступа NCBI Assembly GCA_016804345.1) с помощью алгоритма STAR v. 2.7.11b (Dobin et al., 2013) и дедупликацию в UMICollapse (Liu, 2019). Подсчет числа прочтений, картированных на аннотированные гены, осуществляли в утилите featureCounts v. 2.0.6 (Liao et al., 2014).

Анализ дифференциальной экспрессии генов выполняли в программной среде R 4.0.4 (R Core Team, 2015) с использованием пакета DESeq2 v. 1.24.0 (Love et al., 2014), алгоритм которого базируется на модели отрицательного

биномиального распределения. Для контроля доли ложных открытий (False Discovery Rate, FDR) при множественном статистическом тестировании применяли скорректированный уровень значимости (p_{adj}) с расчетом поправки Бенджамини–Хохберга (Benjamini, Hochberg, 1995). Изменения в уровне транскрипции считали статистически и биологически значимыми при значениях $p_{adj} < 0,05$ и модуле логарифмического изменения кратности экспрессии $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1,0$.

2.24. Определение генетической локализации генов металлорезистентности

Генетическую локализацию (хромосомную или плазмидную) исследуемого *mer*-оперона, а также других детерминант устойчивости к ТМ и генов биосинтеза сидерофоров определяли комплексным методом, сочетающим в себе лабораторный скрининг внехромосомных элементов и тотальный биоинформатический анализ полногеномных сборок *in silico*.

Объектами исследования служили жизнеспособные бактериальные культуры, восстановленные после длительного хранения в лиофилизированном состоянии (период консервации с 1991 по 2014 гг.), а также штаммы из субкультуральной коллекции музея ИЭГМ. Восстановление лиофилизатов проводили путем ресуспендирования на чашки Петри с МПА и культивированием до получения изолированных колоний.

Экстракцию внехромосомной ДНК осуществляли из двухсуточных бактериальных культур при помощи коммерческого набора реактивов для выделения плазмидной ДНК (Евроген, Россия). Данная тест-система ориентирована на выделение линейных репликонов, а также кольцевых плазмид низкого и среднего молекулярного веса. Учитывая, что для представителей класса Actinomycetota характерно наличие гигантских кольцевых мегаплазмид (размером более 100–200 т.п.н.), экстракция которых не обеспечивается стандартными сорбционными наборами, метод использовали исключительно для качественного скрининга и доказательства

наличия или отсутствия малых внехромосомных элементов. Разделение и визуальный учет плазмидных профилей выполняли методом горизонтального электрофореза в 1%-м агарозном геле в 1× TBE-буфере при напряжении 70 В в течение 40 мин. Получение изображений гелей, окрашенных интеркалирующим красителем GelRed (Biotium, США), проводили на системе гель-документирования Bio-Rad GelDoc XR+ (Bio-Rad Laboratories, США). Для контроля размеров выявляемых малых плазмидных фракций использовали маркер длин ДНК в диапазоне 100–1000 п.н. (Евроген, Россия).

Для преодоления ограничений лабораторных методов экстракции и окончательного подтверждения хромосомной или плазмидной локализации исследуемых локусов был проведен тотальный биоинформатический скрининг полногеномных последовательностей штаммов. Поиск потенциальных плазмидных репликонов, сайтов инициации репликации (*oriV*) и консервативных генов систем распределения и мобилизации плазмид (*repA*, *parA/parB*, *mob*) во всех анализируемых контигах осуществляли с помощью веб-сервера PlasmidFinder 2.1 (Center for Genomic Epidemiology, Дания).

Доказательство хромосомной интеграции оперонов проводили путем анализа их непосредственного генетического окружения. Сравнительный анализ фланкирующих областей целевых локусов осуществляли с использованием графических инструментов NCBI Graphics, сервера RAST v2.0 и сервиса SimpleSynteny.

2.25. Изучение механизма поглощения молибдена и ртути бактериальными клетками

Посевным материалом служили бактериальные культуры, предварительно выращенные в МПБ в течение 2 сут. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием (20 мин, 3000 об/мин) в лабораторной стационарной центрифуге, после чего дважды отмывали деионизированной водой. В экспериментах по изучению механизма поглощения ионов ТМ клетками актиномицетов использовали живые и инактивированные путем автоклавирования (1,0 атм., 20 мин) клетки. Из полученной биомассы живых

и мертвых клеток готовили бактериальные взвеси, которые вносили в количестве, обеспечивающем начальную оптическую плотность клеточной суспензии $3,0 \times 10^8$ клеток/мл из расчета 1 об.% в водный раствор минеральной среды, содержащей соли металлов. Клеточную суспензию готовили в 0,5% растворе NaCl. Исходная концентрация ионов Hg^{2+} составляла 0,32 мМ (0,08 г/л). Культивирование проводили на орбитальных шейкерах Certomat IS (“Sartorius”, Германия) при 120 об/мин и температуре 28°C в течение 48 ч.

Подготовка и консервация проб. Дозатором с полипропиленовыми наконечниками отбирали 5 мл аликвоты и помещали ее в полипропиленовые стерильные вials. Добавляли 0,35 мл концентрированной азотной кислоты. Готовые пробы хранили в холодильнике не более 14 сут при температуре 20 °C. Все емкости и расходные материалы перед работой обрабатывали 0,3% р-ром азотной кислоты в соответствии с методикой (М 01-43-2006 от 2011 г., ПУ 62-2017) для выполнения измерений массовой концентрации общей ртути в пробах природных, питьевых и сточных вод атомно-абсорбционным методом на атомно-абсорбционном спектрометре с электротермической атомизацией “МГА-1000” с ртутно-гидридной приставкой «РГП-915».

Пробы для измерений отбирали через 1, 3, 6, 9, 24 и 48 ч. Контролем служили неинокулированная питательная среда, содержащая ионы ТМ, а также бактериальные культуры, выращенные в среде без добавления ионов ТМ.

Определение ТМ проводили на атомно-абсорбционном спектрометре с зеемановской коррекцией неселективного поглощения «МГА-1000» (Люмэкс, Санкт-Петербург). Расчеты и статистическую обработку данных проводили по методике ПНДФ 14.1:2.253-09 (М 01-46-2013).

Для описания динамики и определения механизма пассивной сорбции ионов металлов экспериментальные данные аппроксимировали с использованием линейных форм кинетических уравнений псевдопервого (модель Лагергрена) и псевдовторого (модель Хо и Маккея) порядков.

Уравнение псевдопервого порядка имеет вид:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t, \quad (5)$$

где q_e и q_t – количество сорбированного металла на единицу массы сорбента (мг/г) в состоянии равновесия и в момент времени t (ч) соответственно; k_1 – константа скорости псевдопервого порядка (ч⁻¹).

Интегральная форма уравнения псевдовторого порядка выражается соотношением:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}, \quad (6)$$

где k_2 – константа скорости псевдовторого порядка (г/(мг·ч)).

Величину сорбционной емкости в момент времени t (q_t , мг/г) рассчитывали по формуле:

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t) \cdot V}{m}, \quad (7)$$

где C_0 и C_t – начальная и остаточная концентрации ионов металла в растворе соответственно (мг/л); V – объем жидкой фазы (л); m – сухая масса биосорбента (г).

Адекватность моделей оценивали по величине коэффициента детерминации (R^2).

2.26. Постановка экспериментов по извлечению тяжелых металлов из имитированных сточных вод

Для оценки способности клеток актиномицетов к адсорбции и их окисляющей активности были проведены эксперименты по очистке имитированных сточных вод (СВ), состав которых идентичен составу сточных вод предприятий ОАО «ВОЛГОЦЕММАШ», Тольятти (СВ № 1), Усольская промышленная зона «р. Ангара, канава гидрозолоудаления (ГЗУ)», г. Усолье-Сибирское, Россия (СВ № 2); Норильский промышленный район, река Талнах, Норильск, Россия (СВ № 3); Сточная вода хлорщелочного производства с использованием ртутных электролизеров, Россия (СВ № 4), ОАО «Уральский оптико-механический завод» имени Э.С. Яламова, Екатеринбург (СВ № 5), Сточные воды промышленной зоны г. Усолье-Сибирское – промышленный выпуск 1 комбината «Усольехимпром», Россия (СВ № 6).

Состав СВ представлен в таблице 10. Состав вод был смоделирован на основе опубликованных данных о составе реальных стоков металлургических, химических и других предприятий (Цветкова и др., 2024; Базова, Кошевой, 2017; Полетаева, Пастухов, 2016; Фарберова и др., 2018). Начальное содержание ТМ в сточной воде принимали за 100%.

Таблица 10 – Элементный состав и оценочный pH имитированных сточных вод

ТМ	Концентрация ТМ, мг/л					
	СВ № 1	СВ № 2	СВ № 3	СВ № 4	СВ № 5	СВ № 6
Оценочный pH*	5,5–6,0	6,5–7,5	5,5–6,0	4,5–5,5	5,5–6,0	8,0–9,0
As	–**	0,411	0,05	–	0,7	0,382
Cd	0,01	0,000517	0,0001	–	–	–
Cr	0,022	0,00603	–	0,0272	4,5	–
Cu	0,008	0,00417	0,2	0,1136	0,2	–
Fe	0,050	0,419	–	4,899	0,6	–
Hg	–	0,00265	–	14,15	–	0,239
Mn	–	0,1985	1,0	0,0621	–	23,691
Mo	0,005	0,0696	0,001	–	0,02	–
Ni	0,270	0,0341	0,2	0,0784	0,2	3,936
Pb	0,005	0,00166	–	0,0192	–	0,188
Zn	0,653	0,021	0,01	0,0237	0,05	–

Примечание: * – диапазон от трех измерений; ** – ТМ не входит в состав сточной воды.

Актиномицеты предварительно выращивали в МПБ. Через 48 ч культивирования в МПБ клеточную суспензию центрифугировали при 3500 об/мин в течение 15 мин для удаления остаточного субстрата. Осажденную биомассу дважды отмывали фосфатным буфером, ресуспендировали

до значения $ОП_{600}$ 1,0. Способность к очистке сточных вод исследовали для каждого штамма в отдельности, а также в условиях их ассоциации.

Для очистки искусственной сточной воды использовали лабораторный колоночный биореактор (рисунок 2) – стеклянную колонку, заполненную носителем с иммобилизованными клетками.



Рисунок 2 – Лабораторный колоночный биореактор

1 – выход жидкости; 2 – стеклянный фильтр; 3 – хвойные опилки с иммобилизованным консорциумом; 4 – подача жидкости

Стеклянная колонка соединялась с колбой, содержащей модельную сточную воду. Оптимальная скорость для циркуляции жидкости по системе составляла 1,6 мл/мин за счет работы перистальтического насоса. Жидкость из колбы подавалась в колонку через верхнее входное отверстие и проходила через слой опилок с иммобилизованными клетками, выходила через нижнее отверстие и возвращалась в колбу со сточной водой (рисунок 3). Эксперимент проводили в течение 7 сут. После эксперимента отбирали пробы сточной воды для количественного определения в них остаточного содержания ТМ.



Рисунок 3 – Установка по изучению процесса очистки загрязненных ТМ сточных вод

1 – модельная сточная вода; 2 – колоночный биореактор, заполненный опилками с иммобилизованным консорциумом; 3 – перистальтический насос; 4 – магнитная мешалка

В качестве модели биореактора с перемешиванием выступала колба Эрленмейера на 250 мл, помещенная в орбитальный шейкер с режимом постоянного перемешивания и температурой (120 об/мин, 28°C). В колбы предварительно помещали бактериальные клетки, иммобилизованные на опилках и добавляли модельную сточную воду, состав которой представлен в таблице 5. Эксперимент проводили в течение 7 сут. После эксперимента отбирали пробы сточной воды для количественного определения в них остаточного содержания ионов ТМ.

Определение остаточного содержания ТМ после процесса очистки в колоночном биореакторе и модели биореактора с перемешиванием проводилось на атомно-абсорбционном спектрометре с зеемановской коррекцией неселективного поглощения «МГА-1000» (Люмэкс, Санкт-Петербург).

Для получения результатов эксперимента анализируемую модельную сточную воду 50 мл после очистки отбирали и добавляли 2,5 мл

концентрированной азотной кислоты и 1,5 мл перекиси водорода, упаривали. В качестве холостой пробы использовали деионизированную воду, для которой проводили пробоподготовку как для анализируемых проб. Для оценки степени извлечения ионов ТМ параллельно измеряли контроль – модельную сточную воду после очистки носителем без актиномицетов.

При моделировании процессов очистки СВ № 1–6 не содержали дополнительных (экзогенных) источников углерода и азота, что соответствовало элементному профилю реальных неорганических промышленных стоков.

Для подтверждения сохранения каталитического потенциала биосистемы проводили контроль жизнеспособности бактерий после завершения 7-суточного рабочего цикла биореактора. Образцы отработанного сорбента извлекали из колонки и колб и подвергали колориметрическому анализу с использованием 0,2%-го водного раствора INT (согласно методике, описанной в разделе 2.5). Регистрация интенсивного красно-фиолетового окрашивания опилок (за счет восстановления формазана) подтверждала сохранение высокой респираторной и метаболической активности иммобилизованных клеток на финальных этапах водоочистки.

2.27. Статистическая обработка результатов

Все эксперименты проводили в трех-тридцатикратной повторности в зависимости от условий проведения эксперимента. В связи с различной природой полученных данных математическую обработку результатов осуществляли с привлечением методов как параметрической, так и непараметрической статистики.

Для непрерывных величин (показатели эффективности извлечения металлов, параметры наноморфометрии) рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение, стандартную ошибку и доверительный интервал. Достоверность межгрупповых различий в данных группах оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

Для дискретных данных минимальных подавляющих концентраций, полученных методом серийных разведений и характеризующихся отличным от нормального распределением (критерий Шапиро–Уилка, $p < 0,05$), использовали непараметрические показатели: медиану (Me), межквартильный размах (IQR, интервал между 25-м и 75-м процентилями, определяющий границы диаграмм размаха) и величину размаха вариационного ряда. Влияние состава питательной среды и иммобилизации клеток на уровень устойчивости к металлам оценивали с помощью непараметрического критерия Уилкоксона для связанных выборок, а значимость межвидовых различий – с использованием критерия Фридмана.

Первичный сбор и табличную структуризацию данных выполняли в программе Excel 2016 (Microsoft Inc., США). Анализ больших массивов фенотипических данных, группировку профилей толерантности по видам, нелинейную аппроксимацию кинетики сорбции, а также построение диаграмм размаха (boxplots) осуществляли с использованием программных скриптов автоматизации на языке Python v. 3.14 (библиотеки pandas, numpy, scipy, statsmodels, seaborn и matplotlib) (Python Software Foundation, 2024). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным $p < 0,05$.

Глава 3. ВЛИЯНИЕ МОЛИБДЕНА И РТУТИ НА КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ. ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕТАЛЛОВ

3.1. Изучение устойчивости свободных и иммобилизованных актиномицетов к тяжелым металлам

В результате скринингового исследования 220 коллекционных штаммов алканотрофных актиномицетов оценена фенотипическая толерантность чистых культур к ионам Hg^{2+} и MoO_4^{2-} на богатой органической (МПБ) и минимальной минеральной (RS) средах (Приложение А).

Исследованные штаммы проявляли способность к росту в диапазоне концентраций от 0,0025 до 1,25 мМ хлорида ртути (эквивалентно 0,0005 – 0,2507 г/л Hg^{2+}). Наибольшую толерантность к Hg^{2+} в среде МПБ проявили штаммы *R. fascians* ИЭГМ 535, *R. rhodochrous* ИЭГМ 646, ИЭГМ 1162, *R. ruber* ИЭГМ 337, ИЭГМ 449, ИЭГМ 453, ИЭГМ 583 и ИЭГМ 584. В минеральной среде RS лидировали изоляты *G. rubripertincta* ИЭГМ 129, ИЭГМ 132, *R. rhodochrous* ИЭГМ 646, а также *R. ruber* ИЭГМ 337, ИЭГМ 439 и ИЭГМ 584.

Необходимо подчеркнуть, что из всего спектра таксонов (Таблица 4, Приложение А) в финальный сравнительный анализ были включены только те виды, которые сочетали в себе выраженную экологическую значимость (стабильно высокие МПК при первичном скрининге) и статистически репрезентативный объем выборки (не менее 5 самостоятельных штаммов). Подобный подход позволил отсеять виды, не проявившие целевого уровня металлоторерантности, и исключить искажающее влияние индивидуальных штаммов-выбросов, по которым невозможно сформировать достоверную видовую характеристику. Таким образом, в качестве референтных объектов были зафиксированы пять наиболее репрезентативных видов: *R. rhodochrous*, *R. ruber*, *G. rubripertincta*, *R. fascians* и *R. erythropolis*, суммарно охватывающих основной пул исследованного коллекционного фонда.

Ввиду дискретного характера данных МПК и их распределения, отличного от нормального, статистическое сопоставление порогов устойчивости выделенных видов выполняли с помощью непараметрического метода построения парных диаграмм размаха на линейной шкале (рисунок 4). По интегральным медианным показателям (Me) исследованные виды актиномицетов образуют следующий ряд убывания устойчивости к ионам ртути:

R. rhodochrous > *R. ruber* > *G. rubripertincta* > *R. fascians* > *R. erythropolis*.

Вид *R. rhodochrous* охарактеризован как наиболее устойчивый таксон с высоким биоремедиационным потенциалом, демонстрирующий максимальные значения медианы МПК во всех протестированных условиях (Me = 0,50 мМ в среде МПБ и Me = 0,12 мМ в минеральной среде RS).

Установлено выраженное влияние состава среды культивирования на уровень металлоторерантности бактерий (рисунок 4). При сопоставлении парных диаграмм размаха зафиксирован статистически достоверный сдвиг IQR и медиан МПК Hg^{2+} в минеральной среде RS в область более низких значений – показатели резистентности оказались до 32 раз ниже по сравнению с богатой питательной средой МПБ. Так, для вида *R. ruber* медиана МПК снижалась с 0,21 мМ (МПБ) до 0,04 мМ (RS), а для наименее толерантного вида *R. erythropolis* – с 0,05 мМ до минимальных 0,01 мМ. Редукция или полное отсутствие вертикальных линий («усов») у границ ящиков ряда таксонов отражает высокую фенотипическую однородность выборки и кумулятивное совпадение процентилей из-за фиксированного шага серийных разведений солей. Выявленный эффект влияния среды обусловлен отсутствием в RS белково-пептидных компонентов, связывающих катионы ртути в нетоксичные хелатные комплексы, что обеспечивает максимальную биодоступность свободного токсиканта для бактериальных клеток.

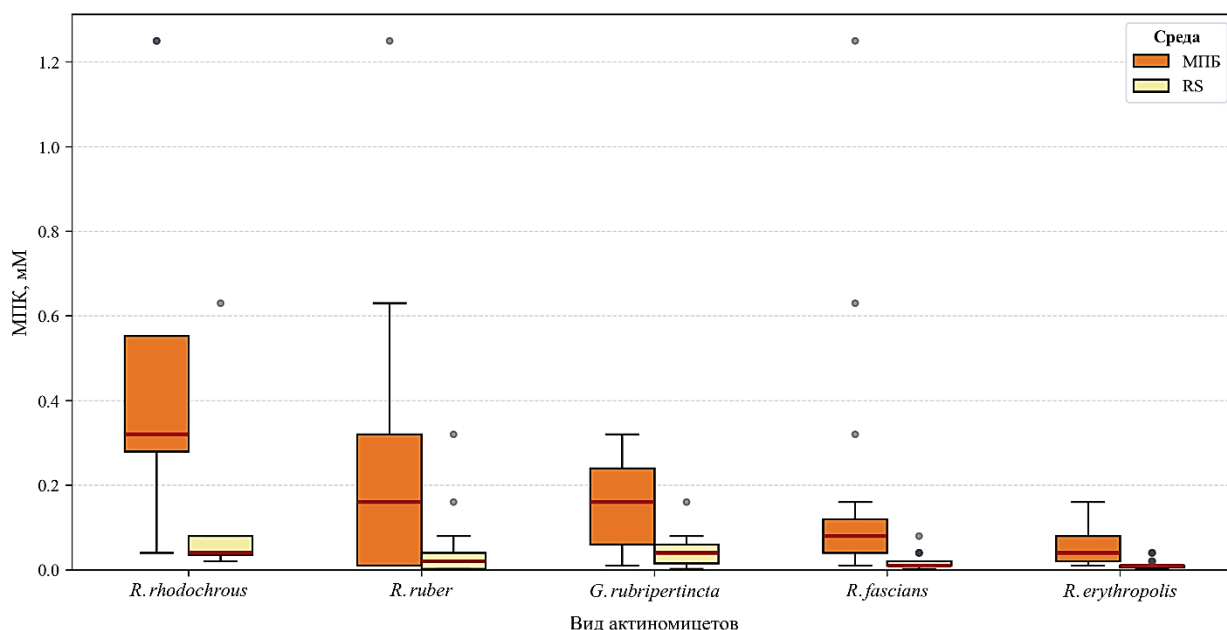


Рисунок 4 – Профили МПК ключевых видов актиномицетов к ртути в различных средах культивирования. Данные представлены в виде диаграмм размаха.

Примечания: Горизонтальная линия внутри ящика – медиана (Me), границы ящика – межквартильный интервал (Q_1 – Q_3), вертикальные линии («усы») – размах вариационного ряда, изолированные точки – статистические выбросы. Шкала оси ординат – линейная.

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*). Максимальные значения МПК в среде МПБ зафиксированы у культур *R. erythropolis* ИЭГМ 1232, ИЭГМ 1303, ИЭГМ 1353, *R. fascians* ИЭГМ 280, *R. rhodochrous* ИЭГМ 639, ИЭГМ 1162, а также *R. ruber* ИЭГМ 91 и ИЭГМ 560. На минеральной среде RS повышенную толерантность сохраняли штаммы *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *R. erythropolis* ИЭГМ 1303, ИЭГМ 1353, *R. fascians* ИЭГМ 1159, *R. rhodochrous* ИЭГМ 639, ИЭГМ 1162 и *R. ruber* ИЭГМ 91.

Оценка распределения порогов устойчивости к анионному токсиканту, представленная на парных диаграммах размаха (рисунок 5), показала смещение межквартильных интервалов в зависимости от таксономической принадлежности штаммов. По рассчитанным непараметрическим медианным

показателям (Me) ряд толерантности видов актиномицетов к молибдат-анионам имеет следующий вид:

R. rhodochrous > *R. erythropolis* > *R. fascians* > *R. ruber* > *G. rubripertincta*.

Лидирующую позицию, как и в случае с катионами ртути, сохраняли представители вида *R. rhodochrous*.

Сравнение парных boxplot-диаграмм выявило статистически значимый трофический сдвиг резистентности бактерий (критерий Уилкоксона, $p < 0,05$). В среде МПБ резистентность бактерий к молибдату превышала значения на минеральной среде в 2–8 раз (рисунок 5). Схлопывание межквартильных интервалов и отсутствие вертикальных «усов» у ящиков ряда исследованных таксонов (в частности, на минеральной среде RS) объективно указывает на высокую фенотипическую гомогенность коллекционной выборки и совпадение процентилей из-за фиксированного дискретного шага серийных разведений солей.

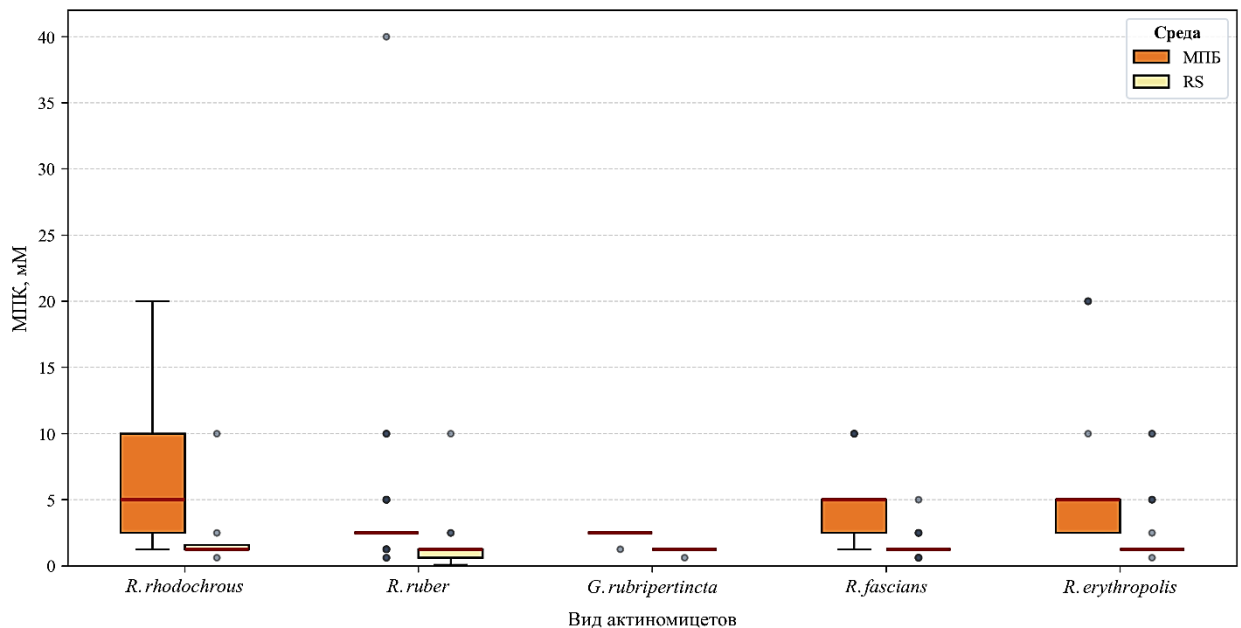


Рисунок 5 – Профили МПК ключевых видов актиномицетов к оксианионам молибдена в различных средах культивирования. Данные представлены в виде диаграмм размаха.

Примечания: Горизонтальная линия внутри ящика – Me, границы ящика – межквартильный интервал (Q_1 – Q_3), вертикальные линии – размах

вариационного ряда, изолированные точки – статистические выбросы. Шкала оси ординат – линейная.

Дальнейший отбор культур для моделирования иммобилизованных биокатализаторов и молекулярно-генетического анализа проводили с учетом фенотипической вариабельности и интенсивности синтеза каротиноидных пигментов, выступающих фактором неспецифической антиоксидантной защиты (Saubenova *et al.*, 2024; Styczynski *et al.*, 2020). В выборку вошли штаммы с различным фенотипом: красно-оранжевые (*G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *G. rubripertincta* ИЭГМ 129, *R. ruber* ИЭГМ 85, ИЭГМ 92, ИЭГМ 453), лососево-розовые (*R. rhodochrous* ИЭГМ 62^г, ИЭГМ 1162), желтые (*R. fascians* ИЭГМ 535, *R. ruber* ИЭГМ 560) и палевые (*R. erythropolis* ИЭГМ 344, *R. qingshengii* ИЭГМ 1270).

В качестве перспективной, экономически доступной и экологически безопасной матрицы для биокатализаторов использовали древесные опилки. Оценка эффективности прикрепления бактерий показала высокую сорбционную способность исследуемых культур по отношению к развитой гидрофобной поверхности носителя. Степень адсорбции варьировала от 44,9 до 88,7% (таблица 11). Максимальные показатели адгезии отмечены у штаммов *R. ruber* ИЭГМ 560 (88,7%) и *R. qingshengii* ИЭГМ 1270 (83,5%).

Таблица 11 – Эффективность иммобилизации клеток актиномицетов на лигноцеллюлозном носителе

Род, вид, штамм	Оптическая плотность до процесса иммобилизации, е.о.п	Оптическая плотность после процесса иммобилизации, е.о.п	Степень адсорбции, %
<i>G. rubripertincta</i>			
ИЭГМ 129	1,014	0,504	49,7
<i>G. paraffinivorans</i>			
ИЭГМ 735	1,036	0,458	44,2
<i>R. erythropolis</i>			
ИЭГМ 344	0,982	0,344	64,9
<i>R. fascians</i>			

Продолжение таблицы 11

Род, вид, штамм	Оптическая плотность до процесса иммобилизации, е.о.п	Оптическая плотность после процесса иммобилизации, е.о.п	Степень адсорбции, %
ИЭГМ 535	1,222	0,332	72,8
<i>R. qingshengii</i>			
ИЭГМ 1270	1,078	0,178	83,5
<i>R. rhodochrous</i>			
ИЭГМ 62 ^T	1,090	0,267	75,5
ИЭГМ 1162	1,013	0,558	44,9
<i>R. ruber</i>			
ИЭГМ 85	1,105	0,324	70,7
ИЭГМ 92	1,082	0,466	56,9
ИЭГМ 453	1,174	0,318	72,9
ИЭГМ 560	1,069	0,121	88,7

Перевод культур в иммобилизованное состояние на лигноцеллюлозном носителе приводил к значительному росту толерантности биосистем. Повышенная устойчивость иммобилизованных клеток к хлориду ртути и гептамолибдату аммония обусловлена барьерным эффектом пористой структуры опилок, первичным связыванием части ионов функциональными группами лигнина, а также индукцией синтеза поверхностных экзополимеров при контакте с *n*-гексадеканом.

Устойчивость иммобилизованных клеток к хлориду ртути возрастала в среде МПБ до 31 раза (рисунок 6), а в минеральной среде RS с добавлением *n*-гексадекана – до 16 раз (рисунок 7) по сравнению со свободными культурами.

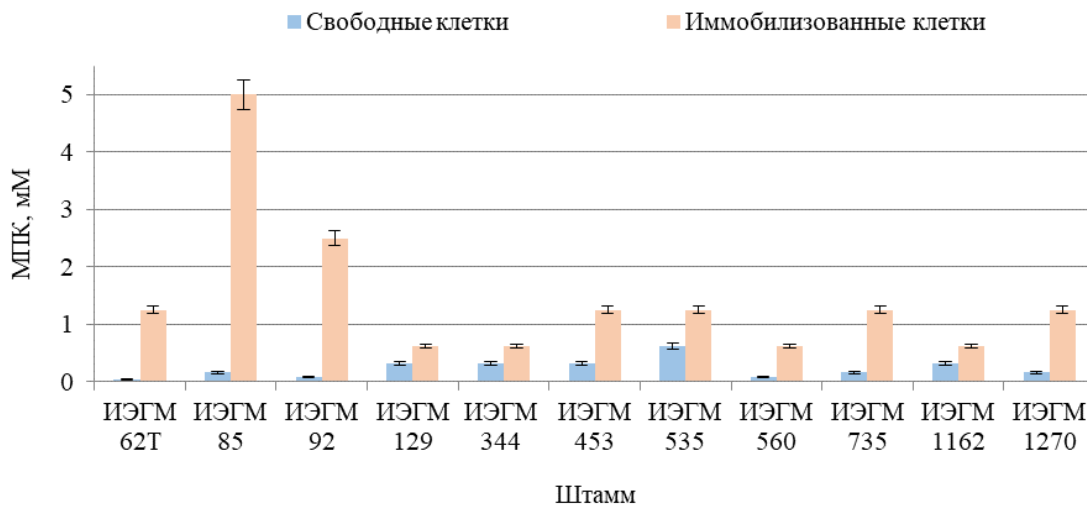


Рисунок 6 – МПК хлорида ртути в отношении свободных и иммобилизованных актиномицетов в МПБ

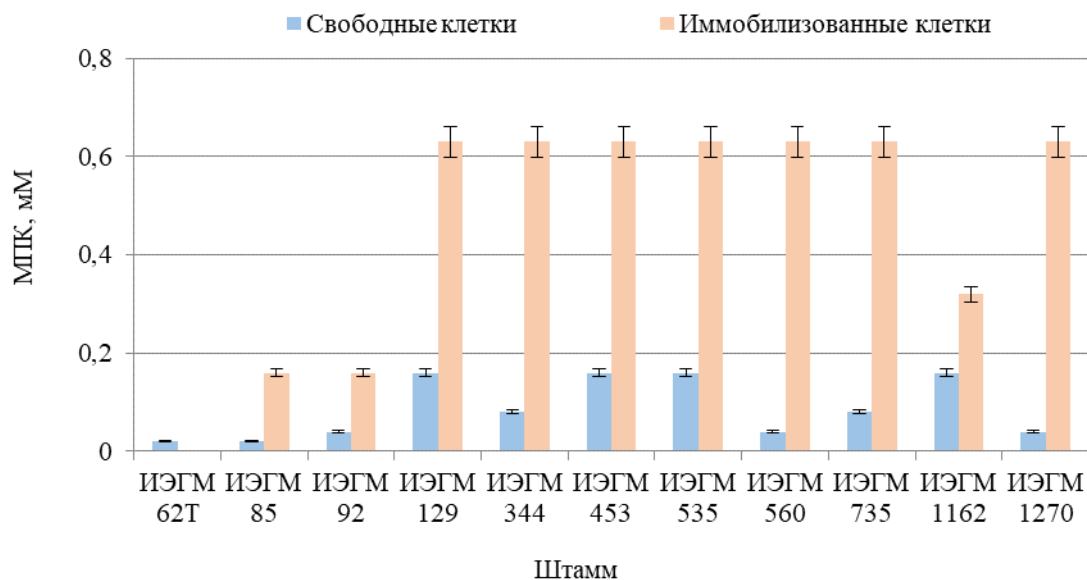


Рисунок 7 – МПК хлорида ртути в отношении свободных и иммобилизованных актиномицетов в RS в присутствии C_{16}

В условиях молибдатного стресса иммобилизация на хвойных опилках также обеспечивала статистически значимую защиту биокатализаторов. В богатой среде МПБ МПК гептамолибдата аммония для иммобилизованных систем возрастала до 8,0 раз по сравнению со свободными клетками (рисунок 8). Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 в иммобилизованном виде проявил максимальную устойчивость, достигнув рекордного значения МПК 80,0 мМ (что эквивалентно 53,8 г/л молибдена).

В минимальной среде RS в присутствии C_{16} иммобилизованные клетки демонстрировали увеличение значений МПК в 2,0–4,0 раза (рисунок 9), за исключением штамма *R. qingshengii* ИЭГМ 1270, сохранившего исходный порог толерантности (1,25 мМ).

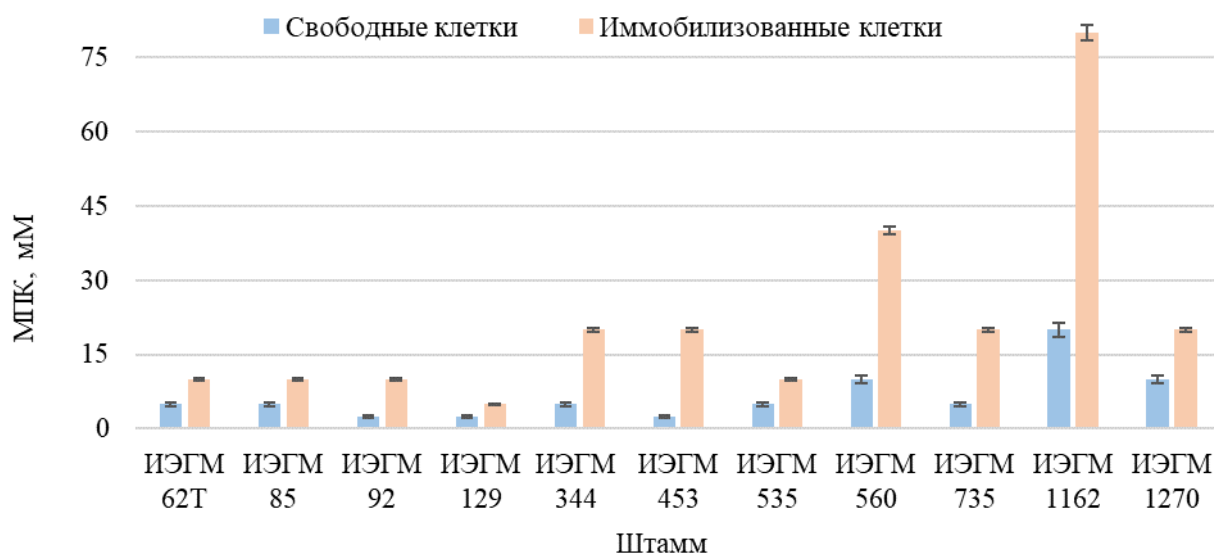


Рисунок 8 – МПК гептамолибдата аммония в отношении свободных и иммобилизованных актиномицетов в МПБ

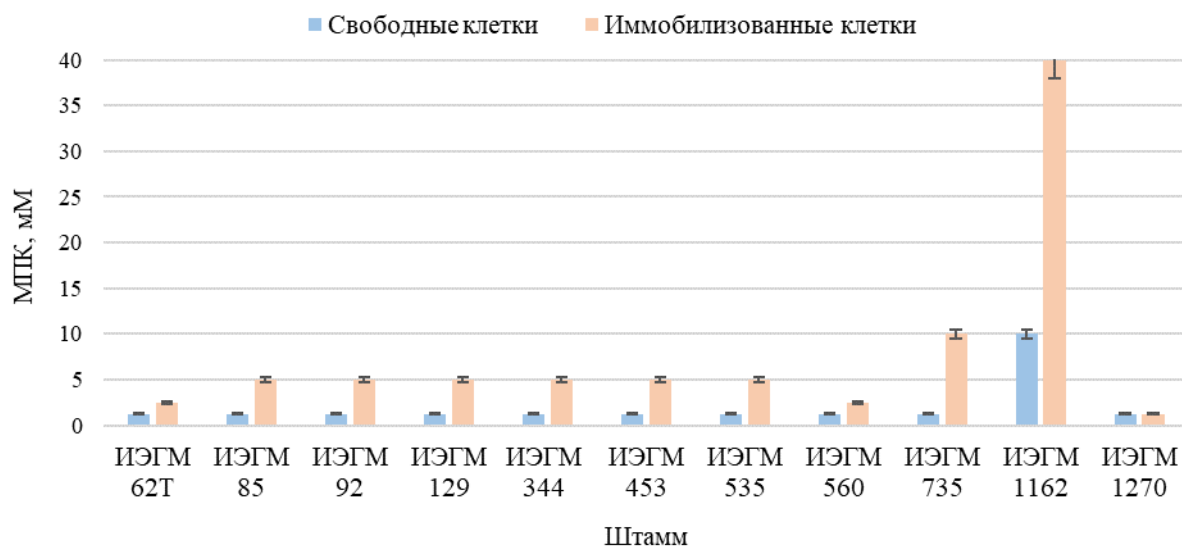


Рисунок 9 – МПК гептамолибдата аммония в отношении свободных и иммобилизованных актиномицетов в RS в присутствии C_{16}

Полученные результаты свидетельствуют о формировании неспецифического защитного барьера матрицей носителя и внеклеточными биополимерами, снижающего токсическую нагрузку на клеточные структуры

(Flemming, Wingender, 2010). Использование C_{16} в качестве субстрата стимулирует липофильный метаболизм родококков, способствуя уплотнению мембран и синтезу защитных липидных комплексов.

3.2. Изменение морфометрических характеристик актиномицетов под воздействием молибдена и ртути

При инкубации клеток в присутствии ионов ртути выявлены выраженные изменения линейных размеров бактерий (рисунок 10). Зафиксировано уменьшение длины клеток более чем в 3,5 раза (с 5,0–7,0 мкм в контроле до 1,2 мкм в опыте). Данный морфологический сдвиг отражает стрессовый переход палочковидных форм в укороченные коккоидные клетки. КЛСМ показала статистически значимое возрастание доли нежизнеспособных (проницаемых для пропидия йодида) клеток по сравнению с интактным биотическим контролем (рисунок 11).

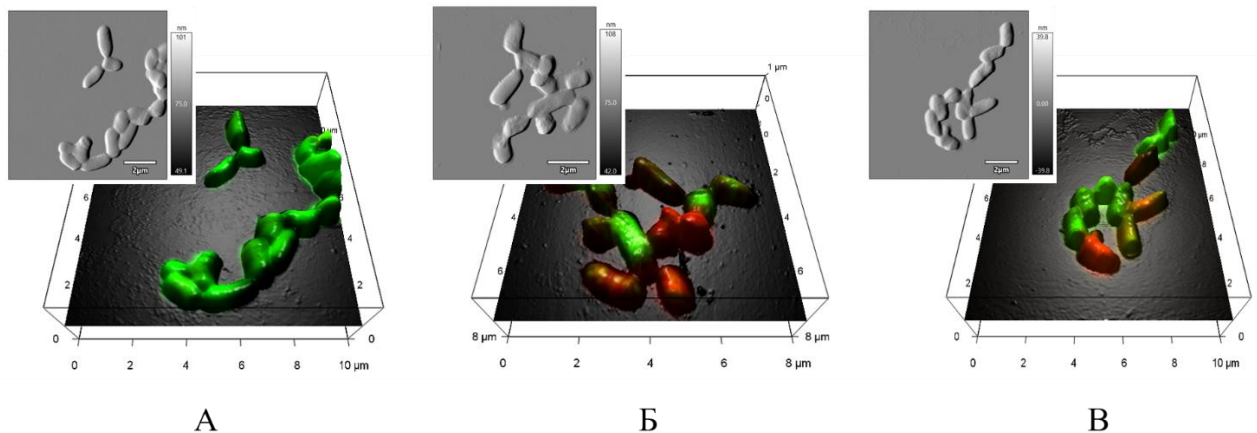


Рисунок 10 – Объемная 3D АСМ-КЛСМ реконструкция и АСМ изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 при воздействии ионов тяжелых металлов, 24 ч.

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

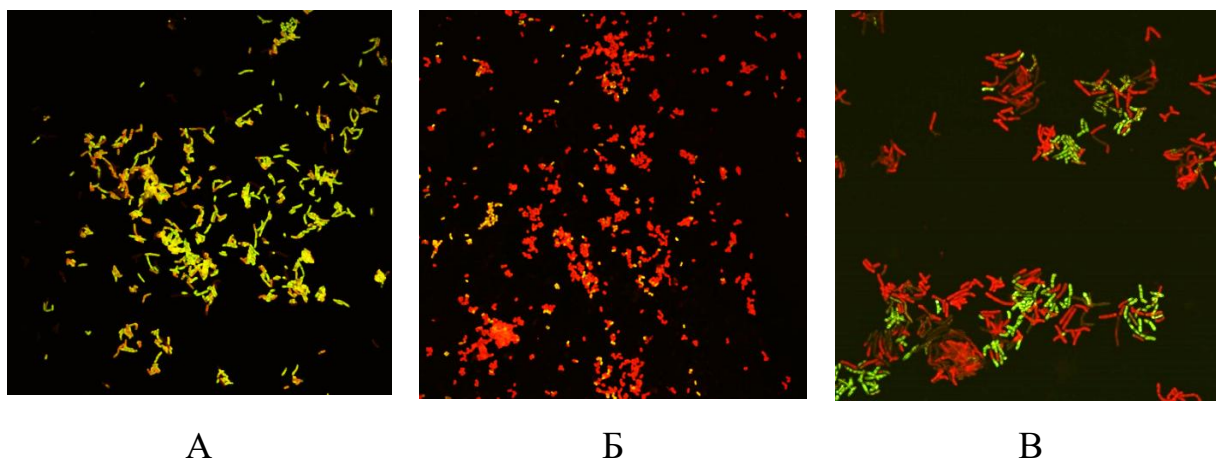


Рисунок 11 – КJСМ изображение клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 при воздействии ионов тяжелых металлов, 24 ч

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

В присутствии сублетальных концентраций ртути (0,32 мМ) сохранялась общая целостность клеток без признаков массового лизиса, однако практически полностью отсутствовали активно делящиеся морфотипы. При повышении концентрации токсиканта до 0,63 мМ наблюдалось локальное нарушение целостности клеточной оболочки, сопровождающееся выходом внутриклеточного содержимого в окружающую среду (рисунок 10 Б, рисунок 12 Б). Описанная закономерность прослеживалась у всех исследованных штаммов.

Комплексный 3D АСМ-КJСМ анализ клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 показал, что в контрольных условиях культура представлена типичными палочковидными формами длиной 3,0–4,0 мкм и шириной 0,3–0,7 мкм с высокой долей делящихся особей (рисунок 12 А). В присутствии ионов молибдата характер адаптивного ответа принципиально отличался от ртутного стресса. Отмечено увеличение линейных размеров клеток в 1,1–1,5 раза и их агрегация в плотные клеточные агломераты (рисунок 10 В, рисунок 12 В). Гипертрофия клеток на фоне молибдатной нагрузки может свидетельствовать о нарушении функционирования мембранных транспортных систем и

развитии внутриклеточного осмотического стресса. Доля делящихся клеток при этом сокращалась до 3 раз относительно контроля (рисунок 11 В).

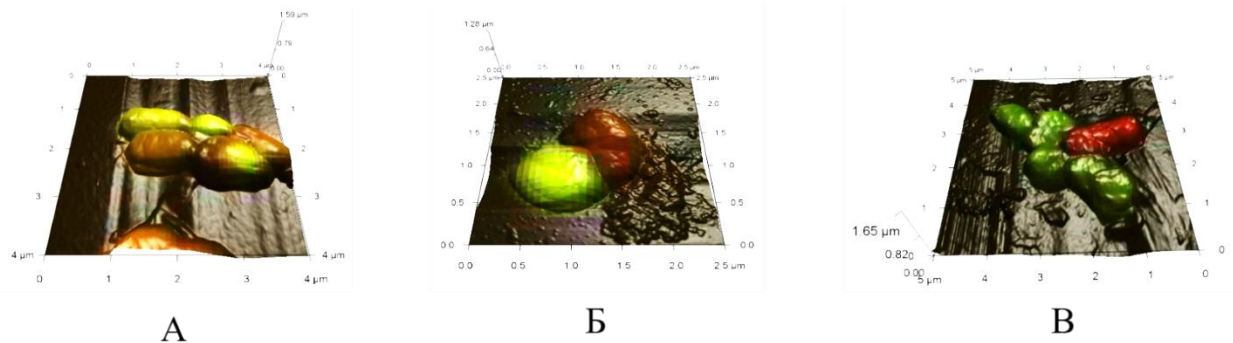


Рисунок 12 – Объемная 3D АСМ-КЛСМ реконструкция клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 при воздействии ионов тяжелых металлов, 24 ч

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

Сходный характер адаптивного ответа клеточной популяции на воздействие молибдата и контрастное действие ртути зафиксированы у наиболее устойчивого изолята *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 (рисунок 13). При 3D АСМ-КЛСМ реконструкции интактной культуры выявлены типичные удлиненные палочковидные клетки, формирующие характерные делящиеся цепочки и ветвящиеся кластеры (рисунок 13 А). В присутствии катионов ртути наблюдалось торможение клеточного деления и образование укороченных агрегатов (рисунок 13 Б). Напротив, культивирование в присутствии анионов молибдата стимулировало интенсивную агрегацию бактерий с формированием плотных многоклеточных конгломератов и кольцевидных структур (рисунок 13 В), что коррелирует со снижением отрицательного электростатического заряда поверхности и способствует коллективной защите клеток внутри биоматрикса.

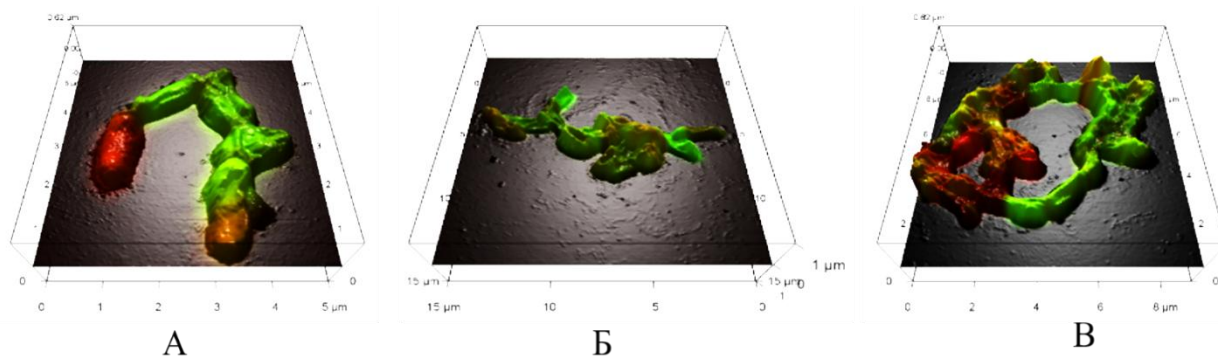


Рисунок 13 – Объемная 3D АСМ-КЛСМ реконструкция клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 при воздействии ионов тяжелых металлов, 24 ч.

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

Для углубленного изучения наноморфологии, топографии и адгезивных свойств клеточной оболочки методом АСМ из предварительно сформированной субвыборки (см. подраздел 3.1) были отобраны три контрастных референтных штамма: *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 и *R. ruber* ИЭГМ 560, различающиеся родовой принадлежностью, каротиноидным профилем и базовым уровнем металлоторантности.

Для детальной количественной оценки морфологии клеточной стенки методом АСМ были рассчитаны параметры средней R_a и среднеквадратичной R_q шероховатости поверхности на основе гистограмм распределения высот (таблица 12, рисунок 14). Анализ нанотопографии выявил металл-специфическую и противоположно направленную динамику изменения рельефа клеточной поверхности у исследованных штаммов.

Таблица 12 – Наномеханические характеристики и параметры шероховатости поверхности клеток актиномицетов по данным АСМ

Штамм	Вариант опыта	Шероховатость R_a , нм ($M \pm SD$)	Шероховатость R_q , нм ($M \pm SD$)	Кратность изменения R_q	Сила адгезии, нН ($M \pm SD$)	Кратность изменения силы адгезии
<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735	Контроль	90,1 $\pm$ 21,91	117,4 $\pm$ 28,62	1,00	8,9 $\pm$ 1,82	1,00
	Hg 0,04мМ	70,9 $\pm$ 13,19	60,9 $\pm$ 16,35	0,52	4,7 $\pm$ 0,95	0,52
	Mo 1,25 мМ	171,4 $\pm$ 18,14	208,7 $\pm$ 23,15	1,77	4,8 $\pm$ 0,47	0,53
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1162	Контроль	113,5 $\pm$ 17,46	120,1 $\pm$ 19,38	1,00	4,1 $\pm$ 1,52	1,00
	Hg 0,04мМ	73,3 $\pm$ 10,91	56,7 $\pm$ 9,35	0,47	5,1 $\pm$ 0,99	1,25
	Mo 1,25 мМ	174,6 $\pm$ 19,74	226,4 $\pm$ 16,50	1,88	8,8 $\pm$ 2,61	2,13
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	Контроль	117,2 $\pm$ 25,65	137,6 $\pm$ 21,55	1,00	4,1 $\pm$ 0,79	1,00
	Hg 0,04мМ	79,8 $\pm$ 11,08	75,8 $\pm$ 11,05	0,55	6,9 $\pm$ 1,43	1,71
	Mo 1,25 мМ	160,8 $\pm$ 15,25	244,4 $\pm$ 37,10	1,78	9,4 $\pm$ 3,14	2,30

Примечание: SD рассчитано по результатам анализа не менее 10 клеток для каждого условия. Различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,05$.

Как следует из представленных данных (рисунок 14), культивирование в присутствии 0,04 мМ HgCl_2 приводило к статистически достоверному $p < 0,01$ двукратному снижению среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности: значения R_q уменьшались в 1,82–2,13 раза (кратность 0,47–0,55 от контроля). Напротив, присутствие 1,25 мМ гептамолибдата аммония стимулировало выраженное огрубление рельефа оболочки: параметр R_q возрастал в 1,77–1,88 раза относительно интактных клеток.

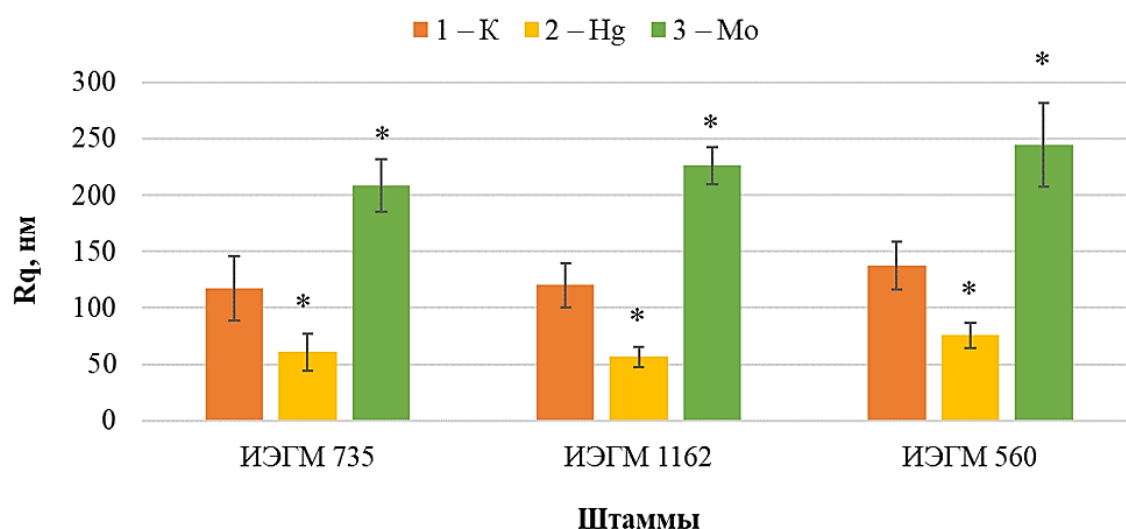


Рисунок 14 – Среднеквадратичная шероховатость (R_q) поверхности клеток актиномицетов *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 и *R. ruber* ИЭГМ 560 по данным АСМ. Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n \geq 10$). Статистически значимые различия по сравнению с контролем: * – $p < 0,001$.

Варианты опыта: 1 – биотический контроль; 2 – в присутствии 0,04 мМ HgCl_2 ; 3 – в присутствии 1,25 мМ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Наблюдаемый контрастный эффект обусловлен принципиальными различиями воздействия металлов на поверхностные структуры. Сглаживание микрорельефа при ртутном воздействии согласуется с деструкцией внешнего миколового слоя, нарушением тургора и потерей поверхностных надмембранных выростов. В свою очередь, возрастание шероховатости под действием молибдена является следствием адаптивной модификации

клеточной стенки – стимуляции биосинтеза экзополимеров, липидных компонентов и формирования на поверхности бактерий нерастворимых электронно-плотных агрегатов металла. Однонаправленный характер изменений у представителей родов *Gordonia* и *Rhodococcus* указывает на универсальный характер поверхностного адаптивного ответа актиномицетов на ионы данных металлов.

Параллельно с оценкой шероховатости методом силовой спектроскопии АСМ были получены двумерные карты пространственного распределения сил взаимодействия зонда с поверхностью и рассчитана удельная сила неспецифической адгезии единичных клеток (таблица 15).

Анализ наномеханических характеристик выявил таксоноспецифический характер ответа адгезивного потенциала (таблица 12). Интактные клетки *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 характеризовались высокой исходной силой сцепления с зондом ($8,91 \pm 1,82$ нН). При культивировании в присутствии как Hg, так и Mo зафиксировано резкое двукратное ингибирование адгезии – до $4,65 \pm 0,95$ нН и $4,75 \pm 0,47$ нН соответственно ($p < 0,01$). На силовых картах штамма ИЭГМ 735 (рисунок 15) наблюдалось исчезновение локальных адгезивных доменов, что свидетельствует о дезорганизации поверхностного липофильного слоя оболочки.

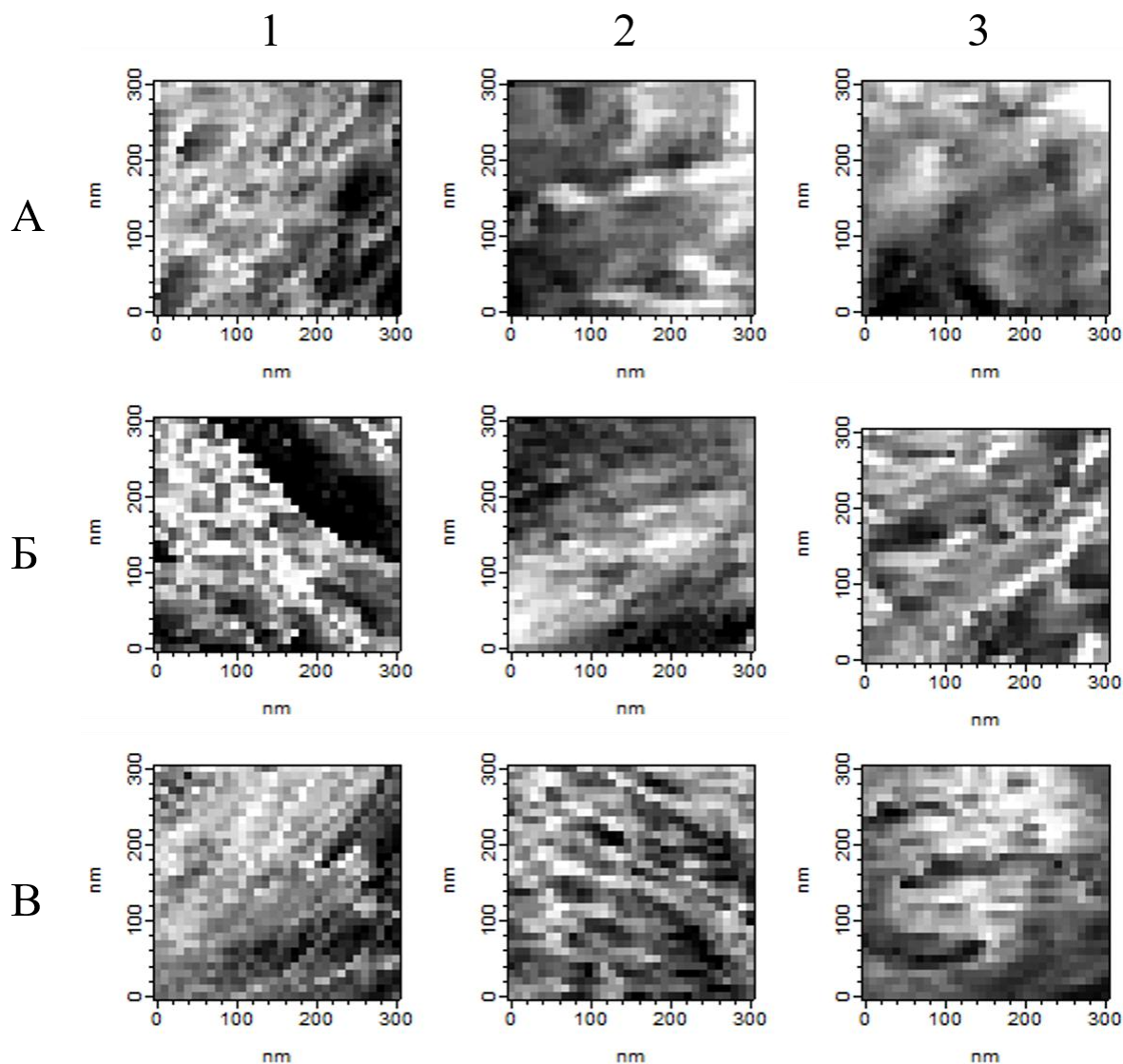


Рисунок 15 – Двумерные карты пространственного распределения сил адгезии на поверхности клеток актиномицетов по данным силовой спектроскопии АСМ. Область сканирования: 300 Ч 300 нм. Градиент серой шкалы отражает вариации силы сцепления зонда микроскопа с клеточной оболочкой (светлые участки соответствуют зонам повышенной адгезии).

Исследованные штаммы: А – *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735; Б – *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162; В – *R. ruber* ИЭГМ 560.

Условия культивирования: 1 – биотический контроль (без металлов); 2 – среда с добавлением 0,04 мМ HgCl_2 ; 3 – среда с добавлением 1,25 мМ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Для представителей рода *Rhodococcus* зафиксирована противоположная тенденция (таблица 12). Исходная сила адгезии интактных клеток

R. rhodochrous ИЭГМ 1162 и *R. ruber* ИЭГМ 560 составляла $4,11 \pm 1,52$ нН и $4,08 \pm 0,79$ нН. В присутствии ртути у *R. ruber* ИЭГМ 560 отмечено достоверное возрастание адгезии в 1,7 раза, тогда как у *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 прирост носил умеренный характер (до $5,12 \pm 0,99$ нН).

Наиболее выраженное возрастание адгезивного потенциала родококков отмечено под действием молибдата. Сила сцепления возрастала до 2,3 раз ($p < 0,001$). На двумерных силовых картах (рисунок 15) в опытных вариантах визуализируются кластеры повышенной адгезивности, топографически ассоциированные с зонами синтеза экзополимеров и образования наноразмерных агрегатов металла. Столь существенная стимуляция адгезивных свойств клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 на наноуровне выступает прямым фактором, обеспечивающим их высокоэффективное закрепление на лигноцеллюлозном носителе при иммобилизации (до 88,7%).

Анализ ультратонких срезов *R. ruber* ИЭГМ 560 методом просвечивающей электронной микроскопии позволил детально охарактеризовать субклеточные перестройки, индуцированные металлами (рисунок 16).

Под действием катионов ртути у значительной части популяции происходило неравномерное утолщение клеточной стенки с формированием обширных электронно-прозрачных областей либо выраженного плазмолиза (рисунок 16 в). В культуре идентифицированы гипертрофированные деструктивные клетки на стадии отмирания (рисунок 16 б). Одновременно часть популяции формировала уплотненный внешний капсулярный слой (рисунок 16 е), превосходящий по толщине контроль (рисунок 16 а). В цитоплазме клеток детектировались полифосфатные гранулы (рисунок 16 г), липидные капли (рисунок 16 д) и мембранные микровезикулы (рисунок 16 в), а также очаги фрагментации цитоплазматического матрикса (рисунок 16 е). Клетки были окружены слоем гидрофобного внеклеточного материала, экранирующего поверхность от токсиканта (рисунок 16 б).

Энергодисперсионный рентгеновский микроанализ подтвердил нарушение барьерных функций цитоплазматической мембраны. У морфологически интактных клеток в присутствии ртути зафиксировано резкое падение внутриклеточного пула ионов калия (рисунок 17, блок 2) по сравнению с полноценным элементным профилем контроля (рисунок 17, блок 1). Ртуть детектировалась преимущественно дискретными сигналами во внеклеточном пространстве и на периферии клеток (рисунок 17, блок 3) на фоне локального перераспределения фосфора и серы.

В присутствии молибдата клеточная популяция сохраняла выраженную гетерогенность. Наряду с интактными электронно-плотными клетками выявлялись морфотипы с утолщенными оболочками, капсульным материалом (рисунок 16 з) и четко выраженной слоистостью клеточной стенки (рисунок 16 и). Зафиксировано формирование мезосомоподобных инвагинаций мембраны (рисунок 16 з), визуализировались нуклеоид, липидные капли и электронно-плотные гранулы (рисунок 16 и, 16 к). В цитоплазме и экзополимерном матриксе обнаружены многочисленные электронно-плотные наноразмерные включения, вероятно, представляющие собой восстановленные формы молибдена (рисунок 16 з, 16 л).

По данным элементного картирования (рисунок 18), 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 (рисунок 18, блок 3), что свидетельствует о биосорбционной и барьерной роли внеклеточного матрикса актиномицетов.

Таким образом, ионы исследованных тяжелых металлов в сублетальных концентрациях вызывают цитотоксический эффект, преодолеваемый популяцией за счет комплексной морфологической адаптации: уплотнения клеточных оболочек, синтеза экзополимерного матрикса, компартментализации металлов в виде наночастиц и перестройки ультраструктуры цитоплазмы.

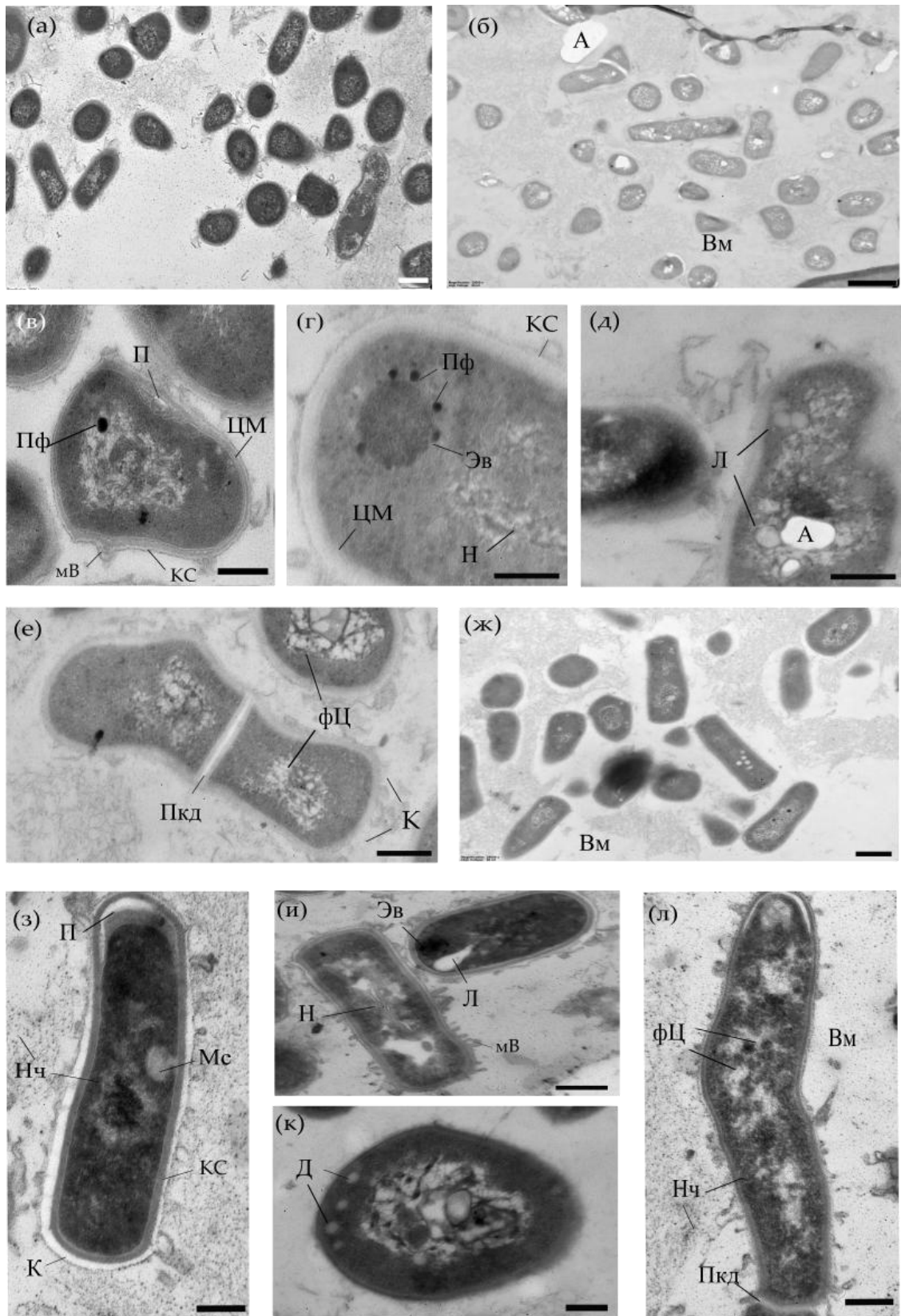


Рисунок 16 – Ультраструктура клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 (ПЭМ), выращенных на МПА. Масштаб: 500 нм (а, б, ж); 200 нм (в–е, з–л).

Варианты опыта: (а) – контроль; (б–е) – среда с добавлением 0,08 мМ HgCl_2 ; (ж–л) – среда с добавлением 2,5 мМ гептамолибдата аммония.

Обозначения: А – артефакт подготовки; К – капсулярный слой; КС – клеточная стенка; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; Пф – гранулы полифосфатов; Л – липидные включения; Пкд – формирующаяся септа деления; Мс – мезосомоподобные структуры; Н – нуклеоид; Нч – наноразмерные электронно-плотные частицы; Вм – внеклеточный матрикс; фЦ – фрагментация цитоплазмы; Эв – электронно-плотные включения; П – плазмолиз; мВ – микровезикулы.

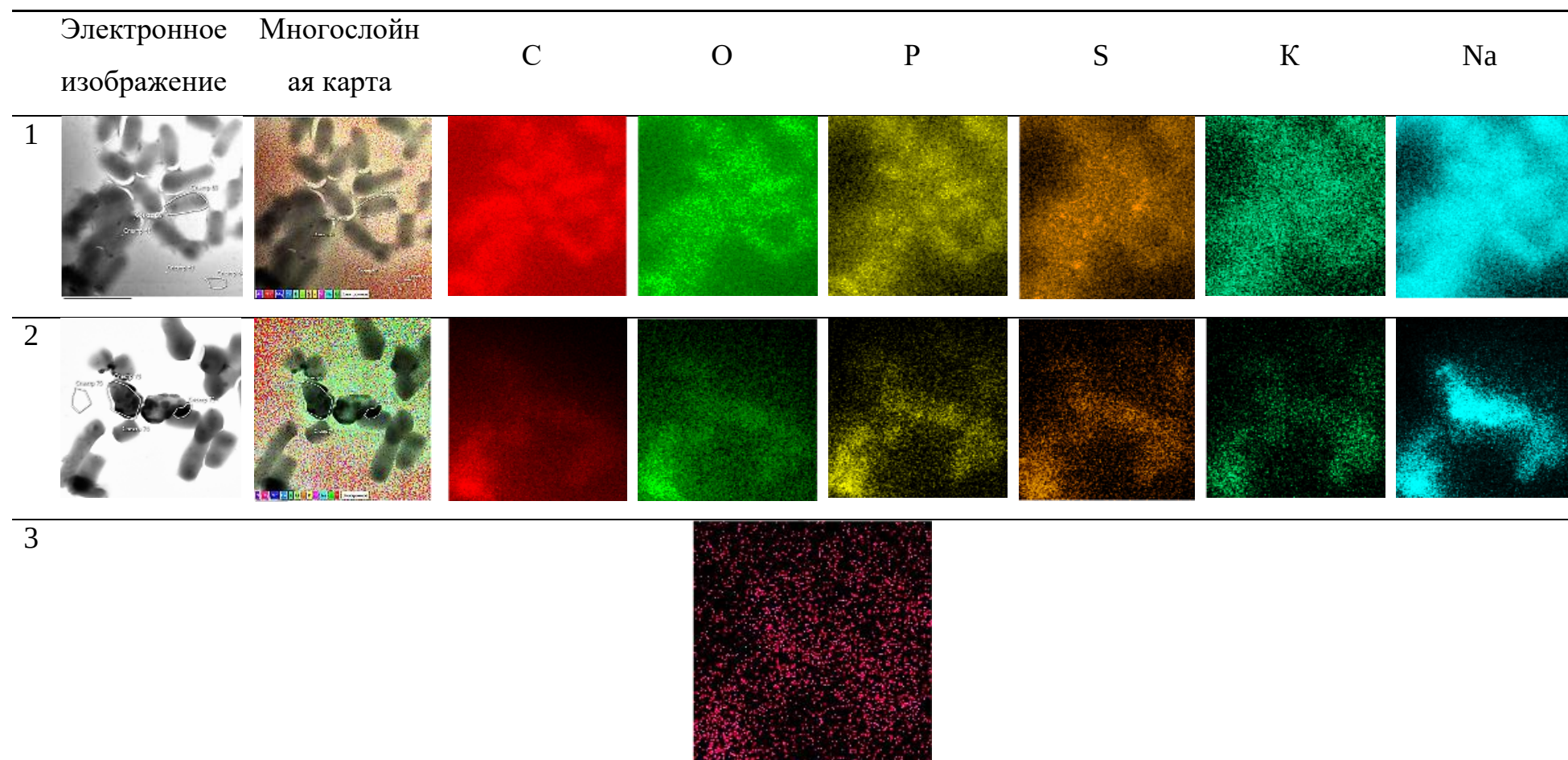


Рисунок 17 – Элементное картирование клеток *R. ruber* ИЭГМ 560, выращенных на МПА в присутствии ионов Hg^{2+} (0,16 мМ). Масштабная линейка: 2,5 мкм.

1 – биотический контроль; 2 – клетки в среде, загрязненной ртутью; 3 – распределение ртути по всему препарату

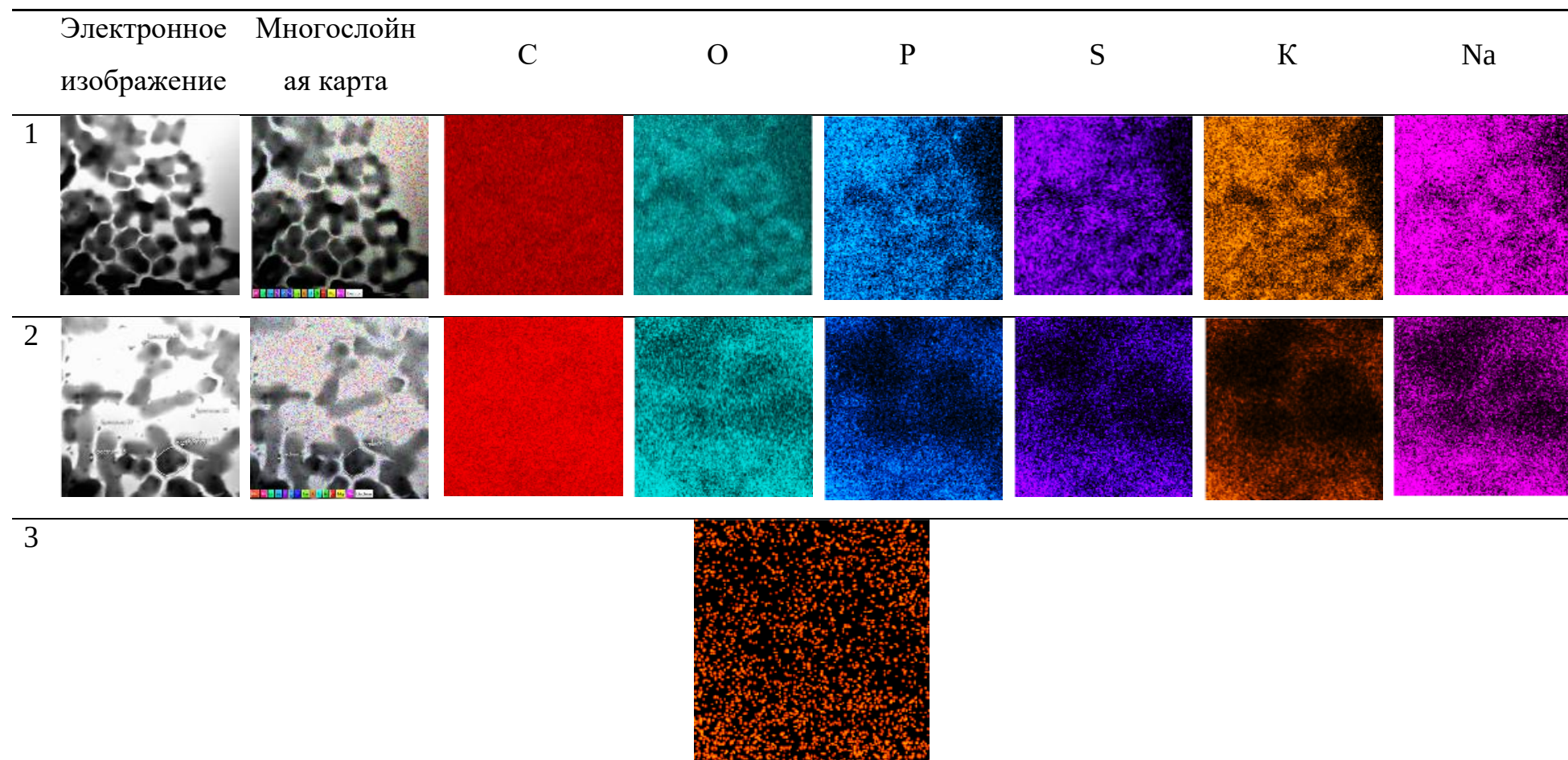


Рисунок 18 – Элементное картирование клеток *R. ruber* ИЭГМ 560, выращенных на среде МПА в присутствии ионов MoO_4^{2-} (2,5 мМ). Масштабная линейка: 2,5 мкм. 1 – биотический контроль; 2 – клетки в среде, загрязненной молибденом; 3 – распределение молибдена по всему препарату

3.3. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимические характеристики актиномицетов

Электрокинетический потенциал бактериальных клеток под воздействием металлов

Измерение электрокинетического потенциала выявило статистически значимые металл- и штамм-специфические сдвиги поверхностного заряда у исследуемых актиномицетов (таблица 13, рисунок 19). В интактных контрольных условиях все три штамма характеризовались выраженным отрицательным значением ζ -потенциала (в диапазоне от -17,9 до -34,2 мВ), обусловленным диссоциацией фосфатных и карбоксильных групп поверхностных биополимеров клеточной оболочки.

У штамма *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 достоверный отклик зафиксирован исключительно при максимальной нагрузке молибдена (2,5 мМ), при которой зафиксировано падение электроотрицательности поверхности почти на 5 мВ ($p = 0,0025$). В остальных вариантах опыта (при воздействии ртути и 1,25 мМ молибдата) сдвиги поверхностного заряда оставались статистически незначимыми ($p > 0,05$).

Для лидера по устойчивости к ТМ *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 оба металла выступали эффективными модуляторами поверхностных свойств. Внесение хлорида ртути индуцировало сильное дозозависимое отрицательное смещение потенциала (до -41,9 мВ) при 0,16 мМ, $p < 0,001$, что указывает на взаимодействие с анионными участками клеточной стенки при ртутном воздействии. Молибдат аммония в умеренной дозе (1,25 мМ) также увеличивал электроотрицательность клеток, однако при концентрации 2,5 мМ характер ответа менялся на противоположный, фиксировалось достоверное снижение отрицательного заряда поверхности ($p = 0,0088$).

У штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 зарегистрированы контрастные разнонаправленные изменения под воздействием ТМ. Минимальная концентрация ртути (0,04 мМ) вызывала слабое отрицательное смещение,

тогда как в присутствии 0,16 мМ ртути наблюдался резкий положительный сдвиг заряда ($p = 0,0002$), что связано с пассивной сорбцией катионов на частично лизированных участках. Воздействие молибдата в концентрации 1,25 мМ приводило к выраженному росту отрицательного заряда, в то время как при дозе 2,5 мМ показатели коаксиально стабилизировались на уровне контроля.

Таблица 13 – Электрокинетический потенциал клеток актиномицетов в присутствии молибдата и хлорида ртути

Вид, штамм	Условие	ζ -потенциал, мВ ($M \pm SD$)	p -значение
<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735	Контроль	$-17,9 \pm 0,9$	—
	Hg 0,04 мМ	$-19,5 \pm 0,2$	0,087
	Hg 0,16 мМ	$-18,9 \pm 0,5$	0,181
	Mo 1,25 мМ	$-20,0 \pm 0,1$	0,049
	Mo 2,5 мМ	$-13,1 \pm 0,8$	0,0025
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1162	Контроль	$-30,2 \pm 0,8$	—
	Hg 0,04 мМ	$-38,8 \pm 0,7$	0,0002
	Hg 0,16 мМ	$-41,9 \pm 1,3$	0,0006
	Mo 1,25 мМ	$-33,9 \pm 0,5$	0,0058
	Mo 2,5 мМ	$-27,1 \pm 0,8$	0,0088
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	Контроль	$-34,2 \pm 0,5$	—
	Hg 0,04 мМ	$-36,8 \pm 0,5$	0,0028
	Hg 0,16 мМ	$-29,0 \pm 0,5$	0,0002
	Mo 1,25 мМ	$-39,5 \pm 0,7$	0,0009
	Mo 2,5 мМ	$-32,2 \pm 1,9$	0,211

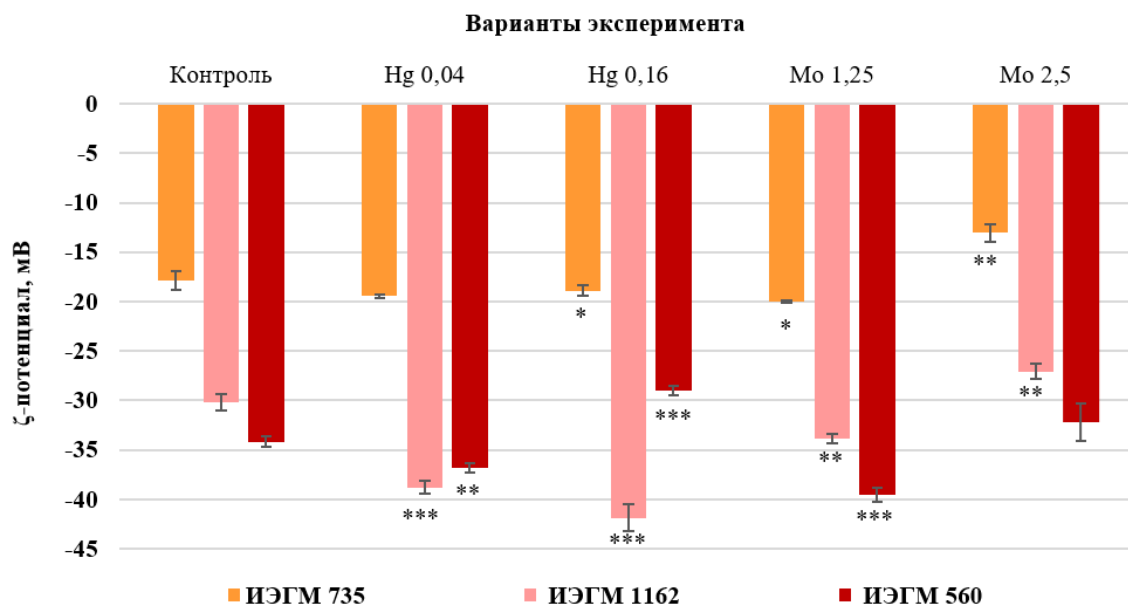


Рисунок 19 – Электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 и *R. ruber* ИЭГМ 560. Данные представлены как $M \pm SD$, $n = 3$. Звездочками отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Варианты опыта: 1 – биотический контроль; 2 – в присутствии 0,04 мМ $HgCl_2$; 3 – в присутствии 0,16 мМ $HgCl_2$; 4 – в присутствии 1,25 мМ $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; 5 – в присутствии 2,5 мМ $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$.

Наблюдаемые у разных штаммов изменения электрокинетического потенциала согласуются с полученными ранее данными по гидрофобности оболочек и силе клеточной адгезии. У штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 снижение плотности отрицательного заряда под действием 2,5 мМ молибдата напрямую коррелирует с интенсификацией гидрофобных взаимодействий на поверхности клеток, что ранее было продемонстрировано методом солевой агрегации SAT. Напротив, индуцированное ртутью мощное отрицательное смещение потенциала приводит к резкому усилению сил межклеточного электростатического отталкивания, что объясняет падение поверхностного адгезивного потенциала, зафиксированное методом АСМ. У штамма *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 наиболее выраженный эффект (сдвиг потенциала в сторону положительных значений при 2,5 мМ молибдата) обусловлен

сорбционным экранированием оболочки поливалентными катионами металлов из среды и адаптивной перестройкой состава клеточной стенки.

Изменение гидрофобных свойств бактериальных клеток в присутствии металлов

Анализ гидрофобных свойств оболочки методом солевой агрегации (SAT) показал, что в интактном состоянии клетки *R. ruber* ИЭГМ 560 и *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 обладают высокой исходной гидрофобностью (порог видимой агрегации составил 0,4 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Микроскопический контроль в фазовом контрасте ($\times 1000$) подтвердил физиологически нормальное клеточное деление по типу *snapping division* с формированием характерных V-образных пар.

В присутствии 0,04 мМ хлорида ртути и 1,25 мМ гептамолибдата аммония порог агрегации культуры *R. ruber* ИЭГМ 560 не изменялся и составлял 0,4 М, при этом при концентрациях сульфата аммония 0,8–2,0 М происходило формирование плотных клеточных агрегатов (рисунок 20). Это доказывает высокую структурную устойчивость микобактериального слоя *R. ruber* ИЭГМ 560 к умеренным дозам исследуемых токсикантов.

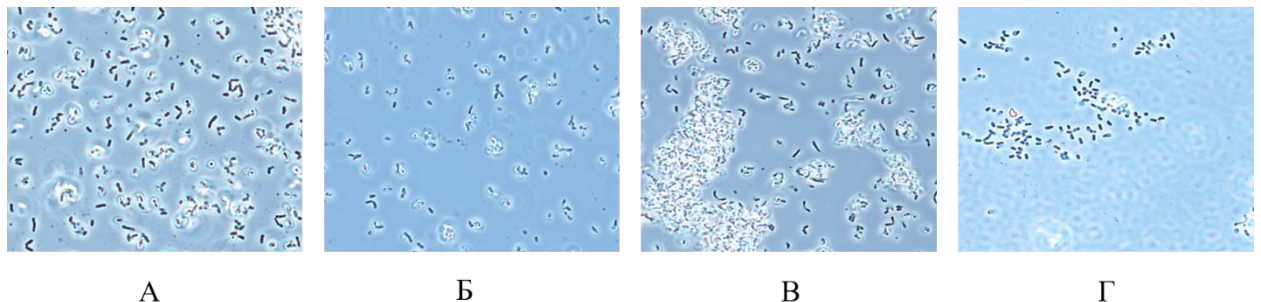


Рисунок 20 – Микрофотографии клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 в тесте SAT (фазовый контраст, $\times 1000$):

А – 0 М, контроль; Б – 0,4 М, контроль, начало образования агрегатов; В – 2,0 М, контроль, плотные конгломераты; Г – 0,4 М + Hg 0,04 мМ, порог агрегации идентичен контролю.

Напротив, культура *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 проявила высокую фенотипическую лабильность. Порог агрегации культуры в контроле

составлял 0,4 М (рисунок 21). Воздействие 0,04 мМ HgCl_2 вызывало выраженный токсический эффект. Клетки теряли характерные контуры, уменьшались в размерах и флокулировали уже при 0 М соли, что свидетельствует о деградации поверхностных структур и неспецифической коагуляции клеточного дебриса. При культивировании с молибденом клетки приобретали неровную, извитую морфологию, сохраняя при этом жизнеспособность. При молибдатном стрессе агрегация клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 также детектировалась уже при 0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, что указывает на компенсаторную гиперпродукцию липофильных экзополимеров и поверхностных липидов в ответ на нарушение биосинтеза клеточной стенки.

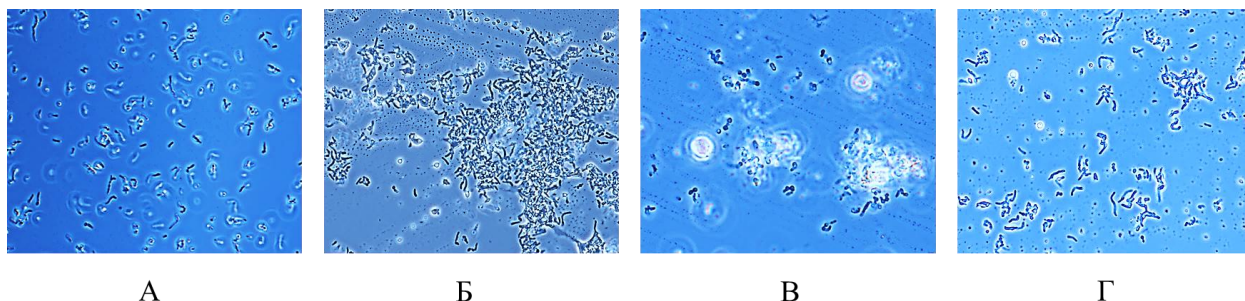


Рисунок 21 – Микрофотографии клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 в тесте SAT (фазовый контраст, $\times 1000$):

А – 0 М, контроль; Б – 0,4 М, контроль, начало образования агрегатов; В – 0,0 М + Hg 0,04 мМ, агрегация плотные конгломераты (свечение); Г – 0,0 М + Мо 1,25 мМ, агрегация.

Модуляция антибиотикочувствительности актиномицетов под действием молибдена и ртути

Исследование профилей чувствительности к антибактериальным препаратам различных фармакологических групп (ингибиторам синтеза клеточной стенки, трансляции и репликации ДНК) диско-диффузионным методом выявило выраженное металл- и таксоноспецифическое модифицирующее действие ионов ТМ (таблица 14). Взаимодействие классифицировали по трем категориям: синергизм (статистически достоверное увеличение зоны лизиса при $(p < 0,05)$), антагонизм (достоверное

уменьшение зоны, свидетельствующее о росте резистентности) и нейтральное взаимодействие ($p \geq 0,05$).

Таблица 14 – Влияние ионов молибдена и ртути на диаметры зон задержки роста (мм) актиномицетов при действии антибиотиков

Антибиотик	<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735, Контроль*	<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735, Мо / Hg	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560: Контроль*	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560, Мо	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560, Hg	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1162, Контроль*	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1162, Мо	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1162, Hg
Ампициллин	46,0 ± 3,6	ППР**	32,0 ± 2,0	32,3 ± 2,1	42,0 ± 4,6****	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 2,6****
Цефотаксим	44,7 ± 5,9	ППР	34,7 ± 4,5	54,3 ± 2,5****	52,3 ± 1,5****	37,7 ± 2,5	41,7 ± 2,9	33,0 ± 1,0
Ванкомицин	28,7 ± 3,1	ППР	29,7 ± 1,5	38,3 ± 2,1****	36,3 ± 5,5	26,0 ± 1,0	33,3 ± 3,2****	25,3 ± 4,7
Эритромицин	43,0 ± 2,6	ППР	32,7 ± 3,2	29,7 ± 2,5	40,7 ± 6,1	29,3 ± 2,1	14,3 ± 2,1****	26,3 ± 5,5
Доксициклин	45,0 ± 3,5	ППР	38,3 ± 0,6	52,6 ± 2,3****	57,3 ± 2,1****	42,3 ± 0,6	46,0 ± 1,7	43,7 ± 2,9
Гентамицин	43,3 ± 3,8	ППР	32,3 ± 1,5	41,7 ± 2,1****	60,7 ± 1,5****	45,7 ± 1,2	39,7 ± 3,5	42,7 ± 2,1
Тетрациклин	46,7 ± 4,2	ППР	42,3 ± 2,5	40,0 ± 4,6	63,0 ± 1,7****	43,3 ± 2,9	44,3 ± 4,0	44,3 ± 4,0
Ципрофлоксацин	47,7 ± 1,5	ППР	37,0 ± 1,0	41,0 ± 2,6	44,0 ± 4,0	20,3 ± 1,5	19,7 ± 1,5	29,0 ± 2,6****

Примечание: * – контролем являлся рост на LB агаре в присутствии антибиотиков без ТМ; **ППР – полное подавление роста бактериального газона по всей площади чашки Петри вследствие выраженного синергидного действия ТМ и антибиотика (измерение дискретной зоны лизиса невозможно); *** – статистически достоверные различия с соответствующим контролем* штамма при $p < 0,05$

У штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 зарегистрирован генерализованный синергидный эффект металлов с большинством антибактериальных агентов. Присутствие молибдена достоверно усиливало чувствительность клеток к ингибиторам сборки пептидогликана цефотаксиму и ванкомицину, а также к блокаторам трансляции доксициклину и гентамицину. Воздействие катионов ртути на клетки штамма приводило к еще более резкой сенсibilизации: зона задержки роста в присутствии гентамицина увеличилась почти в два раза, тетрациклина с 42,3 до 63,0 мм, доксициклина с 38,3 до 57,3 мм, ампициллина до 42,0 мм. Столь масштабное действия антибиотиков согласуется с ранее установленными данными АСМ и КЛСМ о критическом нарушении целостности внешнего липофильного слоя оболочки и падении жизнеспособности клеток при ртутном стрессе.

Для штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 характер влияния носил иной, селективный характер. В интактном состоянии культура обладала абсолютной конститутивной устойчивостью к ампициллину (зона 0 мм). При интоксикации ртутью наблюдалась частичная дестабилизация барьера резистентности с формированием зоны лизиса $7,0 \pm 2,6$ мм. В комбинации с эритромицином молибдат индуцировал выраженный антагонистический эффект: диаметр зоны лизиса сокращался более чем в два раза, что свидетельствует о компенсаторном снижении проницаемости оболочки или активации неспецифических макролидных эффлюксных помп. Кроме того, присутствие ртути приводило к летальному действию ципрофлоксацина, указывая на кумулятивное повреждение аппарата репликации ДНК фторхинолонами и ТМ.

Критический характер носило сочетанное воздействие факторов на культуру *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735. В биотическом контроле штамм проявлял типичную чувствительность ко всем антибиотикам. Однако внесение в среду солей молибдена или ртути вызывало полное подавление роста бактериального газона по всей поверхности агара в присутствии каждого из исследованных антибиотиков. Установлено, что в отсутствие

антибактериальных препаратов штамм *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 формировал сплошной газон, что подтверждает сохранение его жизнеспособности при данных концентрациях ТМ. Таким образом, наблюдаемое ППР является результатом именно синергидного (кумулятивного) цитотоксического действия металлов и антибиотиков. Столь высокая летальность подтверждает фенотипическую лабильность гордоний: дезорганизация внешних липидных слоев клеточной стенки (падение шероховатости на АСМ) в сочетании с отсутствием эндогенных ферментов детоксикации приводит к тотальному коллапсу защитных систем при воздействии любых антимикробных агентов.

Активность каталазы в присутствии тяжелых металлов

Каталаза является одним из ключевых ферментов антиоксидантной защиты наряду с супероксиддисмутазой. Она выполняет критически важную функцию в бактериальном стрессовом ответе и деградации ксенобиотиков. В условиях окислительного стресса в присутствии хлорида ртути в концентрации 0,31, 0,63 и 1,25 мМ исходная каталазная активность *R. ruber* ИЭГМ 560 составляла 40,32 мкмоль/мин х ОП при культивировании в МПБ и 77,59 мкмоль/мин х ОП – при культивировании в RS. В течение первых сут наблюдалось резкое снижение каталазной активности во всех тестируемых вариантах, вероятно, ввиду того, что клетки находились в lag-фазе роста (рисунок 22, рисунок 23). На 3 сут эксперимента при культивировании в МПБ (рисунок 22) в опытном и контрольном вариантах отмечалось постепенное увеличение активности каталазы, что связано с переходом бактерий в фазу экспоненциального роста, адаптации к токсиканту, его биосорбции и постепенным накоплением метаболитов.

В случае культивирования в RS + м/э в присутствии C₁₆ (рисунок 23) наблюдалось дальнейшее снижение каталазной активности, что может объясняться адаптацией как к токсиканту, так и к самому субстрату, что увеличивает продолжительность lag-фазы.

Снижение активности каталазы при культивировании в МПБ во всех образцах на 7 сут может быть обусловлено переходом в стационарную фазу роста и, соответственно, замедлением клеточного метаболизма. В случае с минеральной средой наблюдается повышение каталазной активности, что связано с переходом бактерий в фазу экспоненциального роста. Стоит отметить сходный характер кривой как в опытном, так и в контрольном образцах при культивировании в обеих жидких средах. По-видимому, клетки испытывают значительный окислительный стресс в присутствии хлорида ртути при культивировании в МПБ, поскольку значения каталазной активности в опытном варианте значительно превышают таковые показатели в контроле. В противном случае, при культивировании в RS в присутствии C_{16} , значения каталазной активности контрольного образца превышают показатели опыта. Таким образом, динамика активности каталазы характеризуется сходным поведением во всех четырех популяциях. Эти данные позволяют предположить некий паттерн, который может быть связан с особенностями развития и метаболизма клеток в условиях адаптации к росту на богатых и небогатых по источнику углерода питательных средах.

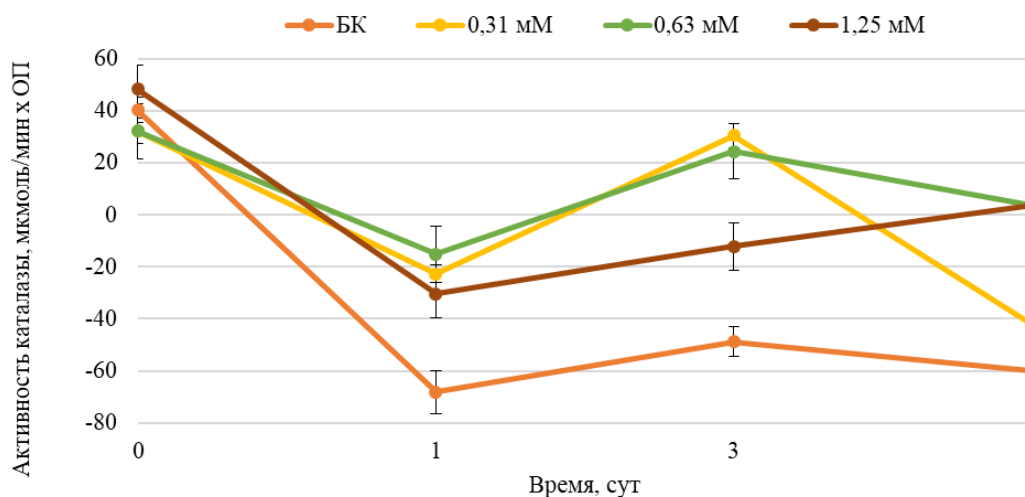


Рисунок 22 – Динамика каталазной активности *R. ruber* ИЭГМ 560 в условиях культивирования в МПБ.

Варианты опыта: 1 – биотический контроль (БК); 2 – в присутствии $HgCl_2$ 0,31 мМ; 3 – $HgCl_2$ 0,63 мМ; 4 – $HgCl_2$ 1,25 мМ.

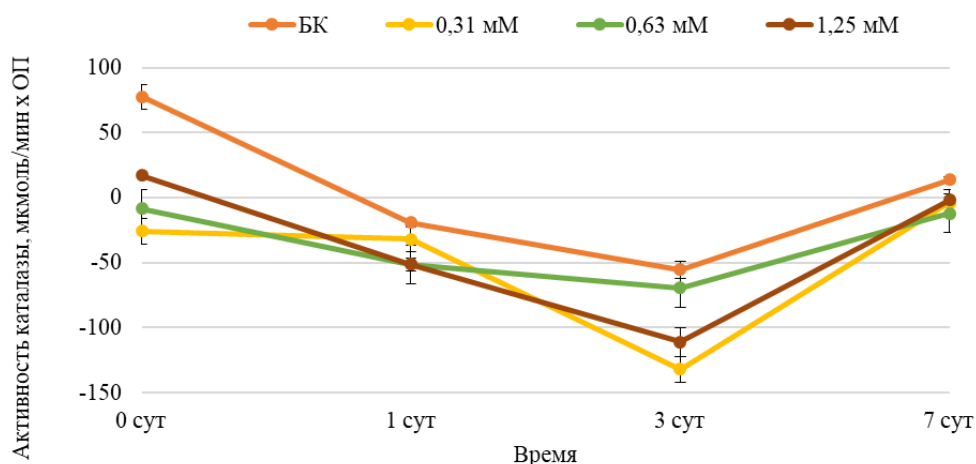


Рисунок 23 – Динамика каталазной активности *R. ruber* ИЭГМ 560 в условиях культивирования в RS в присутствии *n*-гексадекана.

Варианты опыта: 1 – биотический контроль (БК); 2 – в присутствии HgCl_2 0,31 мМ; 3 – HgCl_2 0,63 мМ; 4 – HgCl_2 1,25 мМ.

В условиях окислительного стресса клетка расходует энергию на ферментативные защитные реакции, вследствие чего значения каталазной активности повышаются, поскольку неферментные антиоксидантные системы не инактивируют активные формы кислорода ввиду нарушения клеточных оболочек и целостности мембран (Gogoleva *et al.*, 2012)

Анализ кинетики газообмена (эмиссии CO_2 и потребления O_2)

Оценку катаболического статуса и динамики клеточного дыхания актиномицетов проводили методом непрерывного микрореспирометрического мониторинга газообмена в среде МПБ при внесении различных концентраций хлорида ртути (рисунок 24).

В интактном контроле исследованные культуры характеризовались классической S-образной кинетикой газообмена с переходом в фазу активного экспоненциального дыхания после 12–15 ч инкубации. Средняя скорость эмиссии CO_2 в контроле составила 735,56 мкл/ч для *R. ruber* ИЭГМ 560 (рисунок 24 а) и 629,81 мкл/ч для *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (рисунок 24 б), что обеспечило на 7 сут экспозиции выход 165,5 мл и 144,9 мл CO_2 соответственно.

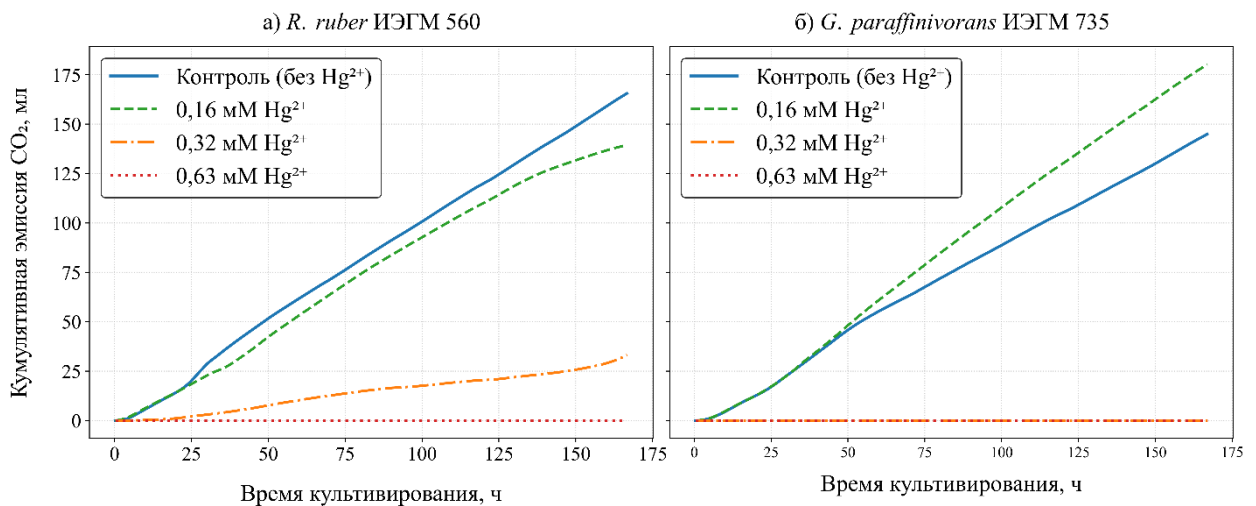


Рисунок 24 – Динамика кумулятивного выделения CO_2 клетками *R. ruber* ИЭГМ 560 (а) и *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (б) в среде МПБ в присутствии различных концентраций HgCl_2 .

Варианты опыта: 1 – биотический контроль (без металла); 2 – среда с добавлением 0,16 мМ HgCl_2 ; 3 – среда с добавлением 0,32 мМ HgCl_2 ; 4 – среда с добавлением 0,63 мМ HgCl_2 .

Внесение ионов ртути приводило к резкому дозозависимому ингибированию респираторной активности культур. При концентрации 0,16 мМ хлорида ртути средняя скорость выделения CO_2 клетками *R. ruber* ИЭГМ 560 снижалась до 8,5 мкл/ч, а у *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 до 7,1 мкл/ч. При этом культура *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 за счет пролонгированного компенсаторного дыхания в поздние сроки инкубации накапливала до 180,2 мл CO_2 (124,4% от контроля), что свидетельствует об активации энергоемких стрессовых систем поддержания клеточного гомеостаза.

При возрастании токсической нагрузки до 0,32 мМ HgCl_2 средняя скорость эмиссии CO_2 падала до 4,8 мкл/ч у *R. ruber* ИЭГМ 560 и до 5,8 мкл/ч у *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, что в 108–153 раза уступало контрольным показателям. При этом если клетки *R. ruber* ИЭГМ 560 сохраняли способность к остаточному метаболизму, то у *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 дыхательный газообмен практически полностью угасал уже к середине срока культивирования.

Максимальная концентрация ртути (0,63 мМ) вызывала критическую блокаду электрон-транспортных цепей у обоих штаммов. К 7 суткам эксперимента в опытных вариантах фиксировалось практически полное прекращение выделения CO_2 и потребления O_2 , тогда как в биотическом контроле отмечался лишь незначительный естественный спад, обусловленный переходом популяции в стационарную фазу.

Полученные результаты кинетики клеточного дыхания демонстрируют выраженную цитотоксичность катионов ртути в концентрациях свыше 0,32 мМ и согласуются с данными микроскопии о нарушении барьерных функций мембранного аппарата и снижении жизнеспособности актиномицетов.

Флуоресцентный анализ жизнеспособности и защитных биополимеров клеток

Для комплексной визуализации цитопатологических эффектов ТМ, оценки целостности клеточного каркаса и индукции протективных внутри- и внеклеточных компонентов на популяционном уровне был проведен микроскопический анализ. Количественный учет выживаемости клеток, а также визуализацию структурных полисахаридов и нейтральных липидов выполняли методом широкопольной флуоресцентной микроскопии, тогда как пространственную верификацию структуры и проницаемости мембран в объеме многоклеточных конгломератов осуществляли КЛСМ.

С использованием широкопольной люминесцентной микроскопии был проведен прямой количественный подсчет соотношения живых и погибших клеток в популяциях актиномицетов после суточного контакта с токсикантами. Установлено, что интактная популяция представлена преимущественно жизнеспособными клетками с неповрежденными мембранами, интенсивно удерживающими флуорохром SYTO 9 (зеленое свечение, рисунок 25 А). В присутствии ртути 0,32 мМ зафиксировано статистически значимое падение доли жизнеспособных морфотипов (до 75 %), при этом в образующихся многоклеточных конгломератах визуализировались

погибшие клетки и клетки на грани отмирания, мембраны которых были проницаемы для пропидия йодида (красно-оранжевое свечение, рисунок 25 Б).

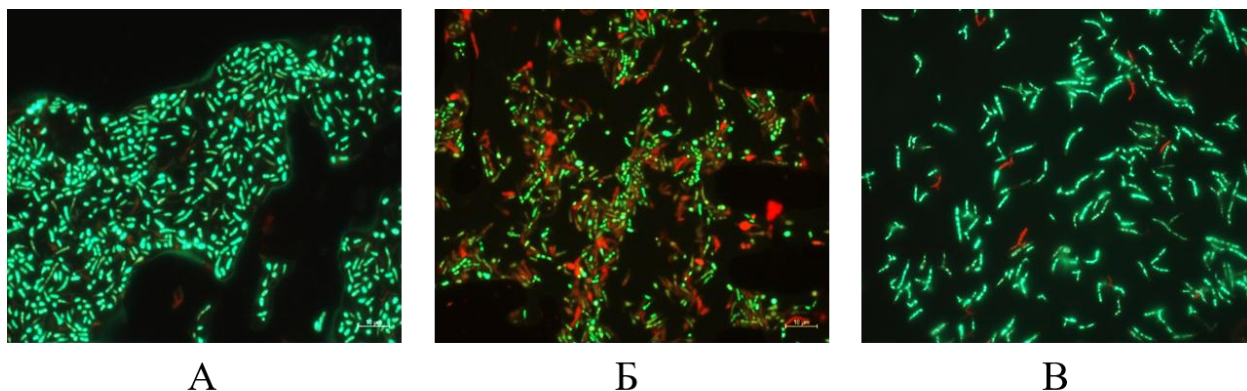


Рисунок 25 – Визуализация и оценка жизнеспособности клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 при воздействии ионов ТМ, 24 ч. Увеличение $\times 1000$. Зеленое свечение соответствует intactным клеткам с сохранной цитоплазматической мембраной (живые); красно-оранжевое – клеткам с поврежденной мембраной (мертвые).

Варианты опыта: а – биотический контроль; б – клетки в присутствии 0,32 мМ HgCl_2 ; в – клетки в присутствии 2,5 мМ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Оценка состояния углеводного каркаса и биопленкообразования с помощью флуоресцентной микроскопии при окрашивании Calcofluor White выявила металл-индуцированную продукцию капсульных полимеров, выступающих внешним неспецифическим барьером (рисунок 26). В intactном контроле клетки штаммов *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 и *R. ruber* ИЭГМ 560 характеризовались равномерным фоновым свечением стенок с четкой локализацией септ деления (рисунок 26 А). Действие ртути вызывало локальную фрагментацию полисахаридного остова стенок и снижение интенсивности флуоресценции у культур (рисунок 26 Б). Напротив, молибдатный стресс стимулировал продукцию внеклеточного полисахаридного матрикса (ЭПС), визуализируемого в виде интенсивных, оптически плотных синих «ореолов» вокруг многоклеточных конгломератов (рисунок 26 В).

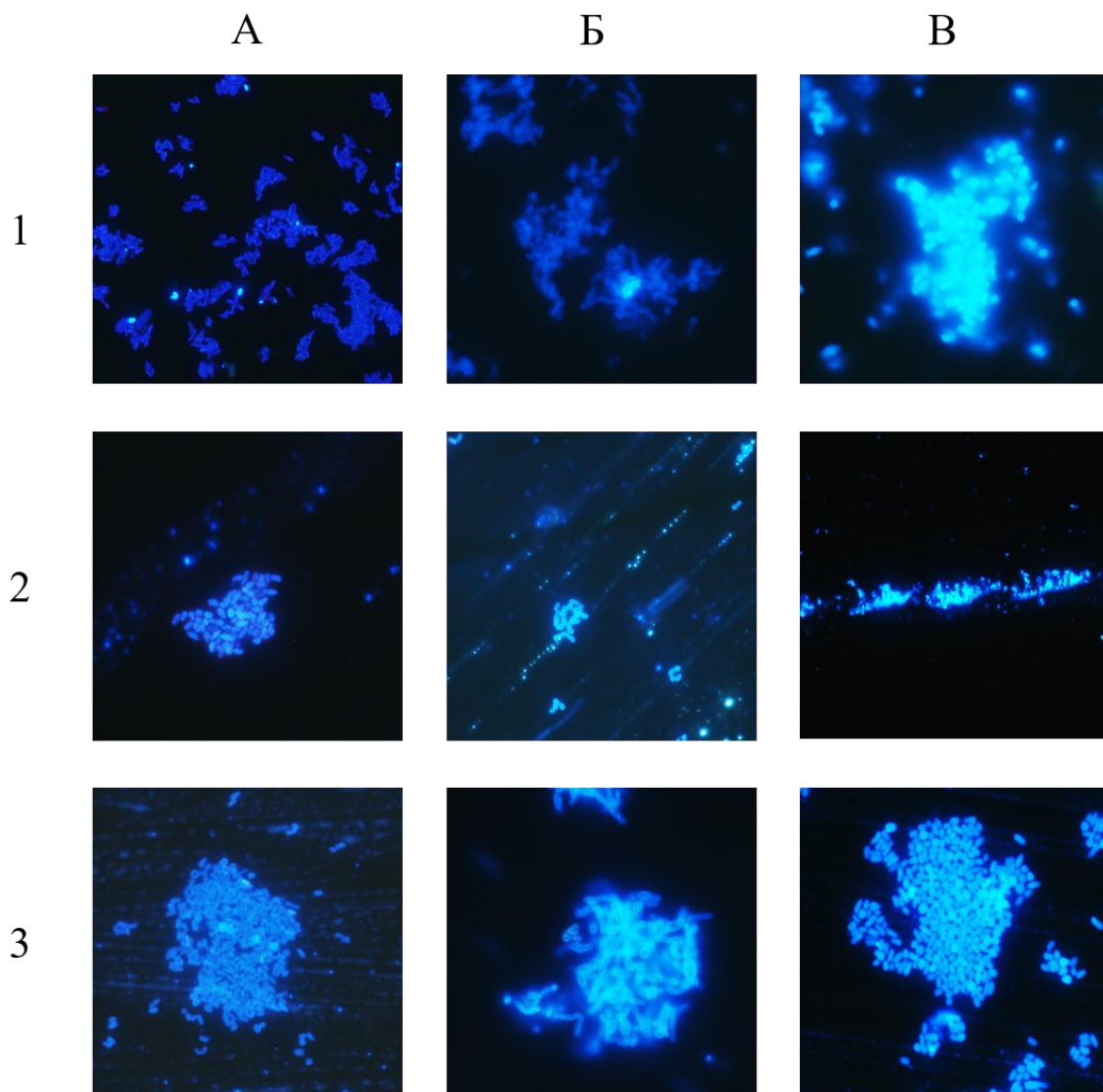


Рисунок 26 – Люминесцентная микроскопия структурных и внеклеточных полисахаридов актиномицетов при воздействии ТМ, 24 ч. Увеличение $\times 1000$. Объекты исследования: 1 – *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735; 2 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162; 3 – *R. ruber* ИЭГМ 560.

Варианты опыта: А– биотический контроль; Б– клетки в присутствии 0,32 мМ HgCl_2 ; В – клетки в присутствии 2,5 мМ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Параллельный флуоресцентный анализ с использованием гидрофобного зонда Nile Red выявил интенсивное накопление внутриклеточных липидов у выживших клеток, находящихся под металлической нагрузкой (рисунок 27). Если в контрольных условиях в цитоплазме фиксировались единичные микровключения (рисунок 27 А), то в присутствии ртути фиксировалось резкое увеличение числа и линейных размеров внутриклеточных липидных

капель (рисунок 27 Б). Синтез нейтральных липидов представляет собой универсальную защитную реакцию нокардиоформных актиномицетов (Zhang *et al.*, 2017). Капли регулируют микровязкость мембран, депонируют токсиканты и служат ключевым эндогенным источником энергии для репаративных процессов при тяжелом элементном стрессе.

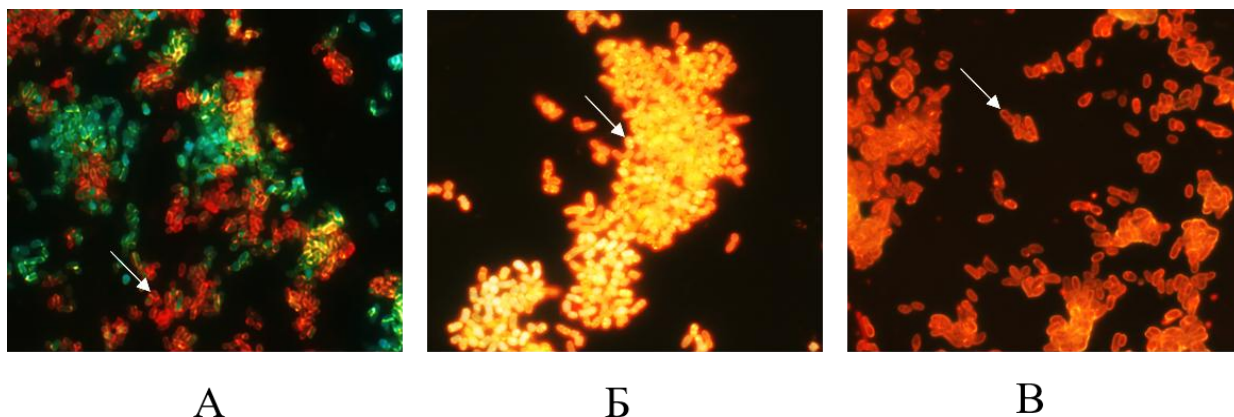


Рисунок 27 – Индукция внутриклеточных нейтральных липидов у штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 в условиях металлического стресса, 24 ч. Увеличение $\times 1000$. Избирательное золотисто-желтое и оранжевое свечение соответствует зонам локализации гидрофобных включений триацилглицеринов в цитоплазме клеток. Формирование наноразмерных липидных капель-протекторов указаны стрелками.

Варианты опыта: а – биотический контроль; б – клетки в присутствии 0,32 мМ HgCl_2 ; в – клетки в присутствии 2,5 мМ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Таким образом, сопряженное использование конфокальной и люминесцентной микроскопии доказывает гетерогенность структуры микробных популяций и выявляет двухконтурный механизм защиты актиномицетов от ТМ, включающий внешнее экранирование ЭПС матриксом и внутреннюю стабилизацию цитоплазмы липидными протекторами.

Глава 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ ДЕТОКСИКАЦИИ И ИНАКТИВАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

4.1. Геномная организация хромосомного острова мультиметаллорезистентности у актиномицетов

На примере штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 полногеномное профилирование позволило охарактеризовать молекулярный базис полирезистентного фенотипа, установленного в ходе фенотипического скрининга. Биоинформатический анализ фланкирующих регионов локуса детоксикации ртути показал, что индуцибельный *mer*-оперон интегрирован в состав протяженного и высококонсервативного хромосомного острова мультиметаллорезистентности (Heavy Metal Resistance Island, HMRI) (таблица 15).

Таблица 15 – Генетическое окружение и функциональные локусы хромосомного острова HMRI штамма *R. ruber* ИЭГМ 560

Интервал координат, п.н.	Направление цепи	Обозначение гена / локуса	Продукт
922 – 1854	—	<i>cadA / zincA</i>	Металл-транспортирующая АТФ-аза Р-типа
5755 – 8347	—	<i>merR-merB-merA-hyp</i>	Операторный регион и структурные гены <i>mer</i> -оперона ртути
12310 – 12474	—	<i>hyp</i>	Гипотетический белок
14538 – 15503	—	<i>cadA2 / copA</i>	Металл-транспортирующая АТФ-аза Р-типа

Продолжение таблицы 15

Интервал координат, п.н.	Направление цепи	Обозначение гена / локуса	Продукт гена
18801 – 20036	—	<i>mntH</i>	Белок направленного транспорта марганца MntH
20130 – 21065	—	<i>ctaG</i>	Фактор сборки цитохромоксидазы <i>caa3</i> -типа CtaG_BS
21099 – 21659	—	<i>copC</i>	Периплазматический белок устойчивости к меди CopC
24492 – 26258	—	<i>cox1 / ctaD</i>	Субъединица I терминального комплекса цитохромоксидазы
27314 – 27676	—	<i>reg</i>	Потенциальный транскрипционный регулятор
28748 – 30739	—	<i>copD / ctaG</i>	Белок устойчивости к меди CopD / Фактор сборки цитохромоксидазы
32542 – 33783	—	<i>ldt</i>	L,D-транспептидаза (стабилизация клеточной стенки бактерии)

Как следует из представленных данных синтении, непосредственное микроокружение ртутного кластера насыщено генами систем активного выведения (эффлюкса) других переходных и тяжелых металлов. Ниже по координатной шкале минус-цепи ДНК (922–1854 п.н.) локализован

полноразмерный ген катион-транспортирующей АТФазы Р-типа *cadA/zincA*, ответственной за энергозависимую эвакуацию токсичных ионов свинца, кадмия и цинка.

В области *upstream* за пределами межгенного регуляторного спейсера выявлена сложноорганизованная полиметаллическая защитная платформа, координирующая устойчивость к меди, кадмию, цинку и марганцу:

- вторая независимая копия Р-типной АТФазы *cadA2/corA* (14 538–15 503 п.н.), специализирующаяся на экспорте двухвалентных катионов меди, цинка и кадмия;
- высокоаффинный транспортер марганца *mntH* (18 801–20 036 п.н.), функционирующий как протон-сопряженная помпа семейства Nramp;
- двухкомпонентная система медного гомеостаза, представленная генами периплазматического шаперона *corC* (21 099–21 659 п.н.) и трансмембранного порина *corD* (28 748–30 739 п.н.), обеспечивающими секвестрацию ионов меди на периферии клетки.

Принципиальной биологической особенностью исследуемого острова NMRI является его прямое физическое сопряжение с резидентными «генами домашнего хозяйства» (*housekeeping genes*), контролирующими дыхательный метаболизм и архитектонику клеточной стенки. Локусы металлорезистентности фланкированы структурными генами терминального участка дыхательной цепи – каталитической субъединицей I цитохромоксидазы *cox1/ctaD* (24 492–26 258 п.н.) и ее сборочным мембранным фактором *ctaG* (20 130–21 065 п.н.), а также геном L,D-транспептидазы *ldt* (32 542–33 783 п.н.), катализирующей образование поперечных 3→3 пептидных связей пептидогликана. Такое сопряжение функционально оправдано: активный транспорт металлов против градиента концентраций требует постоянной генерации протонного потенциала цитохромоксидазой, а индукция L,D-транспептидазы обеспечивает компенсаторное утолщение и сшивку клеточной стенки в условиях металлостресса, что согласуется с данными ПЭМ.

Координация всех функциональных рамок считывания острова HMRI на комплементарной (минус) цепи ДНК в сочетании с его локализацией внутри стабильного хромосомного контига доказывает высокую эволюционную закрепленность признака мультиметаллорезистентности у *R. ruber* ИЭГМ 560. Подобная макроструктурная организация исключает риск спонтанной элиминации адаптивных генов при отсутствии постоянного селективного давления металлов в эконикше и делает данный штамм генетически стабильным биокатализатором для очистки промышленных стоков.

4.2. Архитектура, филогения и транскрипционная активность детерминант устойчивости к ртути

4.2.1. Структурно-функциональная организация *mer*-оперона

Центральным функциональным модулем острова мультиметаллорезистентности штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 выступает индуцибельный ртутный *mer*-оперон (рисунок 28).

Вероятное положение точки старта транскрипции картировано нейросетью SAPPHERE.CNN и подтверждено предиктором G4PromFinder.

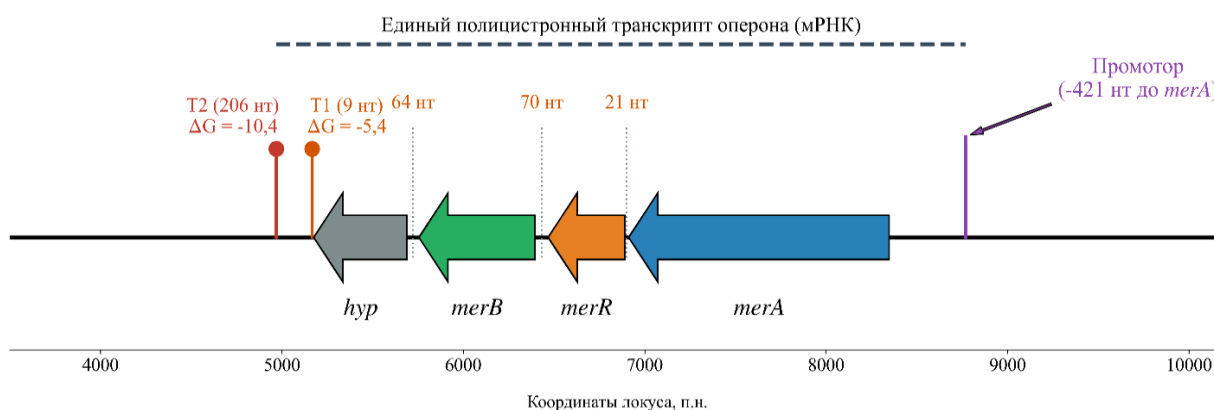


Рисунок 28 – Генетическая организация индуцибельного *mer*-оперона детоксикации ртути в хромосоме *R. ruber* ИЭГМ 560. Стрелками указано направление транскрипции открытых рамок считывания на комплементарной (минус) цепи ДНК.

Обозначения генов: *merA* – ртуть(II)-редуктаза; *merR* – металлочувствительный транскрипционный регулятор; *merB* – органортутная

лиаза; *hup* – малый гипотетический белок. Пунктирными выносками указаны размеры межгенных спейсеров (п.н.). T1 и T2 – шпилечные Rho-независимые вероятные терминаторы транскрипции.

Все четыре цистрона кластера ориентированы сонаправленно на комплементарной (минус) цепи ДНК и считываются в сторону убывания координат контига:

- *merA* (1437 п.н., 478 а.о.) – кодирует цитоплазматическую флавопротеин-дисульфидоксидоредуктазу MerA, катализирующую НАДФН-зависимое двухэлектронное восстановление высокотоксичных катионов Hg^{2+} в нетоксичную летучую форму металлической ртути Hg^0 ;
- *merR* (283 п.н., 94 а.о.) – кодирует металлосенсорный ДНК-связывающий регуляторный транскрипционный фактор семейства MerR с консервативным доменом НТН (helix-turn-helix);
- *merB* (642 п.н., 213 а.о.) – кодирует алкилртутную лиазу MerB (КФ 4.99.1.2), расщепляющую углерод-ртутную связь C–Hg в молекулах токсичных ртутьорганических ксенобиотиков (метилртути, этилртути) с высвобождением субстрата для последующей редуктазы MerA;
- *hup* (516 п.н., 171 а.о.) – терминальная рамка считывания, кодирующая малый мембраноассоциированный белок с консервативными остатками цистеина, потенциально участвующий в сорбционной стабилизации клеточной стенки.

Сравнительный биоинформатический скрининг показал, что классическая четырехкомпонентная полицистронная архитектура (*merA-merR-merB-hup*) свойственна штаммам *R. ruber* ИЭГМ 560 и ИЭГМ 439, а также *G. terrae* ИЭГМ 136, обеспечивая им статус бактерий широкого спектра ртутной устойчивости (таблица 16). Напротив, у штаммов *G. rubropertincta* ИЭГМ 129 и 133 детерминанты резистентности имеют редуцированную моноцистронную организацию в виде изолированного гена *merA*, обуславливающего узкий спектр толерантности исключительно к неорганическим соединениям ртути.

Таблица 16 – Сравнительная характеристика генетической архитектуры *mer*-оперонов у исследованных штаммов актиномицетов

Исследуемый таксон, штамм	Геномная локализация локуса	Цепь ДНК	Состав открытых рамок считывания оперона	Длина гена <i>merA</i> , п.н.	Длина гена <i>merB</i> , п.н.	Спектр устойчивости
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	Хромосома (HMRI)	Минус (-)	<i>merA</i> , <i>merR</i> , <i>merB</i> , <i>hup</i>	1438	642	Широкий (органическая и неорганическая Hg)
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 439	Хромосома (HMRI)	Минус (-)	<i>merA</i> , <i>merR</i> , <i>merB</i> , <i>hup</i>	1437	641	Широкий
<i>R. pyridinivorans</i> ИЭГМ 639	Хромосома (HMRI)	Минус (-)	<i>merR</i> , <i>merR</i> , <i>merA</i> / <i>merA</i> (изолир.)	1437 / 1401	–	Узкий (неорганическая Hg)
<i>G. rubropertincta</i> ИЭГМ 129	Хромосома	Плюс (+)	<i>merA</i> (изолир.)	1425	–	Узкий
<i>G. rubropertincta</i> ИЭГМ 133	Хромосома	Плюс (+)	<i>merA</i> (изолир.)	1425	–	Узкий
<i>G. terrae</i> ИЭГМ 136	Хромосома	Плюс (+)	<i>merA</i> , <i>hup</i> , <i>merB</i>	1437	519	Широкий

Анализ межгенных спейсеров кластера у *R. ruber* ИЭГМ 560 выявил компактную организацию дистальной части: промежуток между *merR* и *merB* составляет всего 11 п.н., а между *merB* и *hup* – 76 п.н., что типично для координированно транслируемых полицистронов. В то же время расширенный спейсер между инициальным цистроном *merA* и геном регулятора *merR* (222 п.н.) представляет собой внутреннюю регуляторную платформу, содержащую мотивы связывания димера MerR и обеспечивающую тонкую посттранскрипционную настройку оперона.

Инициация транскрипции контролируется общим промоторным локусом, картированным в области upstream от гена *merA*. С использованием нейросетевого алгоритма SAPPHERE.CNN и предиктора G4PromFinder точка старта транскрипции (TSS) верифицирована в координате 8768 п.н. контига (на удалении 421 п.н. от стартового кодона *merA*). В составе промотора идентифицированы консервативные боксы –35 (5'-CGGACA-3') и –10 (5'-TGGAAT-3'), соответствующие канонической структуре промоторов актиномицетов с якорными остатками тимина в первой и шестой позициях (TxxxxT) (Strohl, 1992).

Завершение транскрипции обеспечивается двухступенчатой tandemной системой Rho-независимых терминаторов, локализованных в области downstream от стоп-кодона гена *hup* (рисунок 29).

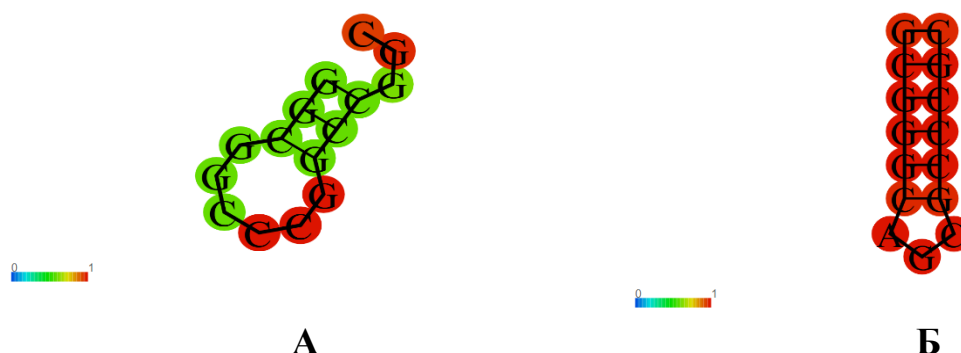


Рисунок 29 – Вероятная вторичная структура и термодинамические параметры Rho-независимых терминаторов транскрипции *mer*-оперона *R. ruber* ИЭГМ 560 (алгоритм RNAfold WebServer). Цветовая шкала отражает

вероятность спаривания нуклеотидов в термодинамическом ансамбле (от 0 – синий до 1 – красный).

А – первичный терминатор T1; Б– дистальный тандемный терминатор T2.

Первичный шпильчатый терминатор T1 (5'-GGCGGCCCGGCCGGC-3', $\Delta G = -5,40$ ккал/моль, частота структуры в ансамбле 58,11%) расположен непосредственно за стоп-кодоном (9 п.н.) и служит первичным барьером для РНК-полимеразы. Дистальный терминатор T2 (5'-GCGGGCAGCGCCCGC-3'), удаленный на 206 п.н., обладает абсолютной комплементарностью 6-парного GC-стебля и минимальной свободной энергией ($\Delta G = -10,40$ ккал/моль, частота структуры в ансамбле 96,14%). Наличие тандемного терминатора T2 гарантирует строгую транскрипционную изоляцию *mer*-оперона и предотвращает транскрипционный проскок на нижележащие хромосомные гены острова HMRI в условиях активной индукции ртутью.

4.2.2. Молекулярная филогения ртути-редуктазы и свидетельства горизонтального переноса генов

Для установления филогенетического происхождения детерминант металлорезистентности был проведен анализ аминокислотных последовательностей фермента MerA штаммов рабочей коллекции и 24 референсных штаммов типа Actinomycetota из базы GenBank NCBI (рисунок 30). Формирование выборки проводилось по критериям полноразмерности цепей и исключения некультивируемых форм. В качестве внешней группы (outgroup) использованы белки MerA *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*.

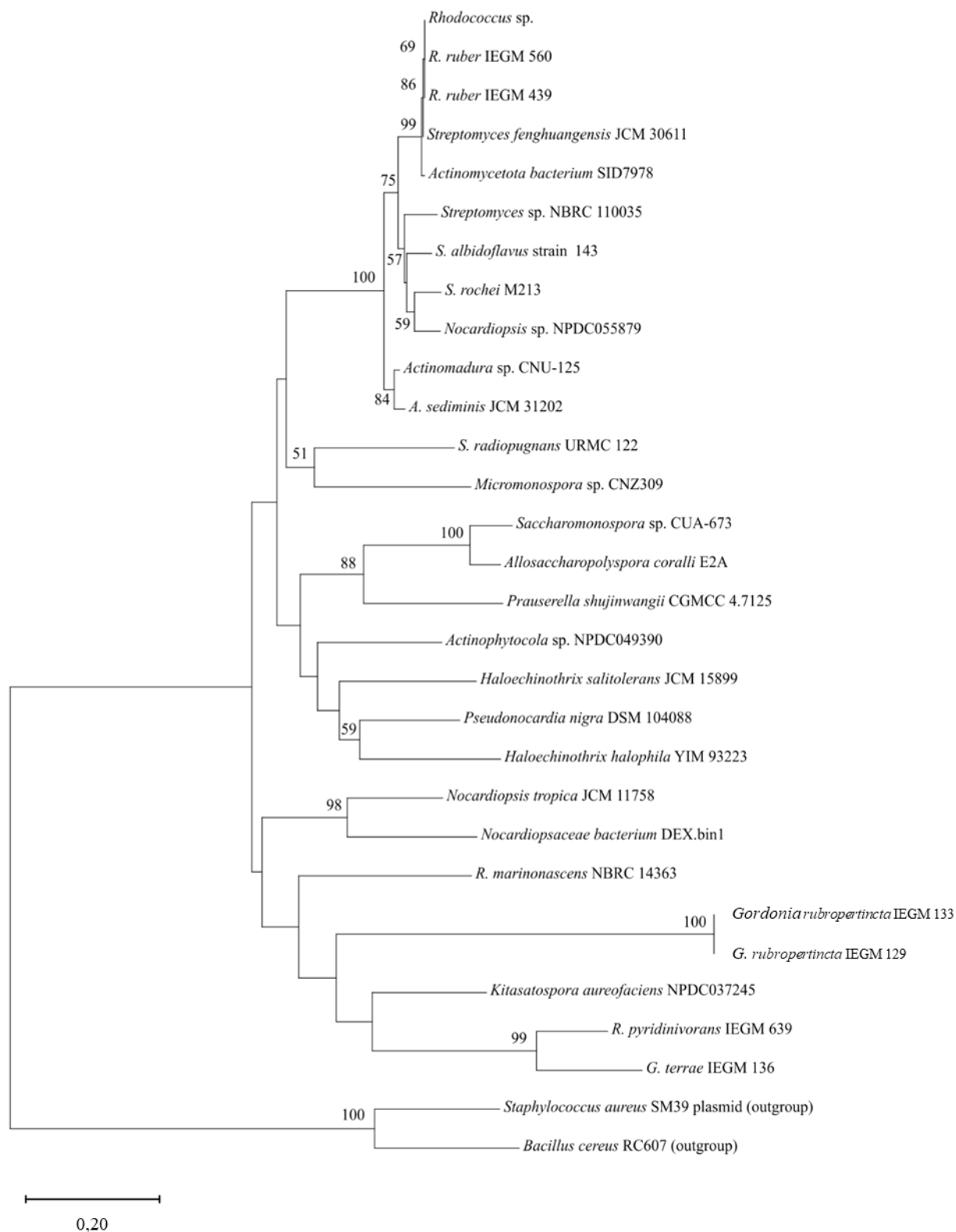


Рисунок 30 – Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей ртути-редуктазы (MerA), построенное методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, матрица замещений LG+F+G, 1000 бутстрэп-реплик). Цифрами в узлах указаны значения

бутстрэп-поддержки ($> 50\%$). Масштабная линейка соответствует 0,20 аминокислотным заменам на сайт.

Топология дендрограммы выявила четкое разделение исследуемых актиномицетов на самостоятельные кластеры. Штаммы *R. ruber* ИЭГМ 560 и ИЭГМ 439 сформировали единый обособленный монофилетический субкластер на вершине древа с высокой статистической поддержкой (бутстрэп 86 %). Идентичность аминокислотных последовательностей MerA у данных штаммов свидетельствует о высокой консервативности каталитического домена у представителей вида *R. ruber*, изолированных из географически удаленных техногенных биотопов. В качестве сестринской клады по отношению к кластеру *R. ruber* выступили представители рода *Streptomyces* (*S. fenghuangensis*, *S. albidoflavus*, *S. rochei*), объединяясь в общий надкластер с абсолютной бутстрэп-поддержкой (100 %).

Анализ филогении выявил молекулярные свидетельства межродового горизонтального переноса генов (ГПГ) *mer*-оперона в микробных сообществах. Штамм *R. pyridinivorans* ИЭГМ 639 сформировал дистальный субкластер (бутстрэп 99 %) совместно со штаммом другого рода (*G. terrae* ИЭГМ 136), оказавшись эволюционно удаленным от штаммов своего же рода *Rhodococcus*.

Столь выраженная дивергенция гомологов MerA внутри рода *Rhodococcus* в сочетании с высокой идентичностью MerA у филогенетически удаленных родов *Rhodococcus* и *Gordonia* показывает мозаичный характер формирования хромосомных островов резистентности. Защитные системы штаммов *R. ruber* ИЭГМ 560, ИЭГМ 439 и штамма *R. pyridinivorans* ИЭГМ 639 могли возникнуть в результате независимых эволюционных процессов латерального обмена мобильными генетическими элементами в полиметаллических эконишах.

4.2.3. Количественный анализ экспрессии генов *merA* и *merB* методом цифровой капельной ПЦР

Для верификации функциональной экспрессии генов *mer*-оперона в условиях металлостресса был проведен количественный абсолютный учет числа копий мРНК ферментов MerA и MerB цкПЦР на микрофлюидных биочипах (таблица 17, рисунок 31).

Таблица 17 – Абсолютная концентрация копий мРНК генов *merA* и *merB* у исследуемых штаммов актиномицетов при индукции HgCl_2 по данным цкПЦР

Тест-организм (вид, штамм)	Целевой цистрон	Концентрация индуктора, HgCl_2	Абсолютная концентрация мРНК (копий/мкл смеси)	Кратность индукции к контролю
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 439	<i>merA</i>	Контроль (отсутствие Hg)	3,4	1,0×
		0,04 мМ	822,2	241,8×
		0,32 мМ	1230,1	361,8×
	<i>merB</i>	0,04 мМ	201,3	59,2×
		0,32 мМ	762,0	224,1×
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	<i>merA</i>	Контроль	29,9	1,0×
		0,04 мМ	370,4	12,4×
	<i>merB</i>	0,04 мМ	239,5	8,0×
<i>R. pyridinivorans</i> ИЭГМ 639	<i>merA</i>	Контроль	41,1	1,0×
		0,04 мМ	269,8	6,6×
		0,32 мМ	1765,7	43,0×
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1162	<i>merA</i>	Контроль	0,00	–
		0,04 мМ	27,6	Индукция <i>de novo</i>
		0,32 мМ	30,9	Индукция <i>de novo</i>

Продолжение таблицы 17

Тест- организм (вид, штамм)	Целевой цистрон	Концентрация индуктора, HgCl ₂	Абсолютная концентрация мРНК (копий/мкл смеси)	Кратность индукции к контролю
<i>G. alkanivorans</i> ИЭГМ 133	<i>merA</i>	Контроль	4,6	1,0×
		0,04 мМ	226,1	49,2×
<i>G. alkanivorans</i> ИЭГМ 129	<i>merA</i>	Контроль	2,9	1,0×
		0,04 мМ	206,9	71,3×

Примечание: исходные концентрации кДНК стандартизованы (320–350 нг/мкл), расчет проведен с учетом фактора разведения матриц (DF = 10).

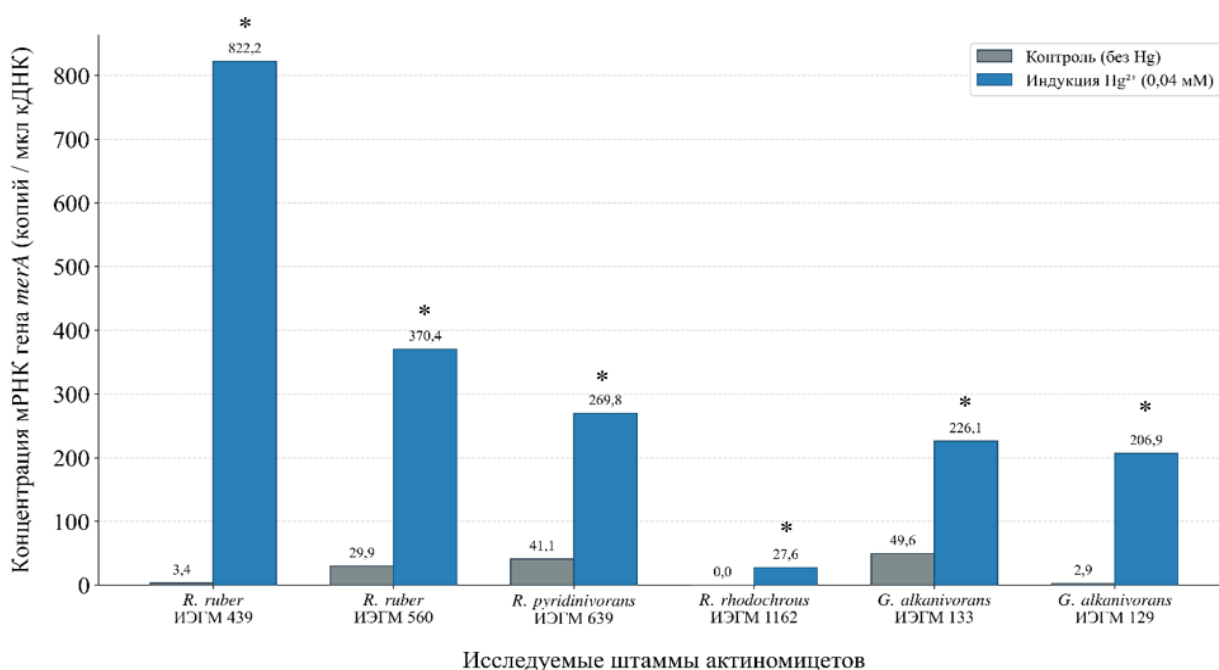


Рисунок 31 – Сравнительный анализ транскрипционной активности гена ртуть-редуктазы *merA* исследуемых штаммов актиномицетов в интактных условиях и при индукции 0,04 мМ HgCl₂ по данным цкПЦР. Данные выражены в абсолютном числе копий мРНК на 1 мкл неразведенного препарата кДНК

($M \pm SD$, $n = 3$). * – различия, статистически достоверные по сравнению с соответствующим биотическим контролем, $p < 0,001$.

Количественный цкПЦР-анализ выявил выраженную дозозависимую индукцию транскрипции гена ртуть-редуктазы *merA* у всех исследованных культур. У штаммов *R. ruber* ИЭГМ 439 и *R. pyridinivorans* ИЭГМ 639 повышение концентрации токсиканта с 0,04 до 0,32 мМ сопровождалось мощным скачком экспрессии: пул транскриптов *merA* нарастал с 822,2 до 1230,1 копий/мкл и с 269,8 до 1765,7 копий/мкл соответственно, что отражает высокую чувствительность промотора к катионам Hg^{2+} .

Важным результатом явилась функциональная детекция экспрессии гена *merA* у штамма-лидера общей толерантности *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162. Использование тест-системы, сконструированной на основе консервативных участков филогенетически близкого штамма *R. pyridinivorans* ИЭГМ 639, позволило зарегистрировать устойчивую индукцию транскрипции *de novo* (до 30,9 копий/мкл при полном отсутствии сигнала в биотическом контроле). Это подтверждает наличие функционально активного гомолога ртуть-редуктазы в неаннотированном геноме штамма ИЭГМ 1162. Высокая эффективность гетерологичной ПЦР-системы объясняется близким филогенетическим родством данных таксонов (ранее штамм ИЭГМ 639 идентифицировался как представитель вида *R. rhodochrous*). Относительно невысокий абсолютный уровень детекции транскриптов у *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 может быть обусловлен экстремально высокой исходной толерантностью культуры (МПК хлорида ртути достигает 1,25 мМ), вследствие чего концентрации 0,04 и 0,32 мМ вызывают лишь умеренную активацию промоторной зоны *mer*-оперона, а также возможным присутствием единичных нуклеотидных замен в сайтах гибридизации праймеров.

Профиль экспрессии представителей рода *Gordonia* продемонстрировал полную корреляцию с результатами филогенетического анализа. Штаммы *G. rubropertincta* ИЭГМ 129 и 133, сформировавшие монофилетическую кладу на филогенетическом древе (рисунок 30), показали практически синхронный

индукционный отклик: в присутствии 0,04 мМ Hg^{2+} уровень экспрессии моноцистронных генов *merA* возрастал до близких значений (206,9 и 226,1 копий/мкл соответственно).

Таким образом, результаты цкПЦР-анализа доказывают функциональную состоятельность предсказанных *mer*-оперонов, подтверждают ферментативный путь детоксикации ртути через ртуть-редуктазный каскад MerA и научно объясняют различия в кинетике поглощения металла, установленные в технологических экспериментах.

4.3. Организация и регуляторный аппарат системы транспорта молибдена

4.3.1. Архитектура *mod*-оперона

Полногеномный биоинформатический анализ штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 позволил идентифицировать и аннотировать высококонсервативную систему транспорта молибдена высокого сродства, организованную в виде четырехкомпонентного полицистронного *mod*-оперона (рисунок 32).

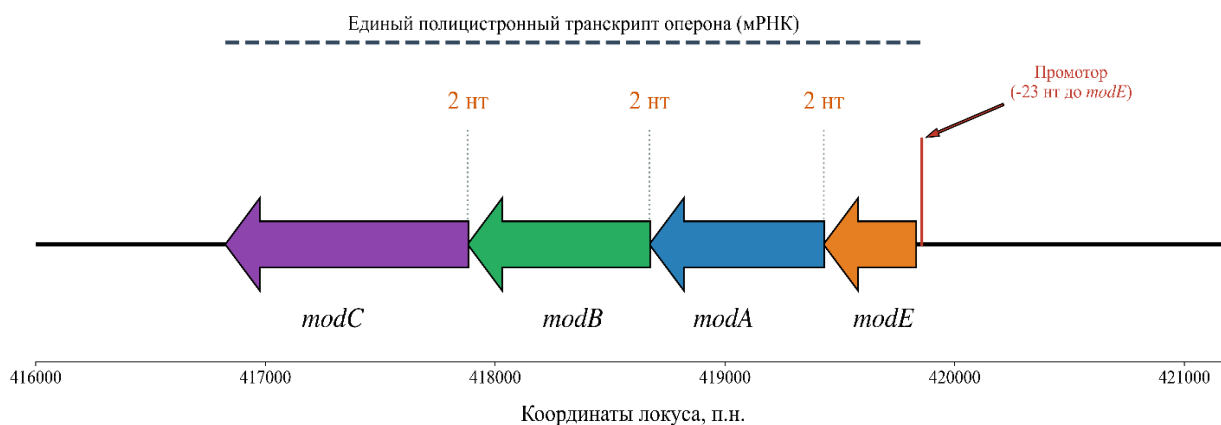


Рисунок 32 – Генетическая организация *mod*-оперона импорта молибдена в хромосоме *R. ruber* ИЭГМ 560. Стрелками указано направление транскрипции открытых рамок считывания на комплементарной (минус) цепи ДНК. Пунктирными выносками указаны размеры фиксированных межгенных спейсеров. Точка старта транскрипции картирована с использованием алгоритма G4PromFinder.

Обозначения генов: *modE* – металлозависимый транскрипционный регулятор; *modA* – периплазматический субстрат-связывающий белок; *modB* – интегральная мембранная пермеаза; *modC* – цитоплазматическая АТФаза импорта.

Кластер локализован на комплементарной (минус) цепи ДНК в интервале 416 825 – 419 833 п.н. контига 1. Все четыре цистрона транскрибируются сонаправленно в сторону уменьшения геномных координат в следующем каноническом порядке:

- *modE* (405 п.н., 134 а.о.) – кодирует первичный металлозависимый транскрипционный регулятор семейства ModE, содержащий N-концевой ДНК-связывающий домен типа «спираль-поворот-спираль» (HTH) и два С-концевых сенсорных субдомена связывания оксианионов молибдата (MOP);
- *modA* (762 п.н., 253 а.о.) – кодирует периплазматический субстрат-связывающий протеин ModA, осуществляющий первичное селективное улавливание ионов MoO_4^{2-} из внешней среды с субнанолярным сродством;
- *modB* (795 п.н., 264 а.о.) – кодирует гидрофобную трансмембранную пермеазу ModB, формирующую пору для транслокации аниона через липидный бислой цитоплазматической мембраны;
- *modC* (1059 п.н., 352 а.о.) – кодирует цитоплазматическую нуклеотид-связывающую субъединицу ModC (ABC-АТФазу), обеспечивающую гидролиз АТФ для сопряженного переноса молибдата внутрь клетки.

Ввиду высокого GC-состава генома *R. ruber* ИЭГМ 560 (> 70%) поиск регуляторных элементов проводили с использованием алгоритма G4PromFinder, ориентированного на локальные АТ-богатые регуляторные зоны, сопряженные с неканоническими вторичными структурами (G-квадруплексами). В области upstream от стартового кодона инициального гена *modE* был картирован высокодостоверный промоторный кластер G4-типа с точкой старта транскрипции (TSS) в координате 419 856 п.н. Промоторное окно (419 856 – 419 930 п.н.) характеризуется падением GC-состава до 60%

(доля АТ-пар достигает 40,0%), что термодинамически облегчает плавление дуплекса ДНК. Спейсер между TSS и старт-кодоном *modE* составляет всего 23 п.н., подтверждая компактность инициаторного аппарата.

В промоторной зоне идентифицирован консенсусный мотив оператора (*modE*-box), связывание димера $[\text{ModE}-\text{MoO}_4^{2-}]$ с которым стерически блокирует РНК-полимеразу, реализуя механизм отрицательной обратной связи при избытке металла в среде.

4.3.2. Синтения молибденового кластера с локусами ассимиляции азота и биосинтеза Мо-кофактора

Анализ контекста генома штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 показал, что *mod*-оперон интегрирован в стабильный хромосомный метаболический конвейер, объединяющий импорт молибдена с путями его цитоплазматической утилизации (таблица 18).

Таблица 18 – Генетическое окружение и функциональные локусы хромосомного региона транспорта молибдена и азотного метаболизма штамма *R. ruber* ИЭГМ 560

Интервал координат (п.н.)	Обозначение гена	Продукт гена (аннотируемая функция белка)
402467 – 405316	<i>leuS</i>	Лейцил-тРНК-синтетаза (ген домашнего хозяйства, трансляция)
412847 – 413716	<i>gat</i>	Глутаминамидотрансфераза класса II (азотистый метаболизм)
416825 – 417883	<i>modC</i>	АТФ-связывающий белок импорта молибдена ModC
417880 – 418674	<i>modB</i>	Интегральная мембранная пермеаза молибдена ModB
418671 – 419432	<i>modA</i>	Субстрат-связывающий белок импорта молибдена ModA

Продолжение таблицы 18

Интервал координат (п.н.)	Обозначение гена	Продукт гена (аннотируемая функция белка)
419429 – 419833	<i>modE</i>	Металл-зависимый транскрипционный регулятор ModE
419894 – 423940	<i>nasA / narB</i>	Ассимиляционная нитратредуктаза
424181 – 426167	<i>katG</i>	Каталаза-пероксидаза KatG
426407 – 426829	<i>fur</i>	Транскрипционный регулятор семейства Fur
426956 – 428443	<i>cca</i>	ССА-тРНК-нуклеотидилтрансфераза

Непосредственно в области upstream за промотором *mod*-оперона (419 894 – 423 940 п.н.) расположен полноразмерный ген ассимиляционной нитратредуктазы *nasA/narB* (4047 п.н.) – классического молибдоэнзима, катализирующего восстановление нитрата до нитрита. Физическая ко-локализация транспортера *modABC* и нитратредуктазы обеспечивает прямое сопряжение импорта MoO_4^{2-} с синтезом молибдоптеринового кофактора (МоСо) и ассимиляцией азота. Хромосомный статус региона подтверждается фланкированием незаменимыми генами домашнего хозяйства: лейцил-тРНК-синтетазой *leuS* (с 3'-фланга) и нуклеотидилтрансферазой *cca* (с 5'-фланга).

Полногеномный скрининг выявил у *R. ruber* ИЭГМ 560 распределенную поликонтинговую систему биосинтеза Мо-кофактора и сопутствующих металлопротеинов. Разветвленная сеть молибдоэнзимов свидетельствует о глубокой интеграции молибдена в базовый метаболизм *R. ruber* ИЭГМ 560.

4.3.3. Сравнительный анализ *mod*-локусов у представителей родов

Rhodococcus* и *Gordonia

Сравнительный геномный анализ выявил консервативность четырехкомпонентной структуры *modE-modA-modB-modC* у исследованных штаммов коллекции ИЭГМ при выраженной вариабельности межгенной синтании (таблица 19).

Установлено фундаментальное различие в механизмах трансляционного сопряжения цистронов. Если у модельного штамма *R. ruber* ИЭГМ 560 гены разделены свободными 2-нуклеотидными спейсерами, то у штаммов *R. ruber* ИЭГМ 439, *R. pyridinivorans* ИЭГМ 639 и *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 доминирует сверхплотная оверлап-упаковка с перекрыванием стоп- и старт-кодонов на 4 нуклеотида (мотив ATGA, оверлап – 4 п.н.), что гарантирует строго эквимольную трансляцию пермеазного комплекса. У штаммов *G. rubripertincta* ИЭГМ 129 и ИЭГМ 133 ген нуклеотид-связывающей субъединицы *modC* усечен до 789–825 п.н. за счет делеции регуляторного С-терминального домена, что может снижать эффективность регуляции эффлюкса при высоких дозах металла.

Таблица 19 – Сравнительная характеристика генетической архитектуры *mod*-оперонов у исследуемых штаммов

Параметр сравнения	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 439	<i>R. pyridinivorans</i> ИЭГМ 639	<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 129	<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 133	<i>G. terrae</i> ИЭГМ 136	<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735
Локализация локуса	Хромосома	Хромосома	Хромосома	Хромосома	Хромосома	Хромосома	Хромосома
Направление цепи	Минус-цепь (-)	Плюс-цепь (+)	Плюс-цепь (+)	Минус-цепь (-)	Плюс-цепь (+)	Плюс-цепь (+)	Плюс-цепь (+)
Состав цистронов	<i>modE-modA-modB-modC</i>	<i>modE-modA-modB-modC</i>	<i>modE-modA-modB-modC</i>	<i>modE-modA-modB-modC</i>	<i>modE-modA-modB-modC</i>	<i>modE-modA-modB-modC</i>	<i>modE-modA-modB-modC</i>
Длина гена <i>modA</i> , нт	762	762	753	741	741	759	741
Длина гена <i>modB</i> , нт	795	795	786	822	822	780	825
Длина гена <i>modC</i> , нт	1059	1059	1062	789 (255+534, усечен)	825 (273+552, усечен)	1089	1092
Спейсеры / оверлапы	по +2 нт	по -4 нт	по -4 нт	по -4 нт	-4 / +2 / -4 нт	-4 / +35 / -4 нт	по -4 нт

4.3.4. Транскриптомный профиль ответа на молибденовый стресс

Функциональная состоятельность предсказанного механизма регуляции подтверждена результатами дифференциального анализа транскриптома *R. ruber* ИЭГМ 560 в пакете DESeq2 при инкубации с сублетальной дозой молибдата аммония (таблица 20, рисунок 33).

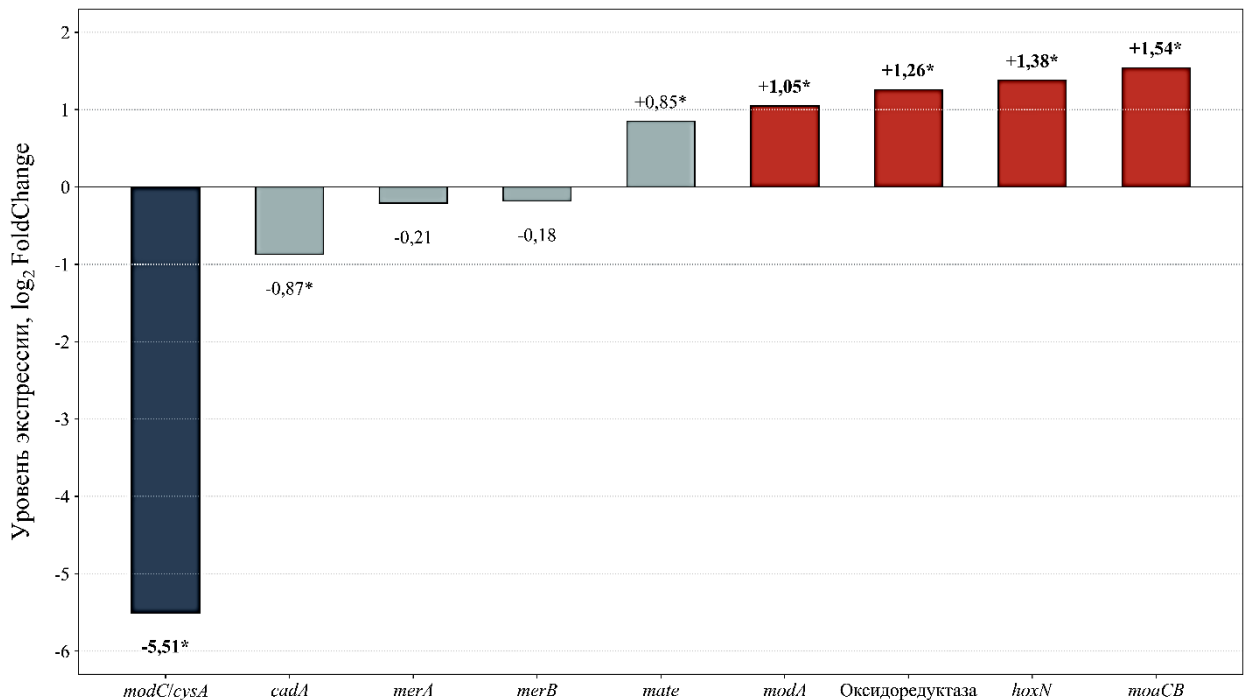


Рисунок 33 – Профиль дифференциальной экспрессии генов систем мембранного транспорта и метаболизма молибдена у *R. ruber* ИЭГМ 560 в условиях молибдатного стресса по данным RNA-seq. Данные выражены в величинах log₂FoldChange относительно биотического контроля. Цветовая дифференциация соответствует строгому порогу биологической значимости ($\log_2FC \geq 1,0$): синий столбец – статистически достоверная репрессия ($p_{adj} < 0,001$), красные столбцы – достоверная индукция ($p_{adj} < 0,05$), серые столбцы – пограничный уровень отклика либо отсутствие изменений. Звездочками (*) отмечены локусы со статистически достоверным сдвигом ($p_{adj} < 0,05$). Тонкими пунктирными линиями показаны уровни двукратного изменения экспрессии ($\pm 1,0$).

Таблица 20 – Параметры дифференциальной экспрессии генов мембранного транспорта и метаболизма молибдена у *R. ruber* ИЭГМ 560 по данным транскриптомного анализа

Идентификатор гена	Локус/Символ	Аннотируемый белковый продукт	Базовый уровень	log ₂ FC	Скорректированная значимость (p_{adj})	Статус отклика
F1734_01805	<i>modC/cysA</i>	АТФаза ABC-транспортера сульфата/молибдата	445,4	−5,51	$1,74 \times 10^{-91}$	Репрессия (в 45,7 раза)
F1734_03600	<i>cadA</i>	Катион-транспортирующая АТФаза Р-типа	375,3	−0,87*	0,0458	Умеренная репрессия
F1734_25830	<i>merA</i>	Ртуть(II)-редуктаза	258,6	−0,21	0,4348	Базальный уровень
F1734_25840	<i>merB</i>	Органортутная лиаза	2,1	−0,18	—	Базальный уровень
F1734_12100	<i>mate</i>	Эффлюкс-транспортер суперсемейства MATE	15 422,3	+0,85*	0,0004	Достоверная индукция

Продолжение таблицы 20

Идентификатор гена	Локус/Символ	Аннотируемый белковый продукт	Базовый уровень	log2FC	Скорректированная значимость (p_{adj})	Статус отклика
F1734_01815	<i>modA</i>	Субстрат-связывающий периплазматический белок	16 194,1	+1,05*	0,0239	Индукция (в 2,1 раза)
F1734_24170	—	Молибдоптерин-зависимая оксидоредуктаза	460,6	+1,26*	$1,31 \times 10^{-8}$	Индукция (в 2,4 раза)
F1734_22515	<i>hoxN</i>	Транспортер никеля/кобальта семейства HoxN	227,1	+1,38*	0,0070	Индукция (в 2,6 раза)
F1734_17260	<i>moaCB</i>	Бифункциональный белок синтеза MoCo MoaC/MoaB	24,7	+1,54*	0,0031	—

Примечание: звездочкой (*) отмечены статистически достоверные изменения экспрессии ($p_{adj} < 0,05$).

Ключевым регуляторным откликом генома *R. ruber* ИЭГМ 560 явилась достоверная репрессия гена ABC-АТФазы импорта оксианионов (*modC/cysA*), экспрессия которого снизилась в 45,7 раза. Выключение каталитической помпы блокирует энергозависимый трансмембранный перенос молибдата внутрь клетки, предотвращая токсический шок. При этом высокий уровень периплазматического сенсора *modA* в сочетании с его умеренной индукцией свидетельствует о переключении функции белка ModA на пассивное связывание и секвестрацию оксианионов на клеточной стенке.

Одновременно зафиксирована активация метаболического конвейера созревания молибдоптерина. Индукция бифункционального гена *moaCB* и молибдоптерин-зависимой оксидоредуктазы обеспечивает включение поступивших следовых количеств молибдена в каталитические центры ферментов защиты. Активация эффлюкс-помпы суперсемейства MATE указывает на стимуляцию выведения вторичных токсических продуктов.

Отсутствие изменений в уровне экспрессии генов ртутного оперона *merA* и *merB* математически подтверждает строгую субстратную специфичность изученных защитных систем. Анионы молибдата активируют изолированный каскад оперона *mod*, не затрагивая опероны ртутной детоксикации.

4.4. Профили биосинтетических кластеров вторичных метаболитов и систем металлохелатирования

С целью глубокого геномного профилирования биосинтетических кластеров вторичных метаболитов BGCs и неспецифических систем металлохелатирования из рабочей коллекции была сформирована субвыборка из четырех контрастных тест-штаммов:

- *R. ruber* ИЭГМ 560 использован в качестве модели хромосомной интеграции *mer*- и *mod*-оперонов в *oriC*-близком стабильном макрорегионе генома;

- *R. pyridinivorans* ИЭГМ 639 выбран как геномный контраст внутри рода *Rhodococcus*, характеризующийся дупликацией гена *merA* и сверхплотной оверлап-упаковкой оперона импорта молибдена;
- *G. terrae* ИЭГМ 136 включен в анализ для межродового сопоставления синтении локусов, выступая в роли полноразмерного двухкомпонентного оперонного контраста на плюс-цепи ДНК;
- *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 представляет интерес в качестве отрицательного контроля по системам ртутной детоксикации (ввиду полного отсутствия *mer*-локусов в геноме).

Профилирование штамма необходимо для верификации гипотезы о компенсаторной роли альтернативных механизмов внеклеточного хелатирования металлов в условиях стресса при отсутствии индуцибельных ферментных систем резистентности.

Полногеномный скрининг субвыборки актиномицетов в предикторе antiSMASH 8.0.4 выявил возможный филогенетически дифференцированный потенциал биосинтеза вторичных метаболитов (таблица 21). Общее число стабильных кластеров BGCs варьировало от 14 у штамма *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (Golysheva, Krivoruchko, Ivshina, 2026*) до 19 у штамма *R. ruber* ИЭГМ 560.

Таблица 21 – Сравнительная характеристика ключевых кластеров биосинтеза вторичных метаболитов и систем металлохелатирования у исследуемых штаммов актиномицетов

Молекулярно-генетический параметр / Название BGC	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	<i>R. pyridinivorans</i> ИЭГМ 639	<i>G. terrae</i> ИЭГМ 136	<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735
Общее число идентифицированных BGCs	19	18	15	14
Профиль доминирующего сидерофора	Гетеробактин	Гетеробактин	Мадурастатин	Мадурастатин
Степень гомологии (база MIBiG 3.0)	Medium	Low	Low	Low
Тип сидерофорной системы	NRP-metallophore	NRP-metallophore	Ni-siderophore	Ni-siderophore
Осмопротекция популяции (эктоин)	Есть (Medium)	Есть (Medium)	Есть (Medium)	Есть (Medium)
Сорбционный биополимер (ϵ -полилизин)	Есть (High)	Есть (High)	Есть (High)	Есть (High)
Каротиноидный пигмент (изорениератен)	Есть (Low)	Есть (Low)	Есть (Low)	Есть (Low)

Примечание: Степень сходства (High / Medium / Low) показывает уровень гомологии обнаруженного кластера с эталонами международной базы данных MIBiG 3.0.

Анализ металлофоров выявил родоспецифичную дискриминацию систем связывания переходных металлов. У представителей рода *Rhodococcus* верифицированы локусы нерибосомальных пептидсинтаз (NRP-metallophore), кодирующие сборку гибридного катехолатно-гидроксаматного сидерофора гетеробактина, участвующего в мобилизации железа и сопутствующем связывании катионов ТМ. Напротив, у представителей рода *Gordonia* обнаружена альтернативная сидерофорная система (Ni-siderophore), ответственная за биосинтез азолинового металлофора мадурастатина. Низкий уровень гомологии (Low) мадурастатиновых локусов гордоний с референсными эталонами репозитория MIBiG 3.0 может указывать на их структурную уникальность и наличие потенциально новых природных вариантов металлохелаторов.

Значение имеют результаты профилирования штамма *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735. Обнаружение в его хромосоме кластера биосинтеза мадурастатина подтверждает гипотезу о существовании компенсаторного эволюционного механизма полирезистентности при полном отсутствии специализированных *mer*-оперонов. В условиях металлостресса данный штамм может сохранять жизнеспособность за счет массивного внеклеточного связывания катионов металлов сидерофорами, что приводит к экранированию клеточного пространства и препятствует диффузии токсикантов в цитоплазму.

Дополнительными факторами неспецифической резистентности у всей исследуемой группы актиномицетов выступают консервативные кластеры биосинтеза осмопротектора эктоина (Medium сходство) и высокомолекулярного сорбционного полимера ϵ -полилизина (High сходство, база KEGG). Выделение данного соединения формирует на поверхности бактерий естественный поликатионный барьер, электростатически задерживающий катионы переходных и тяжелых металлов и препятствующий деструкции пептидогликанового каркаса.

Таким образом, развитый и филогенетически дифференцированный потенциал биосинтеза вторичных метаболитов у исследованных штаммов

определяет сопряженную работу систем гомеостаза. Родоспецифичность металлохелатирующего аппарата обуславливает альтернативные биохимические стратегии внеклеточного связывания ТМ, а наличие кластеров ϵ -полилизина и эктоина формирует универсальный ответ неспецифической защиты клеток от осмотического и элементного шока.

4.5. Верификация генетической локализации детерминант металлорезистентности

Важным этапом молекулярно-генетической характеристики биотехнологического потенциала исследуемых металлоторантанных штаммов актиномицетов является определение точной локализации ключевых детерминант резистентности, транспорта и вторичного метаболизма. Известно, что плазмидная локализация адаптивных генов часто сопряжена с их высокой эволюционной лабильностью, риском спонтанных перестроек и необратимой утраты целевых свойств при длительном непрерывном культивировании бактерий в промышленных условиях. В связи с этим был проведен комплексный перекрестный скрининг внехромосомных элементов как *in vitro*, так и *in silico*.

На первом этапе экспериментальная экстракция и анализ тотальной ДНК методом горизонтального гель-электрофореза в агарозном геле не выявили наличия плазмид малого и среднего размера у всех исследованных штаммов родов *Rhodococcus* и *Gordonia*. С целью исключения наличия скрытых (криптических) или гигантских линейных мегаплазмид, характерных для нокардиоформных актиномицетов и трудно поддающихся выделению стандартными химическими методами щелочного лизиса, был проведен тотальный полногеномный скрининг собранных контигов.

Полногеномные последовательности четырех базовых модельных тест-штаммов были проанализированы с помощью специализированного биоинформатического сервера PlasmidFinder 2.1. В результате

биоинформационного поиска достоверных плазмидных репликонов и групп несовместимости (*incompatibility*-групп) обнаружено не было.

Полученные экспериментальные и теоретические результаты подтверждают исключительно стабильную хромосомную локализацию всех исследованных в данной работе систем детоксикации ртути (*mer*-оперон), высокоаффинного транспорта молибдена (*mod*-оперон) и биосинтетических кластеров металлохелатирования (сидерофоров мадурастатина и гетеробактина). Интеграция данных адаптационных локусов непосредственно в состав бактериальной хромосомы гарантирует их высокую генетическую закрепленность, консервативность и стабильное наследование в ряду поколений.

Этот вывод имеет научно-практическое значение для биотехнологии. Хромосомная природа металлоторантности исключает риск спонтанной элиминации целевых генов при отсутствии постоянного селективного давления металлов и научно обосновывает перспективность использования изученных штаммов актиномицетов в качестве надежных, стабильных и предсказуемых агентов для долгосрочной биоремедиации промышленных стоков в непрерывных проточных биореакторах.

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ АККУМУЛИРОВАТЬ И ИНАКТИВИРОВАТЬ ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Для детального разграничения механизмов энергозависимого внутриклеточного биоаккумуляции и пассивной поверхностной биосорбции на клеточных оболочках актиномицетов была изучена сравнительная кинетика извлечения ионов молибдена и ртути из жидкой минеральной среды живой и термически инактивированной (автоклавированной) биомассой родококков. Проведенные эксперименты показали, что, несмотря на индивидуальные количественные различия между штаммами, общая конфигурация кинетических кривых и характер зависимости метаболического вклада оказались высококонсервативными в пределах исследуемого рода *Rhodococcus*.

На примере штамма-лидера *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 была исследована кинетика извлечения анионов молибдена (MoO_4^{2-}) из среды RS при экстремально высокой начальной концентрации токсиканта – 1,7 г/л (рисунок 34). Установлено, что в течение первых 6 часов экспозиции происходит стремительное падение концентрации молибдена в супернатанте в варианте с живыми клетками. Пик поглощения регистрировался к 6 часу инкубирования, достигая значения 83,0% от исходного количества. В интервале между 6 и 9 часами процесс резко замедлялся, а за последующие сутки (к точке 24 ч) наблюдался обратный процесс – десорбция и активный вынос (эффлюкс) ионов молибдена из клеток в среду культивирования, в результате чего показатель очистки снижался до ~33,0%. К 48 часам инкубации кривая живых клеток выходила на стационарное плато, фиксируя финальное удержание металла на уровне 24,9%.

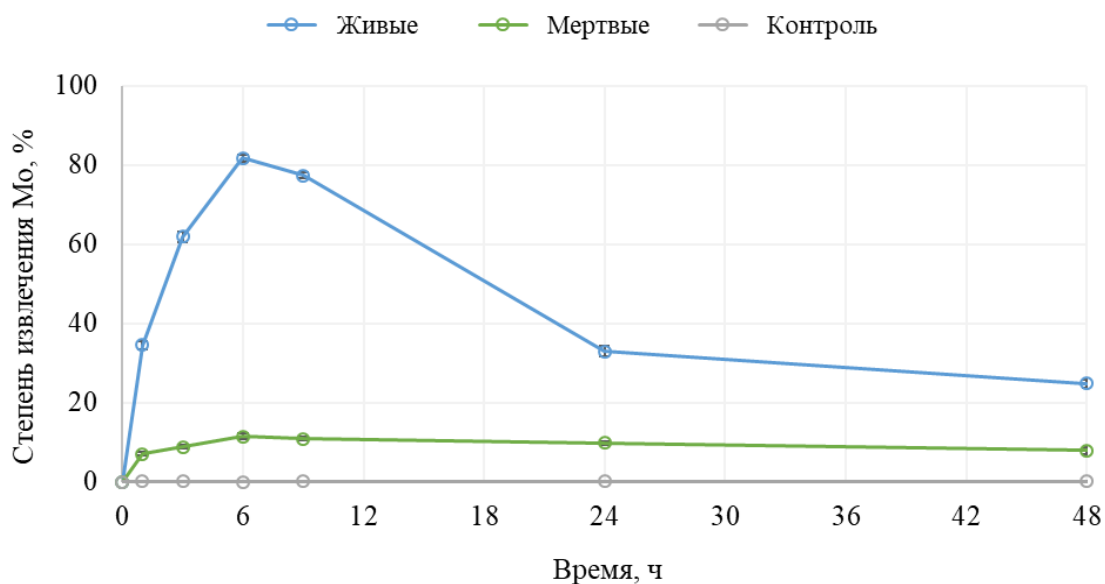


Рисунок 34 – Накопление ионов молибдена живыми и инактивированными клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Принципиально иной характер имела кривая извлечения металла инактивированной биомассой. Степень пассивной сорбции оставалась стабильно низкой на протяжении всех 48 ч эксперимента и варьировала в узком диапазоне от 7,2 до 11,6%.

Описанная кинетическая пульсационная закономерность показывает пик поглощения живыми клетками к 6 часам с последующим частичным выбросом металла и фоново низким уровнем сорбции на мертвых клетках, что регистрировалось в отношении всех исследованных штаммов родококков. В зависимости от индивидуального потенциала штамма максимум аккумулирующей активности живых клеток варьировал от 14,0 до 83,0%, однако во всех случаях доля активного энергозависимого поглощения в пиковой точке составляла основу процесса, обеспечивая до 74,8% от суммарного извлечения. В абиотическом контроле во всех сериях опыта значимых изменений концентрации молибдат-ионов обнаружено не было (потери составили менее 0,5%), что доказывает стабильность раствора.

Физиологически столь высокая скорость поглощения молибдатов живой культурой может быть обусловлена функционированием высокоаффинных

АТФ-зависимых транспортных систем семейства ModABC. При этом минимальный вклад мертвой биомассы объясняется тем, что при нейтральных значениях pH клеточная стенка родококков несет выраженный отрицательный заряд и электростатически отталкивает одноименно заряженные оксианионы MoO_4^{2-} , блокируя пассивную сорбцию. Наблюдаемый после 6–9 ч эффлюкс молибдена выступает защитной гомеостатической реакцией на метаболическое пересыщение цитоплазмы. Поскольку исходная доза металла была токсичной, его избыточное накопление инициирует окислительный стресс, в ответ на который клетка активирует помпы выведения, стабилизируя систему к 48 ч.

Качественно иной характер имела кинетика извлечения высокотоксичных катионов ртути Hg^{2+} при начальной концентрации 0,32 мМ (65 мг/л) (рисунок 35). На начальном этапе (до 9 ч) отмечалось умеренное линейное снижение концентрации ртути, причем показатели живой (11,4–12,2 %) и автоклавированной (8,3–10,4%) биомассы оставались максимально сближенными, что указывает на абсолютное доминирование механизмов пассивной поверхностной биосорбции.

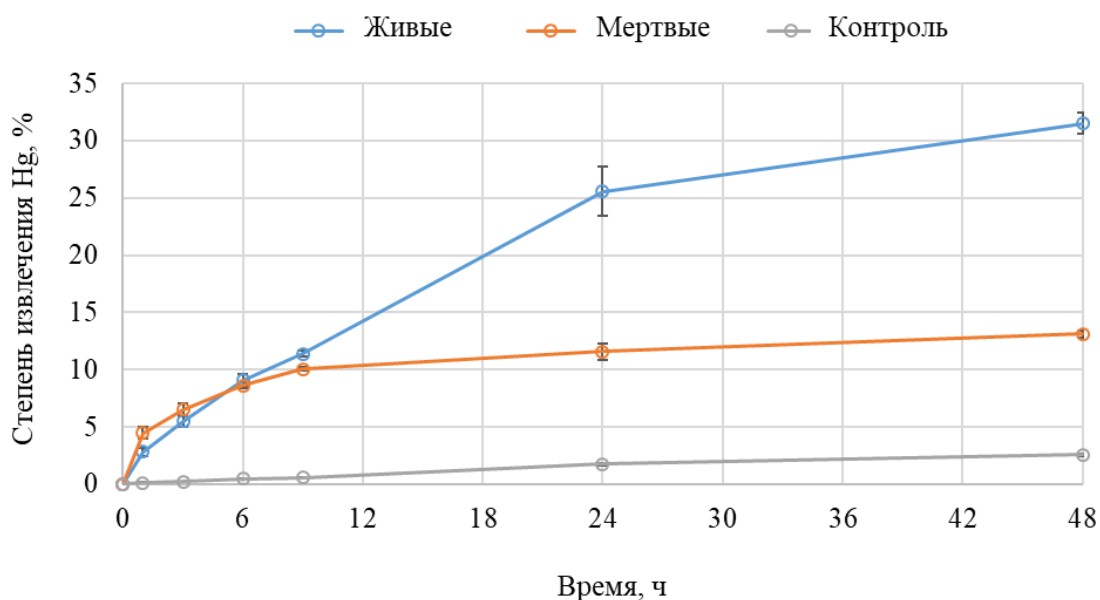


Рисунок 35 – Накопление ионов ртути живыми и инактивированными клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Основной этап удаления ртути живой культурой зафиксирован в интервале между 9 и 24 ч, когда происходил резкий скачок активности. Эффективность извлечения возрастала более чем в два раза, достигая 24,0–27,0%. К 48 часам инкубации живые клетки извлекали максимум – до 32,0% ртути. Напротив, инактивированная биомасса полностью прекращала связывание металла к 24 ч, выходя на плато на уровне 12,0–13,5% удаления, сохранявшееся до конца эксперимента. Доля активного метаболического вклада живой культуры в финальной точке составила 19,0% от исходного количества ртути, что обеспечило до 59,4% от общего объема очистки среды. Потери ртути в абиотическом контроле за счет испарения или сорбции на стенках виал не превышали 2,6%.

Контраст ртутной кинетики по сравнению с молибденовой обусловлен химической природой токсиканта. Катионы Hg^{2+} обладают экстремальным сродством к тиоловым (-SH), фосфатным и карбоксильным лигандам белков и липидов клеточной стенки бактериальных клеток. Термическое автоклавирование денатурирует белковые макромолекулы мертвых клеток, демаскируя скрытые сорбционные сайты, что обеспечивает стабильный уровень пассивного связывания. Наличие выраженной лаг-фазы (до 9 ч) у живых клеток отражает период физиологической адаптации к токсическому шоку, необходимый для экспрессии и индукции регуляторных белков ртутного сопротивления *mer*-оперона. Специфический скачок извлечения после 9 ч связан с запуском фермента ртуть-редуктазы (MerA), восстанавливающей катионы Hg^{2+} до летучей элементарной формы Hg^0 , постепенно удаляющейся из системы. Отсутствие десорбционного эффлюкса подтверждает необратимый характер биотрансформации ксенобиотика.

Установленные закономерности количественно доказывают высокую биоремедиационную емкость актиномицетов рода *Rhodococcus* и обосновывают целесообразность использования именно живых иммобилизованных консорциумов для глубокой очистки сложных металлизированных стоков.

Для количественного описания динамики поверхностного связывания металлов и определения лимитирующей стадии процесса экспериментальные кинетические кривые пассивной биосорбции на инактивированной биомассе *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 были аппроксимированы с помощью классических уравнений псевдопервого (Лагергрена) и псевдовторого (Хо и Маккея) порядков (таблица 22).

Таблица 22 – Кинетические параметры сорбции ионов молибдена и ртути инактивированной биомассой *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162

Моделируемый процесс	$q_{e, \text{эксп}}$, мг/г	k_1 , ч ⁻¹	R^2	$q_{e, \text{расч}}$, мг/г	k_2 , г/(мг·ч)	R^2
Биосорбция Hg^{2+}	8,45	0,084	0,912	8,93	0,0178	0,996
Биосорбция MoO_4^{2-}	193,80	0,312	0,885	204,10	0,0032	0,991

Сопоставление коэффициентов детерминации R^2 показало, что процесс извлечения обоих металлов с высокой точностью ($R^2 = 0,991\text{--}0,996$) описывается кинетической моделью псевдовторого порядка. Теоретически рассчитанные значения равновесной сорбционной емкости ($q_{e, \text{расч}}$) практически совпадают с экспериментальными данными, в то время как модель псевдопервого порядка показала существенно меньшую сходимость ($R^2 < 0,92$).

Адекватность модели псевдовторого порядка служит физико-химическим доказательством того, что скорость биосорбции лимитируется стадией хемосорбции, протекающей с участием двух активных центров связывания. Более высокая константа скорости для ртути ($k_2 = 0,0178$ г / (мг·ч)) по сравнению с молибдатом ($k_2 = 0,0032$ г / (мг·ч)) подтверждает экстремальное химическое сродство катионов Hg^{2+} к сульфгидрильным и аминным лигандам поверхностного биоматрикса актиномицетов.

Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ К ОЧИСТКЕ ИСКУССТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

6.1. Эффективность извлечения тяжелых металлов чистыми культурами и бактериальными консорциумами

На основании результатов скрининга МПК и физиолого-биохимических параметров для практической апробации в процессах очистки были сконструированы стабильные металлоторантные бактериальные ассоциации. В выборку для создания искусственных консорциумов вошли штаммы с различным пигментным фенотипом: красно-оранжевые (*G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, *G. rubripertincta* ИЭГМ 129, *R. ruber* ИЭГМ 453), лососево-розовые (*R. rhodochrous* ИЭГМ 1162), желтые (*R. fascians* ИЭГМ 535, *R. ruber* ИЭГМ 560) и палевые (*R. erythropolis* ИЭГМ 344). В результате апробации биокатализаторов на шести типах многокомпонентных модельных сточных вод (СВ № 1–6) выявлена высокая степень извлечения широкого спектра ионов металлов, зависящая от их химической природы, активной кислотности среды и компонентного состава биопрепарата (таблица 23). Подробные поштаммовые показатели эффективности извлечения ионов ТМ из модельных сточных вод № 1–6 представлены в Приложении Б (таблицы Б.1–Б.6)

Таблица 23 – Сравнительные показатели эффективности извлечения тяжелых металлов (%) из модельных сточных вод № 1–6

ТМ	Реактор с перемешиванием, лучший штамм, %	Реактор с перемешиванием, консорциумы, %	Колоночный биореактор, консорциумы, %
Cd	96,0	81,0–100,0	93,0–100,0
Pb	100,0	66,0–100,0	83,0–100,0
Zn	100,0	69,0–100,0	63,0–100,0
Ni	100,0	88,0–100,0	91,0–100,0

Продолжение таблицы 23

ТМ	Реактор с перемешиванием, лучший штамм, %	Реактор с перемешиванием, консорциумы, %	Колоночный биореактор, консорциумы, %
Mo	96,1	95,0–97,0	99,0–100,0
As	100,0	73,0–100,0	79,0–100,0
Cu	99,0	31,0–99,0	63,0–100,0
Cr	99,4	67,0–100,0	54,0–100,0
Fe	91,6	41,0–90,0	38,0–96,7
Hg	70,2	38,0–90,0	47,0–95,3
Mn	96,1	39,0–96,0	42,0–97,7

Катионы свинца, цинка, никеля и кадмия извлекались практически в полном объеме (до 100%) в большинстве вариантов опытов. Исключение составил свинец в щелочной сточной воде СВ № 6 (рН 8,0–9,0), где его удаление варьировало от 50,0 до 83,3%, что обусловлено формированием гидроксокомплексов, снижающих диффузию ионов к клеточной стенке.

Никель и молибден демонстрировали стабильно высокую степень извлечения (свыше 95,0%) во всех протестированных средах с рН 5,5–7,5, достигая 99–100% в колоночном режиме. Полная элиминация анионов мышьяка (100%) зафиксирована в слабощелочной воде СВ № 6 за счет избирательного поглощения арсенат-ионов, обладающих высоким химическим сродством к поликатионным сайтам бактериальной оболочки.

Ионы меди и хрома эффективно удалялись в слабокислых растворах СВ № 3, 4 и 5 (95–100%), тогда как в нейтральных средах (СВ № 1 и 2) глубина очистки снижалась до 31,0–87,0% вследствие конкурентного ингибирования сопутствующими катионами железа и кальция. Удаление железа носило специфический характер и достигало максимума (90,3–96,7%) только в СВ № 5, тогда как в остальных водах образование нерастворимых коллоидных форм ограничивало микробную биосорбцию до 67,0%.

Извлечение высокотоксичной ртути варьировало в диапазоне от 37,9 до 95,3%. Наибольшая эффективность детоксикации (95,3%) достигнута

при очистке кислой СВ № 4 (рН 4,5–5,5), тогда как в нейтральной СВ № 2 с высоким содержанием хлорид-ионов показатели падали до 37,9–64,0% из-за образования устойчивых трудносорбируемых тетрахломеркурят-комплексов $[\text{HgCl}_4]^{2-}$.

Важным аспектом проведенной апробации являлось то, что имитированные сточные воды (СВ № 1–6) не содержали дополнительных источников углерода и азота, полностью соответствуя элементному профилю реальных неорганических промышленных стоков. Установлено, что поддержание внутриклеточного гомеостаза в этих жестких условиях компенсировалось за счет утилизации внутриклеточных липидных депо (триацилглицеридов), массивированный синтез которых в ответ на металлостресс был экспериментально доказан нами ранее с использованием флуоресцентной микроскопии (раздел 3.2). Наличие интенсивного красно-фиолетового окрашивания (INT-тест) биомассы на носителе после 7 сут работы биореактора прямо подтвердило сохранение высокой респираторной и метаболической активности клеток на финальных этапах водоочистки.

Использование бинарных консорциумов позволило нивелировать токсический шок индивидуальных культур. Искусственные ассоциации штаммов стабильно превосходили монокультуры при удалении молибдена, кадмия, цинка и железа за счет взаимодополняющего спектра функциональных групп биоматрикса. Такой результат согласуется с современными данными о том, что объединение различных видов бактерий и грибов в микробные консорциумы дает мощный синергетический эффект, значительно превосходящий эффективность работы одиночных штаммов при детоксикации сложных сред (Zango *et al.*, 2020).

В этом контексте следует особо пояснить логику отбора штаммов для создания базового запатентованного биопрепарата (Патент 2818318 РФ, 2023*). Как было показано на этапе фенотипического скрининга (раздел 3.1), представители вида *R. rhodochrous* (в частности, штамм ИЭГМ 1162) продемонстрировали максимальные показатели индивидуальной

толерантности к ТМ в монокультуре. Однако при конструировании промышленных микробных ассоциаций приоритет отдавался не только предельному уровню резистентности, но и критериям межвидовой совместимости, отсутствию антагонизма и способности к синергетическому формированию стабильного экзополимерного матрикса на древесном носителе.

В ходе апробации ассоциаций было установлено, что комбинация штаммов *R. ruber* и *G. paraffinivorans* обладает наиболее сбалансированным комплексом биотехнологических характеристик. Несмотря на несколько меньшую базовую толерантность по сравнению с *R. rhodochrous*, данные виды обеспечивают высокую скорость наращивания биомассы, эффективную адгезию к лигноцеллюлозе (что коррелирует с результатами силовой спектроскопии АСМ) и выраженный синергидный эффект детоксикации при совместном культивировании. Именно эта функциональная комплементарность и стабильность консорциума послужила обоснованием для их выбора в качестве основы запатентованной ассоциации (Патент 2818318 РФ, 2023*). В свою очередь, штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162, включенный в состав отдельной экспериментальной ассоциации, целесообразно рассматривать как резервный высокоактивный биокатализатор для локальной очистки специфических узкопрофильных стоков с экстремальным уровнем металлизации.

6.2. Сравнительный анализ колоночного биореактора и системы с перемешиванием

Сопоставление двух гидродинамических режимов культивирования показало явное технологическое преимущество проточного колоночного биофильтра над периодическим реактором с перемешиванием (шейкером).

Колоночный биореактор обеспечивал статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение глубины очистки от большинства исследованных металлов. Количественная оценка технологического выигрыша проточной

системы ($\Delta E = E_{col} - E_{sh}$) наглядно проиллюстрирована на тепловой карте (рисунок 36).

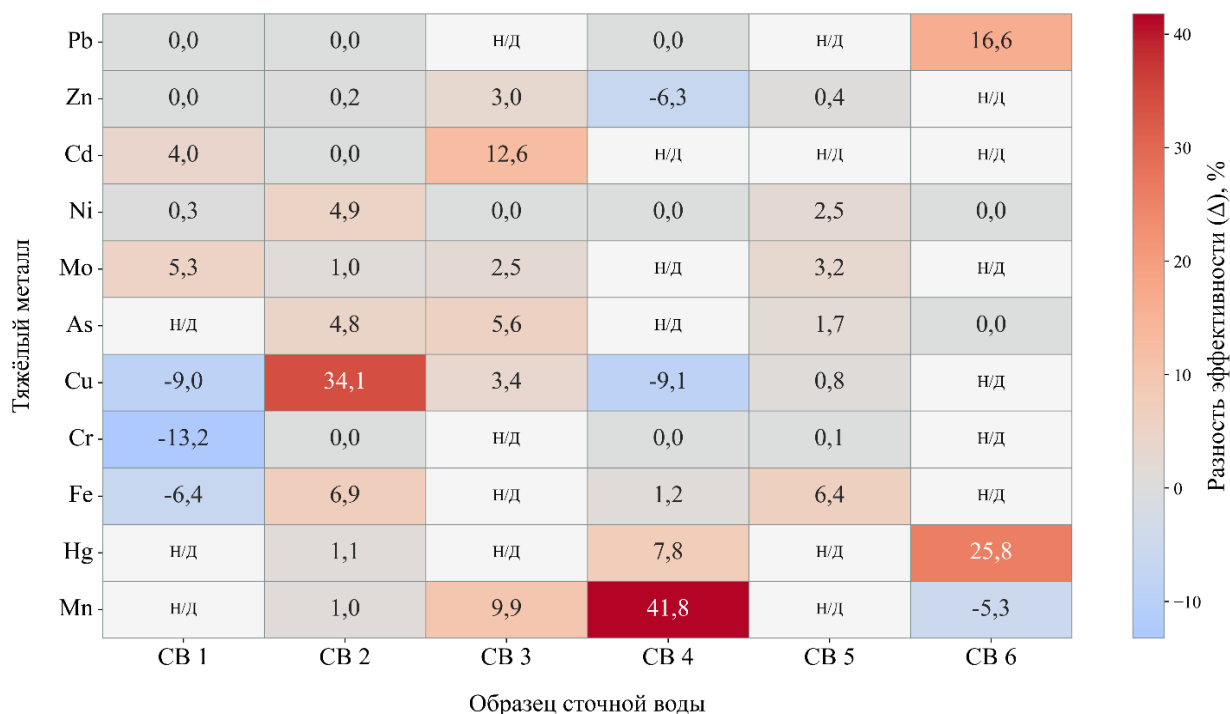


Рисунок 36 – Тепловая карта разности эффективности извлечения тяжелых металлов (ΔE , %) в колоночном биореакторе по сравнению с реактором с перемешиванием.

Цветовая шкала отражает технологический выигрыш: красные оттенки соответствуют приросту очистки в проточной колонке ($\Delta E > 0$), синие – преимуществу шейкера ($\Delta E < 0$), серые – статистической эквивалентности режимов. Н/Д – металл не входил в состав сточной воды.

Наибольший прирост степени извлечения в колонке зафиксирован для трудноудаляемых и токсичных элементов:

- по марганцу в кислой СВ № 4 прирост эффективности составил 41,8% (увеличение очистки с 55,9% до 97,7%);
- по меди в нейтральной СВ № 2 – 34,1%;
- по ртути в высоконагруженной СВ № 6 глубина очистки возросла на 25,8% (с 38,2% до 64,0%);
- по свинцу в СВ № 6 прирост достиг 16,6%.

Преимущество проточного колоночного режима обусловлено непрерывной подачей раствора с восходящим потоком (1,6 мл/мин), отсутствием деструктивных сдвиговых нагрузок на экзополисахаридный матрикс биопленки, пролонгированным контактом токсикантов с порами сорбента и многократной рециркуляцией слабоочищенных фракций через реакционную зону.

6.3. Технологическая схема и принципиальные этапы биоремедиации

Обобщение кинетических и технологических параметров позволило сформировать базовую последовательность стадий биотехнологического процесса очистки промышленных стоков от ионов ТМ:

1. Предварительная физико-химическая коррекция: регулирование активной кислотности стоков до слабокислого оптимума (рН 5,5–6,5), исключая образование труднодоступных гидроксоколлоидов и обеспечивающего максимальную биосорбцию катионов.

2. Формирование биокаталитического слоя: иммобилизация клеток устойчивого консорциума на лигноцеллюлозный носитель (хвойные опилки), обеспечивающий высокую удельную адгезию биомассы. Соотношение носителя к клеточной суспензии 1:50 (2,0 г носителя на 100 мл суспензии). Предварительно выращенные клетки в МПБ и собранные центрифугированием доводят до оптической плотности суспензии $OD_{600} = 1,0$ ($\sim 1,8 + 0,3 \times 10^8$ КОЕ/мл), в 0,05 М фосфатном буфере, культивируют на орбитальном шейкере со скоростью 120 об/мин при 28 °С до достижения равновесной адгезии клеток (48–72 ч).

3. Проточная биофильтрация: пропускание загрязненного стока через колоночный аппарат с нисходящим потоком со скоростью 1,5–2,0 мл/мин в замкнутом рециркуляционном цикле в течение 4–7 сут до достижения нормативных показателей ПДК. Соотношение твердой и жидкой фаз в системе 1:50 (2 г биокатализатора на 100 мл сточной воды).

4. Регенерация биосорбента: мягкая десорбция аккумулированных металлов растворами минеральных кислот (0,1 М HCl) или комплексонов (0,05 М ЭДТА) с сохранением механической целостности носителя для повторных технологических циклов (с последующим возвратом к стадии биофильтрации, п. 3).

5. Финальная утилизация отходов (*через 3–4 цикла очистки*): термическая минерализация (озоление) отработанного сорбента с последующим захоронением токсичных концентратов (Hg, As, Cd, Pb) по нормам опасных отходов или их вторичным металлургическим извлечением.

Разработанный подход демонстрирует технологическую воспроизводимость и высокую сорбционную емкость биомассы актиномицетов (до 215 мг металла на 1 г сухих клеток, плотность заселения составляет 35–40 мг сухой биомассы на 1 г носителя), обеспечивая глубокую детоксикацию многокомпонентных сточных вод сложных производств. Для масштабирования технологии и реализации мероприятий по очистке промышленных стоков оптимальный объем колоночного биореактора должен рассчитываться инжиниринговыми методами, исходя из необходимого времени гидравлического удерживания и суточного дебита сточных вод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема техногенного загрязнения биосферы тяжелыми металлами, в частности высокотоксичными соединениями ртути и избыточными концентрациями молибдена, представляет серьезную глобальную экологическую угрозу. Традиционные физико-химические методы детоксикации водных сред часто сопряжены с высокими экономическими затратами и рисками образования вторичных токсичных шламов. Разработанные в настоящем исследовании подходы предлагают технологически эффективное решение проблемы демеркуризации, что напрямую отвечает глобальным экологическим вызовам и целям Минаматской конвенции (AMAP/UN Environment, 2019).

В ходе диссертационной работы была комплексно оценена роль нокардиоформных актиномицетов родов *Rhodococcus* и *Gordonia* как перспективных биокатализаторов процессов водоочистки, что развивает фундаментальные концепции использования экстремотолерантных микроорганизмов в экологической биотехнологии (Ившина и др., 2021; Ivshina *et al.*, 2024a). Доказано, что данные бактерии обладают выраженной таксоноспецифичной толерантностью к катионам ртути и оксианионам молибдена. Выявлено, что адаптация клеток к металлострессу обеспечивается сложным каскадом структурно-функциональных перестроек: изменением наномеханических параметров стенки (шероховатости и гидрофобности), продукцией защитного экзополисахаридного матрикса и синтезом внутриклеточных липидных включений. Характер морфологических изменений строго зависит от природы токсиканта – ртуть провоцирует фрагментацию и укорочение клеток, тогда как молибден стимулирует их гипертрофию и агрегацию.

С использованием современных методов молекулярно-генетического профилирования впервые детально охарактеризована генетическая архитектура хромосомных систем металлорезистентности у *Rhodococcus*. Установлено, что детоксикация неорганической ртути контролируется

индуцибельным *mer*-опероном, обеспечивающим необратимое восстановление ионов Hg^{2+} высокоспецифичным ферментом ртуть-редуктазой MerA. В свою очередь, транспорт молибдена регулируется консервативным *mod*-опероном с задействованием механизма отрицательной обратной связи, предотвращающим пересыщение цитоплазмы токсикантом. Интеграция данных детерминант непосредственно в хромосому (в составе островов мультиметаллорезистентности HMRI) гарантирует их эволюционную консервативность и биотехнологическую стабильность в промышленных условиях.

Практическая значимость работы подтверждена успешной разработкой эффективных биокатализаторов на основе иммобилизованных бактериальных консорциумов на лигноцеллюлозных матрицах (хвойных опилках), новизна которых подтверждена охранным документом (Патент 2818318 РФ, 2023*). Иммобилизация позволила повысить устойчивость клеток к экстремальным концентрациям металлов более чем в 30 раз. Проведенные испытания на модельных многокомпонентных стоках сложных производств доказали технологическое преимущество проточных колоночных биореакторов. Была достигнута глубокая очистка растворов (до 95,3–100%) от широкого спектра тяжелых металлов (Cd, Pb, Zn, Ni, Mo, As, Hg). Степень извлечения поллютантов удовлетворяет строгим требованиям к качеству очищенных вод и позволяет достигать установленных нормативов ПДК (ГОСТ Р 70281-2022, 2022; Санитарные правила и нормы ..., 2022).

Результаты проведенных исследований существенно расширяют фундаментальные микробиологические представления о механизмах резистентности прокариот к тяжелым металлам и закладывают научно обоснованную, технологически воспроизводимую базу для масштабного внедрения новых экобиотехнологий очистки промышленных сточных вод.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в масштабировании разработанной технологии проточной биофильтрации до уровня опытно-промышленных испытаний на реальных объектах,

загрязненных многокомпонентными промышленными стоками. Кроме того, несомненный фундаментальный и биотехнологический интерес представляет дальнейшее изучение возможностей использования иммобилизованных актиномицетов для направленного биосинтеза наночастиц металлов на поверхности лигноцеллюлозных матриц, а также конструирование 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 Мо 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 псевдовторого 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а.е.м. – Атомная единица массы

АСМ – Атомно-силовая микроскопия

АТФ – Аденозинтрифосфорная кислота

АФК – Активные формы кислорода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПС – Внеклеточные полимерные соединения

ДМСО – Диметилсульфоксид

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

е.о.п. – Единицы оптической плотности

ИЭГМ – Институт экологии и генетики микроорганизмов

кДНК – Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КЛСМ – Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

КОЕ – Колониеобразующая единица

ЛПС – Липополисахариды

МПА – Мясопептонный агар

МПБ – Мясопептонный бульон

МПК – Минимальная подавляющая концентрация

МС – Минеральная среда

м/э – Микроэлементы

об. % – Объемный процент

ОП – Оптическая плотность

ПАВ – Поверхностно-активные вещества

ПДК – Предельно допустимая концентрация

п.н. – Пар нуклеотидов

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – Полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЭМ – Просвечивающая электронная микроскопия

РНК – Рибонуклеиновая кислота

СанПиН – Санитарные правила и нормы

СВ – Сточная вода (имитированная)

ТМ – Тяжелые металлы

т.п.н. – Тысяч пар нуклеотидов

цкПЦР – Цифровая капельная полимеразная цепная реакция

ЦПМ – Цитоплазматическая мембрана

ЭДС – Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПС – Экзополисахариды

BGCs – Кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов (Biosynthetic Gene Clusters)

C₁₆ – *n*-гексадекан

G. – род *Gordonia*

Hg – Ртуть

HMRI – Хромосомный остров мультиметаллорезистентности (Heavy Metal Resistance Island)

INT – Йоднитротетразолия хлорид

IQR – Межквартильный размах (Interquartile Range)

Me – Медиана

Mo – Молибден

MoCo – Молибденовый кофактор

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information)

PI – Пропидия йодид

R. – род *Rhodococcus*

RAST – Rapid Annotation using Subsystem Technology

RNA-seq – Транскриптомное секвенирование

RS – Минеральная среда *Rhodococcus*-surfactant

SD – Стандартное отклонение (Standard Deviation)

SYTO 9 – Флуоресцентный краситель SYTO 9

TSS – Точка старта транскрипции (Transcription Start Site)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*: моногр. / Казан. гос. ун-т им. В.И. Ульянова-Ленина. Казань. – 2006. – 209 с.
2. Багаева Т.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов // Изд-во Казан. ун-та. Казань. – 2013. – 56 с.
3. Базова М.М., Кошевой Д.В. Оценка современного состояния качества вод Норильского промышленного района // Арктика: экология и экономика. – 2017. – № 3 (27). – С. 49–60.
4. Бузолева Л.С., Кривошеева А.М. Влияние тяжелых металлов на размножение патогенных бактерий // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 7. – С. 30–38.
5. Борисов Е.В. Физиологическая роль и токсичность молибдена для микроорганизмов // Старт в науку: материалы LXVI научной конференции Биологического института, Томск, 24–28 апреля 2017 г., Томск. – 2017. – С. 88–98.
6. Боярко Г.Ю., Хатьков В.Ю. Современное состояние молибденовой промышленности России // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. – 2021. – Т. 332, № 2. – С. 73–86.
7. Войтюк Ю.Ю., Кураева И.В., Локтионова Е.П. Источники загрязнения тяжелыми металлами территорий промышленных агломераций черной металлургии // Журнал Белорусского государственного университета. География. Геология. – 2017. – С. 1–8.
8. Галевский Г.В. и др. Молибден в современной металлургии: состояние производства и металлопродукция // Вестник горно-металлургической секции РАЕН. Отделение металлургии. – 2020. – № 43. – С. 20–31.
9. Гигиенические нормативы 2.2.5.1315-03 от 13.07.2017 г. “Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде

водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования.

10. Гигиенические нормативы 2.2.5.3532-18 от 13.02.2018 г. “Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны”.

11. ГОСТ Р 70281-2022 от 5.10.2022 г. “Охрана окружающей среды. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения”.

12. Громова О.А. и др. Систематический анализ эффектов молибдена: здоровье беременной и плода // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2019. – Т. 18, № 4. – С. 83–94.

13. Дускаев Г.К. и др. Влияние тяжелых металлов на организм животных и окружающую среду обитания // Животноводство и кормопроизводство. – 2014. – № 1. – С. 7–12.

14. Ефременко Е.Н. Биокаталитические свойства иммобилизованных клеток микроорганизмов: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.01.06 // Москва: Ин-т биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. – 2009. – С. 53–67.

15. Ившина И.Б. и др. Углевородоксиляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография // УрО РАН. – 2021. – 140 с.

16. Костина Л.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Биосорбция, аккумуляция и способы извлечения тяжелых металлов // LAP Lambert Academic Publishing. – 2010. – 254 с.

17. Костина Л.В. и др. Извлечение тяжелых металлов из техногенно загрязненных городских почв // Аграрный вестник Урала. – 2014. – № 11 (129). – С. 47–53.

18. Криворучко А.В. Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углевородоксиляющих родококков: дис. ... док. био. наук // Пермь. – 2021. – 223 с.

19. Лыков И.Н., Гаранин, Д.И. Петрухина Р.А. Использование биомассы микроорганизмов для извлечения тяжелых металлов из сточных вод // Экология урбанизированных территорий. – 2018. – № 3. – С. 60–63.

20. Макарова Н.В. Статистический анализ медико-биологических данных с использованием пакетов статистических программ Statistica, SPSS, NCSS, SYSTAT: методическое пособие / Н.В. Макарова // Всерос. центр экстрен. и радиац. медицины им. А.М. Никифорова МЧС России. СПб.: Политехника-сервис. –2012. – 178 с.

21. Максимов С.П., Алексеев И.А. Обзор методов биологической очистки сточных вод. // Технические науки – от теории к практике. – 2014. – № 41. – С. 95–101.

22. Масакбаева С.Р. и др. Легирование молибденом и его влияние на свойства стали // Наука и техника Казахстана. – 2021. – № 1. – С. 19–29.

23. Молдагулова Н.Б. и др. Разработка биотехнологического способа очистки сточных вод в лабораторных условиях // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – № 10–1. – С. 35–38.

24. Мухаматдьярова С.Р. и др. Адаптация микроорганизмов к тяжелым металлам // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2023. – № 4. С. – 31–43.

25. Парамонова Т.А. и др. Тяжелые металлы в городских почвах Приволжского федерального округа: сопряженный анализ официальных данных // Почвоведение. – 2023. – № 11. – С. 1472–1488.

26. Патент РФ RU2298033C2. Подорожко Е.А. и др. Композиция для получения носителя иммобилизованных микроорганизмов, расщепляющих углеводороды, и способ получения носителя. Приоритет изобр. 19.04.2005. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 27.04.2007. Бюл. № 12.

27. 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 г. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 02.05.2024 г. Бюл. № 13.

28. Пищик В.Н. и др. Механизмы адаптации растений и микроорганизмов в растительно-микробных системах к тяжелым металлам // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 231–247.

29. Полетаева В. И., Пастухов М. В. Влияние сточных вод Усольской промзоны на гидрохимический состав р. Ангара // Самарский научный вестник. – 2016. – № 1 (14). – С. 74–77.

30. Санитарные правила и нормы 1.2.3685-21 от 30.12.2022 г. “Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания”.

31. Ступин Д.Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления. Уч. пособие / Д.Ю. Ступин // СПб: Лань. – 2009. – 432 с.

32. Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды (обзор литературы) // Астраханский вестник экологического образования. – 2013. – № 1 (23). – С. 182–192.

33. Фарберова Е.А. и др. Применение углеродных сорбентов в технологии очистки сточных вод от ртути // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2018. – Т. 80, № 4 (78). – С. 322–329.

34. Худокормов А.А. и др. Влияние источника углерода на устойчивость к тяжелым металлам штаммов нефтеокисляющих актинобактерий, используемых в процессах биоремедиации // Научный журнал КубГАУ. – 2012. – Т. 83, № 9. – С. 1–10.

35. Цветкова Е. А., Полетаева В. И., Пастухов М. В. Характеристика сточных вод промышленной зоны г. Усоля-Сибирского и их влияние на гидрохимический состав р. Ангара в периоды с разной техногенной нагрузкой // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. – 2024. – Т. 335, № 5. – С. 39–58.

36. Широких И.Г., Ашихмина Т.Я. Актинобактерии в защите окружающей среды от производственных загрязнений // Теоретические проблемы экологии. – 2022. – № 4. – С. 14–21.

37. Янкевич М.И., Хадеева В.В., Мурыгина В.П. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра // Междисциплин. научный и прикладной журнал “Биосфера”. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 199–208.
38. Ahmaruzzaman M. Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2011. – Vol. 166, No. 1–2. – P. 36–59.
39. Al-Sulaiti M.M. et al. The causes and effects of mercury and methylmercury contamination in the marine environment: A review // *Curr. Pollut. Rep.* – 2022. – Vol. 8. – P. 249–272.
40. Alvarez A. et al. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals // *Chemosphere*. – 2017. – Vol. 166. – P. 41–62.
41. AMAP/UN Environment. Technical Background Report to the Global Mercury Assessment 2019; UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch: Geneva, Switzerland; Arctic Monitoring and Assessment Programme: Oslo, Norway, 2019.
42. Arnold E. Non-classical roles of bacterial siderophores in pathogenesis and environmental adaptation // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2024. – Vol. 14. – P. 1465719.
43. Bae M. et al. Nanotoxicity of 2D molybdenum disulfide, MoS₂, nanosheets on beneficial soil bacteria, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11. – P. 1–14.
44. Balali-Mood M. et al. Recent advances in the clinical management of intoxication by five heavy metals: Mercury, lead, chromium, cadmium and arsenic // *Heliyon*. – 2025. – Vol. 11. – Article e42696.
45. Bankar A.V., Zinjarde S.S., Kapadnis B.P. Management of heavy metal pollution by using yeast biomass in microorganisms in environmental management // Springer: Dordrecht. The Netherlands. – 2012. – P. 335–363.
46. Barkay T. et al. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems // *FEMS Microbiol Rev.* – 2003. – Vol. 27. – P. 355–384.

47. Barkay T. et al. A thermophilic bacterial origin and subsequent constraints by redox, light and salinity on the evolution of the microbial mercuric reductase // *Environ Microbiol.* – 2010. – Vol. 12. – P. 2904–2917.
48. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. – 1995. – Vol. 57, No 1. – P. 289–300.
49. Bessbousse H. et al. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions by filtration with a novel complexing membrane containing poly(ethyleneimine) in a poly(vinyl alcohol) matrix // *Journal of Membrane Science*. – 2008. – Vol. 307, No. 2. – P. 249–259.
50. Blin K. et al. AntiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49. – P. W29–W35.
51. Boland C.A., Meijer W.G. The iron dependent regulatory protein IdeR (DtxR) of *Rhodococcus equi* // *FEMS Microbiol Lett.* – 2000. – Vol. 191, No. 1. – P. 1–5.
52. Boyd E.S., Barkay T. The mercury resistance operon: From an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine // *Front. Microbiol.* – 2012. – Vol. 3. – Article 349.
53. Brown N.L. et al. MerR family of transcriptional regulators // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2003. – Vol. 27, No 2–3. – P. 145–163.
54. Butler A., Theisen R. M. Iron(III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2010. – Vol. 254, No 3-4. – P. 288–296.
55. Cappelletti M. et al. Genomics of *Rhodococcus*. In *Biology of Rhodococcus*. Chapter 2 // Springer International Publishing: Basel, Switzerland. – 2019. – P. 23–60.
56. Carran C.J. et al. Heterobactins: a new class of siderophores from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 containing both hydroxamate and catecholate donor groups // *BioMetals*. – 2001. – Vol. 14, No 2. – P. 119–125.

57. Chakraborty I. et al. Bioelectrochemically powered remediation of xenobiotic compounds and heavy metal toxicity using microbial fuel cell and microbial electrolysis cell // Mater. Sci. Technol. – 2020. – No. 3. – P. 104–115.
58. Chen H.W. et al. Effects of extracellular polymeric substances on the bioaccumulation of mercury and its toxicity toward the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* // J. Environ. Sci. Health Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. – 2014. – Vol. 49. – P. 1371–1375.
59. Christakis C.A., Barkay T., Boyd E.S. Expanded diversity and phylogeny of mer genes broadens mercury resistance paradigms and reveals an origin for MerA among thermophilic archaea // Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 2–3.
60. Dash H.R. et al. Functional efficiency of MerA protein among diverse mercury resistant bacteria for efficient use in bioremediation of inorganic mercury // Biochimie. – 2017. – Vol. 142. – P. 207–215.
61. Di Salvo M. et al. G4PromFinder: an algorithm for predicting transcription promoters in GC-rich bacterial genomes based on AT-rich elements and G-quadruplex motifs // BMC bioinformatics. – 2018. – Vol. 19, No 1. – C. 36.
62. Dhungana S. et al. Purification and characterization of rhodobactin: a mixed ligand siderophore from *Rhodococcus rhodochrous* strain OFS // BioMetals. – 2007. – Vol. 20, No 6. – P. 853–867.
63. Dobin A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29, No 1. – P. 15–21.
64. El Baz S. et al. Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas // Sci. World J. – 2015. – Vol. 1. – P. 33–40.
65. Endicott N.P. et al. Emergence of ferrichelatase activity in a siderophore-binding protein supports an iron shuttle in bacteria // ACS Central Science. – 2020. – Vol. 6, No 4. – P. 493–506.
66. Fagorzi C. et al. Harnessing *Rhizobia* to improve heavy-metal phytoremediation by legumes // Genes. – 2018. – Vol. 9. – Article 542.

67. Fang H. et al. Simultaneous removal of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes by molybdenum carbide assisted electrochemical disinfection // J. Hazard. Mater. – 2022. – Vol. 432. – Article 128733.
68. Filipovic-Kovacevic Z., SiposLbriski F. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillusniger* 405 from aqueous solutions // Food Technol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 38. – P. 211–216.
69. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // Nature Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8, No. 9. – C. 623–633.
70. François F. et al. Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78, No. 4. – P. 1101–1105.
71. Fu F., Wang Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A Review // J. Environ. Manag. – 2011. – Vol. 92. – P. 407–418.
72. Gauthier I. et al. Experience moderates overlap between object and face recognition, suggesting a common ability // J. Vis. – 2014. – Vol. 14. – P. 1–12.
73. Gionfriddo C.M. et al. Genome-resolved metagenomics and detailed geochemical speciation analyses yield new insights into microbial mercury cycling in geothermal springs // Appl. Environ. Microbiol. – 2020. – Vol. 86. – Article e00176-20.
74. Gogoleva O.A. et al. Catalase activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria // Appl. Biochem. Microbiol. – 2012. – Vol. 48, No. 6. – P. 552–556.
75. Golysheva A., Anastasiia Krivoruchko A., Ivshina I. Draft genome sequence of a promising bioremediation agent *Gordonia paraffinivorans* IEGM 735 // Microbiol. Res. Announ. – 2026. – Vol. 15, No. 3. – Article e0105925.
76. Golysheva A.A., Litvinenko L.V., Ivshina I.B. Diversity of Mercury-Tolerant Microorganisms // Microorganisms. – 2025. – Vol. 13, No. 6. – Article 1350.

77. Gomes A.F.R. et al. Siderophores and metallophores: Metal complexation weapons to fight environmental pollution // *Sci. Total Environ.* – 2024. – Vol. 932. – Article 173044.
78. Grunden A. M., Shanmugam K. T. Molybdate transport and regulation in bacteria // *Archiv. Microbiol.* – 1997. – Vol. 168, No 5. – P. 345–354.
79. Gullberg E. et al. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals // *MBio.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–9.
80. Gunatilake S.K. Methods of removing heavy metals from industrial wastewater // *J. Multidisc. Engineer. Sci. Stud. (JMESS).* – 2015. – Vol. 1, No. 1. – P. 12–18.
81. Gworek B., Dmuchowski W., Baczewska-Dabrowska A.H. Mercury in the terrestrial environment: A review // *Environ. Sci. Eur.* – 2020. – Vol. 32. – Article 128.
82. Henson W.R. et al. Lipid metabolism of phenol-tolerant *Rhodococcus opacus* strains for lignin bioconversion // *Biotechnol. Biofuels.* – 2018. – Vol. 11. – P. 1556–1565.
83. Hider R.C., Kong X. Chemistry and biology of siderophores // *Natural Product Reports.* – 2010. – Vol. 27, No 5. – P. 637–657.
84. Hofmann M. et al. Screening for microbial metal-chelating siderophores for the removal of metal ions from solutions // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9, No 1. – P. 111.
85. Hollenstein K., Frei D.C., Locher K.P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein // *Nature.* – 2007. – Vol. 446, No 7132. – P. 213–216.
86. Hussein S.H. et al. Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – Vol. 41, No. 24. – P. 8439–8446.
87. Ivshina I.B. et al. Extremotolerant *Rhodococcus* as an important resource for environmental biotechnology // In *Actinomycetes in Extreme and*

Marine Environments: An Unexhausted Source for Microbial Biotechnology / Ed. By I. Kurtböke. Science Publishers. – 2024a. – P. 204–241.

88. Ivshina I.B. et al. Bioaccumulation of molybdate ions by alkanotrophic *Rhodococcus* leads to significant alterations in cellular ultrastructure and physiology // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2024b. – Vol. 274. – Article 116190.

89. Ivshina I.B., Peshkur T.A., Korobov V.P. Efficient uptake of cesium ions by *Rhodococcus* cells // *Microbiology*. – 2002. – Vol. 71. – P. 357–361.

90. Johnstone T.C., Nolan E.M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores // *Dalton Transactions*. – 2015. – Vol. 44, No 14. – P. 6320–6339.

91. Kavamura V.N., Esposito E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals // *Biotechnol. Adv.* – 2010. – Vol. 28, No. 1. – P. 61–69.

92. Khalid S. et al. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils // *J. Geochem. Explor.* – 2016. – Vol. 182, part B. – P. 247–268.

93. Kotnala S. et al. Impact of heavy metal toxicity on the human health and environment // *Sci. Total Environ.* – 2025. – Vol. 987. – Article 179785.

94. Krivoruchko A.V. et al. 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. – Vol. 27, № 17. – Article 7890.

95. Kuyukina M.S. et al. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant // *J. Microbiol. Methods*. – 2006. – Vol. 65, No. 3. – P. 596–603.

96. Kuyukina M.S., Krivoruchko, A.V. Ivshina I.B. Hydrocarbon and metal-polluted soil bioremediation: Progress and challenges // *Microbiol. Aust.* – 2018. – Vol. 39. – P. 133–136.

97. Lafrance-Vanasse J. et al. Crystal structures of the organomercurial lyase MerB in its free and mercury-bound forms: insights into the mechanism of

methylmercury degradation // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, No 2. – P. 938–944.

98. Ledin M. Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soil systems // Earth-Sci. Rev. – 2000. – Vol. 51. – P. 1–31.

99. Leimkuhler S., Iobbi-Nivol C. Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes // FEMS Microbiol. Rev. – 2016. – Vol. 40, No 1. – P. 1–18.

100. Letek M. et al. The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions // PLoS Genetics. – 2010. – Vol. 6, No. 9. – Article e1001145.

101. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, No 7. – P. 923–930.

102. Lindahl M. et al. A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects. – 1981. – Vol. 677, No 3–4. – P. 471–476.

103. Litvinenko L.V. Ability of the *Dietzia*, *Gordonia* and *Rhodococcus* actinobacteria to accumulate nickel ions // Microbiology. – 2019. – Vol. 88. – P. 191–199.

104. Liu D. Algorithms for efficiently collapsing reads with Unique Molecular Identifiers // PeerJ. – 2019. – Vol. 7. – Article e8275.

105. Liu L. et al. Recent Advances in the Siderophore Biology of *Shewanella* // Front. Microbiol. – 2022. – Vol. 13.

106. Lopes E. et al. Bactericidal efficacy of molybdenum oxide nanoparticles against antimicrobial resistant pathogens // J. Med. Microbiol. – 2018. – Vol. 67. – P. 1042–1046.

107. Love M. I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Gen. Biol. – 2014. – Vol. 15, No 12. – Article 550.

108. Magalon A., Mendel R.R. Biosynthesis and insertion of the molybdenum cofactor // *EcoSal Plus*. – 2015. – Vol. 6, No 2.
109. Maitra J. Microbial Bioremediation of Heavy Metals-Process, Challenges and Future Aspect: A Comprehensive Review // *Exp. Opin. Environ. Biol.* – 2022. – Vol. 11, No. 6. – Article 1000165. – P. 1–7.
110. Mao X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review // *J. Hazard. Mat.* – 2015. – Vol. 285. – P. 419–435.
111. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C, Andrade A.F. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods// *Curr. Microbiol.* – 1999. – Vol. 38, No 1. – P. 37–42.
112. Maupin-Furlow J.A. et al. Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177, No 17. – P. 4851–4856.
113. Maynaud G. et al. CadA of *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a zinc-rich mining soil is a PIB-2-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance // *Res. Microbiol.* – 2014. – Vol. 165. – P. 175–189.
114. Maret W. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17. – P. 66.
115. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // *EMBnet.journal.* – 2011. – Vol. 17, No 1. – P. 10–12.
116. Meziane M. A. et al. Microbial strategies for heavy metal remediation: mechanisms, challenges, and promising approaches for metal detoxification // *Environ. Sci. Poll. Res.* – 2026. – Vol. 33. – P. 2497–2516.
117. Miranda-CasoLuengo R. et al. The intracellular pathogen *Rhodococcus equi* produces a catecholate siderophore required for saprophytic growth // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190. – P. 1631–1637.
118. Mousavi A. et al. Mercury in natural waters: A mini-review // *Environ. Forensics.* – 2011. – Vol. 12. – P. 14–18.

119. Mrunalini B.R., Girisha S.T. Screening and characterization of lipid inclusions in bacteria by fluorescence microscopy and mass spectrometry as a source for biofuel production // *Ind. J. Sci. Technol.* – 2017. – Vol. 10, No. 21. – P. 1–7.
120. Nocelli N. et al. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of *Rhizobia* // *Materials*. – 2016. – Vol. 9. – P. 419–423.
121. Ondrasek G. et al. Metal contamination – a global environmental issue: sources, implications & advances in mitigation // *RSC Adv.* – 2025. – Vol. 15. – P. 3904-3927.
122. Outridge P.M. et al. Updated global and oceanic mercury budgets for the United Nations Global Mercury Assessment 2018 // *Environ. Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 52. – P. 11466–11477.
123. Oyetibo G.O. et al. Biotechnological remedies for the estuarine environment polluted with heavy metals and persistent organic pollutions // *Int. Biodeter. Biodegrad.* – 2016a. – Vol. 119. – P. 615–620.
124. Oyetibo G.O. et al. Mercury removal during growth of mercury tolerant and self-aggregating *Yarrowia* spp. // *AMB Express*. – 2016b. – Vol. 1. – Article 99.
125. Pacwa-Płociniczak M. et al. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12, No. 1. – P. 633–654.
126. Pals M.J. et al. Catechol-siderophore mimics convey nucleic acid therapeutics into bacteria // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2024. – Vol. 63, No 19. – Article e202402405.
127. Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // *Biotechnol. Adv.* – 2021. – Article 107698.
128. Peng T. et al. Comparative genomics of molybdenum utilization in prokaryotes and eukaryotes // *BMC Genom.* – 2018. – Vol. 19. – Article 691.

129. Peng Y. et al. Coupling process study of lipid production and mercury bioremediation by biomimetic mineralized microalgae // *Biores. Technol.* – 2017. – Vol. 243. – P. 628–630.
130. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100 // *Clin. Lab. Standards Inst. (CLSI)*. Wayne, PA. – 2019. – 250 p.
131. Piacenza E. et al. Tunable photoluminescence properties of selenium nanoparticles: Biogenic versus chemogenic synthesis // *Nanophotonics*. – 2020. – Vol. 9. – P. 3615–3628.
132. Postgate J.R. Differential media for sulphur bacteria // *J. Sci. Food Agricul.* – 1959. – Vol. 10, No. 12. – P. 669–674.
133. Presentato A. et al. Aerobic growth of *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 using selected naphthenic acids as the sole carbon and energy sources // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Article 672.
134. Presentato A. et al. Processing of metals and metalloids by actinobacteria: cell resistance mechanisms and synthesis of metal(loid)-based nanostructures // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, No. 12. – Article 2027.
135. Priyadarshane M. et al. Cellular and genetic mechanism of bacterial mercury resistance and their role in biogeochemistry and bioremediation // *J. Hazard. Mater.* – 2022. – Vol. 423, Part A. – Article 126985.
136. Python Software Foundation. Python Language Reference, version 3. – Wilmington, Delaware: Python Software Foundation, 2024. – URL: python.org (дата обращения: 18.02.2025).
137. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. – Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015. – URL: r-project.org (дата обращения: 10.08.2026).
138. Rai P.K. et al. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management // *Environ. Intern.* – 2019. – Vol. 125. – P. 365–385.

139. Rehman K., Fatima F., Waheed I., Akash M.S.H. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences // J. Cell. Biochem. – 2018. – Vol. 119. – P. 157–184.
140. Retamal-Morales G. et al. Isolation and characterization of arsenic-binding siderophores from *Rhodococcus erythropolis* S43: role of heterobactin B and other heterobactin variants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – Vol. 105, No 4. – P. 1731–1744.
141. Rice K.M. et al. Environmental mercury and its toxic effects // J. Prev. Med. Public Health. – 2014. – Vol. 47. – P. 74–75.
142. Roosenberg J.M. et al. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators and analogs as potential drug delivery agents // Curr. Med. Chem. – 2000. – Vol. 7, No. 2. – P. 159–197.
143. Rošková Z., Škarohlíd R., McGachy L. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? // Science of The Total Environment. – 2022. – Vol. 819. – Article 153144.
144. Sandy M., Butler A. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores // Chem. Rev. – 2009. – Vol. 109, No. 10. – P. 4580–4595.
145. Santhy K., Selvapathy P. Removal of heavy metals from wastewater by adsorption on coir pith activated carbon // Sep. Sci. Technol. – 2004. – No. 39. – P. 331–351.
146. Saubenova M. et al. Production of carotenoids by microorganisms // Fermentation. – 2024. – Vol. 10, No. 10. – P. 502.
147. Schalk I.J., Hannauer M., Braud A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance // Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 13, No. 11. – P. 2844–2854.
148. Schalk I.J. Bacterial siderophores: diversity, uptake pathways and applications // Nature Rev. Microbiol. – 2025. – Vol. 22, No 1. – P. 24–40.
149. Sharma S.K., Sanghi R., Mudhoo A. Green practices to save our precious “Water Resource” // Indian Institute of Technology Kanpur. UP. India.

Advances in Water Treatment and Pollution Prevention. Chapter 1. – 2012. – P. 1–36.

150. Siegl T. et al. Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes // Met. Engin. – 2013. – Vol. 19. – P. 98–106.

151. Sone Y. et al. Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68 // AMB Express. – 2013. – Vol. 3, No. 41. – P. 1–6.

152. Strohl W.R. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters // Nucleic Acids Res. – 1992. – Vol. 20, No. 5. – P. 961–974.

153. Styczynski M. et al. Genome-based insights into the production of carotenoids by antarctic bacteria, *Planococcus* sp. ANT_H30 and *Rhodococcus* sp. ANT_H53B // Molecules. – 2020. – Vol. 25, No. 19. – Article 4357.

154. Suman J. et al. Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment? // Front. Plant Sci. – 2018. – No. 9. – Article 1476.

155. Tchounwou P.B. et al. Heavy metal toxicity and the environment. In Molecular, Clinical and Environmental Toxicology // Springer: Basel, Switzerland. – 2012. – Vol. 3. – P. 133–164.

156. Teitzel G.M., Parsek M.R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – P. 2315–2318.

157. Vanella R., Verma S.K. Co^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis* // Biotechnol. Prog. – 2006. – Vol. 24, No. 5. – P. 1282–1293.

158. Wang Z.J. et al. Measurement and scaling of mercury on soil and air in a historical artisanal gold mining area in northeastern China // Chin. Geogr. Sci. – 2019. – Vol. 29. – P. 245–257.

159. Wu Q. et al. Spatial distribution and accumulation of Hg in soil surrounding a Zn/Pb smelter // Sci. Total Environ. – 2014. – Vol. 496. – P. 671–673.

160. Yadav M. et al. Evaluation of mercury adsorption and removal efficacy of pulverized *Chlorella* (*C. vulgaris*) // J. Appl. Phycol. – 2020. – Vol. 32, No. 2. – P. 1253–1262.
161. Yadav P., Bora J., Gupta A. Microbial bioremediation of heavy metal approaches and advancement // Adv. Chem. Pollut. Environ. Manag. Prot. – 2025. – Vol. 12. – P. 473–488.
162. Yakasai H.M. et al. Microbiological reduction of molybdenum to molybdenum blue as a sustainable remediation tool for molybdenum: a comprehensive review // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2021. – Vol. 5731. – P. 1–25.
163. Yang Z. et al. Development of selenized magnetite ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-xSey}$) as an efficient and recyclable trap for elemental mercury sequestration from coal combustion flue gas // Chem. Eng. J. – 2020. – Vol. 394. – Article 125022.
164. Young S.D. Chemistry of heavy metals and metalloids in soils // Heavy Metals in Soils. Springer. Chapter 1. – 2012. – P. 51–95.
165. Zampolli J. et al. Identification of a novel biosurfactant with antimicrobial activity produced by *Rhodococcus opacus* R7 // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10, No. 2. – Article 475.
166. Zhang C. et al. Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress // Nature Commun. – 2017. – Vol. 8, No. 1. – Article 15979.
167. Zango U.U. et al. Microbial Bioremediation of Heavy Metals: Emerging Trends and Recent Advances // Res. J. Biotechnol. – 2020. – Vol. 15, No. 1. – P. 164–178.

**Приложение А. УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ
К ИОНАМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ***

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
<i>G. alkanivorans</i>				
ИЭГМ 748	0,01	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 1277	0,02	0,005	2,50	1,25
<i>G. amarae</i>				
ИЭГМ 720 ^T	0,02	0,02	5,00	5,00
<i>G. amicalis</i>				
ИЭГМ 1275	0,0025	0,0025	2,50	2,50
ИЭГМ 1279	0,08	0,01	2,50	1,25
<i>G. paraffinivorans</i>				
ИЭГМ 735	0,16	0,08	5,00	1,25
<i>G. rubripertincta</i>				
ИЭГМ 96	0,08	0,02	1,25	0,63
ИЭГМ 101	0,32	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 112	0,01	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 120	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 124	0,16	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 126	0,04	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 129	0,32	0,16	2,50	1,25
ИЭГМ 132	0,32	0,16	1,25	1,25
ИЭГМ 133	0,32	0,04	1,25	1,25
ИЭГМ 142	0,32	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 761	0,16	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 1388	0,16	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 1392	0,16	0,04	2,50	1,25
<i>G. terrae</i>				
ИЭГМ 136	0,16	0,04	1,25	1,25
ИЭГМ 144	0,16	0,04	0,63	0,32
ИЭГМ 145	0,16	0,01	2,50	0,32
<i>R. corynebacterioides</i>				
ИЭГМ 929 ^T	0,08	0,02	2,50	0,63
ИЭГМ 1202	0,01	0,01	5,0	1,25

Приложение А (продолжение)

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
<i>R. erythropolis</i>				
ИЭГМ 183	0,08	0,04	5,00	1,25
ИЭГМ 203	0,08	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 212	0,08	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 215	0,02	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 216	0,16	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 250	0,16	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 251	0,16	0,04	5,00	1,25
ИЭГМ 266	0,16	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 268	0,02	0,0025	5,00	2,50
ИЭГМ 270	0,16	0,08	1,25	1,25
ИЭГМ 274	0,02	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 344	0,16	0,04	5,00	1,25
ИЭГМ 486	0,08	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 487	0,02	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 507	0,16	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 509	0,04	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 658	0,04	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 659	0,04	0,005	5,00	1,25
ИЭГМ 661	0,02	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 662	0,02	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 758	0,02	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 770	0,04	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 784	0,04	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 785	0,16	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 786	0,02	0,005	5,00	1,25
ИЭГМ 787	0,04	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 788	0,02	0,005	5,00	1,25
ИЭГМ 1017	0,02	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 1018	0,005	0,005	5,00	1,25
ИЭГМ 1020	0,005	0,005	5,00	5,00
ИЭГМ 1167	0,16	0,005	5,0	5,00
ИЭГМ 1178	0,01	0,01	5,00	1,25

Приложение А (продолжение)

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
ИЭГМ 1179	0,04	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 1180	0,0025	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 1182	0,02	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 1188	0,02	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 1192	0,04	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 1199	0,02	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 1204	0,01	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 1205	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 1232	0,01	0,0025	20,00	5,00
ИЭГМ 1245	0,0025	0,0025	5,00	0,63
ИЭГМ 1247	0,08	0,01	5,00	0,63
ИЭГМ 1249	0,02	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 1268	0,0025	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 1303	0,02	0,0025	20,00	10,00
ИЭГМ 1321	0,0025	0,0025	10,00	2,50
ИЭГМ 1353	0,08	0,01	20,00	10,00
ИЭГМ 1389	0,02	0,0025	10,00	5,00
<i>R. fascians</i>				
ИЭГМ 34	0,04	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 35	0,08	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 36	0,04	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 37	0,04	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 38	0,08	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 39	0,08	0,02	0,63	0,63
ИЭГМ 40	0,08	0,04	5,00	1,25
ИЭГМ 41	0,04	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 42	0,16	0,01	1,25	0,63
ИЭГМ 43	0,08	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 173	0,32	0,04	5,0	1,25
ИЭГМ 177	0,08	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 178	0,01	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 276	0,16	0,08	1,25	0,63
ИЭГМ 277	0,08	0,02	2,50	0,63

Приложение А (продолжение)

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
ИЭГМ 278	0,16	0,02	1,25	0,63
ИЭГМ 279	0,08	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 280	0,08	0,01	10,00	2,50
ИЭГМ 281	0,01	0,01	10,00	2,50
ИЭГМ 288	0,08	0,01	1,25	1,25
ИЭГМ 289	0,04	0,01	1,25	1,25
ИЭГМ 414 ^г	0,04	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 524	0,32	0,08	1,25	1,25
ИЭГМ 529	0,08	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 531	0,01	0,01	1,25	1,25
ИЭГМ 535	0,63	0,01	5,00	1,25
ИЭГМ 1072	0,01	0,01	1,25	1,25
ИЭГМ 1159	1,25	0,01	10,00	5,00
ИЭГМ 1168	0,01	0,01	10,00	1,25
ИЭГМ 1213	0,01	0,01	10,00	1,25
ИЭГМ 1218	0,08	0,04	10,00	2,50
ИЭГМ 1226	0,01	0,04	10,00	2,50
ИЭГМ 1233	0,02	0,0025	10,00	2,50
<i>R. jostii</i>				
ИЭГМ 33	0,08	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 60	0,01	0,005	5,00	1,25
ИЭГМ 458	0,01	0,00025	5,00	1,25
ИЭГМ 508	0,01	0,00025	5,00	1,25
ИЭГМ 550	0,04	0,00025	5,00	1,25
ИЭГМ 589	0,08	0,00025	2,50	1,25
ИЭГМ 951 ^г	0,01	0,00025	2,50	1,25
ИЭГМ 1170	0,16	0,00025	5,00	1,25
ИЭГМ 1193	0,01	0,00025	5,00	1,25
<i>R. opacus</i>				
ИЭГМ 56	0,08	0,005	0,31	0,04
ИЭГМ 57	0,04	0,02	1,25	0,04
ИЭГМ 58	0,02	0,005	5,00	0,31
ИЭГМ 59	0,08	0,01	1,25	0,31

Приложение А (продолжение)

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
ИЭГМ 248	0,02	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 261	0,02	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 262	0,04	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 263	0,02	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 264	0,04	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 488	0,02	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 716 ^T	0,01	0,005	1,25	1,25
ИЭГМ 717	0,04	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 765	0,02	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 1157	0,02	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 2226	0,32	0,16	5,00	1,25
<i>R. oxybenzonivorans</i>				
ИЭГМ 28	0,01	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 29	0,02	0,01	0,31	0,08
ИЭГМ 30	0,01	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 31	0,08	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 32	0,01	0,01	1,25	1,25
ИЭГМ 68	0,04	0,00025	2,50	1,25
<i>R. pyridinivorans</i>				
ИЭГМ 639	0,16	0,04	10,00	5,00
ИЭГМ 1055 ^T	0,02	0,005	2,50	1,25
ИЭГМ 1142	0,16	0,08	5,00	1,25
<i>R. qingshengii</i>				
ИЭГМ 247	0,02	0,01	10,00	1,25
ИЭГМ 267	0,01	0,005	1,25	1,25
ИЭГМ 1016 ^T	0,02	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 1262	0,16	0,04	5,00	1,25
ИЭГМ 1270	0,08	0,04	10,00	1,25
<i>R. rhodochrous</i>				
ИЭГМ 62 ^T	0,04	0,02	5,0	1,25
ИЭГМ 64	0,16	0,02	2,5	1,25
ИЭГМ 629	0,32	0,04	10,00	2,50
ИЭГМ 646	1,25	0,63	1,25	0,63

Приложение А (продолжение)

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
ИЭГМ 647	0,32	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 1137	0,32	0,08	5,00	1,25
ИЭГМ 1162	1,25	0,04	20,00	10,00
ИЭГМ 1298	0,32	0,04	10,00	1,25
<i>R. ruber</i>				
ИЭГМ 77	0,32	0,08	1,25	0,32
ИЭГМ 81	0,04	0,01	2,50	1,25
ИЭГМ 85	0,08	0,04	5,00	1,25
ИЭГМ 90	0,63	0,02	0,63	0,08
ИЭГМ 91	0,32	0,02	40,00	10,00
ИЭГМ 92	0,16	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 93	0,08	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 231	0,16	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 232	0,08	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 233	0,08	0,02	0,63	0,08
ИЭГМ 241	0,32	0,02	1,25	0,63
ИЭГМ 337	0,63	0,32	2,50	1,25
ИЭГМ 376	0,32	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 377	0,32	0,08	5,00	1,25
ИЭГМ 378	0,01	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 379	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 380	0,01	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 381	0,01	0,0025	1,25	1,25
ИЭГМ 382	0,01	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 383	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 384	0,16	0,0025	5,00	1,25
ИЭГМ 385	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 386	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 387	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 436	0,01	0,0025	10,00	1,25
ИЭГМ 437	0,32	0,02	2,50	0,63
ИЭГМ 438	0,16	0,01	1,25	0,32
ИЭГМ 439	0,16	0,16	2,50	0,63

Приложение А (продолжение)

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
ИЭГМ 440	0,32	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 441	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 442	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 443	0,32	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 445	0,32	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 446	0,01	0,0025	2,50	0,63
ИЭГМ 447	0,01	0,0025	1,25	0,63
ИЭГМ 449	0,63	0,08	2,50	0,63
ИЭГМ 450	0,32	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 452	0,01	0,0025	2,50	0,63
ИЭГМ 453	1,25	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 454	0,01	0,0025	2,50	1,25
ИЭГМ 455	0,16	0,01	1,25	1,25
ИЭГМ 456	0,16	0,16	1,25	1,25
ИЭГМ 457	0,01	0,0025	1,25	1,25
ИЭГМ 468	0,16	0,0025	1,25	1,25
ИЭГМ 471	0,32	0,08	5,00	1,25
ИЭГМ 472	0,04	0,02	5,00	1,25
ИЭГМ 474	0,32	0,08	5,00	1,25
ИЭГМ 475	0,32	0,02	2,50	0,63
ИЭГМ 476	0,32	0,01	1,25	0,63
ИЭГМ 478	0,32	0,02	0,63	0,08
ИЭГМ 480	0,32	0,16	1,25	1,25
ИЭГМ 560	0,08	0,04	10,00	2,50
ИЭГМ 561	0,32	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 565	0,16	0,08	1,25	0,08
ИЭГМ 583	0,63	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 584	0,63	0,16	2,50	1,25
ИЭГМ 612	0,08	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 657	0,32	0,04	2,50	1,25
ИЭГМ 759	0,16	0,08	2,50	1,25
ИЭГМ 896	0,16	0,02	2,50	1,25
ИЭГМ 1126	0,32	0,04	2,50	1,25

Приложение А (продолжение)

Штамм	МПК, мМ			
	Hg ²⁺ МПБ	Hg ²⁺ МС	MoO ₄ ²⁻ МПБ	MoO ₄ ²⁻ МС
ИЭГМ 1127	0,16	0,02	2,50	0,63
ИЭГМ 1129	0,32	0,08	2,50	0,63
ИЭГМ 1130	0,01	0,0025	2,50	0,32
ИЭГМ 1217	0,32	0,08	2,50	2,50
ИЭГМ 1352	0,02	0,0025	10,00	2,50
<i>R. wratislaviensis</i>				
ИЭГМ 1171	0,16	0,0025	5,00	1,25
<i>R. yunnanensis</i>				
ИЭГМ 1323	0,01	0,01	5,00	2,50

Примечание: * – приведены средние значения; T – типовой штамм.

Приложение Б. ОЧИСТКА ИМИТИРОВАННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

Таблица Б1 – Показатели очистки СВ № 1 микробными биокатализаторами на основе *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560

ТМ	Извлечение ТМ, Е, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	ИЭГМ 735	ИЭГМ 560	Консорциум 735+560	Носитель (контроль)	
Cd	96,0	96,0	96,0	8,0	100,0
Cu	87,5	76,3	63,5	5,0	72,5
Mo	89,4	87,1	94,5	5,1	99,8
Ni	99,1	98,9	99,1	3,6	99,4
Zn	100,0	100,0	100,0	8,6	100,0
Cr ⁺⁶	61,8	45,5	54,6	4,5	67,7
Fe _{общ.}	4,4	1,0	38,6	0,5	45,0
Pb	100,0	100,0	100,0	7,1	100,0

Примечание: Е, % (Эффективность) – процент извлечения ТМ из раствора от исходного количества металла.

Таблица Б2 – Показатели очистки СВ № 2 микробными биокатализаторами на основе *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560

ТМ	Извлечение ТМ, Е, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	ИЭГМ 735	ИЭГМ 560	Консорциум 735+560	Носитель (контроль)	
As	79,5	80,1	84,2	2,3	89,0
Cd	86,8	85,3	100,0	5,8	100,0
Cu	40,8	42,7	31,9	1,9	66,0
Hg	37,9	39,1	46,4	1,1	47,5

Продолжение Таблицы Б2

Mg	62,5	59,6	71,7	6,3	72,9
Mo	79,9	83,3	90,2	2,1	91,2
Mn	96,0	96,1	96,7	2,5	97,7
Ni	86,8	85,3	88,3	6,6	91,2
Zn	74,4	69,7	99,8	2,6	100,0
Cr	56,4	79,9	100,0	10,0	100,0
Fe _{общ.}	56,3	53,2	60,6	8,1	67,5
Pb	100,0	100,0	100,0	6,7	100,0

Примечание: E, % (Эффективность) – процент извлечения ТМ из раствора от исходного количества металла.

Таблица Б3 – Показатели очистки СВ № 3 микробными биокатализаторами на основе ассоциации *G. rubripertincta* ИЭГМ 129 и *R. erythropolis* ИЭГМ 344

ТМ	Извлечение ТМ, E, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	ИЭГМ 129	ИЭГМ 344	Консорциум 129+344	Носитель (контроль)	
As	69,2	65,0	73,5	1,5	79,1
Mn	70,4	69,1	75,7	3,3	85,6
Ni	91,7	91,7	91,7	9,4	91,7
Cu	95,2	94,3	95,3	5,6	98,6
Zn	94,9	93,9	95,9	10,1	98,9
Cd	57,9	47,4	81,1	7,6	93,7
Mo	96,1	92,3	97,5	3,4	100,0

Примечание: E, % (Эффективность) – процент извлечения ТМ из раствора от исходного количества металла.

Таблица Б4 – Показатели очистки СВ № 4 микробными биокатализаторами на основе ассоциации *R. ruber* ИЭГМ 453 и *R. fascians* ИЭГМ 535

ТМ	Извлечение ТМ, Е, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	ИЭГМ 453	ИЭГМ 535	Консорциум 453+535	Носитель (контроль)	
Mg	49,1	50,3	55,1	4,0	66,2
Fe	35,0	34,4	41,7	2,5	42,9
Mn	41,8	41,8	39,1	2,3	80,9
Ni	98,9	88,9	100,0	1,3	100,0
Zn	45,2	41,9	69,8	4,8	63,5
Cu	79,6	78,4	83,2	6,1	92,3
Pb	99,8	90,7	100,0	4,7	100,0
Hg	65,8	70,2	87,5	9,1	95,3
Cr	91,9	95,8	100,0	4,9	100,0

Примечание: Е, % (Эффективность) – процент извлечения ТМ из раствора от исходного количества металла.

Таблица Б5 – Показатели очистки СВ № 5 микробными биокатализаторами на основе *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560

ТМ	Извлечение ТМ, Е, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	ИЭГМ 735	ИЭГМ 560	Консорциум 735+560	Носитель (контроль)	
As	95,8	95,4	97,2	5,2	98,9
Cu	99,9	98,3	99,2	8,0	100,0
Mo	83,1	89,4	96,8	5,7	100,0
Ni	99,6	95,5	97,5	5,0	100,0

Продолжение Таблицы Б5

Zn	85,4	88,2	99,6	2,0	100,0
Cr ⁺⁶	99,4	98,8	99,9	9,2	100,0
Fe _{общ.}	91,6	90,8	90,3	6,7	96,7

Примечание: E, % (Эффективность) – процент извлечения ТМ из раствора от исходного количества металла.

Таблица Б6 – Показатели очистки СВ № 6 микробными биокатализаторами на основе ассоциации *R. ruber* ИЭГМ 453 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162

ТМ	Извлечение ТМ, Е, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	ИЭГМ 453	ИЭГМ 1162	Консорциум 453+1162	Носитель (контроль)	
As	100	100	100	7,5	100
Mn	38,1	79,2	42,3	9,5	47,6
Pb	50,1	66,7	66,7	0,1	83,3
Ni	100	100	100	9,1	100
Hg	46,9	62,3	38,3	6,1	64,1

Примечание: E, % (Эффективность) – процент извлечения ТМ из раствора от исходного количества металла.