

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
“ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ”

На правах рукописи

Тюмина Елена Александровна

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

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,

академик РАН **Ившина Ирина Борисовна**

Пермь – 2019

Оглавление

Введение	5
Обзор литературы.....	14
Глава 1. Диклофенак натрия – высокотоксичный экополлютант	14
1.1. Общая характеристика нестероидного противовоспалительного соединения диклофенака	14
1.2. Обнаружение диклофенака в экосистемах и живых организмах	17
1.3. Экотоксические эффекты диклофенака.....	24
1.3.1. Острая и хроническая токсичность диклофенака.....	24
1.3.2. Экотоксические эффекты диклофенака на беспозвоночных и позвоночных животных.....	25
1.3.3. Экотоксические эффекты диклофенака на растения.....	33
1.3.4. Экотоксические эффекты диклофенака на микроорганизмы.....	33
1.3.5. Экотоксические эффекты продуктов абиотической трансформации диклофенака.....	34
1.4. Биодеструкция диклофенака.....	35
1.4.1. Биодеструкция диклофенака с использованием грибов	36
1.4.2. Биодеструкция диклофенака с использованием бактерий	42
1.4.3. Ферменты, участвующие в трансформации диклофенака.....	45
1.5. Родококки – биоокислители фармполлютантов	47
Экспериментальная часть.....	60
Глава 2. Материалы и методы исследования	60
2.1. Рабочая коллекция	60
2.2. Химические реагенты	60
2.3. Условия культивирования.....	60
2.4. Контрольные эксперименты	69
2.5. Иммунизация бактериальных клеток.....	70
2.6. Получение отдельных клеточных фракций родококков.....	73
2.7. Жизнеспособность бактериальных клеток.....	74
2.8. Минимальная подавляющая концентрация диклофенака	75

2.9. Микроскопические исследования	76
2.10. Гидрофобность клеток.....	77
2.11. Дзета-потенциал.....	77
2.12. Общие липиды.....	78
2.13. Дыхательная активность	78
2.14. Каталазная активность.....	79
2.15. Содержание глюкозы в среде культивирования.....	79
2.16. Содержание хлоридов в среде культивирования.....	80
2.17. Математическое моделирование процесса биодеструкции диклофенака.....	81
2.18. Количественный и качественный анализ диклофенака и его метаболитов	81
2.19. Фитотоксичность диклофенака и продуктов его биодеструкции.....	82
2.20. <i>In silico</i> анализ продуктов биодеструкции диклофенака	83
2.20.1. Биологическая активность продуктов биодеструкции диклофенака.....	83
2.20.2. Экологическая токсичность продуктов биодеструкции диклофенака.....	84
2.21. Статистическая обработка результатов	84
Глава 3. Исследование способности коллекционных штаммов родококков к деструкции диклофенака.....	85
3.1. Определение устойчивости родококков к диклофенаку.....	85
3.2. Биодеструкция диклофенака свободными клетками родококков	88
3.3. Биодеструкция диклофенака иммобилизованными родококками.....	93
3.4. Кинетическое моделирование процесса биодеструкции диклофенака..	98
Глава 4. Ответные реакции родококков на токсическое воздействие диклофенака.....	107
4.1. Изменение морфометрических характеристик родококков под воздействием диклофенака	107
4.2. Влияние диклофенака на физико-химические характеристики родококков	112

4.3. Биодеструкция диклофенака с использованием отдельных клеточных фракций	117
Глава 5. Пути биодеструкции диклофенака. Токсичность продуктов его биодеструкции.....	120
5.1. Предполагаемые пути биодеструкции диклофенака.....	120
5.2. Фитотоксичность диклофенака и продуктов его биодеструкции.....	127
5.3. Экоотоксичность продуктов биодеструкции диклофенака	129
5.4. Биологическая активность продуктов биодеструкции диклофенака ...	132
Заключение.....	134
Выводы.....	139
Список сокращений.....	140
Список литературы.....	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В последние годы массовое развитие получают исследования механизмов поступления фармацевтических препаратов и их производных в окружающую среду, а также изменений, происходящих в открытых экосистемах с этими высокостабильными соединениями с разнообразной химической структурой и выраженной биологической активностью.

На сегодня в водных объектах 71 страны мира обнаружено более 1000 химических веществ, относящихся к фармацевтическим препаратам (aus der Beek *et al.*, 2016). Чаще всего и в сравнительно низких концентрациях (от десятков нг/л до сотен мкг/л) – это тотально применяемые антибиотики, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), гормоны, спазмолитики, гиполипидемические препараты, терапевтические средства для лечения рака, антиэпилептики и антидепрессанты, а также статины и противодиабетические препараты, все чаще потребляемые в связи с распространением малоподвижного образа жизни людей, обусловленного урбанизацией (Fatta-Kassinos *et al.*, 2011; aus der Beek *et al.*, 2016; Letsinger *et al.*, 2019). Проблема фармацевтического загрязнения приобрела планетарный характер по масштабам и по значимости. Оно обнаружено даже в особо охраняемых регионах, таких как Антарктика, территория которой до недавнего времени считалась неподверженной антропогенному воздействию (González-Alonso *et al.*, 2017). Несмотря на относительно низкие уровни присутствия фармпрепаратов, их постоянное пополнение в водных средах может привести к высоким долговременным концентрациям и стимулировать потенциально отрицательное воздействие на человека и окружающую среду (Ji *et al.*, 2013; Básci *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Mezzelani *et al.*, 2018).

В связи с этим наблюдается нарастание фундаментального интереса к изучению степени биодоступности и токсического воздействия фармполлютантов на природные микроорганизмы, играющие роль системы первичного реагирования и инициирующие адаптивные реакции. Эти исследования позволят

установить потенциал последствия и снизить риск, возникающий от присутствия фармполлютантов для окружающей среды и здоровья человека. Микроорганизмы, деградирующие фармполлютанты, могут применяться для детоксикации промышленных стоков. Среди микроорганизмов, участвующих в процессах самоочищения природных экосистем, важную экологическую роль в биологической детоксикации и деконтаминации почв и воды могут играть актинобактерии рода *Rhodococcus* – устойчивые обитатели загрязненных почв, водоемов, активных илов, сточных вод, обладающие высокой активностью оксидоредуктаз, богатыми адаптивными возможностями в отношении различных токсических соединений, а также высоким потенциалом для биоремедиации загрязненных объектов (Larkin *et al.*, 2006; Ivshina *et al.*, 2017; de Carvalho, 2019; Krivoruchko *et al.*, 2019). Актуальность использования метаболического потенциала родококков для биодegradации фармвеществ подтверждается всё возрастающим числом их исследований (Kim *et al.*, 2007; Evangelista *et al.*, 2008; O’Grady *et al.*, 2009; Gauthier *et al.*, 2010; Larcher, Yargeau, 2011; Maia *et al.*, 2018; Thelusmond *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2019). Продемонстрирована способность родококков к полной биодеструкции фармпрепаратов группы обезболивающих и спазмолитических средств, в том числе парацетамола (Ivshina *et al.*, 2006), дротаверина гидрохлорида (Ivshina *et al.*, 2012, 2015). В настоящей работе интерес представлял анализ возможного участия их в качестве биоокислителей фармпрепаратов группы полициклических НПВС, наиболее часто детектируемых в окружающей среде (aus der Beek *et al.*, 2016; Márta *et al.*, 2018).

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

Диапазон фактических концентраций часто детектируемого ДН в грунтовых (Sui *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017), поверхностных (в том числе морских) (Huebner *et al.*, 2015; Nebot *et al.*, 2015; Alygizakis *et al.*, 2016; UNESCO, HELCOM, 2017),

сточных водах (Singh *et al.*, 2014; Vieno, Sillanpää, 2014; Dasenaki, Thomaidis, 2015; Agunbiade, Moodley, 2016; Kot-Wasik *et al.*, 2016; Rivera-Jaimes *et al.*, 2018) и даже питьевых водах (Khan, Nicell, 2015; Simazaki *et al.*, 2015) по всему миру варьирует от 0,02 нг/л до 110 мкг/л. Помимо неметаболизируемого ДН в сточных водах и речных отложениях детектированы его метаболиты (4'-гидроксидиклофенак, 5-гидроксидиклофенак и *p*-бензохинонимин 5-гидроксидиклофенака) (Gröning *et al.*, 2007; Vouju *et al.*, 2016).

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

ДН ингибирует рост зеленых водорослей (Bácsi *et al.*, 2016), индуцирует оксидативный стресс и инактивацию биологических защитных реакций в организме моллюсков и рыб, а также нарушение их общей продуктивности (Boisseaux *et al.*, 2017; Balbi *et al.*, 2018; McRae *et al.*, 2018; Horie *et al.*, 2019). ДН, используемый в ветеринарной практике в странах Южной Азии, и выраженная его нефротоксичность явились причиной исчезновения отдельных популяций грифов (*Gyps bengalensis*, *G. indicus*, *G. tenuirostris*) на индийском субконтиненте (Oaks *et al.*, 2004). Кроме того, ДН может биоаккумулироваться в пищевой цепочке внутриводоёмных экосистем. ДН обнаружен в шерсти выдр (*Lutra lutra*), что свидетельствовало о загрязнении им водных экосистем и рыбной фауны –

среды обитания и кормовой базы этих животных (Richards *et al.*, 2011). ДН не безопасен и для человека, длительное воздействие препарата сопровождается поражением печени (Sriuttha *et al.*, 2018) и желудочно-кишечного тракта (Aysan *et al.*, 2018).

Использование традиционных физико-химических методов и новых окислительных технологий удаления фармацевтических загрязнителей из водных растворов экологически не безопасно, поскольку ограничено возможностью образования побочных продуктов деструкции фармполлютантов и весьма затратно в связи с высокими эксплуатационными расходами и энергозатратами, и труднодоступно для большинства регионов (Fischer *et al.*, 2015; Márquez Brazón *et al.*, 2016; Schröder *et al.*, 2016). В связи с этим потребность в инновационных технологиях, направленных на эффективную детоксикацию и выведение органических микрозагрязнителей из водных и сухопутных экосистем, остается.

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

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

Основные задачи исследования

1. Исследовать каталитическую активность родококков в отношении ДН. Отобрать штаммы – активные биодеструкторы ДН. Рассчитать параметры динамики процесса биодеструкции ДН методом математического моделирования.

2. Изучить ответные реакции родококков на воздействие ДН.

3. Определить основные продукты и возможные пути разложения ДН. Оценить степень токсичности продуктов биодеструкции ДН.

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

ДН задействованы цитохром Р450-зависимые монооксигеназы. Описаны возможные пути бактериальной метаболизации ДН. Впервые получены сведения, подтверждающие разрыв связи С-N и раскрытие ароматического кольца в молекуле ДН с образованием нетоксичных конечных метаболитов. Спрогнозирована биоактивность отдельных продуктов метаболизации ДН.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные сведения расширяют представление о биодеструктурирующем потенциале актинобактерий рода *Rhodococcus* и их возможном вкладе в нейтрализацию и детоксикацию фармполлютантов. Отобран штамм *R. ruber* ИЭГМ 346, способный к полной биодegradации ДН (50 мкг/л) в течение 6 сут. Определены основные пути разложения ДН через метаболизацию первичных гидроксильированных производных, приводящих к разрыву связи С-N в структуре ДН с образованием фенилуксусной кислоты и раскрытию хинонового цикла с образованием фумарилацетоуксусной кислоты и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной и фумаровой кислот, которые могут считаться продуктами детоксикации ДН. Штамм *R. ruber* ИЭГМ 346 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ Ас-2106. Получено Положительное решение о выдаче патента на изобретение РФ “Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия” (заявка № 2018132086/10(052377)) от 23.09.2019. Результаты исследования используются в лекционных курсах “Биоразнообразие и систематика микроорганизмов” и “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков” для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штамме-биодеструкторе ДН внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет (www.iegmcol.ru).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Актинобактерии рода *Rhodococcus* способны к использованию ДН в качестве единственного источника углерода и энергии. Наиболее выраженной (МПК \geq 200 мг/л) устойчивостью к ДН характеризуются представители

экологически значимых видов *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*. Полное разложение 50 мкг/л ДН с использованием штамма *R. ruber* ИЭГМ 346 достигается на 6 сут эксперимента в присутствии глюкозы (0,5 %) и кратковременной адаптации клеток в присутствии 5 мкг/л ДН. Кинетическое моделирование, параллельное проводимым экспериментам, позволяет определить продолжительность процесса биодеструкции ДН.

2. Воздействие ДН на родококки сопровождается образованием многоклеточных агрегатов в жидкой среде, изменением морфометрических параметров и дзета-потенциала клеточной поверхности, увеличением содержания суммарных клеточных липидов и степени гидрофобности клеточной стенки, а также изменением каталазной активности. Процесс биодеструкции ДН катализируется цитоплазматическими и мембраносвязанными ферментными комплексами. В процессах начального окисления молекулы ДН задействованы цитохром Р450-зависимые монооксигеназы.

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

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Школе кадрового резерва российской науки и экономики “Развитие науки как средство достижения целей устойчивого развития”, Москва, 2015; II Всероссийском научном форуме “Наука будущего – наука молодых”, Казань, 2016; Региональной студенческой научной конференции “Фундаментальные исследования в биологии и экологии”, Пермь, 2015, 2017, 2018; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”, Пермь, 2016; IV Международной конференции “Микробное разнообразие: ресурсный потенциал (ICOMID)”, Москва, 2016; 7th Congress of European Microbiologists “FEMS–2017”, Valencia, Spain, 2017; II

Международной (XV Региональной) научной конференции “Техногенные системы и экологический риск”, Обнинск, 2018; 2nd International Conference „Smart Bio“, Kaunas, Lithuania, 2018; II Международной научно-практической конференции “Высокие технологии, определяющие качество жизни”, Пермь, 2018; XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием “Симбиоз–Россия 2019”, Пермь, 2019; 8th Congress of European Microbiologists “FEMS–2019”, Glasgow, UK, 2019.

По теме диссертации опубликованы 12 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, входящих в международные системы научного цитирования Web of Science и Scopus (Scientific Reports, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, Microbiology Australia).

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

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

исследований автора. Исследования с использованием системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования проводили на базе кабинета микроскопии *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Расшифровку путей биодеструкции ДН проводили на базе кафедры аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии (зав. лабораторией – д.фарм.н., проф. Вихарева Е.В.). Математическое моделирование процесса биодеструкции ДН выполнено на базе кафедры вычислительной математики, механики и биомеханики Пермского национального политехнического университета (зав. кафедрой – д.т.н., профессор Столбов В.Ю.).

Глава 1. ДИКЛОФЕНАК НАТРИЯ – ВЫСОКОТОКСИЧНЫЙ ЭКОПОЛЛЮТАНТ

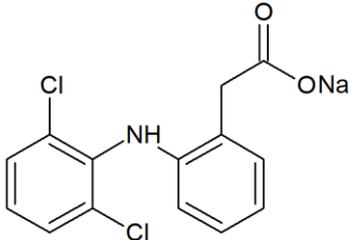
1.1. Общая характеристика нестероидного противовоспалительного соединения диклофенака

Диклофенак натрия (ДН, *син.* Вольтарен[®], Ортофен[®]) – одно из наиболее популярных фармацевтических веществ группы нестероидных противовоспалительных средств (Lonappan *et al.*, 2016a), оказывающее выраженное противовоспалительное действие, а также мощный анальгетический, антипиретический и противоопухолевый эффект (Altman *et al.*, 2015; Pantziarka *et al.*, 2016). Соединение впервые синтезировано в 1966 году в исследовательской лаборатории фирмы “Гейги” в ходе реализации программы по разработке противовоспалительного препарата с улучшенными биологическими свойствами (Данилов, 2009). Изначально ДН применялся главным образом в лечении ревматологических заболеваний, но, в последующем, область применения ДН существенно расширилась. В настоящее время ДН применяется в хирургии, травматологии, неврологии, гинекологии (Данилов, 2009). ДН входит в перечень жизненно важных лекарственных препаратов в 74 странах мира и занимает одно из лидирующих мест на фармацевтическом рынке (Lonappan *et al.*, 2016a). По подсчетам (Асиña *et al.*, 2015), прогнозируемое глобальное потребление ДН составляет 1443 тонн/г. В России ДН занимает лидирующие позиции в структуре рынка НПВС: доля препаратов ДН составляет 25,6 % от общего числа препаратов группы НПВС (Олейникова, Пожидаева, 2018). Согласно Регистру лекарственных средств, в Российской Федерации зарегистрировано 88 торговых названий монокомпонентных и комплексных препаратов ДН (<https://www.rlsnet.ru/>). Разнообразие выпускаемых лекарственных форм обуславливают высокий потребительский спрос ДН у населения (Жураховская и др., 2014).

ДН представляет собой кристаллический порошок от желтовато-белого до светло-бежевого цвета, хорошо растворим в воде, метаноле и этаноле,

практически нерастворим в хлороформе. Прочие физико-химические характеристики ДН представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические свойства ДН

Структура	
Молекулярная формула	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$
Название ИЮПАК	2-(2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота (в виде натриевой соли)
CAS	15307-79-6
Молекулярный вес	318,13 г/М
Растворимость в воде	2,37 мг/л (25 °С)
Константа Генри	$4,79 \times 10^{-7}$ Па м ³ /М (25 °С)
Температура кипения	412 °С
Температура плавления	283–285 °С
pKa (константа диссоциации)	4,15
Log K _{ow} (коэффициент распределения октанол-вода)	4,51

Основным механизмом действия ДН считается торможение биосинтеза простагландинов. ДН является мощным неселективным ингибитором циклооксигеназы (ЦОГ) *in vitro* и *in vivo*, тем самым снижая синтез простагландинов, простациклинов и тромбоксановых продуктов. Так же, как и другие НПВС, ДН является мощным обратимым ингибитором вторичной фазы индуцированной агрегации тромбоцитов. Однако ДН в обычных терапевтических дозах мало влияет на время кровотечения. Препарат также влияет на функцию полиморфноядерных лейкоцитов, уменьшая хемотаксис, продукцию супероксида и продукцию протеазы (Todd, Sorkin, 1988).

ДН подвергается практически полной метаболизации в организме человека, только около 1 % вещества выделяется в неизменном виде (рисунок 1). Данный НПВС в I фазе метаболизма гидроксилируется цитохром Р450-зависимыми оксигеназами (СУР), а во II фазе конъюгируется с глюкуроновой кислотой и аминокислотой таурин.

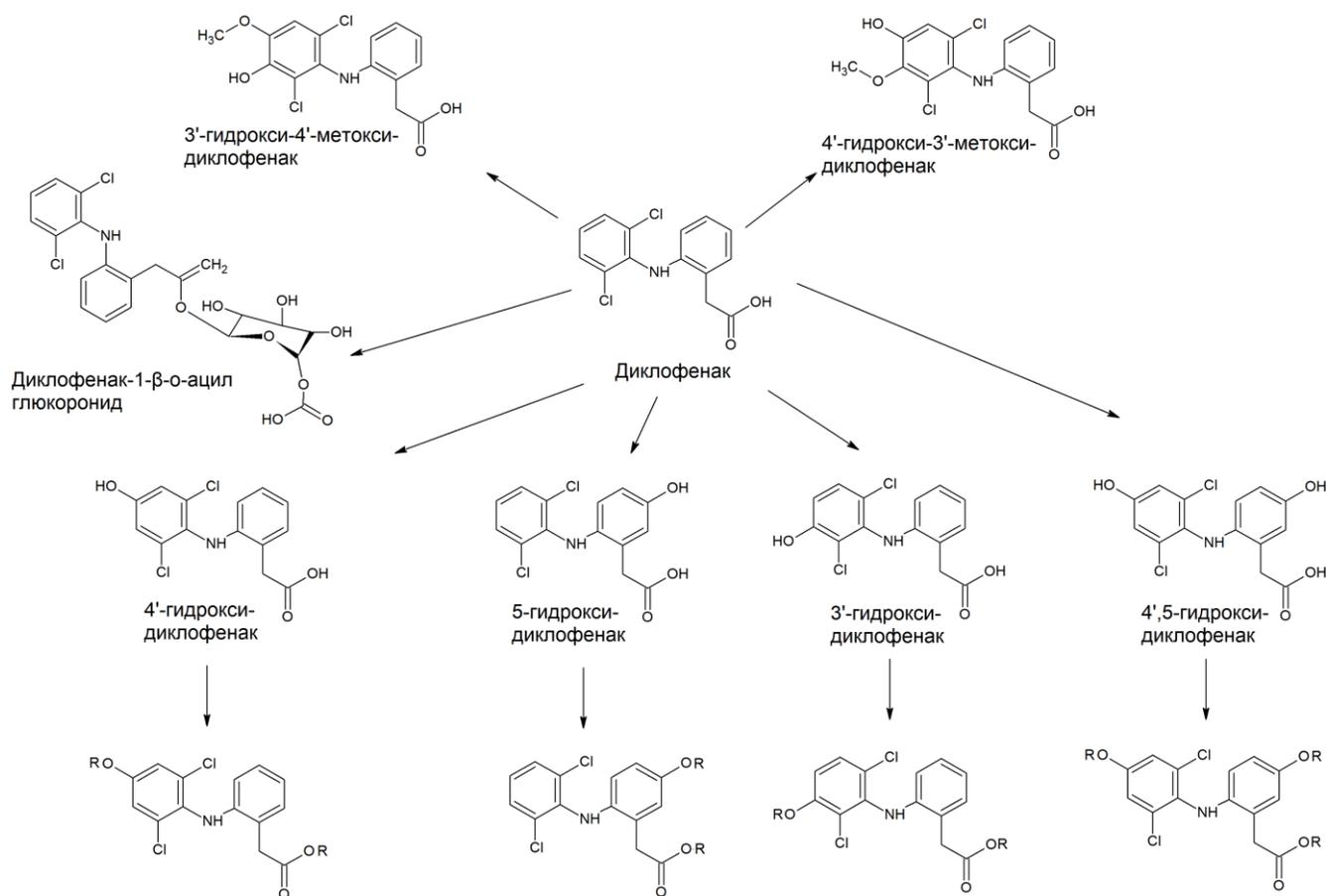


Рисунок 1 – **Метаболический путь ДН в организме человека** (цит. по Vieno, Sillanpää, 2014).

Во II фазе метаболизма образуются глюкуронидные и сульфатные конъюгаты ДН, доля которых составляет 11 % от потребленной дозы. Оставшиеся 88 % потребленной дозы ДН выводятся в виде метаболитов или их конъюгатов (Vieno, Sillanpää, 2014).

ДН известен наличием выраженных побочных эффектов на желудочно-кишечный тракт и почки (Niu *et al.*, 2015; Aysan *et al.*, 2018). Описаны клинические случаи нарушений тканей печени, острого и хронического гепатита, апоптоза и изменений функции митохондрий в гепатоцитах (Bessone, 2010; Sriuttha *et al.*, 2018). Среди всех НПВС прием ДН сопровождается наиболее высоким риском развития панкреатита (Pezzilli *et al.*, 2010). Кроме того, ДН является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний (Schmidt *et al.*, 2018).

Физико-химические свойства ДН обуславливают его опасность для открытых экосистем, водных и наземных организмов. Молекула ДН содержит два

ароматических кольца, развернутых по отношению друг к другу на 69°. Наличие двух атомов хлора в химической структуре, термодинамическая стабильность бензольного кольца определяют высокую устойчивость этого ароматического хлорированного азотсодержащего соединения к биоразложению, токсичность, способность к персистированию и, следовательно, опасность для окружающей среды (Richards *et al.*, 2011; UNESCO, HELCOM, 2017). Коэффициент распределения ДН в системе *n*-октанол-вода ($\log K_{ow}$), равный 4,51 (Barra Caracciolo *et al.*, 2015), свидетельствует о липофильности этого химического вещества, что может способствовать его потенциальной биоаккумуляции в живых организмах и прежде всего в объектах гидробиоты.

1.2. Обнаружение диклофенака в экосистемах и живых организмах

ДН является наиболее часто детектируемым в окружающей среде фармполлютантом: он обнаружен в водных объектах 50-и стран по всему миру (aus der Beek *et al.*, 2016). Диапазон фактических концентраций ДН в грунтовых, поверхностных (речные, озерные, морские, океанические), сточных водах (муниципальные, больничные, промышленные) и даже питьевой воде варьирует от 0,02 нг/л до 110 мкг/л (таблица 2). Помимо неметаболизируемого ДН в сточных водах и речных отложениях детектированы его метаболиты (4'-гидроксидиклофенак, 5-гидроксидиклофенак и *p*-бензохинонимин 5-гидроксидиклофенака) (Bouju *et al.*, 2016). Следует особо отметить, что ДН обнаружен даже в особо охраняемых регионах, таких как Антарктика, территория которой до недавнего времени считалась неподверженной антропогенному воздействию (González-Alonso *et al.*, 2017).

Попадание ДН в окружающую среду главным образом происходит с бытовыми сточными водами (Zhang *et al.*, 2018a), поскольку ДН полностью не метаболизируется в организме человека, и часть исходного соединения выделяется в неизменном виде или в комплексах с глюкуроновой кислотой (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008). Отсутствие строгого контроля в сфере оборота лекарственных средств приводит к тому, что непригодные для медицинского

Таблица 2 – Обнаружение ДН в окружающей среде

Страна	Источник обнаружения	Концентрация, нг/л	Литературный источник
Антарктида (Аргентинская станция)	Сточные воды	15087	González-Alonso <i>et al.</i> , 2017
	Эфемерные стоки	84–7761	
	Стоки ледника	77	
Босния и Герцеговина	Поверхностные воды (речные)	10–82	Toušová <i>et al.</i> , 2019
Бразилия	Поверхностные воды (морские)	19,4	Pereira <i>et al.</i> , 2016
Великобритания	Поверхностные воды (эстуарий)	250,8	Letsinger <i>et al.</i> , 2019
Канада	Сточные воды (очищенные)	15,95–830	Comeau <i>et al.</i> , 2008; Lonappan <i>et al.</i> , 2016b; Saunders <i>et al.</i> , 2016
	Поверхностные воды (речные)	4–6	Comeau <i>et al.</i> , 2008
Чехия	Поверхностные воды (речные)	1080	Marsik <i>et al.</i> , 2017
Китай	Поверхностные воды (речные)	1,8–1300	Yang <i>et al.</i> , 2017
	Поверхностные воды (озера)	3,3–230,5	Ma <i>et al.</i> , 2016
	Сточные воды (неочищенные)	128,6–1027,1	Zhang <i>et al.</i> , 2018a
	Сточные воды (очищенные)	7,9–237,7	
	Грунтовые воды	0,3–750	Yang <i>et al.</i> , 2017
Хорватия	Сточные воды (очищенные)	113–732	Česen <i>et al.</i> , 2019
	Поверхностные воды (речные)	0,0649–2,35	
Колумбия	Сточные воды (неочищенные)	81–717	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2018
	Сточные воды (очищенные)	111–446	
	Больничные сточные воды	1080–3040	
Коста-Рика	Поверхностные воды (речные)	< 12–266	Spongberg <i>et al.</i> , 2011
	Поверхностные воды (морские)	< 14	
	Питьевая вода	< 12	
	Сточные воды (очищенные)	62	
Финляндия	Сточные воды (неочищенные)	250–750	Lindholm-Lehto <i>et al.</i> , 2016
	Сточные воды (очищенные)	1000–2250	
	Поверхностные воды (озера)	20–470	
Франция	Поверхностные воды (речные)	20–70	Vystavna <i>et al.</i> , 2012
Германия	Поверхностные воды (морские)	54	UNESCO, HELCOM, 2017
	Поверхностные воды (речные)	9–79	Huebner <i>et al.</i> , 2015
	Сточные воды (неочищенные)	2100–3900	
	Сточные воды (очищенные)	1600–2900	
Греция	Сточные воды (неочищенные)	514–4869	Dasenaki, Thomaidis, 2015

Страна	Источник обнаружения	Концентрация, нг/л	Литературный источник
Греция	Сточные воды (очищенные)	761–2668	Dasenaki, Thomaidis, 2015; Papageorgiou <i>et al.</i> , 2016
	Поверхностные воды (морские)	< 1,4–16,3	Alygizakis <i>et al.</i> , 2016
	Донные отложения	234 нг/г	Koumaki <i>et al.</i> , 2017
Венгрия	Поверхностные воды (речные)	24–931	Helenkár <i>et al.</i> , 2010
Индия	Сточные воды (неочищенные)	1430–25680	Singh <i>et al.</i> , 2014
Ирландия	Сточные воды (очищенные)	310–2630	McEneff <i>et al.</i> , 2014
	Поверхностные воды (морские)	110–460	
Япония	Источник питьевых вод (до очистки)	44	Simazaki <i>et al.</i> , 2015
	Питьевая вода (очищенная)	16	
Иордания	Поверхностные воды (речные)	160	Tiehm <i>et al.</i> , 2011
	Сточные воды (очищенные)	390	
Кения	Сточные воды (неочищенные)	930–1510	K'oreje <i>et al.</i> , 2016
	Сточные воды (очищенные)	30–61	
	Поверхностные воды (речные)	30–730	
Малайзия	Поверхностные воды (речные)	15,49	Praveena <i>et al.</i> , 2018
Мексика	Поверхностные воды (речные)	28–1398	Félix-Cañedo <i>et al.</i> , 2013; González-González <i>et al.</i> , 2014; Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018
	Сточные воды (неочищенные)	2325–2470	Rivera-Jaimes <i>et al.</i> , 2018
	Сточные воды (очищенные)	1865–2180	Félix-Cañedo <i>et al.</i> , 2013
	Грунтовые воды	1	
Новая Зеландия	Грунтовые воды	1000	Moreau <i>et al.</i> , 2019
Пакистан	Сточные воды (неочищенные)	2–600	Khan <i>et al.</i> , 2018
Польша	Сточные воды (неочищенные)	3–11720	Kot-Wasik <i>et al.</i> , 2016; Kapelewska <i>et al.</i> , 2018
	Сточные воды (очищенные)	20–5401,5	
	Фильтрат под ТБО	2100–108340	Kapelewska <i>et al.</i> , 2018
	Грунтовые воды под ТБО	150–2770	
Португалия	Поверхностные воды (океанические)	34	Paíga <i>et al.</i> , 2015
	Поверхностные воды (морские)	241	Lolić <i>et al.</i> , 2015

Страна	Источник обнаружения	Концентрация, нг/л	Литературный источник
ЮАР	Донные отложения	57,2 – 309 нг/г	Agunbiade, Moodley, 2016
ЮАР	Сточные воды (неочищенные)	10001–104000	Agunbiade, Moodley, 2016; Madikizela, Chimuka, 2016; Gumbi <i>et al.</i> , 2017
	Поверхностные воды (речные)	600–8174	Agunbiade, Moodley, 2016; Gumbi <i>et al.</i> , 2017
	Сточные воды (очищенные)	20800	Madikizela, Chimuka, 2016
Россия	Сточные воды (неочищенные)	154,2–800	HELCOM, 2014
	Сточные воды (очищенные)	153,8–750	
	Сточные воды (очищенные)	0,19–0,35	Русских и др., 2014
	Поверхностные воды	3,9–270,0	
	Поверхностные воды (водохранилище)	0,025	
Саудовская Аравия	Поверхностные воды (морские)	14020	Ali <i>et al.</i> , 2017
Шотландия	Сточные воды (очищенные)	24,2–927	Nebot <i>et al.</i> , 2015
	Поверхностные воды (речные)	1,9	
Сингапур	Поверхностные воды (морские)	< 1,5–11,6	Bayen <i>et al.</i> , 2013
Словения	Сточные воды (очищенные)	487–812	Česen <i>et al.</i> , 2019
	Поверхностные воды (речные)	2,93–4,62	
Испания	Поверхностные воды (речные)	49–3363	Valcárcel <i>et al.</i> , 2011; Carmona <i>et al.</i> , 2014
	Донные отложения	15	Carmona <i>et al.</i> , 2014
	Минеральные воды	25	
	Питьевая вода	18	Carmona <i>et al.</i> , 2014; Biel-Maeso <i>et al.</i> , 2018
	Сточные воды (неочищенные)	90–195	
	Сточные воды (очищенные)	172–277	
	Поверхностные воды (океанические)	2,5	Biel-Maeso <i>et al.</i> , 2018
Украина	Поверхностные воды (речные)	2,5–250	Vystavna <i>et al.</i> , 2012
США	Источник питьевых вод	1,2	Benotti <i>et al.</i> , 2009
	Поверхностные воды (речные)	2,5–124	Sengupta <i>et al.</i> , 2014; Maruya <i>et al.</i> , 2016

использования лекарственных препараты, в том числе ДН, сливаются в канализационные системы без предварительной обработки (Bashaar *et al.*, 2017). Серьезную антропогенную нагрузку также несут сточные воды фармацевтических предприятий и медицинских учреждений, концентрации НПВС в которых достигают десятков и даже сотен мкг/л (Sim *et al.*, 2011; Simazaki *et al.*, 2015; Botero-Coy *et al.*, 2018). Очистные сооружения не справляются с фармацевтической нагрузкой – эффективность удаления ДН не превышает 30 % (Kruglova *et al.*, 2014; Dasenaki, Thomaidis, 2015; Lai *et al.*, 2016; González-Pérez *et al.*, 2017; Botero-Coy *et al.*, 2018; Rivera-Jaimes *et al.*, 2018; Tran *et al.*, 2018). Наиболее высокие уровни ДН в очищенных сточных водах зафиксированы в ЮАР (20,8 мкг/л), Польше (5,4 мкг/л), в поверхностных водах – в Саудовской Аравии (14,0 мкг/л), ЮАР (8,2 мкг/л), Испании (3,4 мкг/л) (Carmona *et al.*, 2014; Agunbiade, Moodley, 2016; Kot-Wasik *et al.*, 2016; Madikizela, Chimuka, 2016). В последнее время выявлено повышение концентрации ДН в процессе очистки сточных вод (HELCOM, 2014; Dasenaki, Thomaidis, 2015; Kot-Wasik *et al.*, 2016; Lindholm-Lehto *et al.*, 2016), что связано, по-видимому, с высвобождением глюкуроновых конъюгатов экотоксиканта (Ferrer, Thurman, 2012; HELCOM, 2014; Vieno, Sillanpää, 2014). Отдельные работы посвящены отслеживанию сезонной динамики обнаружения фармполлютантов в окружающей среде. Отмечается, что зимой концентрация ДН выше, чем в весенне-летний период, поскольку зимой турбуляция водных масс не выражена, а низкие температуры препятствуют биологической деградации экотоксиканта (Sengupta *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017).

В России исследования по обнаружению фармацевтических поллютантов в окружающей среде немногочисленны и локальны. Первые работы инициированы в 2009 г. рекогносцировочными исследованиями Института водных проблем (Москва) в интересах МГУП “Мосводоканал” с целью создания методологии обнаружения микрофармполлютантов в водных экосистемах, а также выявления фармакологической активности ксенобиотиков, не являющихся лекарствами (т.н. квазилекарства) (Баренбойм, Чиганова, 2012). В результате проведенного анализа

в водных объектах Москвы и Московской области обнаружены 49 фармацевтических соединений и 43 метаболита известных лекарственных веществ. ДН детектировали в концентрациях 0,19–0,35 нг/л в сточных и 0,025 нг/л в поверхностных водах (Баренбойм и др., 2014). Оценку фармацевтического загрязнения сточных и поверхностных вод в г. Санкт-Петербург проводили в рамках исследовательского проекта BASE Project под эгидой Хельсинкской комиссии по защите Балтийского моря (HELCOM, 2014). В сточных водах обнаружены 20 лекарственных препаратов. В обработанных сточных водах концентрация ДН составляла 153,8–750,0 нг/л (HELCOM, 2014). По данным Я.В. Русских с соавторами (2014), в поверхностных водах Санкт-Петербурга, Ленинградской области и Республики Карелия ДН обнаруживался в концентрации 3,9–270,0 нг/л. Таким образом, задокументированные концентрации ДН в водных экосистемах в России сопоставимы с мировыми уровнями фармацевтического загрязнения. Такие концентрации фармполлютанта в окружающей среде несут потенциальные экологические риски, рассчитанные по коэффициентам экологической опасности, и представляют собой источник неблагоприятных эффектов для окружающей среды (Gamarra *et al.*, 2015; Pusceddu *et al.*, 2018).

Неэффективная нейтрализация лекарств в процессе очистки сточных вод способствует их распространению в водных объектах, миграции с водотоками, воздействию на гидробиоту, биоаккумуляции и биомагнификации (Баренбойм, Чиганова, 2012). Значительные (до 20 мкг/л) концентрации ДН выявлены в очищенных сточных водах в странах Африки и Европы (Kot-Wasik *et al.*, 2016; Madikizela, Chimuka, 2016) (рисунок 2).

Высокая загрязненность природных объектов фармполлютантами обуславливает их миграцию по пищевой цепочке и биоаккумуляцию в живых организмах. Так, ДН детектировали в морских (Ericson *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2017; Mezzelani *et al.*, 2018) и пресноводных моллюсках (Xie *et al.*, 2015), рыбах (Huerta *et al.*, 2013; Tanoue *et al.*, 2015; UNESCO, HELCOM, 2017). Существуют лишь единичные работы по детектированию фармполлютантов в организме

млекопитающих. N.L. Richards с соавторами (2011) обнаружили ДН и ибупрофен в шерсти выдры (*Lutra lutra*) на территории Великобритании, что свидетельствовало о загрязнении ими водных экосистем и рыбной фауны – среды обитания и кормовой базы этих животных.

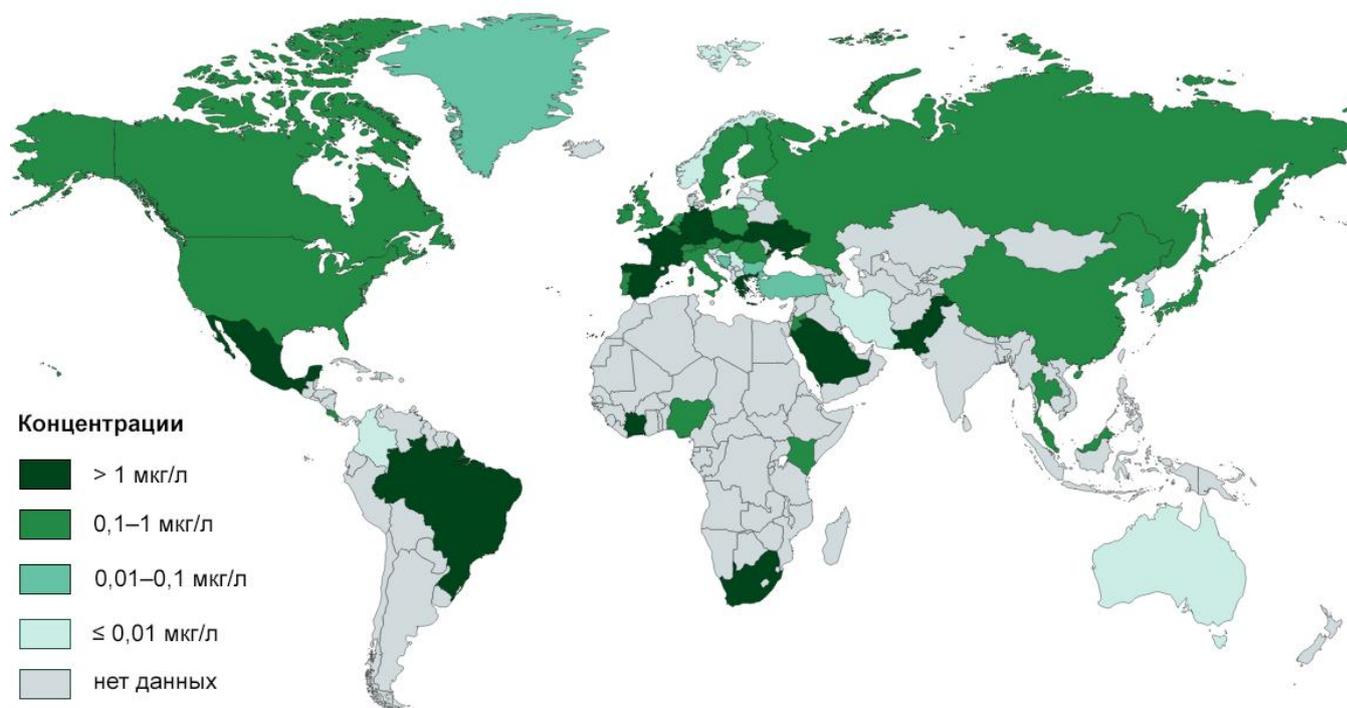


Рисунок 2 – Максимальные экологические концентрации ДН в поверхностных водах (модиф. по aus der Beek *et al.*, 2016).

Немногочисленны работы по изучению фармацевтической нагрузки на высшие растения. Высокая степень биоаккумуляции НПВС (ДН, напроксен, ибупрофен) выявлена у водных растений, например, эхинодруса Горемана (*Echinodorus horemanii*) и эйхорнии отличной (*Eichhornia crassipes*) (Pi *et al.*, 2017). Накопление токсикантов в подводном растении эхинодрусе в основном происходило в побегах, в то время как в свободноплавающей эйхорнии – в корневой системе. Способность биоаккумуляции ДН некоторыми наземными растениями (*Raphanus sativus*, *Lolium perenne*) из почвы описана в работе (Carter *et al.*, 2014).

1.3. Экотоксические эффекты диклофенака

1.3.1. Острая и хроническая токсичность диклофенака

Изучение негативных эффектов фармполлютантов, в том числе ДН, на живые организмы инициировалось проведением расчетов острой и хронической токсичности (таблица 3). Показатели острой токсичности выражаются в средней летальной дозе (ЛД₅₀) либо в средней эффективной дозе (ЭД₅₀). Для оценки опасности фармполлютантов для водных экосистем (Hazardous to Aquatic Environment) используется руководство Глобальной гармонизированной системы классификации и маркировки химических веществ (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) (United Nations, 2011). Согласно данному документу, вещества классифицируются на следующие категории: (I) высокотоксичные: $ЛД_{50}/ЭД_{50} \leq 1$ мг/л; (II) токсичные: $1 \text{ мг/л} < ЛД_{50}/ЭД_{50} \leq 10$ мг/л; (III) опасные для водных организмов: $10 \text{ мг/л} < ЛД_{50}/ЭД_{50} \leq 100$ мг/л; (IV) нетоксичные: $ЛД_{50}/ЭД_{50} > 100$ мг/л.

Для наземных организмов вещества подразделяются на следующие категории: (I) высокотоксичные: $ЛД_{50}/ЭД_{50} \leq 10$ мг/л; (II) токсичные: $10 \text{ мг/кг} < ЛД_{50}/ЭД_{50} \leq 100$ мг/л; (III) опасные: $100 \text{ мг/л} < ЛД_{50}/ЭД_{50} \leq 1000$ мг/л; (IV) нетоксичные: $ЛД_{50}/ЭД_{50} > 1000$ мг/л.

С использованием этих документов и доступных данных по острой и хронической токсичности установлено, что ДН относится к токсичным или опасным соединениям для водных/наземных организмов (таблица 3). Эти сведения соотносятся с мировыми исследованиями (Ortiz de García *et al.*, 2014; Mohd Zanuri *et al.*, 2017; Jurado *et al.*, 2019).

Таблица 3 – Острая и хроническая токсичность ДН в отношении организмов разных таксономических групп

Организм	Экспозиция	Показатель, мг/л		Литературный источник	Категория опасности
		ЭД ₅₀	ЛД ₅₀		
Острая токсичность					
<i>Aliivibrio fischeri</i> ¹	15 мин		15,90	Di Nica <i>et al.</i> , 2017	III
<i>Raoultella</i> sp.	24 ч		1950,00	Domaradzka <i>et al.</i> , 2016	IV
<i>Vibrio fischeri</i>	24 ч		11,45	Ferrari <i>et al.</i> , 2003	III

Организм	Экспозиция	Показатель, мг/л		Литературный источник	Категория опасности
		ЭД ₅₀	ЛД ₅₀		
<i>V. fisheri</i>	15 мин	22,80		de García <i>et al.</i> , 2016	III
<i>V. fisheri</i>	15 мин	14,04		Czech <i>et al.</i> , 2014	III
<i>Atyaephyra desmarestii</i> ²	96 ч		6,30–6,40	Nieto <i>et al.</i> , 2016	II
<i>Daphnia magna</i>	48 ч	123,30		De Oliveira <i>et al.</i> , 2015	IV
<i>D. magna</i>	48 ч	2,69		Czech <i>et al.</i> , 2014	II
<i>Eisenia fetida</i>	72 ч		90,49*	Pino <i>et al.</i> , 2015	II
<i>Hyalella azteca</i>	72 ч		4,60	Gómez-Oliván <i>et al.</i> , 2014b	II
<i>Siriella armata</i>	96 ч		2,90	Pérez <i>et al.</i> , 2015	II
<i>Clarias gariepinus</i> ³	96 ч		25,12	Ajima <i>et al.</i> , 2015	III
<i>Danio rerio</i>	96 ч		4,44	Alsop, Wilson, 2019	II
<i>D. rerio</i>	96 ч		166,00	Praskova <i>et al.</i> , 2011	IV
<i>D. rerio</i> (эмбрионы)	144 ч		3,68	Praskova <i>et al.</i> , 2011	II
Хроническая токсичность					
<i>D. magna</i> ²	21 сут	50,00		Liu <i>et al.</i> , 2017	III
<i>Folsomia candida</i>	28 сут	170,00*	1099,00*	Chen <i>et al.</i> , 2015	III/IV

Примечание. 1 – бактерии, 2 – беспозвоночные, 3 – позвоночные, 4 – водоросли. * мг/кг. I – высокотоксичные, II – токсичные, III – опасные, IV – нетоксичные.

1.3.2. Экотоксические эффекты диклофенака на беспозвоночных и позвоночных животных

Поскольку фармацевтические вещества в окружающей среде обнаруживаются в сравнительно невысоких (нг/л–мкг/л) концентрациях, при оценке реальных сценариев токсического воздействия этих поллютантов в природных экосистемах нельзя руководствоваться показателями острой токсичности. Необходимо также изучение конкретных физиологических ответов на воздействие микрополлютантов, используя большую выборку организмов из разных таксономических групп. Важно учитывать характер взаимодействия отдельных фармполлютантов в смеси, так как в окружающей среде лекарственные вещества обнаруживаются в виде фармацевтических коктейлей. Нецелесообразным является проецирование данных о токсичности экополлютантов для одних организмов на другие, даже если они находятся в

достаточно близком таксономическом (филогенетическом) родстве. Адекватный расчет экологического риска и прогнозирование коэффициента опасности должны быть проведены специфически к конкретному тест-организму. Так, экотоксические показатели ДН, полученные с использованием в качестве модельных организмов отдельных видов птиц (например, мускусной утки, японского перепела или домашнего голубя), не соответствовали аналогичным показателям в отношении грифов ввиду разного метаболизма и, соответственно, разной фармакинетики у этих птиц (Hassan *et al.*, 2018). Поэтому в последние годы появляется все больше работ по исследованию экотоксических воздействий фармпрепаратов, в том числе ДН, которые учитывают один или несколько вышеперечисленных факторов (таблица 4).

По многочисленным данным, ДН вызывает нарушения во всех системах органов живых организмов. Наиболее общей ответной реакцией у беспозвоночных и позвоночных животных на воздействие фармполлютанта является индукция окислительного стресса. Это выражается в изменении активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы и др.), изменении суммарного количества белков, а также перекисном окислении липидов (Gómez-Oliván *et al.*, 2014a; Gonzalez-Rey, Bebianno, 2014; Novoa-Luna *et al.*, 2016; Stancova *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018; Mathias *et al.*, 2018; McRae *et al.*, 2018). Токсическое действие ДН и других НПВС обусловлено продуцированием активных форм кислорода, в результате чего метаболизация таких фармполлютантов происходит через окислительно-восстановительный цикл. ЦОГ образуют оксигенированный комплекс интермедиат–окси-ЦОГ с последующим выходом супероксид-аниона. Известно, что НПВС в сосудистой системе ацетилируют ЦОГ-2 с образованием 15-эпи-липоксина А4, который способствует синтезу NO. При связывании NO и супероксид-аниона через диффузно-контролируемую реакцию может образовываться активная форма азота – пероксинитрит, которая, в свою очередь, индуцирует окисление белков и нитрирование, приводя к митохондриальной

Таблица 4 – Экотоксические эффекты ДН

НПВС	Концентрация, мкг/л	Экспозиция	Организм	Негативные эффекты	Источник
Позвоночные животные					
ДН	1; 5; 20; 50; 100	28 сут	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Цитологические изменения в печени, почках, жабрах	Triebkorn <i>et al.</i> , 2007
	0,5; 1; 5; 25	21 сут	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Нарушения в почках и желудочно-кишечном тракте	Mehinto <i>et al.</i> , 2010
	0,1; 1; 10; 100	25 сут	<i>Salmo trutta</i>	Цитологические изменения в печени, почках, жабрах; повышенная смертность	Schwarz <i>et al.</i> , 2017
	7000	30 сут	<i>Danio rerio</i>	Эмбриотоксичность, анормальные морфометрические изменения	Horie <i>et al.</i> , 2019
	26,5	40 сут	<i>Oryzias latipes</i>	Нижнечелюстной дисморфизм	Yokota <i>et al.</i> , 2018
	1570; 3140; 6280	42 сут	<i>Clarias gariepinus</i>	Нарушения в кровеносной системе, изменение активности ферментов (аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа)	Ajima <i>et al.</i> , 2015
	0,17; 763	96 ч	<i>Galaxias maculatus</i>	Окислительный стресс (увеличение каталазной активности, липидная пероксидация)	McRae <i>et al.</i> , 2018
	1250	48 ч	<i>Danio rerio</i>	Окислительный стресс, апоптоз, дерегуляция киназной активности, липидного метаболизма, митохондриальная дисфункция	De Felice <i>et al.</i> , 2012
	1; 10; 100	35 сут	<i>Cirrhinus mrigala</i>	Нарушения в функционировании щитовидной железы	Saravanan <i>et al.</i> , 2014
	60	35 сут	<i>Tinca tinca</i>	Окислительный стресс (снижение активности глутатион-S-трансферазы, каталазы)	Stancova <i>et al.</i> , 2017

Продолжение таблицы 4

НПВС	Концентрация, мкг/л	Экспозиция	Организм	Негативные эффекты	Источник
НПВС коктейль	ДН 2960 ИБП 2060 НПР 2300	96 ч	<i>Cyprinus carpio</i>	Окислительный стресс (увеличение содержания общих белков, увеличение соотношения восстановленного и окисленного глутатиона, уменьшение супероксиддисмутазной, каталазной активности)	Gao <i>et al.</i> , 2018
Продукты деградации НПВС	ДН 2960 ИБП 2060 НПР 2300	96 ч		Окислительный стресс (увеличение содержания общих белков, уменьшение соотношения восстановленного и окисленного глутатиона, уменьшение супероксиддисмутазной, каталазной активности)	
Беспозвоночные животные					
ДН	250	8 сут	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	Снижение плодовитости	de Oliveira <i>et al.</i> , 2018
	34000*	21 сут	<i>Chironomus riparius</i>	Угнетение скорости роста	Nieto <i>et al.</i> , 2016
	2,5	60 сут	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Угнетение стабильности лизосомальных мембран, повреждение ДНК	Mezzelani <i>et al.</i> , 2018
	1; 10	30 мин 24 ч	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Морфологические изменения, влияние на экспрессию генов	Balbi <i>et al.</i> , 2018
	0,25	15 сут		Окислительный стресс (окисление липидов, увеличение супероксиддисмутазной, каталазной активности)	Gonzalez-Rey, Bebianno, 2014
	0,25	3–7 сут	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Увеличение щелочно-лабильного фосфатного уровня в женских гонадах (маркер эндокринных нарушений)	
	1–10000	21 сут	<i>Mytilus edulis trossulus</i>	Снижение скорости роста, изменение секреции биссусовой железы	Ericson <i>et al.</i> , 2010

Продолжение таблицы 4

НПВС	Концентрация, мкг/л	Экспозиция	Организм	Негативные эффекты	Источник
ДН	≥ 0,1	0–2 ч	<i>Asterias rubens</i>	Нарушения в репродуктивной системе	Mohd Zanuri <i>et al.</i> , 2017
	460	72 ч	<i>Hyalella azteca</i>	Окислительный стресс (окисление липидов, увеличение каталазной и глутатионпероксидазной активности, снижение супероксиддисмутазной активности)	Novoa-Luna <i>et al.</i> , 2016
	1; 1000	96 ч	<i>Mytilus spp.</i>	Окислительный стресс (окисление липидов)	Schmidt <i>et al.</i> , 2011
	5; 50; 500; 5000	24; 48; 96 ч; 21 сут	<i>Daphnia magna</i>	Изменение экспрессии генов детоксификации (HR96, глутатион-S-трансфераза, CYP314, р-гликопротеин, экдизоновый рецептор, вителлогенин), репродуктивные нарушения	Liu <i>et al.</i> , 2017
	10; 100; 1000	3 сут	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Иммунные ответы (увеличение плотности гемацитов, НАДФ-оксидазной активности)	Boisseaux <i>et al.</i> , 2017
НПВС коктейль	ДН 7,6 ИБП 7,3 НПР 12,6 АЦ 22,1	72 ч	<i>Hyalella azteca</i>	Окислительный стресс (индукция перекисного окисления липидов; каталазной активности; супердисмутазной активности; глутатион-пероксидазной активности)	Novoa-Luna <i>et al.</i> , 2016
	ДН 760 АЦ 770 ДН 760 ИБП 170 ДН 760 НПР 760 ДН 760 АСА 260	72 ч	<i>Hyalella azteca</i>	Окислительный стресс (перекисное окисление липидов, изменение каталазной, супероксиддисмутазной и глутатион-пероксидазной активности)	Gómez-Oliván <i>et al.</i> , 2014b

Продолжение таблицы 4

НПВС	Концентрация, мкг/л	Экспозиция	Организм	Негативные эффекты	Источник
НПВС коктейль	АСА 0,2 ДН 0,38 ИБП 0,6 НПР 0,185 АЦ 36000	3 сут, 14 сут	<i>Corbicula fluminea</i>	Нарушение метаболизма (белкового профиля)	Geret <i>et al.</i> , 2010
	АЦ, ДН, ИБП, НПР, СК 0,2	56 сут	<i>Hyalella azteca</i>	Изменение полового распределения (увеличение количества самцов на 17 %)	Borgmann <i>et al.</i> , 2007
	ДН 60–3630 ИБП 2530–5620	48 ч	<i>Atyaephyra desmarestii</i>	Угнетение респираторной активности	Nieto <i>et al.</i> , 2016
Растения					
ДН	1000	28 сут	<i>Populus alba</i>	Окислительный стресс (изменение активности глутатион-S-трансферазы, пероксидазы, глутатион-редуктазы)	Pierattini <i>et al.</i> , 2018
	4–100	96 ч	<i>Lemna minor</i> , <i>Lemna gibba</i>	Изменение содержания хлорофилла а, хлорофилла b, каротиноидов и антоцианов, окислительный стресс	Alkimin <i>et al.</i> , 2019
	100	10 сут	<i>Desmodemus communis</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i>	Снижение содержания хлорофилла а	Bácsi <i>et al.</i> , 2016
Микроорганизмы					
ДН	0,01–100	30 мин	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Изменение фагоцитарной активности	Fekete-Kertész <i>et al.</i> , 2018
	5	60 сут	Активный ил	Окислительный стресс (увеличение супероксиддисмутазной активности, снижение сукцинат дегидрогеназной активности), таксономическое перераспределение	Jiang <i>et al.</i> , 2017
	100	168 сут	Речная биопленка	Ингибирование роста биопленки, снижение биомассы, таксономическое перераспределение	Paje <i>et al.</i> , 2002
	10; 100	49 сут	Речная биопленка	Уменьшение размеров микроколоний, структурные изменения в биопленке, снижение метаболической активности	Lawrence <i>et al.</i> , 2007

Продолжение таблицы 4

НПВС	Концентрация, мкг/л	Экспозиция	Организм	Негативные эффекты	Источник
ДН	2000	20 сут	<i>Micrococcus</i> sp.	Снижение биомассы	Węgrzyn, Felis, 2018
	100	10 сут	<i>Synechococcus elongatus</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>	Снижение содержания хлорофилла а	Bácsi <i>et al.</i> , 2016
НПВС коктейль	ДН, КТП, ИБП, НПР 1–10*	90 сут	Почвенная микробиота	Изменение субстрат-индуцированной респирации, дегидрогеназной, фосфатазной, уреазной активности, аммонификации	Cysoń <i>et al.</i> , 2016
	ДН, ИБП, НПР 5	60 сут	Активный ил	Окислительный стресс (увеличение супероксиддисмутазной активности, снижение сукцинат дегидрогеназной активности), изменение внутриклеточных полимерных веществ	Jiang <i>et al.</i> , 2017

Примечание: АСА – ацетилсалициловая кислота, АЦ – ацетоаминофен, ДН – диклофенак, ИБП – ибупрофен, КТП – кетопрофен, НПР – напроксен, СК – салициловая кислота. * Данные приведены в мкг/кг.

дисфункции и необратимым нарушениям в клетке, окислительному фосфорилированию и потере клеточного АТФ (González-González *et al.*, 2014). ДН индуцируют нарушения в системе самоочищения организма: цитологические изменения почек и печени в организме рыб (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*) описаны в работах (Triebkorn *et al.*, 2007; Mehinto *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2017). Под воздействием ДН выявлены нарушения кровоснабжения и сердечные аномалии у пресноводных рыб *Clarias gariepinus* и *Danio rerio* (Selderslaghs *et al.*, 2012; Ajima *et al.*, 2015; Rangasamy *et al.*, 2018).

Кроме того, у беспозвоночных и позвоночных животных ДН индуцирует метаболические пертурбации: от изменения активности ферментов детоксикации до митохондриальной дисфункции и снижения функциональной активности мембран (Geret *et al.*, 2010; De Felice *et al.*, 2012; Mezzelani *et al.*, 2018). ДН способствует изменениям на молекулярно-генетическом уровне, вызывая нарушения в экспрессии генов и разрыв цепи ДНК (Geret *et al.*, 2010; Parolini *et al.*, 2011; Gómez-Oliván *et al.*, 2014a; Liu *et al.*, 2017; Balbi *et al.*, 2018; Mezzelani *et al.*, 2018).

Помимо перечисленных токсических эффектов, ДН может вызывать эндокринные нарушения. Увеличение выработки вителлогенина (маркера эндокринных нарушений) у самцов *Oryzias latipes* под действием 1000 мкг/л ДН описано в работе (Han *et al.*, 2010). В женских гонадах маркером эндокринных изменений является увеличение щелочно-лабильного фосфатного уровня, что зафиксировано под воздействием ДН на примере двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis* (Gonzalez-Rey, Bebianno, 2014). Кроме того, ДН (1–100 мкг/л) индуцировал эндокринные нарушения в пресноводных рыбах *Cirrhinus mrigala* (Saravanan *et al.*, 2014). Многочисленны работы по выявлению патологий в репродуктивной системе животных (Isidori *et al.*, 2005; Borgmann *et al.*, 2007; Flippin *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2010; Collard *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2013; Mohd Zanuri *et al.*, 2017).

1.3.3. Экотоксические эффекты диклофенака на растения

На настоящий момент существуют лишь единичные работы по изучению неблагоприятных воздействий ДН на растения. Воздействие экотоксиканта на высшие растения и водоросли сопровождается индукцией окислительного стресса и изменением содержания хлорофилла, антоцианов и каротиноидов (Bácsi *et al.*, 2016; Landa *et al.*, 2018; Pierattini *et al.*, 2018; Alkimin *et al.*, 2019). Это свидетельствует о необходимости дальнейших исследований влияния микрополлютантов на растения.

1.3.4. Экотоксические эффекты диклофенака на микроорганизмы

Микроорганизмы играют ключевую роль в окружающей среде, участвуя в биогеохимических циклах, а также являясь системой “первичного реагирования” на ксенобиотическую нагрузку в открытых экосистемах. Поэтому они представляют большой интерес в качестве объектов исследования экотоксических эффектов фармацевтических поллютантов. Следует отметить, что исследования влияния НПВС на микроорганизмы представлены не столь широко и только начинают разворачиваться.

Ряд исследований подтвердили ингибирующее действие ДН в отношении природных биопленок (Paje *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2007; Corcoll *et al.*, 2014). Флуоресцентная *in situ* гибридизация показала наличие многих таксономических групп, среди которых преобладали представители филумов *Cytophaga-Flavobacteria* и *Gammaproteobacteria* (Paje *et al.*, 2002). Изучение воздействия НПВС (ДН и ибупрофен) и гормонов (эстрон и 17 α -этинилэстрадиол) на микробное сообщество нитрифицирующего активного ила проводили А. Kruglova с соавторами (2017). Исследователи установили, что наиболее обширные филогенетические группы в условиях последовательно-циклического реактора были представлены членами филумов *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Отмечено, что в процессе культивирования консорциума активного ила в присутствии экотоксикантов происходит резкое увеличение численности актинобактерий по отношению к другим таксономическим группам, что свидетельствует о возможном участии их в биологическом разложении

фармполлютантов. Тем не менее, процесс элиминации ДН отмечался только в присутствии членов *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Изучение влияние ДН (5 мкг/л), его смесей с ибупрофеном и напроксеном в эквивалентных концентрациях на микробиоту активного ила показало, что НПВС вызывали разрыв клеточной оболочки, что сопровождалось снижением количества живых клеток, индукцией окислительного стресса, а также увеличением содержания экзополимеров во внешней среде (Jiang *et al.*, 2017). Также было показано, что смесь НПВС оказывает более сильный токсический эффект по сравнению с отдельными фармсоединениями. Интересно отметить, что по сравнению с контролем внесение НПВС увеличивало численность представителей *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*, указывая на тот факт, что данные группы микроорганизмов могут быть вовлечены в процессы биологической элиминации противовоспалительных фармполлютантов. Таксономическое перераспределение в сообществе активного ила в присутствии ДН 50–5000 мкг/л описано в работе (Nguyen *et al.*, 2019). Под воздействием экотоксиканта увеличивалось количество представителей родов *Nitratireductor*, *Asticcacaulis* и *Pseudoxanthomonas*. Авторы отмечают возможный вклад данных микроорганизмов в очистку ДН-загрязненных стоков и отходов. ДН, дифлунизал, ибупрофен, мефенамовая кислота и пироксикам индуцировали снижение содержания хлорофилла-а в цианобактериях (Vácsi *et al.*, 2016).

Существуют лишь единичные работы, описывающие влияние НПВС на почвенную микрофлору. Влияние ДН на почвенные микроорганизмы может быть выражено в ингибировании их физиологической активности и, как следствие, в нарушении важнейших экологических процессов в биосфере, например, круговорота углерода (Pino-Otín *et al.*, 2017).

1.3.5. Экотоксические эффекты продуктов абиотической трансформации диклофенака

Отдельного внимания заслуживают исследования экотоксического влияния продуктов абиотической деструкции ДН. Поскольку фармполлютанты беспрепятственно проходят фильтры очистных сооружений, инициированы

работы по разработке и внедрению инновационных технологий абиотического обеззараживания сточных вод от фармацевтических загрязнителей. Однако такие методы нейтрализации сточных вод зачастую являются экологически небезопасными (Isidori *et al.*, 2005). Так, в работе X. Gao с соавторами (2018) показано, что использование системы УФ-обеззараживания и обработки персульфатом натрия (УФ/ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) приводило к достаточно быстрой (до 30 мин) деградации трех НПВС: ДН, ибупрофена и напроксена. Тем не менее, минерализация веществ составляла не более 28 %. Экотоксические исследования в отношении *Cyprinus carpio* показали, что продукты деградации НПВС оказывали губительное воздействие на рыб, приводя к необратимым нарушениям антиоксидантной системы. Обработка ДН озонированием и активированным персульфатом (O_3/PS) приводила к образованию более токсичных промежуточных продуктов, ингибирующих билюминесценцию у *Vibrio qinghaiensis* (Lu *et al.*, 2017). В другом исследовании УФ-фотолиз ДН приводил к образованию более токсичных продуктов, которые индуцировали окислительный стресс у *Danio rerio* (Diniz *et al.*, 2015).

В связи с тем, что современные методы небиологического окисления фармполлютантов экологически не безопасны, актуален поиск альтернативных более совершенных технологий детоксикации микрополлютантов. Таковыми являются биотехнологии, основанные на использовании живых организмов, а также их ассоциаций. Биодegradации и биотрансформации ДН посвящен следующий раздел.

1.4. Биодеструкция диклофенака

ДН – наиболее устойчивый к биологической трансформации фармпрепарат из группы НПВС (Quintana *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Poirier-Larabie *et al.*, 2016; He *et al.*, 2018a, 2018b; Zhan *et al.*, 2018). Эффективность нейтрализации ДН в очистных сооружениях остается достаточно низкой (González-Pérez *et al.*, 2017; Botero-Coy *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018b; Ćesen *et al.*, 2019). Как правило, полная биодegradация ДН отсутствовала либо была незначительна в условиях современных очистных установок, в том числе в мембранном биореакторе,

реакторе с неподвижным или подвижным биопленочным слоем и гидрботанических площадках (González *et al.*, 2006; Kosjek *et al.*, 2007, 2009; Vo *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2013; Casas *et al.*, 2015; Bouju *et al.*, 2016; Bragança *et al.*, 2016; Jing *et al.*, 2016; Nowrotek *et al.*, 2016). В качестве биоокислителей ДН используются бактериальные и грибные штаммы, микробные консорциумы, водоросли и высшие растения (таблица 5). Масштабы экспериментальных исследований варьируют от лабораторных экспериментов в условиях периодического культивирования биодеструкторов до изучения биоразложения фармацевтических веществ в пилотных установках и работающих очистных сооружениях (Marco-Urrea *et al.*, 2010; Kruglova *et al.*, 2014; Nowrotek *et al.*, 2016; Nom-Diaz *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2019). Подавляющее большинство исследований посвящено деградации НПВС с использованием грибов и бактерий.

1.4.1. Биодеструкция диклофенака с использованием грибов

Полная деструкция ДН достигнута при использовании грибов белой гнили *Trametes versicolor* (Marco-Urrea *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013; Stenholm *et al.*, 2018), *T. trogii*, *Yarrowia lipolytica* (Aracagök *et al.*, 2018), *Bjerkandera* sp. и *Phanerochaete chrysosporium* (Rodarte-Morales *et al.*, 2010), аскомицетов *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella echinulata*, *C. elegans*, *Penicillium oxalicum* (Osorio-Lozada *et al.*, 2008; Aracagök *et al.*, 2018; Olicón-Hernández *et al.*, 2019) и агарикомицета *Pleurotus ostreatus* (Palli *et al.*, 2017). Основными метаболитами грибной биоконверсии ДН являлись 4'-гидрокси- и 5-гидроксидиклофенак.

Несмотря на высокую деградирующую активность грибов в отношении ДН, существует ряд особенностей, которые ограничивают их широкое использование в процессах очистки сточных вод: (1) оптимальный режим функционирования грибов наблюдается при pH 4,5, в то время как pH сточных вод составляет около 7; (2) необходимость внесения дополнительного энергетического субстрата; (3) возможность обрастания биореактора; (4) характер посевного (спорового) материала; (5) способность к синтезу микотоксинов; (6) снижение

Таблица 5 – Биодеструкция ДН с использованием организмов разных таксонов

Концентрация, мг/л	Биодеградация	Биодеструктор	Условия биодеструкции	Метаболиты	Ссылка
			Бактерии		
0,04	50 % 20,1 сут	Консорциум речной воды/донных отложений	Аэробные	–	Koumaki <i>et al.</i> , 2017
	50 % 37,7 сут		Аноксигенные (в присутствии NO ₃ ⁻)		
	50 % 44,9 сут		Анаэробные		
	50 % 50,0 сут		Сульфатредуцирующие (в присутствии SO ₄ ²⁻)		
0,001	58 % 28 сут	Консорциум морской воды	Аэробные	–	Baena-Nogueras <i>et al.</i> , 2017
0,3	75 % 21 сут	Активный ил	Минеральная среда + 0,01 г/л Fe-цитрат аммония	–	Langenhoff <i>et al.</i> , 2013
0,1	50 % 27,8 сут	Нитрифицирующие бактерии	Биомасса аэротенка СОСВ	–	Park <i>et al.</i> , 2017
0,1	80 % 6 сут	Нитрифицирующие бактерии	Кометаболизм в присутствии аммония	–	Tran <i>et al.</i> , 2009
0,1	40 % 6 сут	Активный ил	В присутствии ацетата натрия		
0,1	40 % 18 сут	Активный ил			
4'-гидрокси-ДН	100 % 9 сут	Активный ил	Синтетическая сточная вода	1-(2,6-дихлорфенил)-1,3-дигидро-2Н-индол-2-он, 4'-гидрокси-ДН, TP389, TP294	Bouju <i>et al.</i> , 2016
0,001	60–71 % 168 ч	Активный ил	Сточная вода, содержащая 21 фармполлютант, в присутствии питательных компонентов	–	Muter <i>et al.</i> , 2017
0,6	81,2 % 5 сут	Активный ил	Преинкубация в присутствии ДН (2 мг/л)	–	Wang, Wang, 2018
0,05–5,00	15–45 % 70 сут	Активный ил	В качестве единственного источника углерода и энергии	–	Nguyen <i>et al.</i> , 2019
300	75 % 21 сут	Активный ил	В присутствии цитрата аммония (0,001 г/л)	2-((2,6-дихлор-фенил)амино)бензил-этил-метиловый эфир	Langenhoff <i>et al.</i> , 2013

Продолжение таблицы 5

Концентрация, мг/л	Биодеградация	Биодеструктор	Условия биодеструкции	Метаболиты	Ссылка
100–1000	100 % 7–10 сут	Микробный консорциум лесной почвы	Минеральная среда М9 с добавлением почвы (4 г)	Карбоксилированный ДН, 2,6-дихлоранилин, карбоксилированная 2-гидроксифенилуксусная кислота	Facey <i>et al.</i> , 2018
100	100 % 6 сут		Стерильная дождевая вода с добавлением почвы (4 г)		
70,0	100 % 72 ч	<i>Klebsiella</i> sp. KSC	В качестве единственного источника углерода и энергии	12 метаболитов (TP144, TP177, TP254, TP259, TP294, TP312, TP310, TP328, TP298, TP282, TP286 и TP301)	Stylianou <i>et al.</i> , 2018
0,5	100 % 6 сут	<i>Labrys portucalensis</i> F11	Кометаболизм в присутствии 5,9 мМ ацетата натрия	12 метаболитов, включая 4'-гидрокси-ДН, 5-гидрокси-ДН, бензохинонимин	Moreira <i>et al.</i> , 2018
10,0	100 % 25 сут		В качестве единственного источника углерода и энергии		
0,5–10	70 % 30 сут		В качестве единственного источника углерода и энергии		
10,0	52,8 % 48 ч	<i>Enterobacter hormaechei</i> D15	В качестве единственного источника углерода и энергии	1-(2,6-дихлофенил)-1,3-дигидро-2H-индол-2-он	Aissaoui <i>et al.</i> , 2017a
	67,57 % 48 ч	<i>Enterobacter cloacae</i> (D16)	Кометаболизм в присутствии глюкозы (50 мг/л)		
6,0	10 % 28 сут	<i>Raoultella</i> sp. DD4	В качестве единственного источника углерода и энергии	–	Aissaoui <i>et al.</i> , 2017b Domaradzka <i>et al.</i> , 2016
1000	92 % 72 ч	<i>Raoultella</i> sp. KDF8	Кометаболизм в присутствии этанола 1 % об/об	32 метаболита 4'-гидрокси-ДН, 5-гидрокси-ДН, 6-гидрокси-ДН, 4',5-дигидрокси-ДН,	Palyzová <i>et al.</i> , 2018, 2019
15,0	100 % 5 ч	<i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 53771	Богатая питательная среда	4'-гидрокси-ДН, 5-гидрокси-ДН, 4',5-дигидрокси-ДН	Osorio-Lozada <i>et al.</i> , 2008

Продолжение таблицы 5

Концентрация, мг/л	Биодеградация	Биодеструктор	Условия биодеструкции	Метаболиты	Ссылка
10,0	35 % 30 сут	<i>Brevibacterium</i> sp. D4	В качестве единственного источника углерода и энергии	–	Bessa <i>et al.</i> , 2017
	90 % 30 сут		Кометаболизм в присутствии ацетата		
2,0	15 % 20 сут	<i>Microbacterium flavescens</i> MG7	В качестве единственного источника углерода и энергии	–	Węgrzyn, Felis, 2018
	35 % 20 сут		Кометаболизм в присутствии фенола (20 мг/л)		
Грибы					
0,1	70 % 28 сут	<i>Aspergillus nidulans</i>	В качестве единственного источника углерода и энергии	гидрокси-ДН	Gonda <i>et al.</i> , 2016
296	100 % 6 сут	<i>Phanerochaete sordida</i> YK-624	Питательная среда (3,0 % глюкоза, 1,0 % пептон, 1,0 % солодовый экстракт, 0,4 % дрожжевой экстракт)	4'-гидрокси-ДН, 5-гидрокси-ДН, 4',5-гидрокси-ДН	Hata <i>et al.</i> , 2010
10,0	94 % 4 ч	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Богатая питательная среда (глюкоза, тартрат аммония)	4'- гидрокси-ДН, 5-гидрокси-ДН	Marco-Urrea <i>et al.</i> , 2010
0,045	100 % 0,5 ч				
0,69	100 % 120 ч	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 7731	В качестве единственного источника углерода и энергии	–	Nguyen <i>et al.</i> , 2013
10,0	98 % 7 сут	<i>Trametes versicolor</i> AG1383	Иммобилизация на полиэтилене	5 метаболитов, в том числе гидроксипроизводные ДН	Stenholm <i>et al.</i> , 2018
	99,9 % 4 ч		Иммобилизация на полиуретановой пене	–	

Продолжение таблицы 5

Концентрация, мг/л	Биодеградация	Биодеструктор	Условия биодеструкции	Метаболиты	Ссылка
50,0	100 % 6 ч	<i>Trametes trogii</i> ATCC 200800	Кометаболизм в присутствии глюкозы	Гидроксированные производные ДН	<i>Aracagök et al.</i> , 2018
	100 % 48 ч	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 328			
	48 % 48 ч	<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658			
1,0	56 % 48 ч	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME 446	Свободные анаморфы Иммобилизованные на полиуретановой пене	–	<i>Rodarte-Morales et al.</i> , 2010
	100 % 4 сут ~ 90 % 7 сут	<i>Bjerkandera</i> sp. R1			
1,0	100 % 4 сут	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	Свободные пеллеты	–	
	100 % 7 сут		Иммобилизованные на полиуретановой пене		
10,0	100 % 18 ч	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Больничная сточная вода в условиях биореактора с псевдоожиженным слоем	4'-гидрокси-ДН, 5-гидрокси-ДН	<i>Palli et al.</i> , 2017
15,0	100 % 120 ч	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159,	Богатая питательная среда (триптон, глюкоза, дрожжевой экстракт)	–	<i>Osorio-Lozada et al.</i> , 2008
		<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 11585a, <i>C. elegans</i> ATCC 36112			
30,0	> 99 % 24 ч	<i>Penicillium oxalicum</i>	Богатая питательная среда Кирка	7 метаболитов, в том числе 4'-гидрокси-ДН, 5-гидрокси-ДН, 4',5-дигидрокси-ДН, ацилглюкоронид ДН	<i>Olicón-Hernández et al.</i> , 2019
	100 % 70 ч		Иммобилизация на полиуретановой пене		
	20 % 70 ч		Иммобилизация на пластиковом бионосителе		

Продолжение таблицы 5

Концентрация, мг/л	Биодеградация	Биодеструктор	Условия биодеструкции	Метаболиты	Ссылка
Водоросли					
0,15	60 % 30 сут	<i>Chlorella sorokiniana</i> ССАР211/8К	Бескислородная “черная вода” муниципальных сточных вод	–	de Wilt <i>et al.</i> , 2016
	99 % 9 сут	<i>Scenedesmus obliquus</i> SAG 276-1			
25,0	71 % 9 сут	<i>Chlorella vulgaris</i> SAG 221-12	В качестве единственного источника углерода и энергии в условиях барботирующего	–	Escapa <i>et al.</i> , 2018
	67 % 9 сут	<i>Chlorella sorokiniana</i> ССАР 211/8 К	колоночного фотобиореактора		

биодеструктирующей активности в процессе иммобилизации; (7) неэффективная конкуренция с автохтонными бактериями, сопровождающаяся снижением ферментативной активности, снижением их биомассы, повреждением мицелия (Rodarte-Morales *et al.*, 2010; Borràs *et al.*, 2011; Mir-Tutusaus *et al.* 2018; Olicón-Hernández *et al.*, 2019). В связи с этим все большую популярность приобретает бактериальная деградация фармполлютантов.

1.4.2. Биодеструкция диклофенака с использованием бактерий

Исследования, посвященные поиску активных штаммов-биодеструкторов НПВС, ограничиваются лишь небольшим числом работ. При этом в качестве биоокислителей предлагаются в основном энтеробактериальные и актинобактериальные штаммы. С использованием энтеробактерии *Klebsiella* sp. KSC достигнута полная метаболизация ДН (70 мг/л) в течение 72 ч с образованием 12-ти продуктов (Stylianou *et al.*, 2018). Штаммы *Enterobacter hormaechei* D15 и *E. cloacae* D16 конвертировали ДН (10 мг/л) на 53 и 82 % в течение 48 ч соответственно (Aissaoui *et al.*, 2017a,b). В качестве промежуточного продукта энтеробактериальной деструкции ДН идентифицирован 1-(2,6-дихлофенил)-1,3-дигидро-2H-индол-2-он. Штамм *Raoultella* sp. KDF8 в присутствии этанола деградировал ДН в высокой концентрации (1 г/л) на 92 % в течение 72 ч (Palyzová *et al.*, 2018, 2019). Биоконверсия сопровождалась образованием 32 метаболитов, среди которых детектированы малоновая, оксоглутаровая, 3-гидроксиглутаровая, гидроксилевулиновая кислоты, что свидетельствовало о раскрытии цикла и дехлорировании исходной молекулы ДН. Бактериальный штамм *Labrys portucalensis* F11 использовал ДН (34 мМ) в качестве единственного источника углерода на 70 % в течение 30 сут (Moreira *et al.*, 2018). В присутствии ацетата натрия продолжительность биодеструкции экотоксиканта в концентрации 1,7 мМ и 34 мМ составляла 6 и 25 сут соответственно. Биодеградация ДН сопровождалась образованием 12 метаболитов, включая гидроксипроизводные и бензохинонимин (рисунок 3). Полная биодеструкция ДН (50 мкМ) актинобактериальным штаммом *Actinoplanes* sp. ATCC 53771 достигалась на 5 ч эксперимента (Osorio-Lozada *et al.*, 2008).

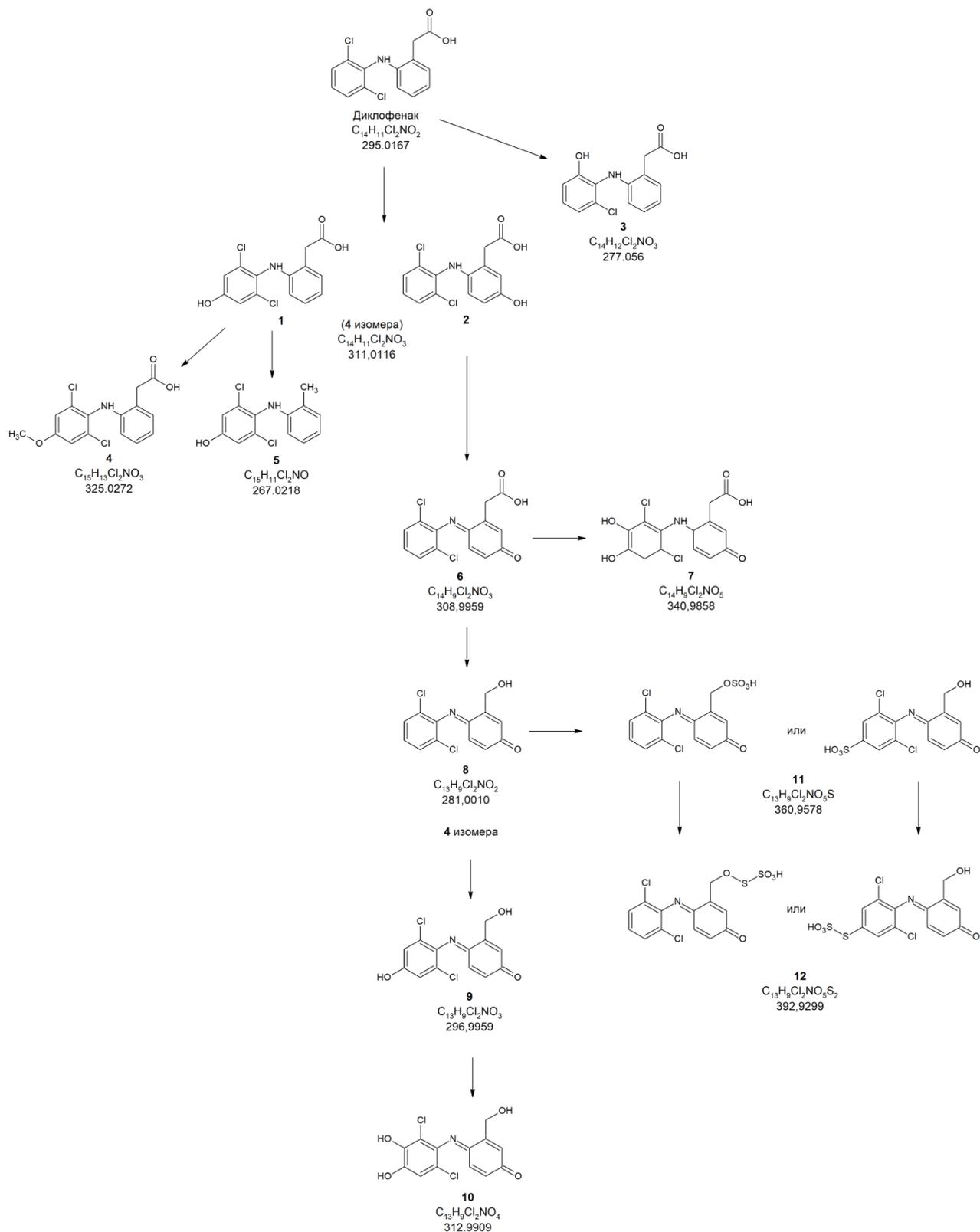


Рисунок 3 – Возможные пути биодеструкции ДН клетками *Labrys portucalensis* F11 (цит. по Moreira *et al.*, 2018).

Биоконверсия сопровождалась формированием 4'-гидрокси-, 5-гидрокси- и 4',5-дигидроксидиклофенака. Актинобактерии рода *Brevibacterium*

метаболизировали ДН (10 мг/л) в качестве единственного источника углерода на 35 % в течение 30 сут (Bessa *et al.*, 2017). Введение в среду культивирования глюкозы в качестве дополнительного энергетического источника повысило эффективность биодеструкции данного НПВС в 2,5 раза. Штамм *Microbacterium flavescens* MG7, выделенный из ризосферы канареечника тростниковидного (*Phalaris arundinacea*), деструктировал ДН (2 мг/л) на 15 и 35 % в качестве единственного источника углерода и в присутствии фенола соответственно (Węgrzyn, Felis, 2018).

Отдельные исследования по биоконверсии ДН проведены с вовлечением в этот процесс бактериальных консорциумов. В работе K.S. Jewell с соавторами (2016) описана практически полная биотрансформация ДН (250 мкг/л) в условиях реактора с подвижным биопленочным слоем в течение 24 ч. Биотрансформация этого экотоксиканта в данном случае протекала с образованием 20 метаболитов, среди которых обнаруживались диклофенак-лактан, диклофенак-бензойная кислота, 4'-гидрокси- и 5-гидроксициклофенак. Полная утилизация ДН (3–35 мкМ) микрофлорой речных донных отложений в условиях биореактора с фиксированным слоем достигалась на 12–24 ч эксперимента (Gröning *et al.*, 2007). Биодеструктирующая способность микроорганизмов может быть повышена приемом их преинкубации и адаптации к экотоксиканту. Исследование биологической деструкции биопленками в условиях кольцевого ротационного биопленочного реактора показало, что нативная культура микроорганизмов способна только к 20 % трансформации ДН на 24 ч. Адаптированная в течение 6 недель биопленка практически полностью (97 %) деструктировала экотоксикант за 5 сут эксперимента (Paje *et al.*, 2002). Использование активного ила для биоконверсии ДН в разных концентрациях описано в нескольких работах (Tran *et al.*, 2009; Langenhoff *et al.*, 2013; Vouju *et al.*, 2016; Muter *et al.*, 2017; Wang, Wang, 2018; Nguyen *et al.*, 2019). Эффективность удаления ДН составляла от 10 до 80 %. Полная биоконверсия ДН почвенным микробным консорциумом продемонстрирована в работах (Xu *et al.*, 2009; Facey *et al.*, 2018; Thelusmond *et al.*, 2018).

1.4.3. Ферменты, участвующие в трансформации диклофенака

Основная стратегия грибной и бактериальной биотрансформации ДН заключается в снижении токсичности исходной молекулы путем её окисления с образованием гидроксильированных производных (Olicón-Hernández *et al.*, 2017). Реализацию такого подхода обеспечивают оксигеназные ферментные комплексы. Наиболее важную роль в процессе биологического окисления токсиканта играют цитохром Р450-зависимые монооксигеназы (цитохром Р450), а также лакказы. Цитохромы Р450 печени млекопитающих вовлечены в метаболизм большинства лекарственных препаратов (Guengerich, 2006). У бактерий и грибов в процессе метаболизации поллютантов, в том числе фармацевтических веществ, также задействованы цитохромы Р450. Вовлечение Р450 в процесс окисления ДН подтверждено в работе (Prior *et al.*, 2010). Монооксигеназа СYP107E4 из штамма *Actinoplanes* sp. 53771 катализировала биотрансформацию ДН до двух гидроксильированных метаболитов: 4'-гидрокси- и, по-видимому, 5-гидроксидиклофенак. Фермент СYP116В2 из *Rhodococcus* sp. катализировал процесс окисления ДН в 5-гидроксидиклофенак (Klenk *et al.*, 2017). Предполагалось, что трансформация ДН грибом белой гнили *Trametes versicolor*, ведущая к образованию 4'-гидрокси- и 5-гидроксидиклофенака, также катализировалась цитохромами Р450 (Marco-Urrea *et al.*, 2010). Цитохром Р450 ВМ3 (СYP102) в клетках *Bacillus megaterium* гидроксильировал ДН в 4'-гидроксидиклофенак (Damsten *et al.*, 2008). Помимо этого, исследовали токсичность ВМ3-метаболитов (ВМ3-mediated metabolites) ДН в модельной дрожжевой системе на основе *Saccharomyces cerevisiae* (van Leeuwen *et al.*, 2011). Стоит отметить, что получение гидроксильированных продуктов ДН химическим путем является весьма трудоёмким процессом, в связи с этим обосновано получение их с помощью процесса биокатализа. Для изучения метаболизма и токсикологических аспектов фармацевтических веществ целесообразно использование именно биокаталитических систем на основе отдельных ферментов и/или целых клеток микроорганизмов (Asha, Vidyavathi, 2009). Биодеструкция ДН нитрифицирующими бактериями обеспечивалась аммоний-

монооксигеназами, отличающимися субстратной неспецифичностью в отношении алифатических и ароматических соединений (Dawas-Massalha *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016).

Наряду с целлюлозными биокатализаторами в процессах биологического окисления фармполлютантов используют очищенные ферменты. Так, L. Lloret с соавторами (2010) изучали трансформирующую активность лакказ, выделенных из аскомицета *Myceliophthora thermophila*. Полное удаление ДН (5 мг/л) было достигнуто за 1 ч эксперимента. Конверсия лакказами фармацевтического коктейля, состоящего из ДН, напроксена и кетопрофена приводила на 7 сут к убыли веществ на 100, 90 и 23 % соответственно. В другом исследовании полная деструкция ДН (10 мг/л) очищенными лакказами достигалась на 4 ч эксперимента (Palli *et al.*, 2017). Для увеличения стабильности и эффективности ферментного биокатализатора применяются различные методы иммобилизации. Лакказы, выделенные из *Trametes versicolor* и иммобилизованные на хитозановых гранулах, демонстрировали высокую трансформирующую активность ДН (90 % в течение 4 ч) с образованием 4'-гидрокси- и 5-гидроксициклофенака (Argiceno *et al.*, 2019). Авторы изучили возможность применения иммобилизованных лакказ для биодеструкции НПВС-коктейля (ДН, напроксен, кетопрофен). По результатам исследования А. Argiceno с соавторами (2019), использование биокатализатора способствовало удалению 100, 90 и 30 % ДН (78,5 мМ), напроксена (98 мМ) и кетопрофена (108 мМ) соответственно. Биодеструкция ДН в смеси с хлортетрациклином и карбамазепином под воздействием лакказ, иммобилизованных на полиакрилонитриле, изучалась в работе М. Taheran с соавторами (2017). С использованием данного биокатализатора на 8 ч эксперимента достигнуто 72,7, 63,3 и 48,6 % деструкции ДН, хлортетрациклина и карбамазепина соответственно.

Несмотря на накопленный материал по биоконверсии ДН, остается открытым вопрос по поиску микроорганизмов, способных к полной биодеструкции данного экотоксиканта. Большинство работ описывают лишь частичную трансформацию ДН через гидроксирование его молекулы, а

актуальные исследования по эффективной бактериальной деградации ДН задействуют патогенные энтеробактерии (*Klebsiella* sp., *Raoultella* sp.) и ксантобактерии (*Labrys* sp.). Использование грибных культур, способных окислять широкий диапазон органических веществ, предполагает определенные риски ввиду их спорового материала и способности к синтезу микотоксинов. Грибы отличаются низкой конкурентоспособностью в присутствии бактерий, а приемы иммобилизации грибных гранул не приводят к интенсификации биотрансформации экотоксикантов. Кроме того, в литературе недостаточно данных об адаптивных реакциях биоокислителей в ответ на токсическое действие ДН. В связи с этим актуален дальнейший поиск устойчивых, эффективных и непатогенных биокатализаторов процессов биоразложения ДН, а также изучение защитных механизмов бактериальных клеток на присутствие ДН.

1.5. Родококки – биоокислители фармполлютантов

Актинобактерии рода *Rhodococcus* считаются одной из наиболее биотехнологически перспективных групп микроорганизмов, способных к биоокислению соединений, которые не трансформируются другими организмами. Биохимический потенциал родококков все больше изучается из-за их широкой катаболической гибкости, уникальных ферментативных возможностей, широкой субстратной специфичности и характерного комплекса стратегий выживания (Larkin *et al.*, 2010; Cappelletti *et al.*, 2019; de Carvalho, 2019; Kuyukina, Ivshina, 2019a). Родококки способны к биодеградации ксенобиотиков разного химического происхождения и строения, будь то алифатические и ароматические углеводороды, галогенированные и азотсодержащие соединения, гетероциклические вещества, пестициды, а также эмерджентные поллютанты (фармацевтические вещества, гормоны, средства личной гигиены) (Ivshina *et al.*, 2012, 2015; Gundersen *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018c; Krivoruchko *et al.*, 2019). Другим важным преимуществом родококков является их активная трансформирующая активность нитрилов, вторичных растительных метаболитов (алкалоиды, терпены, стеролы), а также десульфуризация угля и нефти (S. Chen *et al.*, 2018; Li, Ma, 2019; Zampolli *et al.*, 2019).

Согласно последним представлениям, родококки занимают следующее положение в таксономической системе: домен *Bacteria*, филум *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*, порядок *Corynebacteriales*, семейство *Nocardiaceae*, род *Rhodococcus*. В настоящее время насчитывается 67 валидных видов родококков (<http://www.bacterio.net/rhodococcus.html>). Стремительное совершенствование инструментальной базы, полногеномное секвенирование, сопровождаемое биоинформатическим анализом, широкое использование MALDI-TOF масс-спектрометрических методов обусловило развитие исследований по идентификации и реклассификации актинобактерий: только за последние 9 лет описано 22 новых вида *Rhodococcus* (Sangal *et al.*, 2019). Совсем недавно описаны еще два новых вида – *R. daqingensis*, представители которого выделены из нефтезагрязненной почвы в Китае, и *R. subtropicus* – из природной пещеры в Южной Корее (Wang *et al.*, 2019a; Lee *et al.*, 2019).

Актинобактерии рода *Rhodococcus* – аэробные, Грам-положительные, неподвижные, не образующие спор бактерии с трехстадийным морфогенетическим циклом развития (кокки/короткие палочки – палочки/ветвящиеся нитевидные клетки/гифы – кокки/короткие палочки) (Ившина и др., 1987; Jones, Goodfellow, 2015). Некоторые культуры родококков образуют разветвленные или неразветвленные воздушные гифы (Jones, Goodfellow, 2015). Колонии могут быть бугорчатыми, шероховатыми (rough, R-формы), гладкими (smooth, S-формы) или слизистыми (mucoid, M-формы). Среди родококков распространены пигментированные формы, которые дают палевые, кремовые, желтые, оранжевые, коралловые, розовые и красные колонии, хотя встречаются и бесцветные варианты. Актинобактерии рода *Rhodococcus* характеризуются хемоорганотрофным и окислительным типом обмена веществ. Большинство штаммов хорошо растут на стандартных средах при температурах 15–40 °C и используют широкий спектр органических соединений в качестве единственного источника углерода для энергии и роста.

Родококки широко распространены в водных и наземных экосистемах по всему миру, в том числе в Арктике и Антарктике (Goordial *et al.*, 2016; Kim *et al.*,

2018). Они выделены из чистых и техногенно загрязненных почв и поверхностных вод, бытовых и промышленных сточных вод, грунтовых вод, морских донных осадков, ризосферы растений, навоза травоядных животных, из кровососущих членистоногих и даже с космической станции “МИР” (Sangal *et al.*, 2019). Основная экологическая роль родококков заключается в деконтаминации экосистем от стабильных органических веществ и ксенобиотиков (Jones, Goodfellow, 2015).

Способность родококков к усвоению ксенобиотиков, большинство из которых имеет гидрофобную природу, обеспечивается особыми свойствами их клеточной стенки. Уникальность клеточных оболочек родококков обеспечивается (1) пептидогликаном типа A₁, в состав которого входят *N*-ацетил-глюкозамин, *N*-гликомурамовая кислота, *D*- и *L*-аланин, *D*-глутамовая кислота, мезо-2,6-диаминопимелиновая кислота; (2) арабинозой и галактозой в качестве диагностических сахаров клеточной стенки (IV хемотип); (3) комплексом фосфолипидов, включающих дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин (таксономически значимый фосфолипид), фосфатидилинозитол, фосфатидилинозитол маннозиды (II тип фосфолипидов); (4) жирными кислотами, представленными большим количеством прямоцепочечных, ненасыщенных и туберкулостеариновых кислот (IV тип жирных кислот); (5) дегидрогенированными менахинонами; (6) миколовыми кислотами, содержащими 30–54 атомов углерода (Sutcliffe *et al.*, 2010; Jones, Goodfellow, 2015). Миколовые кислоты являются естественным барьером для гидрофобных и гидрофильных агентов (de Carvalho, 2019).

Исключительная метаболическая гибкость актинобактерий рода *Rhodococcus* отражается в характерных особенностях их генома: (1) большие размеры генома, содержащие информацию о многочисленных катаболических путях различных химических соединений; (2) значительная степень избыточности генов, которая обеспечивает функциональную устойчивость генома; (3) наличие кольцевых и линейных плазмид, представляющих собой дополнительный пул ДНК, который может эволюционировать и легко переноситься (Larkin *et al.*, 2006,

2010; Di Canito *et al.*, 2018; Cappelletti *et al.*, 2019). Генетическая избыточность рассматривается в качестве основы универсальности катаболической активности родококков, их функциональной устойчивости и способности к адаптации в экстремальных условиях окружающей среды. Обеспечение генетической избыточности происходит за счет дубликации или горизонтального переноса генов (Larkin *et al.*, 2010; Cappelletti *et al.*, 2019; Guevara *et al.*, 2019). Обнаруженные дубликатные гены кодируют изоферменты (ферменты, отличающиеся по аминокислотной последовательности, но выполняющие одинаковые функции), участвующие в центральных метаболических путях (например, цикл трикарбоновых кислот), в деградации *n*-алканов (например, множественные гомологи *alkB*) и ароматических углеводов (например, гены *bphA*, *etb1A* и *etb2A*, кодирующие биодеструкцию бифенилов и этилбензола), в адаптации к низким температурам (Laczi *et al.*, 2015; Goordial *et al.*, 2016; Cappelletti *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2019).

Размеры хромосом родококков варьируют от 4 до 10 Mb (Larkin *et al.*, 2010; Cappelletti *et al.*, 2019; Zampolli *et al.*, 2019). Содержание G+C в геноме 61–71 %; наиболее высокий GC состав (> 70 %) выявлен у представителей видов *R. aetherivorans* и *R. ruber* (Cappelletti *et al.*, 2019). Кроме того, во многих изолятах выявлено наличие крупных (до 1 Mb) линейных и мелких (до 0,2 Mb) кольцевых плазмид. Крупные плазмиды несут информацию многих ферментов, участвующих в деградации ксенобиотиков. Так, в трех мегаплазмидах (RHL1, RHL2, RHL3) штамма *R. jostii* RHA1 локализованы гены, кодирующие ферменты деградации полихлорированных бифенилов и фталатов (Kim *et al.*, 2018). Косвенное подтверждение локализации генов биодеструкции на плазмидах отмечено в работе (Zeng *et al.*, 2019). Так, потеря биодеградирующей активности штамма *Rhodococcus* sp. НК6 при отсутствии длительного воздействия полиароматических углеводов (ПАУ), например, пирена, могла свидетельствовать о потере плазмид с функциональными генами. Поразительно, что даже мелкие кольцевые плазмиды также связаны с катаболическими генами. Криптические кольцевые плазмиды рКА22 (4969 bp), рRTL1 (100 bp) кодируют

гены деградации галогенированных алканов, а плазмиды *Rhodococcus* sp. IGTS8 – гены, вовлеченные в процессы десульфуризации сераорганических соединений (Kulakova *et al.*, 1995; Larkin *et al.*, 2010; Li, Ma, 2019).

Высокая катаболическая активность родококков в отношении ксенобиотиков широкого спектра обеспечивается функционированием оксигеназных ферментных комплексов. В геноме одного из наиболее изученных штаммов *R. jostii* RHA1 обнаружено 203 оксигеназы, среди которых 86 диоксигеназ, 88 флавопротеин монооксигеназ, 50 гидроксилаз, 28 цитохром P450-зависимых оксигеназ (Zampolli *et al.*, 2019). Большая часть генов оксигеназ локализована на хромосоме, что свидетельствует об их фундаментальной роли в физиологии родококков (McLeod *et al.*, 2006a). Биоинформатический анализ генома *R. jostii* RHA1 показал, что данный штамм имеет достаточно стабильный большой геном, обладающий только двумя интактными инсерционными последовательностями и относительно небольшим количеством генов транспозазы (McLeod *et al.*, 2006b).

Функциональная стабильность генома родококков объясняется наличием защитных механизмов. Несмотря на отсутствие палиндромных повторов типа CRISPR, у некоторых штаммов, например, *R. ruber* Chol-4, обнаружен генный кластер, связанный со специализированными системами деградации белка, включающий протеасомную активность 20S (субъединицы α и β), АТФазу, которая использует АТФ для развертывания белков и их перемещения в протеасому, и Pup систему мечения белка для расщепления прокариотическим убиквитиноподобным белком. Конъюгация с Pup служит сигналом для деградации белков с помощью протеасомы (Guevara *et al.*, 2019).

У штаммов рода *Rhodococcus* катаболизм ароматических соединений организован по модульному принципу, который включает периферический, центральный и основной пути. В периферических путях сложные ароматические соединения (например, бифенил и фталат) превращаются в отдельные промежуточные соединения (например, катехол и фенилацетат), которые, в свою очередь, используются в центральных ароматических путях для получения ряда

общих промежуточных соединений (например, метаболитов цикла трикарбоновых кислот), которые, наконец, являются субстратами для основных путей (McLeod *et al.*, 2006b; Yam *et al.*, 2010; Guevara *et al.*, 2019). Сегодня у родококков насчитывается как минимум 26 периферических путей и 8 центральных метаболических путей (Larkin *et al.*, 2010). Отсутствие катаболитной репрессии у родококков обуславливает их “безотказную” вовлеченность в процессы окисления сложных органических соединений и постоянное функционирование их периферической катаболитной системы (de Carvalho *et al.*, 2014).

Выживание родококков в экстремальных условиях среды и их способность к окислению труднорастворимых соединений обеспечивается широким спектром приспособительных особенностей. Под воздействием токсичных поллютантов в бактериальных клетках может происходить нарушение клеточных оболочек, потеря ионов, белков, липидов, внутриклеточных метаболитов. Во избежание таких пертурбаций родококки меняют состав мембранных белков, стеролов, каротиноидов и, прежде всего, липидов (de Carvalho, 2010, 2019). Так, текучесть мембран поддерживается за счет изменения степени насыщения жирных кислот фосфолипидов. В условиях азотного голодания родококки способны переходить в покоящиеся формы и накапливать внутриклеточные запасные вещества, например, триацилглицерины, сложные эфиры воска, поли(гидроксibuтираты) или поли(3-гидроксиалканоаты) (Chen *et al.*, 2018). Кроме того, в присутствии экотоксикантов наблюдаются морфометрические (шероховатость и площадь поверхности) изменения клеток (Мухутдинова, 2015; Kuyukina *et al.*, 2014; Korshunova *et al.*, 2016; Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018). Ответными реакциями родококков на присутствие поллютантов или других повреждающих факторов являются изменения интегральных физико-химических показателей бактериальных клеток, например, сдвиг электрокинетического потенциала клеточной поверхности в более положительную или более отрицательную сторону (de Carvalho *et al.*, 2014; Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018). Продуцирование внеклеточных полимерных соединений и биосурфактантов

является еще одним адаптационным механизмом родококков в противостоянии негативным экологическим факторам (de Carvalho, 2019; Kuyukina, Ivshina, 2019b).

Устойчивость родококков в присутствии токсичных неорганических и органических соединений объясняется наличием эффлюксных насосов – транспортных систем выведения токсичных соединений и продуктов из клетки. Существуют специфические эффлюксные насосы, активные в отношении одного вещества или класса веществ, и, так называемые, эффлюксные насосы множественной лекарственной устойчивости (Multidrug resistance, MDR) (de Carvalho *et al.*, 2014). Специфические эффлюксные насосы родококков ассоциированы с выведением тяжелых металлов (мышьяк, кадмий), а MDR – с устойчивостью к антибиотикам разного действия, например, аминогликозидам, бета-лактамам и т.д. Необходимо подчеркнуть, что функционирование MDR эффлюксных насосов может иметь решающее значение для выживания представителей *Rhodococcus* spp. в условиях сосуществования с микроорганизмами, продуцирующими антибиотики (например, *Streptomyces* spp.) (de Carvalho *et al.*, 2014).

Важными биологическими свойствами родококков, позволяющими им конкурировать в экологических нишах с другими микроорганизмами и успешно выживать в неблагоприятных условиях внешней среды, являются способность использовать газообразные углеводороды (Ившина, 1997). Помимо этого, родококки способны к олиготрофному росту в отсутствии источников питания или в их экстремально низких, следовых количествах. *R. erythropolis* N9T-4, выделенный из сырой нефти, использовал в качестве источника азота атмосферный аммиак (Yoshida, 2019). В условиях олиготрофного питания клетки родококков накапливают волютиновые гранулы (ацидокальцисомы), содержащие полифосфаты. Это своеобразное депо неорганического фосфора в клетках, функционирующее в неблагоприятных условиях среды. Обнаруживаются новые свойства родококков. Недавно в морских кораллах был обнаружен новый вид *R. electrophilus*, обладающий электрогенными свойствами (Ramarasad *et al.*, 2018).

Ввиду широких катаболических возможностей, разнообразия адапционных механизмов родококки интенсивно используются в процессах биodeградации сложных органических соединений и в биоремедиации загрязненных природных экосистем (рисунок 4).

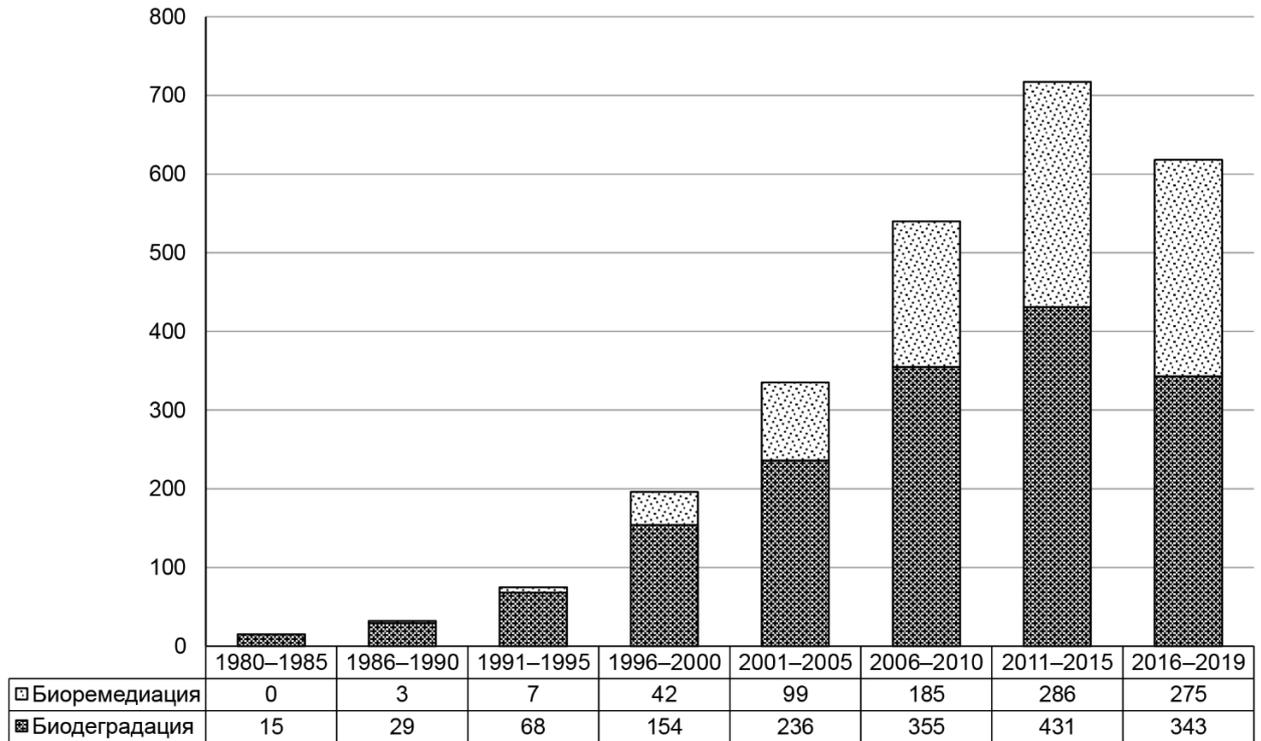


Рисунок 4 – Количество научных работ, опубликованных по темам биодеградации и биоремедиации с вовлечением родококков (по данным <http://www.scopus.com>). Поисковые запросы: заголовок/аннотация/ключевые слова: *Rhodococcus*, biodegradation, bioremediation. Нерелевантные публикации по результатам запроса не учитывались.

Родококки окисляют труднодоступные для других микроорганизмов полиароматические углеводороды (ПАУ). Штамм *R. wratislaviensis* 9 полностью конвертировал фенантрен, частично деградировал пирен и бензпирен (Subashchandrabose *et al.*, 2019). Методами молекулярно-генетического анализа выявлены ферменты, участвующие в процессе деградации данных ПАУ: 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа (*bphC*), 4-нитрофенол 2-монооксигеназа, 4-гидроксибензоат 3-монооксигеназа (*phbH*), экстрадиол диоксигеназа (*edo*) и нафталин диоксигеназа (*ndo*). Штамм *Rhodococcus* sp. T1, выделенный из нефтезагрязненной почвы в Китае, использовал пирен на 42,79 и 60,63 % в

качестве единственного источника углерода и в присутствии *n*-гексадекана соответственно (Jia *et al.*, 2019). В работе (Goswami *et al.*, 2018) штамм *R. opacus* DSM 43205 деградировал нафталин, фенантрен, флуорантен на 80–90 %.

В настоящее время проводятся исследования по актинобактериальной конверсии нефти и нефтепродуктов и разработке биоремедиационных технологий борьбы с нефтезагрязнениями. Штаммы *R. erythropolis* P2-2P, M-25 и *R. zopfii* N3-2P, изолированные из нефтезагрязненной морской воды (Канада), эффективно деградировали *n*-алканы сырой нефти (Pi *et al.*, 2019). Биодegradация нефти в почве использованием штаммов *R. erythropolis* CD 130, CD 167 и их консорциума составляла 29,8, 38,4 и 29,7 % соответственно (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2019). Биодеструкция тяжелого нефтяного топлива с использованием штаммов *Gordonia polyisoprenivorans* B, *R. erythropolis* A и C, а также *R. rhodochrous* D детально изучалась в работе (Shintani *et al.*, 2019). Следует отметить, что данные штаммы официально разрешены в Японии для применения в работах по биоаугментации. Отдельные штаммы и их консорциум эффективно деградировали топливо в жидкой среде и модельной почве при нормальных (30 °C) и пониженных (15 °C) температурах (Shintani *et al.*, 2019).

Штамм *Rhodococcus* sp. KDPy1, выделенный из сточных вод коксохимического предприятия, деградировал 1442 мг/л пиридина на 99,6 % в течение 48 ч (Zhang *et al.*, 2019a). В работе (Zhang *et al.*, 2019b) *Rhodococcus* sp. PA18 трансформировал 100 мг/л пиколиновой кислоты, карбоксилированного производного пиридина, до 6-гидроксипиколиновой кислоты за 24 ч. Показано, что родококки эффективно деградируют галогенированные углеводороды, например, тетрабромбисфенол-А (Yang *et al.*, 2018). Штамм *R. pyridinivorans* GF3, выделенный из индустриально загрязненной почвы, способен к разложению антрахинонов с образованием катехинов и салициловой кислоты (Lu *et al.*, 2019). *R. pyridinivorans* XB эффективно деградировал фталаты и фталевую кислоту (Zhao *et al.*, 2018). Эффективная биотрансформация гербицида метрибузина *R. rhodochrous* AQ1 описана в работе (Wahla *et al.*, 2019). По данным C. Nawong с соавторами (2018), у штамма *R. pyridinivorans* F5 обнаружена способность к

биодеструкции резины, обеспечиваемая наличием латекс-деградирующего фермента, кодируемого геном *lcr*.

Еще одним перспективным биотехнологическим направлением является получение биотоплива и биохимикатов с использованием родококков. Природные и мутантные штаммы (*R. opacus* PD630, *R. jostii* RHA1, *R. jostii* RHA1 VanA) способны к биоконверсии лигнина в условиях соокисления (глюкоза) с образованием липидов (Li *et al.*, 2019). *R. opacus* DSM 1069 трансформировал низкомолекулярные компоненты лигнина (Ravi *et al.*, 2019).

Родококки находят применение в нанотехнологиях. Например, штамм *Rhodococcus* sp. 2012B проявлял высокую устойчивость и жизнеспособность в присутствии наноалмазов детонационного синтеза в разных концентрациях (0,25, 0,5, 5, 10 мг/мл). Авторы отметили потенциальную возможность использования родококков в процессах деградации наноалмазов (Safronova, Koksharova, 2018).

В связи с экстраординарными биокислительными возможностями родококков в отношении ксенобиотиков широкого спектра отмечается высокий потенциал *Rhodococcus* spp. в процессах биоконверсии фармполлютантов разных терапевтических групп. В работе (Gauthier *et al.*, 2010) *R. rhodochrous* ATCC 13808 в условиях соокисления деструктировал в течение 12–36 сут антибиотики сульфаметизол (43,4 ppm), сульфаметоксазол (31,6 ppm), антиэпилептик карбамазепин (9,5 ppm) и β -блокатор метопролол (107,8 ppm) на 20,5, 53,8, 21,0 и 4,5 % соответственно. Энантиоселективная биодеградация антибиотиков группы фторхинолонов исследовалась в работе (Maia *et al.*, 2018). В присутствии ацетата клетки *Rhodococcus* sp. FP1 конвертировали оксифлоксацин (40–250 мкг/л) на 50–60 % в течение 30 сут. При этом *S*-энантиомер оксифлоксацина (левофлоксацин) трансформировался более эффективно. Возможный вклад родококков в биоконверсию устойчивых фармполлютантов карбамазепина, триклокарбана и триклозана в почве установлен в работе (Thelusmond *et al.*, 2019).

Поскольку присутствие гормональных препаратов представляет собой особую угрозу для популяционного перераспределения в природных экосистемах, ряд исследований направлен на эффективную эксплуатацию родококков в

процессах элиминации этих лекарств из окружающей среды. В исследовании (Yoshimoto *et al.*, 2004) с использованием штаммов родококков двух видов *R. equi* и *R. zopfii* достигалось полное разложение 100 мг/л эстрогенов (17 β -эстрадиол, эстрон, эстриол и этинилэстрадиол). В работе (Wang *et al.*, 2019b) показано, что клетки *R. equi* DSSKP-R-001 деградировали 17 β -эстрадиол на 86 %. Совместное культивирование родококков с бетапротеобактериальным штаммом *Comamonas testosteroni* QYY20150409 приводило к интенсификации процесса биоразложения гормона (94 %). Штамм *Rhodococcus* sp. P14 деградировал эстрадиол, эстриол и тестостерон в качестве единственного источника углерода и энергии. Анализ полногеномной последовательности штамма выявил наличие диоксигеназы 17 β -HSDx (Ye *et al.*, 2019). В присутствии косубстрата (глюкоза, адипиновая кислота) представители видов *R. erythropolis*, *R. equi* разлагали 17 α -этинилэстрадиол (0,5 и 1,4 мг/л), на 39–47 % в течение 12 сут (O'Grady *et al.*, 2009). По данным S. Larcher и V. Yargeau (2013), штамм *R. rhodochrous* ATCC 13808 полностью утилизировал 17 α -этинилэстрадиол (5 мг/л) за 48 ч инкубирования. С использованием нерастаущих клеток *R. equi* ATCC 14887 в течение 2 сут достигнуто полное разложение тестостерона (1 мг/мл). Среди конечных продуктов биодеструкции идентифицирован 3-гидрокси-9,10-секоандроста-1,3,5(10)-триен-9,17-дион, который далее, по-видимому, разлагается до углекислого газа и воды (Kim *et al.*, 2007).

С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM 768, <http://www.iegmcol.ru>) проведены исследования по биодеградации часто обнаруживаемых в экосистемах фармполлютантов, таких как спазмолитики (дротаверин, производное изохинолина) (Ivshina *et al.*, 2012, 2015), анальгетики (парацетамол, производное *p*-аминофена, и кодеин, производное изохинолина) (Ivshina *et al.*, 2006; Plotnikov *et al.*, 2017), широко используемых в медицинской практике в России и за рубежом. По данным (Ivshina *et al.*, 2006), штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 77, ИЭГМ 767 трансформировали парацетамол с образованием пирокатехина, гидрохинона и бензохинона. Максимальная убыль

парацетамола в виде субстанции составляла 86 % на 20 сут, а полная биодegradация парацетамола в таблетированной форме наблюдалась через 5 сут. Использование иммобилизованных родококков в криогель на основе поливинилового спирта позволило сократить продолжительность процесса до 3 сут. С использованием свободных, иммобилизованных и дормантных клеток родококков достигнута полная деструкция дротаверина (20 мг/л) с образованием простых ароматических соединений – производных протокатеховой кислоты, не обладающих выраженной токсичностью по сравнению с таковой исходного соединения (Ivshina *et al.*, 2012, 2015). Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 трансформировал кодеин до кодеинона, гидрокодона, 14-гидрокси Кодеинона (Плотников и др., 2015; Plotnikov *et al.*, 2017).

Отдельные работы посвящены исследованию возможности получения более активных фармацевтических соединений путем трансформации исходных молекул с использованием биокаталитической активности родококков. Так, рацемический напроксен-амид подвергали гидролизу иммобилизованными клетками *R. erythropolis* МР 50 с образованием *S*-напроксена, который обладает более выраженным терапевтическим эффектом по сравнению с другими формами напроксена (Effenberger *et al.*, 1997). Другой интересный пример связан с гидролизом (*R*)-1,4-дибензодиоксан-2-карбонитрила до 2*S*-1,4-бензодиоксан-2-карбоксамиды и 2*R*-1,4-бензодиоксан-2-карбоновой кислоты целыми клетками *R. erythropolis* AJ270 (Liu *et al.*, 2006). 2*R*-1,4-бензодиоксан-2-карбоновая кислота используется для производства “Доксазосина” – гипотензивного и сосудорасширяющего препарата. С использованием клеток *Rhodococcus* sp. KY1 показана возможность биоконверсии индена в (2*R*)-индандиол, который применяется в производстве “Криксивана” – препарата, рекомендованного для борьбы с ВИЧ-инфекцией (Stafford *et al.*, 2001).

N.V. Сарова с соавторами (2011) с использованием свободных и иммобилизованных клеток *R. erythropolis* ВКПМ Ас-1740 из 11 стероидов ряда андростана и прегнана при содержании субстрата в реакционной среде 0,5–10 г/л получили более активные соответствующие 9 α -гидрокси производные с

максимальным выходом не менее 65 %. Использование биокатализатора на основе родококков, иммобилизованных в матрицу поливинилового спирта, повышало эффективность процесса биотрансформации: выход 9 α -гидроксиандростендиона повышался с 85 до 98 % по сравнению с таковой у свободных клеток (Carrova *et al.*, 2011). В работе (Kimura *et al.*, 2014) с использованием штамма *R. rubropertinctus* N82 изучена биотрансформация трет-бутилового эфира 6,7-дигидро-4Н-тиено [3,2-с] пиридин-5-карбоновой кислоты (LS1) в трет-бутиловый эфир 2-гидрокси-6,7-дигидро-4Н-тиено [3,2-с] пиридин-5-карбоновой кислоты (LP1) – вещества, ингибирующего образование тромбоцитов и являющегося активным центром препарата “Прасугрель”.

Таким образом, актинобактерии рода *Rhodococcus* можно рассматривать в качестве одних из наиболее активных природных агентов, обладающих высокой деструктирующей и трансформирующей активностью в отношении фармацевтических соединений. Стоит отметить, что исследования с вовлечением родококков в процессы биоконверсии фармпрепаратов активно развиваются, однако информации о влиянии фармполлютантов на микроорганизмы, которые являются природной системой “первичного реагирования” на ксенобиотическую нагрузку в открытых экосистемах и запускают защитные реакции в ответ на присутствие загрязнителей, явно недостаточно. Кроме того, малочисленны сведения о продуктах метаболизации фармацевтических веществ и степени их токсичности и опасности для природных экосистем. Вследствие этого детальное раскрытие подобных вопросов будет способствовать формированию представления о “судьбе” и “поведении” фармполлютантов в окружающей среде, а также позволит создать в обозримом будущем технические решения процессов доочистки сточных вод фармацевтического профиля и экологически безопасные биотехнологические способы обезвреживания и утилизации опасных фармотходов.

Экспериментальная часть

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Рабочая коллекция

В работе использовали 104 штамма родококков из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegmcoll.ru). Культуры принадлежали к десяти видам *Rhodococcus*: *R. cercidiphylli* (1 штамм), *R. corynebacterioides* (2 штамма), *R. erythropolis* (41 штамм), *R. jostii* (3 штамма), *R. koreensis* (1 штамм), *R. pyridinivorans* (2 штамма), *R. qingshengii* (4 штамма), *R. rhodochrous* (8 штаммов), *R. ruber* (41 штамм), *R. wratislaviensis* (1 штамм). Выбор штаммов обоснован географией и источником выделения, а также известной каталитической активностью родококков по отношению к сложным органическим соединениям (таблица 6, рисунок 5).

2.2. Химические реагенты

ДН ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$, CAS 15307-86-5, 2-(2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота в виде натриевой соли). ДН использовали в виде фармацевтической субстанции (светло-бежевый кристаллический порошок без запаха, чистота – 99,0 % в пересчете на сухое вещество, умеренно растворимый в воде, производство (Kairav Chemicals Ltd, Индия).

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

2.3. Условия культивирования

В экспериментах по биодеструкции ДН применяли минеральную среду RS (www.iegmcoll.ru/strains/index.html) без внесения хлоридов натрия и кальция. При выборе рабочей концентрации ДН исходили из фактической концентрации ДН, детектируемой в водных и почвенных средах, а также из предположения о том, что большие дозы приносят негативные эффекты, но стимулируют защитные

Таблица 6 – Коллекционные штаммы родококков, использованные в работе

Коллекционный номер	Характеристика штамма	Источник выделения	География выделения
<i>R. cercidiphylli</i>			
ИЭГМ 1184	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода и энергии	Почва, ризосфера <i>Chenopodium album</i>	Соликамск, Россия
<i>R. corynebacterioides</i>			
ИЭГМ 931	Использует нормальные углеводороды (C ₁₄ , C ₁₆), алифатические спирты (бутан-1-ол) и ароматические углеводороды (ксилол) в качестве единственного источника углерода и энергии	Почва, ризосфера <i>Arctium tomentosum</i>	Пермь, Россия
ИЭГМ 1202	Использует <i>n</i> -гексадекан, алифатические спирты (бутан-1-ол) и ароматические углеводороды (ксилол) в качестве единственного источника углерода и энергии	Прибрежная почва	оз. Гольцовое, п-ов Мамонта, Ямало-Ненецкий автономный округ
<i>R. erythropolis</i>			
ИЭГМ 22, ИЭГМ 23, ИЭГМ 24, ИЭГМ 25, ИЭГМ 26	Используют нормальные углеводороды и алифатические спирты (бутан-2-ол, этанол, октан-1-ол) в качестве единственного источника углерода; деградируют ароматические кислоты (<i>m</i> -оксибензойная, <i>p</i> -оксибензойная кислоты)	Пластовая вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 179, ИЭГМ 180, ИЭГМ 181, ИЭГМ 182, ИЭГМ 183, ИЭГМ 186	Используют нормальные углеводороды и алифатические спирты (бутан-2-ол, этанол, октан-1-ол, пропан-1-ол, пропан-2-ол), ароматические углеводороды (нафталин, оксибензол, ксилол), ароматические кислоты (<i>m</i> -оксибензойная, <i>p</i> -оксибензойная) в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты	Нефтезагрязненная вода	Пермский край, Россия

Продолжение таблицы 6

Коллекционный номер	Характеристика штамма	Источник выделения	География выделения
ИЭГМ 187, ИЭГМ 188, ИЭГМ 189	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии; продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₀ -C ₁₆)	Нефтезагрязненные донные осадки	Тюменская область, Россия
ИЭГМ 193, ИЭГМ 194, ИЭГМ 196	Используют нормальные углеводороды, алифатические спирты (этанол, пропан-1-ол, пропан-1,2,3-триол), ароматические углеводороды (нафталин, оксibenзол, ксилол) и фенилуксусную кислоту в качестве единственного источника углерода	Донные отложения	р. Пим, Тюменская область, Россия
ИЭГМ 199, ИЭГМ 201	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₂ -C ₁₇); деградируют парацетамол; устойчивы к Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , VO ³⁻	Родниковая вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 200, ИЭГМ 203, ИЭГМ 204, ИЭГМ 709	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты	Скважинная вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 211, ИЭГМ 212, ИЭГМ 213, ИЭГМ 244, ИЭГМ 344	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода; устойчивы к дротаверину	Бытовая сточная вода	Харбин, Китай
ИЭГМ 250	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода	Снег	Якутия, Россия
ИЭГМ 486, ИЭГМ 487	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода; имеют холестерол-оксидазу; трансформируют β-ситостерол	Донные отложения	оз. Байкал, Иркутская обл., Россия
ИЭГМ 496	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода	Минеральная вода	Тюменская обл., Россия

Продолжение таблицы 6

Коллекционный номер	Характеристика штамма	Источник выделения	География выделения
ИЭГМ 588	Использует <i>n</i> -декан, <i>n</i> -гексадекан, бутанол	Донные отложения	Средиземное море, Италия
ИЭГМ 696, ИЭГМ 700	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода	Поверхностная вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 701	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода	Сточная вода, завод синтетических моющих средств	Пермь, Россия
ИЭГМ 703	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода	Сточная загрязненная нефтью вода, сырой	Пермский край, Россия
ИЭГМ 711, ИЭГМ 712	Используют нормальные углеводороды, алифатические спирты (пропан-1-ол, пропан-2-ол, бутан-1-ол, бутан-2-ол), ароматические углеводороды (бензол, толуол) в качестве единственного источника углерода	Пена, очистное сооружение	Ирвин, Шотландия, Великобритания
ИЭГМ 1020	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода	Сточная вода, завод по производству лекарственных средств	Пермский край, Россия
ИЭГМ 1321	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода	Донные отложения	о. Кейн, Земля Франца-Иосифа, Новая Земля, Архангельская обл., Россия
<i>R. jostii</i>			
ИЭГМ 68	Продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₀ -C ₁₆); имеет адгезию к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан)	Почва	Пермский край, Россия
ИЭГМ 550	Использует пропан, <i>n</i> -углеводороды (C ₁₆), бутан-1-ол, ксилол в качестве единственного источника углерода	Техногенно загрязненная почва	Пермский край, Россия

Продолжение таблицы 6

Коллекционный номер	Характеристика штамма	Источник выделения	География выделения
ИЭГМ 1193	Использует <i>n</i> -углеводороды (C ₁₆), алифатические спирты (бутан-1-ол), ароматические углеводороды (ксилол) в качестве единственного источника углерода	Нефтезагрязненная почва	Пермский край, Россия
<i>R. koreensis</i>			
ИЭГМ 962 [†]	Деградирует 2,4-динитрофенол	Индустриальная сточная вода	Чхонджу, Южная Корея
<i>R. pyridinivorans</i>			
ИЭГМ 1055 [†]	Деградирует пиридин	Индустриальная сточная вода	Северная Корея
ИЭГМ 1277	Использует пропан, <i>n</i> -гексадекан, бутанол, ксилен и сырую нефть в качестве источника углерода	Поверхностная вода	Пермский край, Россия
<i>R. qingshengii</i>			
ИЭГМ 247	Использует <i>n</i> -гексадекан, сырую нефть в качестве источника углерода; деградирует эфиры фталевой кислоты	Почва, завод по производству полиэфирного волокна лавсана	Могилев, Беларусь
ИЭГМ 1262, ИЭГМ 1270	Используют <i>n</i> -гексан, <i>n</i> -гексадекан, сырую нефть в качестве источника углерода	Нефтяной шлам	Республика Удмуртия, Россия
ИЭГМ 1359	Использует <i>n</i> -гексан, <i>n</i> -гексадекан, бутанол в качестве источника углерода	Донные отложения	о. Ли-Смита, Земля Франца-Иосифа, Новая Земля, Архангельская обл., Россия
<i>R. rhodochrous</i>			
ИЭГМ 608, ИЭГМ 629, ИЭГМ 646	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода; деградируют дротаверин, имеют адгезию к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан)	Поверхностная вода	Пермский край, Россия

Продолжение таблицы 6

Коллекционный номер	Характеристика штамма	Источник выделения	География выделения
ИЭГМ 639	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C ₁₁ -C ₁₆), алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве источника углерода; трансформирует тиоанизол; имеет адгезию к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан); устойчив к <i>n</i> -гексану	Снег	Пермский край, Россия
ИЭГМ 647	Имеет холестерол-оксидазу; трансформирует тиоанизол, аккумулирует молибден; устойчив к дротаверину; имеет адгезию к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан); устойчив к <i>n</i> -декану, 1-бутанолу, этанолу	Нефтезагрязненная вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 654	Имеет нитрилазу; гидролизует нитроолефины (1-фенил-2-нитропропен до 1-фенил-2-нитропропана); трансформирует тиоанизол	Почва	Эдинбург, Шотландия, Великобритания
ИЭГМ 1362	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода; деградирует дегидроабиетиную кислоту	Торф	Пермский край, Россия
<i>R. ruber</i>			
ИЭГМ 71, ИЭГМ 83, ИЭГМ 85, ИЭГМ 86, ИЭГМ 90, ИЭГМ 91	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода; деградируют диметилфталат, диметилтерефталат и ди-(2-этилгексил)фталат; устойчивы к линкомицину, метициллину, полимиксину, цефалексину, налидиксовой кислоте; аккумулируют цезий; трансформируют β-ситостерол	Поверхностная вода	П-ов Таймыр, Красноярский край, Россия
ИЭГМ 73, ИЭГМ 82, ИЭГМ 333, ИЭГМ 340, ИЭГМ 341, ИЭГМ 342	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода; трансформируют тиоанизол; устойчивы к Cu ²⁺ ,	Подземная вода	Пермский край, Россия

Продолжение таблицы 6

Коллекционный номер	Характеристика штамма	Источник выделения	География выделения
	Pb^{2+} , VO^{3-} , VO_4^{3-}		
ИЭГМ 76, ИЭГМ 234, ИЭГМ 235, ИЭГМ 371, ИЭГМ 442, ИЭГМ 451	Используют пропан, <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C_{12} - C_{17}); деградируют парацетамол; устойчивы к линкомицину, хлорамфениколу	Снег	Пермский край, Россия
ИЭГМ 219, ИЭГМ 220, ИЭГМ 222	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C_5 - C_7 , C_{11} - C_{16}) в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C_{10} - C_{17}); демонстрируют антилизоцимную активность; имеют адгезию к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан); устойчивы к 1-бутанолу, этанолу	Поверхностная вода	р. Илыч, Республика Коми, Россия
ИЭГМ 231, ИЭГМ 237	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C_{12} - C_{17}); деградируют высокопористые керамические материалы; деградируют парацетамол; имеют холестерол-оксидазу; устойчивы к Cd^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , VO^{2+} , VO^{3-} , VO_4^{3-} ; аккумулируют молибден, никель; имеют адгезию к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан); биоремедиаторы нефтезагрязненной почвы; устойчивы к 1-бутанолу, этанолу; продуцируют гликолипидный биосурфактант с иммуномодулирующими свойствами	Родниковая вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 320, ИЭГМ 321, ИЭГМ 322	Используют пропан, <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода	Минеральная вода	Ханты-Мансийский автономный округ, Россия

Продолжение таблицы 6

Коллекционный номер	Характеристика штамма	Источник выделения	География выделения
ИЭГМ 343, ИЭГМ 345, ИЭГМ 346	Используют пропан, <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₂ -C ₁₇); устойчивы к дротаверину, <i>n</i> -гексану, 1-бутанолу, этанолу	Сточная вода	Харбин, Китай
ИЭГМ 351, ИЭГМ 352	Используют пропан, <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода; продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₂ -C ₁₇)	Скважинная вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 369	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C ₅ -C ₁₆) в качестве единственного источника углерода; продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₂ -C ₁₇)	Грунтовая вода	Свердловская область, Россия
ИЭГМ 379	Деградирует эфиры фталевой кислоты	Техногенно загрязненная почва	Могилев, Беларусь
ИЭГМ 380, ИЭГМ 383, ИЭГМ 384, ИЭГМ 385, ИЭГМ 386	Используют пропан, <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода; трансформируют тиоанизол	Донные отложения	Оз. Байкал, Иркутская область, Россия
ИЭГМ 445, ИЭГМ 593	Используют углеводороды; поддерживают метаболическую активность (45 %) при высокой концентрации соли (123,0 г/л)	Пластовая вода	Пермский край, Россия
ИЭГМ 1133	Использует пропан, <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода	Донные отложения	Пермский край, Россия
<i>R. wratislaviensis</i>			
ИЭГМ 1171	Использует пропан, <i>n</i> -гексадекан, бутанол, ксилол в качестве единственного источника углерода	Почва, ризосфера <i>Urtica dioica</i>	Пермь, Россия

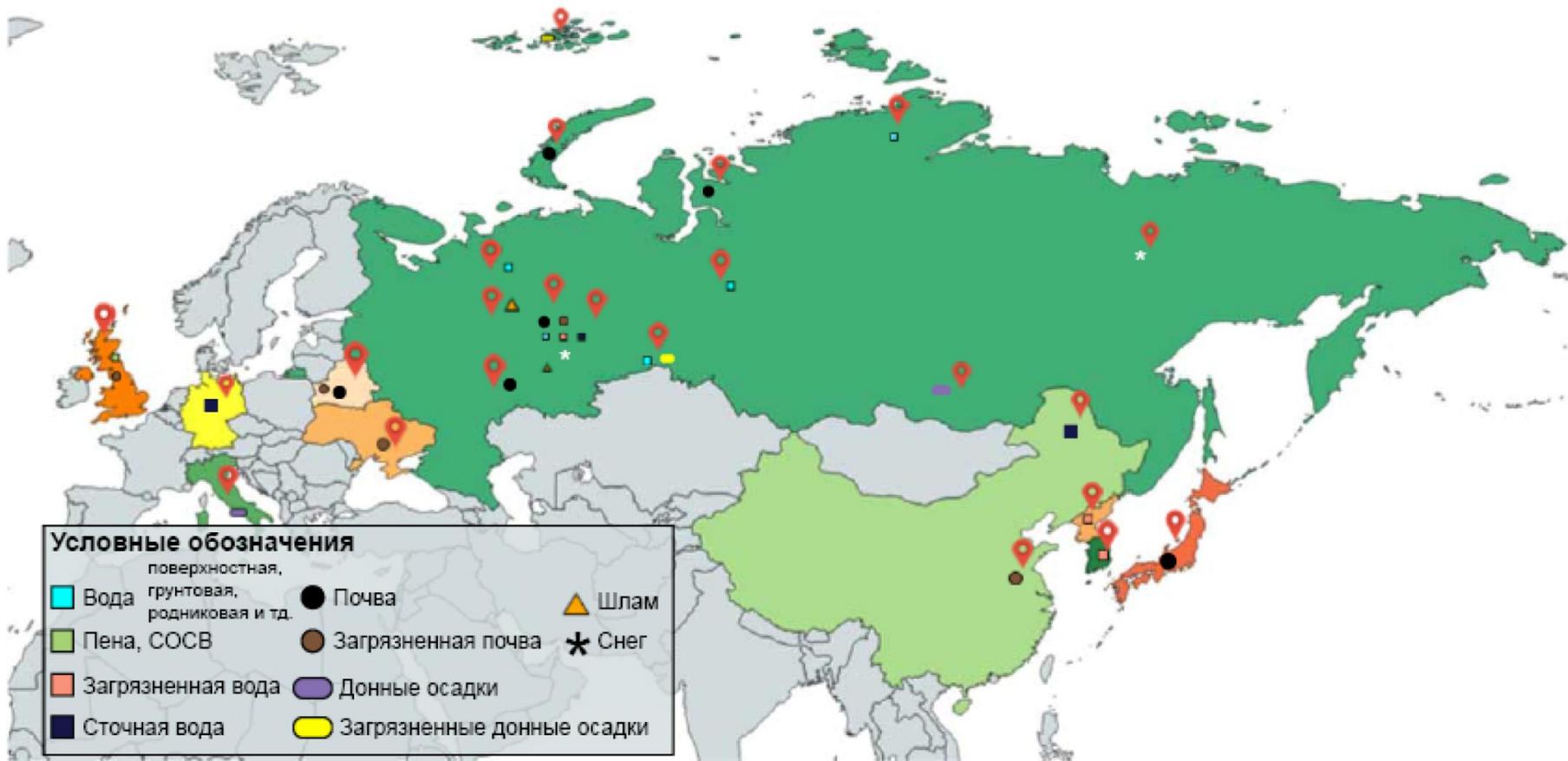


Рисунок 5 – География и источник выделения штаммов родококков, использованных в работе.

механизмы организма, тогда как малые дозы вызывают негативные эффекты, но не стимулируют защитные механизмы организма. ДН использовали в концентрации 50 мг/л и 50 мкг/л. До инокуляции исходное значение рН среды составляло 7,0. Клетки, предварительно выращенные в течение 2-х сут в мясопептонном бульоне (МПБ, Sigma-Aldrich, США) и отмытые дважды фосфатным буфером (рН 7,0), вносили в среду культивирования до конечной концентрации $3,8 \times 10^7$ кл/мл. В отдельных экспериментах родококки предварительно выращивали в МПБ в присутствии низкой (5 мкг/л) концентрации ДН. Для оценки содержания хлоридов в среде культивирования клетки выращивали в бесхлорной среде RS. В качестве дополнительного энергетического субстрата использовали D-глюкозу (0,5 %). Процессы биодеструкции вели в условиях периодического культивирования (160 об/мин, 28 °С). Во избежание фотоинициированного окисления ДН содержимое колб защищали от действия света с помощью светонепроницаемого материала. В виду большой (более 60 сут) продолжительности лабораторных экспериментов во времени, полученные значения корректировали с учетом поправки на испарение воды с помощью уравнений, приведенных в работе (Gauthier *et al.*, 2010).

В экспериментах по исследованию влияния ингибиторов оксигеназ на деградирующую активность родококков использовали специфические ингибиторы цитохром Р450-зависимых монооксигеназ (1-аминобензотриазол, амиодарона гидрохлорид, имидазол, кетоконазол, проадифен), которые вносили в среду до конечной концентрации 5 мМ (Marco-Urrea *et al.*, 2010). В качестве контролей использовали минеральную среду с родококками (1) без ингибиторов, (2) без ДН, (3) без ингибиторов и ДН. О влиянии ингибиторов на активность монооксигеназ судили по уровню биотрансформации ДН.

2.4. Контрольные эксперименты

В качестве контролей использовали (1) стерильный раствор ДН в минеральной среде (для оценки абиотической деструкции фармвещества); (2) стерильный раствор ДН в минеральной среде с инактивированными клетками родококков (для оценки степени адсорбции ДН на бактериальных клетках), при

этом бактериальные клетки инактивировали автоклавированием в течение 20 мин при 1,0 атм. трехкратно; (3) минеральную среду, содержащую глюкозу с бактериальными клетками, без лекарственного вещества (контроль для разграничения метаболитов, появляющихся в результате разложения ДН).

2.5. Иммобилизация бактериальных клеток

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

Для закрепления бактериальных клеток, предварительно выращенных в присутствии низких концентраций ДН, адсорбент на основе древесных пород (2 г) и полипропиленовые диски (200 шт, $d_{\text{диска}} = 0,5$ мм) помещали в 100 мл клеточной суспензии с ОП₆₀₀ 1,0 в фосфатном буфере (рН 7,0) (рисунок 6). Опилки предварительно гидрофобизовали (для повышения сродства поверхности иммобилизатора к бактериальным клеткам) с помощью биосурфактанта, *n*-гексадекана или олифы производства “Оксоль”, Россия (Криворучко, 2008; Podorozhko *et al.*, 2008) (рисунок 7).

Процесс адсорбции осуществляли при перемешивании 120 об/мин и температуре 28 °С в течение 3–6 сут. Степень адсорбции бактериальных клеток на поверхности носителя (адсорбционная емкость носителя) вычисляли по формуле:

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

где S – степень адсорбции, %; $S_{\text{исх}}$ – оптическая плотность суспензии до иммобилизации; $S_{\text{равн}}$ – оптическая плотность после иммобилизации. Неадсорбированные клетки трижды отмывали фосфатным буфером.

Для закрепления родококков в матрицу ПВС клетки предварительно выращивали в течение 2 сут при 28 °С в МПБ и низких концентраций ДН (Куякина *et al.*, 2006). Бактериальную суспензию (ОП₆₀₀ 1,0) смешивали со стерильным раствором ПВС (12 %) в соотношении 1:2 v/v.

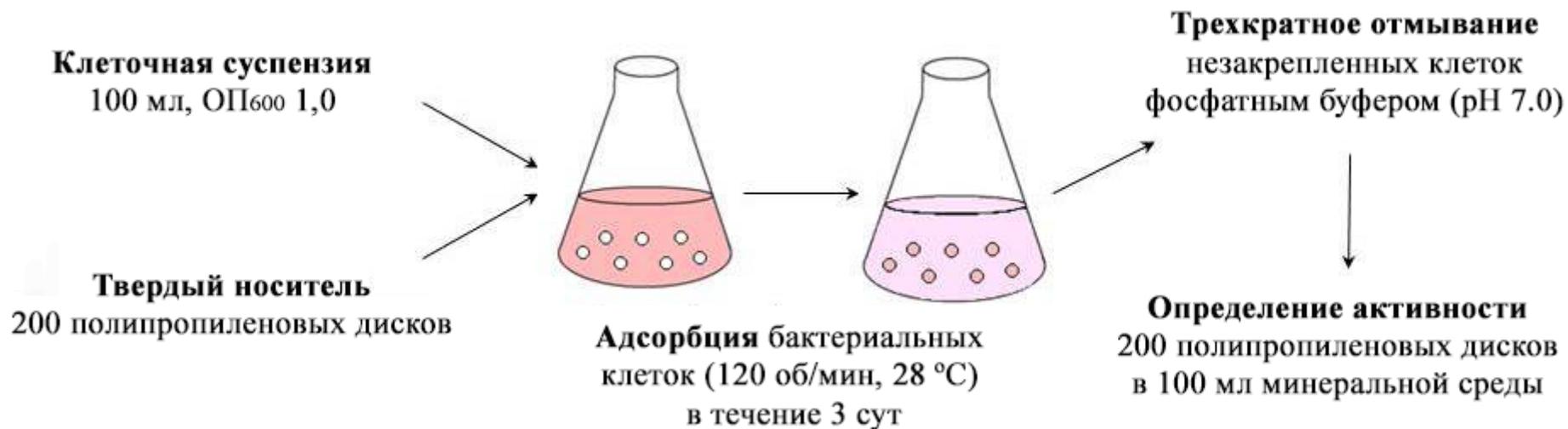


Рисунок 6 – Схема иммобилизации родококков на поверхности полипропиленовых дисков (цит. по Черемных, 2018).

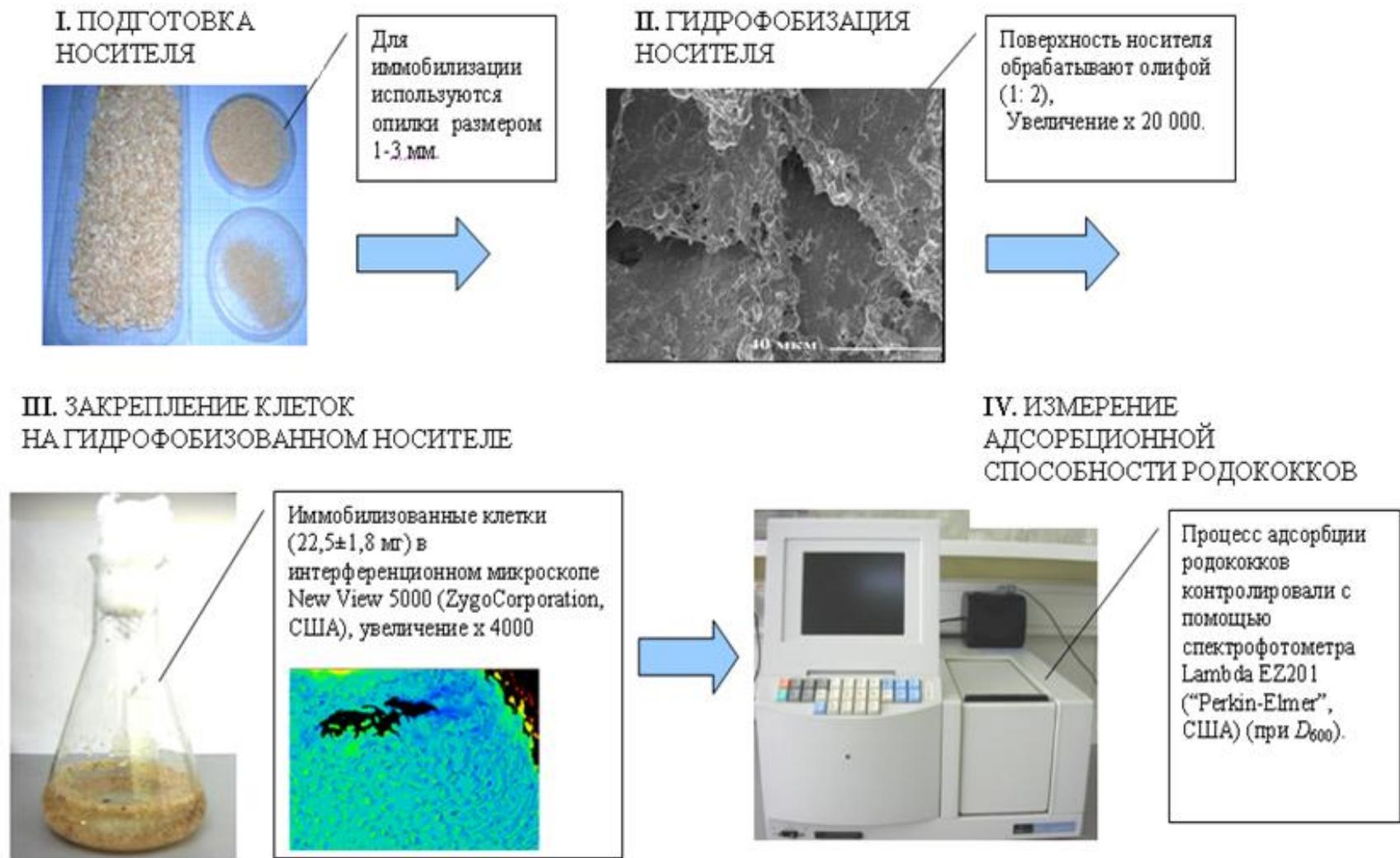


Рисунок 7 – Схема иммобилизации родококков на древесных опилках (цит. по Мухутдинова, 2015).

Этапы замораживания и оттаивания осуществляли согласно схеме (рисунок 8). В сравнительных экспериментах по биодеструкции ДН использовали одинаковое количество клеток – $3,8 \times 10^7$ кл/мл. Хранение полученного биокатализатора осуществляли при 4 °С. Перед использованием иммобилизованные клетки предварительно регидратировали в 0,5 %-м растворе NaCl в течение 24 ч.

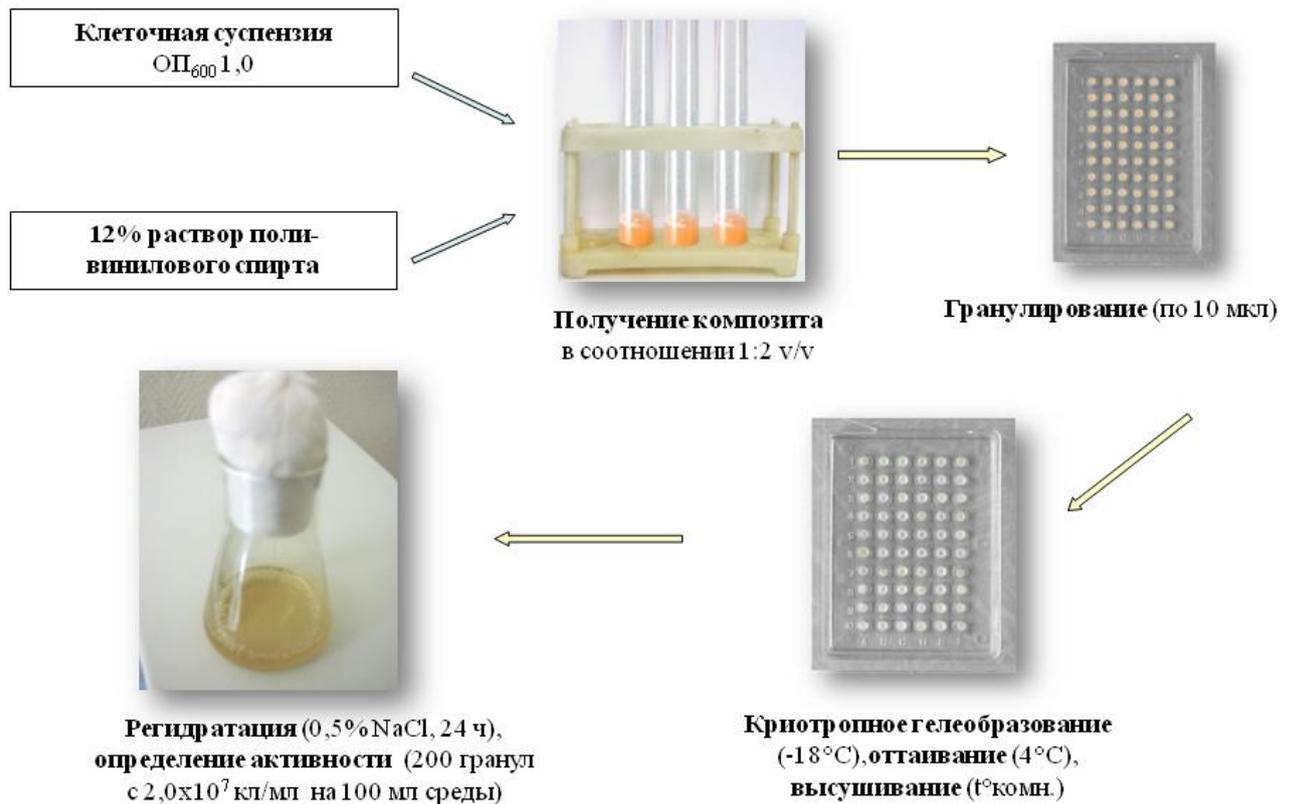


Рисунок 8 – Схема получения бактериальных клеток, иммобилизованных в криогеле на основе ПВС (цит. по Елькин, 2011).

2.6. Получение отдельных клеточных фракций родококков

Отдельные фракции актинобактериальных клеток получали по методике, описанной в работе (Tarasova *et al.*, 2017). Родококки, предварительно выращенные в течение 2 сут в МПБ и в присутствии ДН (5 мкг/л), трижды отмывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (рН 7,0) (рисунок 9). Клеточную суспензию обрабатывали с помощью ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 (MSE, Великобритания) в течение 60 мин при амплитуде 10 мкм в условиях охлаждения.

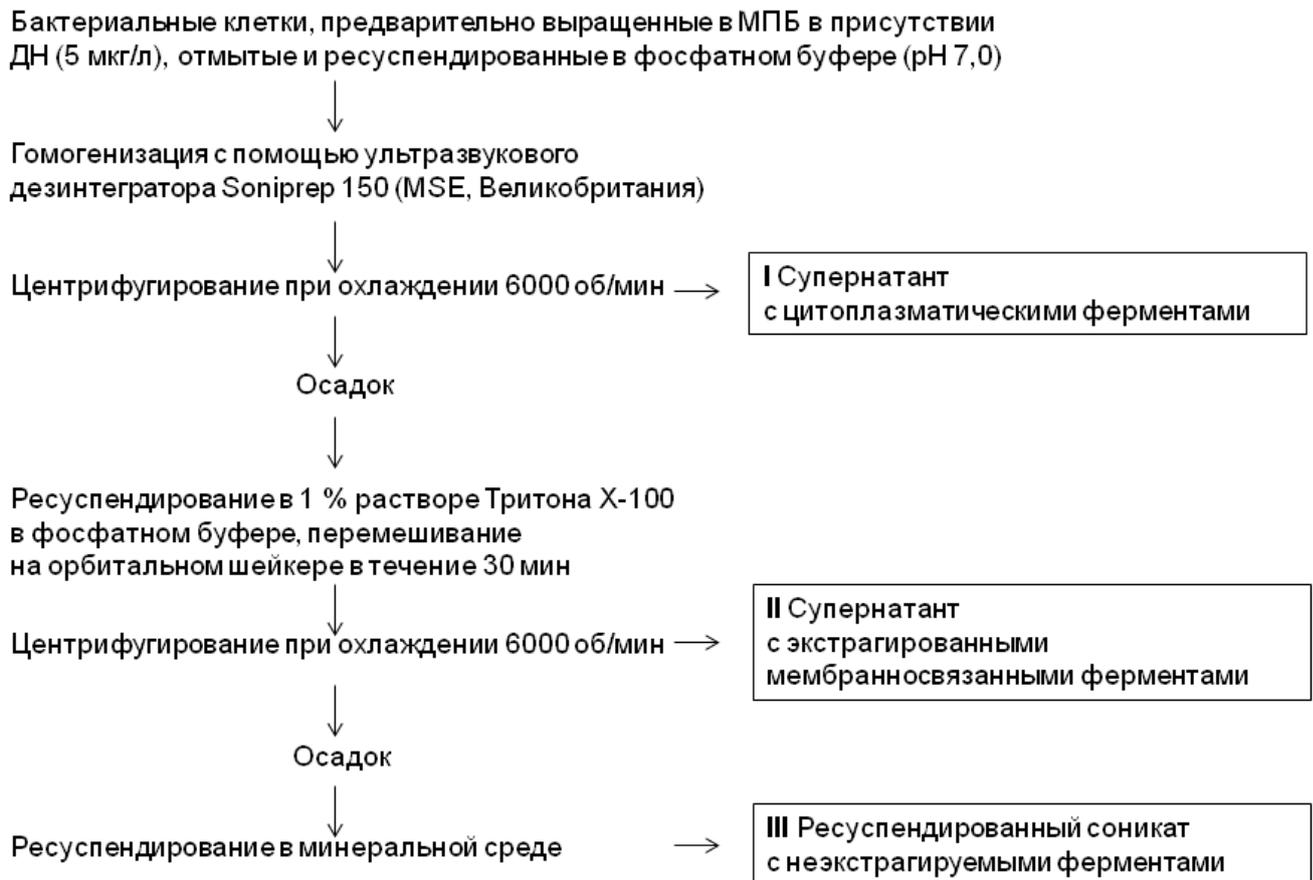


Рисунок 9 – Схема получения клеточных фракций родококков.

В результате соникации выживало не более 0,1 % клеток, что подтверждалось подсчетом КОЕ/мл микрометодом точечных высевов и микроскопическими исследованиями. Полученный гомогенат центрифугировали (6000 об/мин, 20 мин, 4 °С) для получения фракции цитоплазматических ферментов. Для выделения мембранносвязанных ферментов осадок ресуспендировали в 1 % растворе Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере (pH 7,0), перемешивали на орбитальном шейкере в течение 30 мин и затем центрифугировали (6000 об/мин, 20 мин, 4 °С). Соникат мембранносвязанных ферментов, неэкстрагированных детергентом, ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,0). В качестве контроля использовали целые клетки родококков в фосфатном буферном растворе (pH 7,0).

2.7. Жизнеспособность бактериальных клеток

Жизнеспособность клеток в процессе биодеструкции ДН определяли микрометодом точечных высевов (Веслополова, 1995) и специфическим

окрашиванием бактерий йодонитротетразолия хлоридом (INT, Sigma-Aldrich, США) (Kuyukina *et al.*, 2006). INT-тест основан на дегидрогеназной активности активно респираторных клеток, в результате которой INT – конечный акцептор электронов и водорода, слабоокрашенное легко растворимое вещество, восстанавливается до нерастворимого в воде красно-фиолетового INT-формаза. Количество формаза пропорционально количеству жизнеспособных клеток. Для определения жизнеспособности родококков 0,5 мл культуральной жидкости смешивали с 0,25 мл 0,2 % водного раствора INT и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Количество образовавшегося формаза после его экстракции эквивалентным объемом этилацетата определяли нефелометрически (при 490 нм) с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США). Число жизнеспособных клеток рассчитывали по калибровочному графику зависимости оптической плотности раствора формаза в этилацетате от КОЕ/мл, определяемого микрометодом точечных высевок.

2.8. Минимальная подавляющая концентрация диклофенака

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ДН в отношении родококков определяли методом двукратных серийных разведений в МПБ (Performance Standards..., 2017) с использованием полистироловых планшетов стандартной конфигурации 8×12 (96) лунок (Медполимер, Россия). ДН вносили в начальной концентрации 200 мг/л с последующим двукратным разведением. К полученной смеси добавляли по 10 мкл бактериальной суспензии ($3,0 \times 10^7$ кл/мл), предварительно выращенной в течение 2 сут в МПБ. Бактерии инкубировали на протяжении 3 сут при температуре 28 °С и перемешивании (300 об/мин) на планшетном шейкере Titramax 1000 (Heidolph, Германия) с последующим окрашиванием клеток 0,2 %-ным водным раствором INT. Оценку жизнеспособности клеток проводили по измерению оптической плотности формаза с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, США).

Для исследования МПК смеси ДН с другими наиболее часто детектируемыми в окружающей среде фармацевтическими веществами (ибупрофеном,

мелоксикамом, в частности) испытуемые соединения смешивали в равных пропорциях.

2.9. Микроскопические исследования

Визуализацию клеток проводили с использованием оптического микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста. Фотодокументирование изображений осуществляли с помощью фотокамеры Pixera PRO 150ES (Pixera, США) и компьютерной программы ВидеоТест-Размер 5,0 (Аконд, Россия). Влияние ДН на морфологию и рельеф поверхности клеток исследовали с использованием системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования, включающей атомно-силовой микроскоп (АСМ) MFP-3D-BIO™ (Asylum Research Inc., США) и конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (КЛСМ) Olympus Fluo View 1000 (Olympus Corporation, Япония). Для дифференциации живых и мертвых клеток бактериальную суспензию окрашивали флуоресцентным красителем LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США). Подготовку препаратов осуществляли по методике, описанной в работе (Коршунова, 2016). Для возбуждения флуоресценции SYTO 9 и пропидиум иодида 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. Приготовленный препарат сканировали с помощью КЛСМ. Клетки, флуоресцирующие зеленым цветом, считали жизнеспособными, красным – мертвыми. Анализ изображений проводили с использованием программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). Затем изображения импортировали в программное обеспечение Igor Pro 6,22A (WaveMetrics, США) и проводили АСМ-сканирование выбранной области в полуконтактном режиме на воздухе со скоростью 0,2 Гц с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц, константой жесткости 0,5–4,4 Н/м и радиусом кривизны зонда 9 нм. Измеряли среднеквадратичную шероховатость клеточной поверхности, длину, ширину клеток по данным с канала Height. Объем (1) и площадь (2) поверхности клеток рассчитывали по формулам, приведенным в работах (Neumann *et al.*, 2005):

$$V = r^2 \pi h, \quad (2)$$

$$S = 2 r^2 \pi + 2 \pi r h, \quad (3)$$

где V – объем клеток, мкм^3 , S – площадь клеток, мкм^2 , r – радиус клеток, мкм , h – длина клеток, мкм .

2.10. Гидрофобность клеток

Степень гидрофобности бактериальных клеток определяли методом Salt Aggregation Test (SAT), основанном на предпосылке, что чем больше гидрофобных клеток в исследованной взвеси бактерий, тем в большей степени увеличивается скорость агрегации бактериальных клеток (Lindahl *et al.*, 1981). Родоккокки суспендировали в фосфатном буфере с добавлением сульфата аммония. Провоцирование клеточной флокуляции происходило за счет повышения концентрации соли. Готовили ряд разведений сульфата аммония в интервале концентраций от 0 до 2,0 М с шагом от 0,2 до 0,4 М. На предметном стекле смешивали 10 мкл бактериальной взвеси ($\sim 10^{10}$ кл/мл) и 10 мкл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Визуализацию контрольных и агрегированных под действием 0,2–2,0 М сульфата аммония клеток осуществляли с использованием светового микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия). Минимальную концентрацию раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, при которой наблюдалось образование клеточных агрегатов, принимали за условное значение степени гидрофобности клеточной стенки. Оценку степени гидрофобности бактериальных клеток проводили по шкале: высокая гидрофобность – показатель солености раствора сульфата аммония от 0 до 0,8 М; умеренная – от 1,0 до 2,0 М; слабая – от 2,2 до 3,8 М (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999).

2.11. Дзета-потенциал

Измерение дзета-потенциала (ζ -потенциал) бактериальных клеток проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZetaSizer, v. 2.2. ζ -потенциал рассчитывали по формуле:

$$\zeta = \frac{\eta u}{\varepsilon_0 \varepsilon_r}, \quad (4)$$

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.

Клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы и ДН, дважды отмывали и ресуспендировали в 0,1 М KNO_3 (pH 7,0) до достижения OP_{600} 0,2. Измерения проводили в U-образной кювете с позолоченными электродами при температуре 25 °С и pH 7,0.

2.12. Общие липиды

Сравнительное определение общих липидов в бактериальных клетках, выращенных в минеральной среде в присутствии глюкозы и ДН в течение 15 сут, проводили согласно методике (Ившина, 2014). Для этого 50 мг сухой клеточной биомассы выдерживали в течение 24 ч в 3,75 мл смеси хлороформ – метанол (4 мл) в объемном соотношении 2:1. По истечении 24 ч смесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант сливали в центрифужную пробирку. Полученный осадок экстрагировали повторно с использованием 4,75 мл смеси хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8). Надосадочную жидкость объединяли с ранее полученным экстрактом, к которому добавляли 5 мл смеси хлороформ–вода (1:1) и центрифугировали. В сухие, предварительно взвешенные круглодонные колбы, в равных количествах переносили хлороформный слой и разбавляли эквивалентным количеством бензола. Полученную смесь упаривали на роторном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °С до постоянного веса. Количество общих липидов выражали в процентах от сухой массы клеток.

2.13. Дыхательная активность

Дыхательную деятельность клеток оценивали с помощью 6-канального респирометра Micro-Охумах[®] (Columbus Instruments, США). Эксперименты проводили в стеклянных флаконах Micro-Охумах вместимостью 300 мл, с объемом минеральной среды 100 мл при постоянном перемешивании (160 об/мин, 28±2 °С) на магнитной мешалке IKAMAG[®] RO10power (IKA Werke, Германия). Оценивали количество (мкл) и скорость (мкл/мин) потребляемого O_2 и

выделяемого CO₂. Автоматическая регистрация респираторной активности проводилась каждые 42 мин в течение 5–10 сут.

2.14. Каталазная активность

Каталазную активность родококков в процессе биодеструкции ДН определяли по методике, описанной в работе (Gogoleva *et al.*, 2012). Бактериальные клетки, выращенные в присутствии глюкозы и ДН, 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:

$$A_{\text{кат}} = \frac{12,5(1 - \text{ОП}_0 / \text{ОП}_k)}{T \times \text{ОП}_6}, \quad (5)$$

где $A_{\text{кат}}$ – каталазная активность, мкМ/мин × ОП; ОП₀ – оптическая плотность супернатанта в опытном образце, ед. опт. плотн.; ОП_к – оптическая плотность супернатанта в контрольном образце, ед. опт. плотн.; Т – время инкубации бактерий в присутствии H₂O₂ (10 мин); ОП₆ – оптическая плотность бактериальной суспензии (ОП₄₉₂ 0,2).

2.15. Содержание глюкозы в среде культивирования

Определение содержания глюкозы проводили глюкозооксидазным методом с использованием набора реагентов “Фотоглюкоза” согласно инструкции производителя (Импакт, Россия). Принцип метода заключается в том, что глюкозооксидаза запускает ряд реакций, приводящих к перекисному окислению 4-аминоантипирина (компонент реагента) до окрашенного соединения, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в

анализируемом образце. Для этого 25 мкл культуральной жидкости родококков смешивали с 2 мл рабочего реагента, полученный раствор перемешивали и инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре. В качестве калибровочного раствора использовали готовый калибратор из набора. По окончании инкубации измеряли оптическую плотность опытных и калибровочных проб на спектрофотометре Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 500 нм. Расчет концентрации глюкозы в образцах проводили по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} \times 10, \quad (6)$$

где C – концентрация глюкозы, мМ/л; E_o – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.; E_k – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.; 10,0 – концентрация глюкозы в калибраторе.

2.16. Содержание хлоридов в среде культивирования

Содержание хлоридов в среде культивирования родококков определяли тиоцианатным методом с использованием набора реагентов “Хлориды ДДС” (Диакон-ДС, Россия). Суть метода заключается в образовании тиоцианатом ртути и хлорид-ионами комплекса красного цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации хлоридов в пробе. Для этого 10 мкл культуральной среды смешивали с 1 мл реагента, раствор тщательно перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность образцов измеряли с использованием спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 480 нм. Содержание хлоридов в образцах рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} \times 100, \quad (7)$$

где C – концентрация хлоридов, мМ/л; E_o – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.; E_k – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.; 100 – концентрация хлоридов в калибраторе.

2.17. Математическое моделирование процесса биодеструкции диклофенака

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

2.18. Количественный и качественный анализ диклофенака и его метаболитов

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

Состав продуктов разложения ДН анализировали на базе Центра коллективного пользования “ИЭГМ УрО РАН” методом ГХ-МС на хроматографе Agilent 6890-5973N (Agilent Technologies, США), оборудованном капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм и работавшем в режиме ионизации электронным ударом при 70 эВ. В качестве газа-носителя использовали гелий (1 мл/мин). Температура инжектора и интерфейса составляла 260 и 290 °С соответственно. Температура колонки программировалась от 130 до 300 °С с повышением температуры со скоростью 10 °С/мин. Ввод хлороформного экстракта в количестве 1 мкл осуществляли без деления потока газа-носителя.

Масс-спектрометр работал в режиме снятия масс-спектров в диапазоне от 40 до 500 m/z. Полученные масс-спектры сравнивали с масс-спектрами библиотеки NIST 98 Mass Spectral Library with Windows Search Program (Version 1,7). Масс-спектры считали идентифицированными при совпадении масс-спектров исследуемого вещества с библиотечными с коэффициентом подобия, превышающим 90 %. Для выделения ДН и его возможных метаболитов среду ферментации подкисляли 10%-ным водным раствором HCl до pH 2,0 и трижды экстрагировали эквивалентным (10 мл) объемом хлороформа. Объединенные экстракты сушили над Na₂SO₄, растворитель удаляли на ротаторном испарителе (Heidolph, Германия). Расшифровку масс-спектров продуктов биодеструкции ДН проводили на базе кафедры аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии (зав. лабораторией – д.фарм.н., проф. Вихарева Е.В.).

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

2.19. Фитотоксичность диклофенака и продуктов его биодеструкции

Фитотоксичность в отношении овса посевного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). Схема определения фитотоксичности в отношении ДН и продуктов его бактериальной деструкции представлена на рисунке 10. В экспериментах использовали семена, всхожесть которых составляла 98 %. Семена проращивали в течение 3 сут в стерильных чашках Петри с фильтровальной бумагой, обработанной дистиллированной водой (5 мл). Затем проросшие семена обрабатывали водным раствором ДН либо продуктов его биодеструкции. Степень фитотоксичности определяли по истечении 7 сут. Токсичность определяли по величине эффекта торможения роста корневой системы растения по формуле:

$$E_T = \frac{L_K - L_{Op}}{L_K} \cdot 100 \%, \quad (8)$$

где E_T – эффект торможения, %; L_{OP} – средняя длина корней в опыте, см; L_K – средняя длина корней в контроле, см. Фитотоксическое действие считается доказанным, если фитозффект (E_T) составляет 20 % и более.

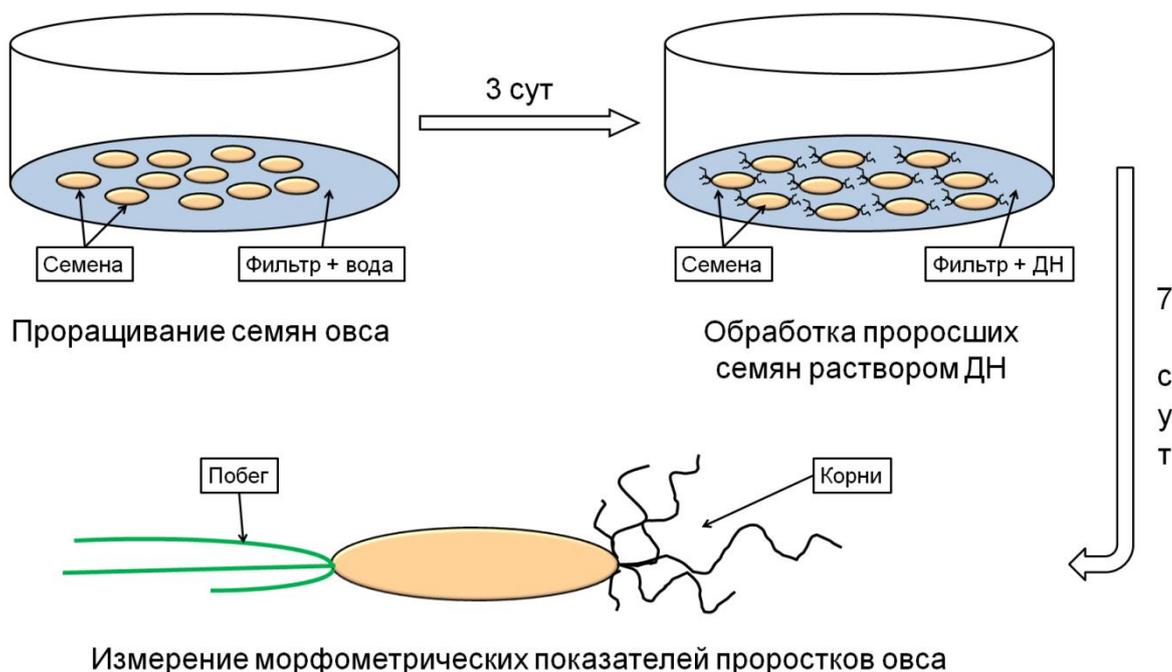


Рисунок 10 – Схема определения фитотоксичности ДН и продуктов его биодеструкции.

2.20. *In silico* анализ продуктов биодеструкции диклофенака

2.20.1. Биологическая активность продуктов биодеструкции диклофенака

Для прогноза профиля биологической активности отдельных метаболитов ДН на основе их структурных формул исследовали с использованием компьютерной программы PASS online (Prediction of Activity Spectra of Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). Структуры анализированных соединений были построены в веб-сервисе Marvin applet (ChemAxon, Венгрия). Биологическая активность соединения с помощью PASS online описывается в качественном выражении (да/нет). В качестве выходной информации применяется список прогнозируемых видов активности с оценками вероятности наличия каждого вида активности P_a и вероятности его отсутствия P_i , которые могут

принимать значения в диапазоне от нуля до единицы. Наибольшая вероятность обнаружения активности в программе принималась за 1. Вероятности P_a (вероятность обнаружения) и P_i (вероятность не обнаружения) являются также оценками вероятностей ошибок первого и второго рода соответственно. Чем больше для конкретной активности значение P_a и чем меньше значение P_i , тем больше шанс обнаружить данную активность в эксперименте. Список биологических спектров метаболитов ДН ограничивали теми видами активности, для которых $P_a > 0,7$.

2.20.2. Экоотоксичность продуктов биодеструкции диклофенака

Экоотоксичность ДН и продуктов его бактериальной деструкции рассчитывали с помощью компьютеризированной системы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationships), доступной в программном пакете EPI Suite TM (The Estimation Programs Interface, EPA, США). Программа ECOSAR подсчитывает острую и хроническую токсичность химических веществ в отношении водных и наземных организмов с использованием компьютеризированного анализа структурно-функциональной взаимосвязи в молекулах. Результаты экоотоксичности прогнозируются на основании доступных данных по токсическим эффектам органических соединений различных химических классов.

2.21. Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводили в трех-, восьми- или десятикратной повторности. Математическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 13 (StatSoft, 2018). При использовании степени достоверности различий средних арифметических использовали t-критерий Стьюдента. Для решения отдельных задач использовали многовариантные техники исследования на основе кластерного анализа данных. Критериями оценки явились показатели взвешенного среднего числа пары группы, расстояние (S) между которыми рассчитывали по формуле City-block Manhattan distance.

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ РОДОКОККОВ К ДЕСТРУКЦИИ ДИКЛОФЕНАКА

3.1. Определение устойчивости родококков к диклофенаку

Подавляющее большинство исследованных культур родококков сохраняли жизнеспособность в присутствии ДН в диапазоне концентраций от 50 до 100 мг/л. Дендрограмма на рисунке 11 иллюстрирует распределение исследованных бактериальных штаммов по кластерам в зависимости от МПК ДН. Устойчивыми к относительно высоким (МПК ≥ 200 мг/л) концентрациям ДН оказалось сравнительно небольшое (18) число штаммов (рисунок 11). Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам родококков *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, преимущественно выделенные ранее из муниципальных сточных вод (*R. erythropolis* ИЭГМ 211, ИЭГМ 213, ИЭГМ 250, ИЭГМ 712; *R. ruber* ИЭГМ 343, ИЭГМ 346), родниковых вод (*R. erythropolis* ИЭГМ 199, ИЭГМ 201; *R. ruber* ИЭГМ 231, ИЭГМ 237) и грунтовых вод (*R. ruber* ИЭГМ 341, ИЭГМ 342, ИЭГМ 369) (рисунок 12А).

По литературным данным, показатели МПК ДН в отношении патогенных и условно-патогенных штаммов *Escherichia coli* С600 и *Staphylococcus aureus* 6571 составляли 50–100 мг/л (Dastidar *et al.*, 2000), *Enterococcus faecalis* – 50 мг/л (Salem-Milani, Balaei-Gajan, 2013), *Mycobacterium* spp. – 10–25 мг/л (Dutta *et al.*, 2004). Полученные нами результаты свидетельствуют о более высокой (МПК ≥ 200 мг/л) резистентности выделенных из природных сред штаммов *Rhodococcus* в отношении ДН.

Наименее резистентными (МПК 25–50 мг/л) к ДН оказались штаммы, изолированные из поверхностных (*R. erythropolis* ИЭГМ 700; *R. pyridinivorans* ИЭГМ 1277; *R. ruber* ИЭГМ 86, ИЭГМ 90, ИЭГМ 91, ИЭГМ 222), скважинных (*R. erythropolis* ИЭГМ 200, ИЭГМ 203; *R. ruber* ИЭГМ 351, ИЭГМ 352, ИЭГМ 380, ИЭГМ 384), минеральных вод (*R. erythropolis* ИЭГМ 496, *R. ruber* ИЭГМ 320, ИЭГМ 321), а также из почвы (*R. cercidiphylli* ИЭГМ 1184; *R. corynebacterioides*

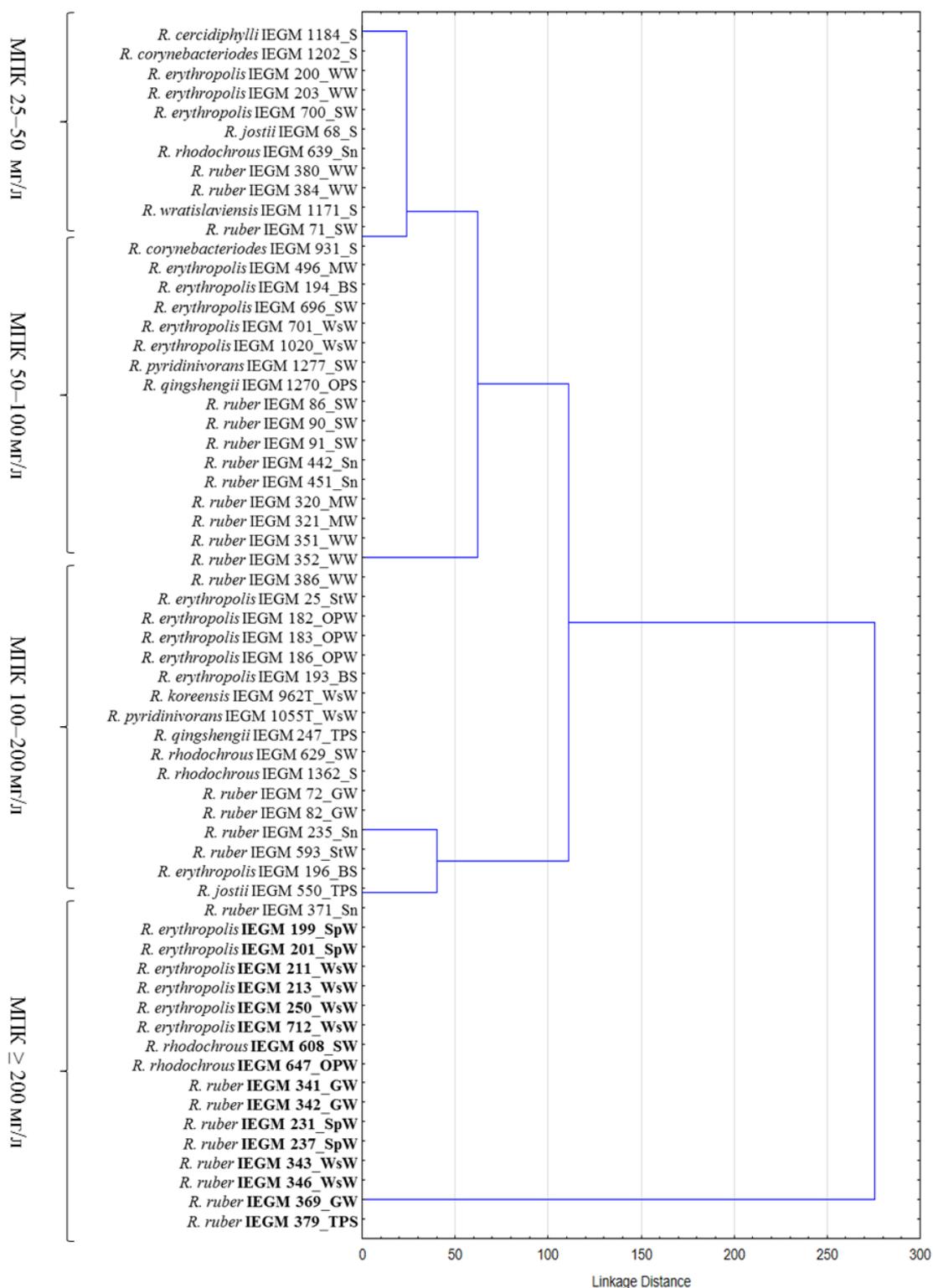


Рисунок 11 – Дендрограмма, иллюстрирующая устойчивость к ДН, выделенных из различных экологических систем. BS – донные отложения, GW – подземная вода, MW – минеральная вода, OPS – нефтезагрязненная почва, OPW – нефтезагрязненная вода, S – почва, Sn – снег, SW – поверхностная вода, SpW – родниковая вода, StW – пластовая вода, TPS – техногенно загрязненная почва, WW – колодезная вода, WsW – сточная вода.

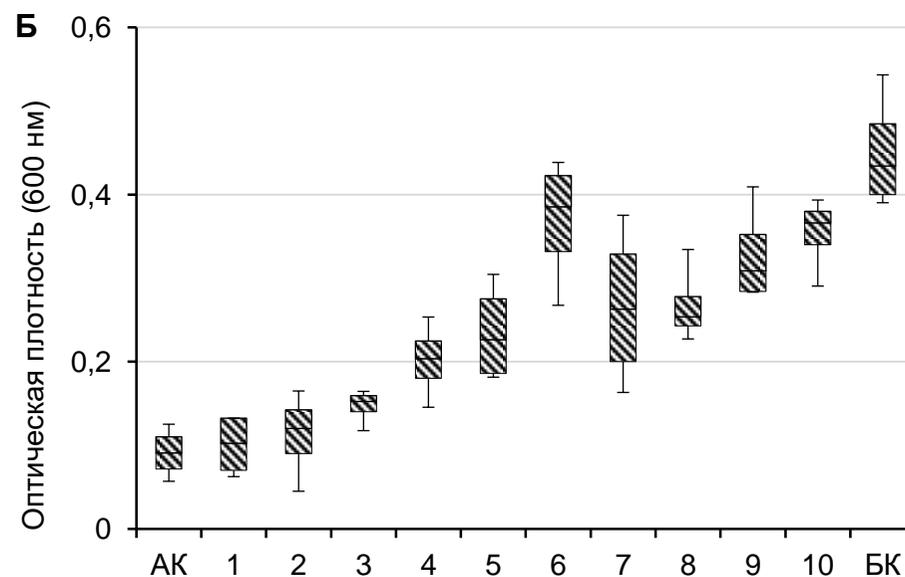
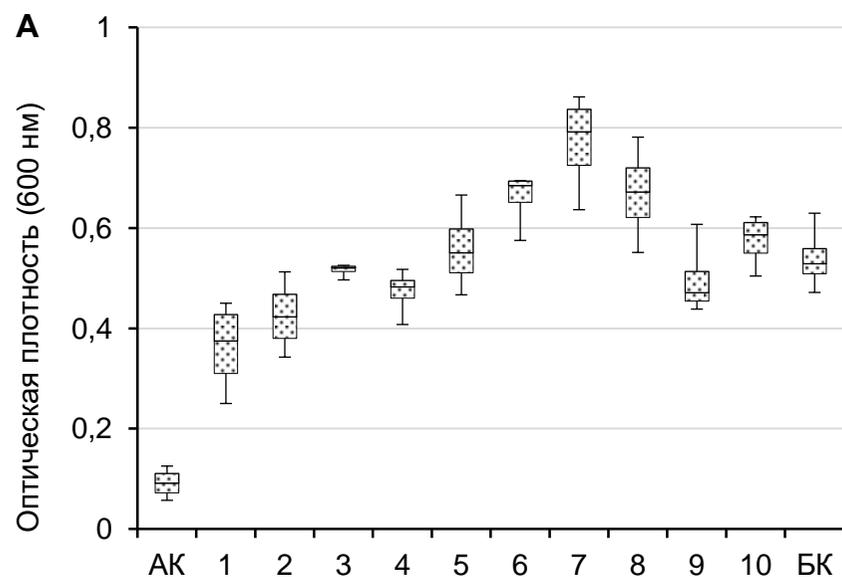


Рисунок 12 – Рост клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 (А) и *R. cercidiphylli* ИЭГМ 1184 (Б) в присутствии разных ∞
концентраций ДН. АК – абиотический контроль, БК – биотический контроль, 1 – 200 мг/л ДН; 2 – 100 мг/л ДН; 3 – 50 мг/л ДН; 4 – 25 мг/л ДН; 5 – 17,5 мг/л ДН; 6 – 8,8 мг/л ДН; 7 – 4,4 мг/л ДН; 8 – 2,2 мг/л ДН; 9 – 1,1 мг/л ДН; 10 – 0,6 мг/л ДН.

ИЭГМ 931, ИЭГМ 1202; *R. jostii* ИЭГМ 68; *R. wratislaviensis* ИЭГМ 1171), снега (*R. rhodochrous* ИЭГМ 639; *R. ruber* ИЭГМ 442, ИЭГМ 451) (рисунок 12Б).

В водных экосистемах, как правило, обнаруживается смесь фармпрепаратов разных терапевтических групп, в том числе НПВС (Dasenaki, Thomaidis, 2015; Huebner *et al.*, 2015; Sui *et al.*, 2015). При исследовании ДН в смеси с ибупрофеном и мелоксикамом установлено, что коктейль этих веществ даже в более низких концентрациях наносит больший подавляющий эффект на клетки *R. ruber* ИЭГМ 346, чем эти отдельные соединения. По нашим данным, МПК ДН составляла 200 мг/л, в то время как в смеси с ибупрофеном и мелоксикамом данный показатель снижался в 8 раз – до 25 мг/л (таблица 7). Полученные данные совпадают с другими исследованиями, в которых показано, что фармацевтический коктейль в более низких концентрациях наносит больший экотоксикологический ущерб, чем отдельные соединения (Barra Caracciolo *et al.*, 2015).

Таблица 7 – Минимальные подавляющие концентрации (МПК) отдельных НПВС и их смесей

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

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

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

3.2. Биодеструкция диклофенака свободными клетками родококков

Родококки способны использовать ДН в качестве единственного источника углерода, однако процесс биодеструкции его протекал крайне медленно (рисунок

13). Остаточное содержание ДН в высокой (50 мг/л) концентрации на 60 сут эксперимента составляло еще более 70 %, что свидетельствовало о высокой химической устойчивости молекулы исходного экотоксиканта. Полное разложение ДН в низкой (50 мкг/л) концентрации регистрировали на 30 сут. В процессе биодеструкции ДН в высокой (50 мг/л) концентрации наблюдалось заметное снижение численности бактерий: количество колониеобразующих единиц на 20 сут составляло $1,13 \times 10^5$. В контроле абиотической деструкции исходная концентрация ДН варьировала в пределах от 2 до 5 %. В контрольном варианте с инактивированными клетками зафиксировано незначительное (до 7 %) снижение исходной концентрации ДН, что свидетельствовало о частичной сорбции вещества на поверхности бактериальных клеток.

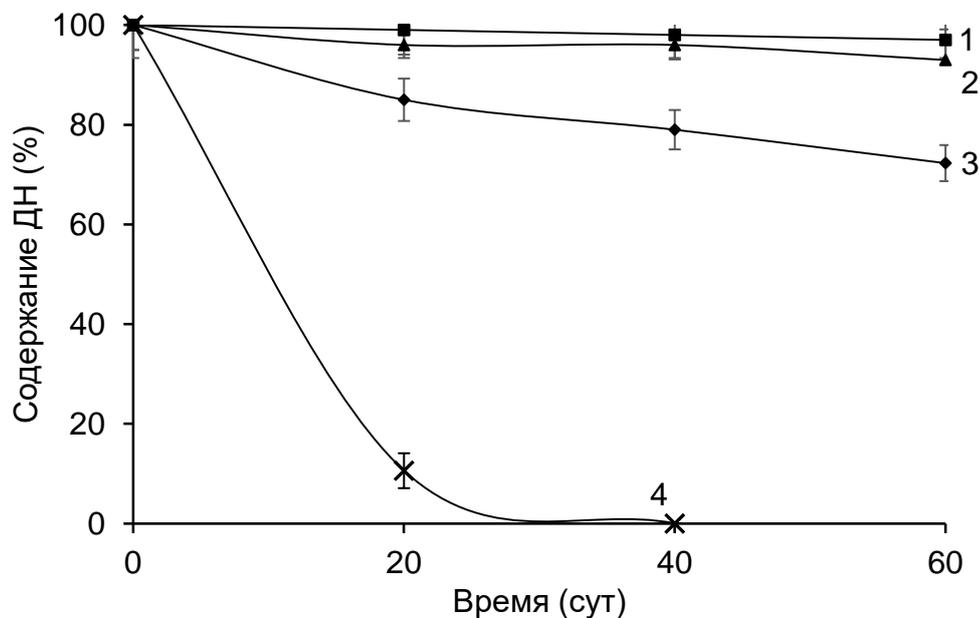


Рисунок 13 – Биодegradации 50 мг/л (3) и 50 мкг/л (4) ДН в качестве единственного источника углерода нативными клетками *R. ruber* ИЭГМ 346. 1 – контроль абиотической деструкции, 2 – контроль биосорбции. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям.

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

Как видно из рисунка 14, прединкубация родококков ускоряла процесс биодеструкции ДН: при использовании низкой (50 мкг/л) концентрации ДН на 20 сут эксперимента наблюдалась его полная деструкция, тогда как в случае высокой концентрации (50 мг/л) ДН остаточное содержание его на 60 сут эксперимента составляло еще 60,1 %. При этом число колониеобразующих единиц сохранялось в течение первых десяти сут ($1,51 \times 10^7$ кл/мл), а затем наблюдалось снижение численности клеток до $1,87 \times 10^6$ кл/мл на 20 сут эксперимента.

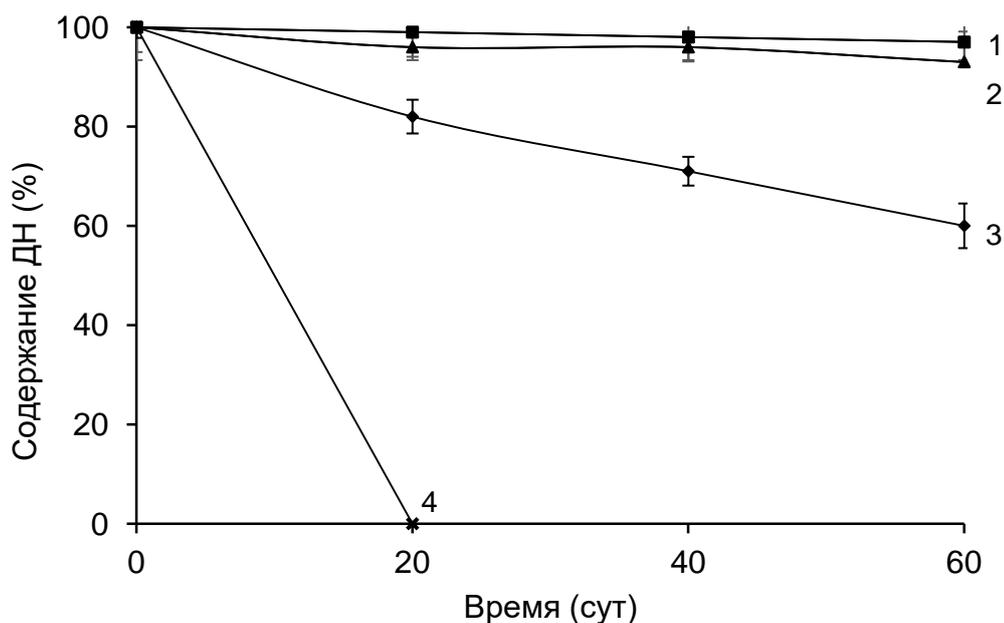


Рисунок 14 – Биодеградация 50 мг/л (3) и 50 мкг/л (4) ДН прединкубированными клетками *R. ruber* ИЭГМ 346. 1 – контроль абиотической деструкции, 2 – контроль биосорбции. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям.

В условиях внесения дополнительного ростового субстрата (0,5 % глюкоза) остаточное содержание ДН (50 мг/л) в постферментационной культуральной среде *R. ruber* ИЭГМ 346 на 60 сут составляло еще примерно 50 % (рисунок 15А). Средняя скорость биодегградации ДН на протяжении эксперимента составляла 0,4 мг/сут. Максимальные (0,7 мг/сут) показатели скорости биодегградации наблюдались в первые 10 сут эксперимента. Максимальная удельная скорость деградации ДН (мг ДН/мг СВ/сут) составляла $0,02 \text{ сут}^{-1}$. На 10 сут регистрировалось увеличение роста родококков и постепенное снижение

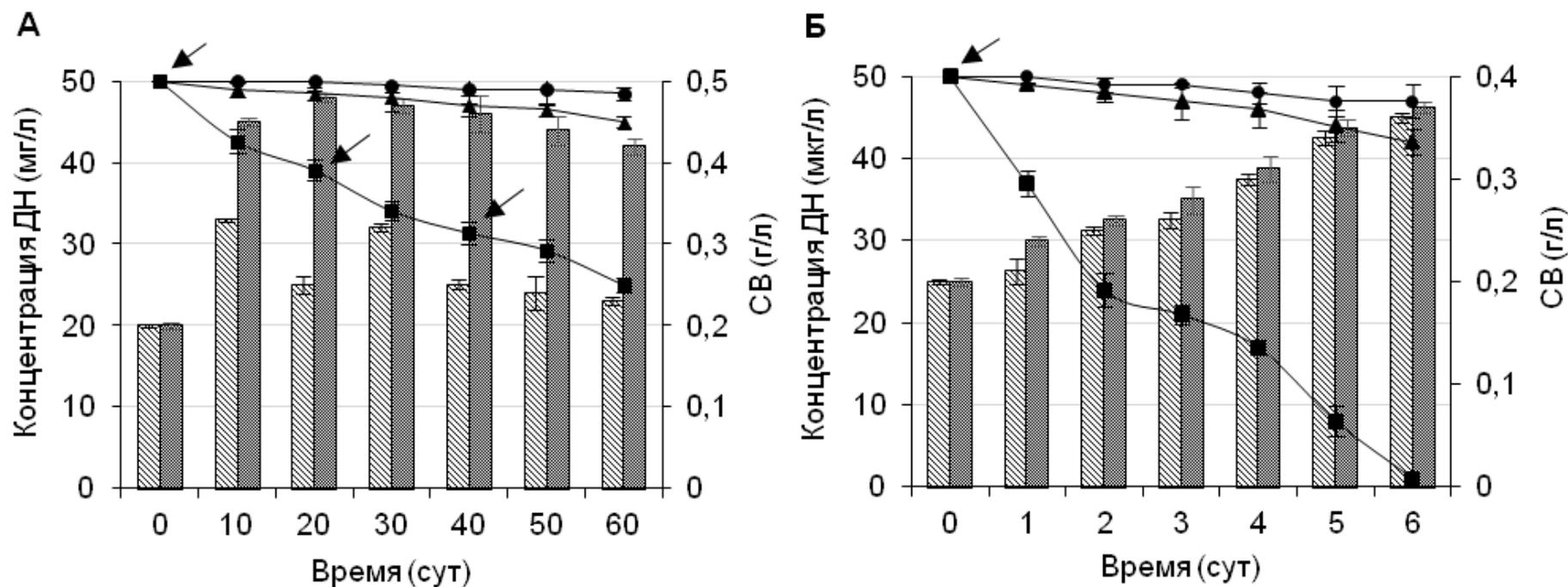


Рисунок 15 – Динамика биodeградации 50 мг/л (А) и 50 мкг/л (Б) ДН прединкубированными клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 (■) в присутствии глюкозы. (●) контроль абиотической деструкции, (▲) контроль биосорбции, (▨) сухой вес биомассы родококков в присутствии ДН и глюкозы, (■) сухой вес биомассы родококков в присутствии глюкозы. Стрелками обозначено дробное внесение глюкозы. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям.

концентрации ДН при условии дробного внесения глюкозы в качестве легко деструктируемого источника углерода.

Другая картина наблюдалась в случае использования ДН в низкой концентрации (50 мкг/л). В этом случае значительную убыль ДН регистрировали в первые 2 сут (рисунок 15Б). При этом средняя скорость биодеструкции составляла 8,3 мкг/сут. На фоне достижения максимальной скорости биодegradации ДН (13 мкг/сут) происходил постепенный стабильный прирост клеточной биомассы. Максимальная удельная скорость деградации ДН составляла $0,0005 \text{ сут}^{-1}$. На 5-е сут увеличение численности родококков сопровождалось значительной убылью ДН, полное разложение которого достигалось на 6 сут эксперимента. При длительных экспериментах для поддержания роста клеточной биомассы использовали дробное внесение глюкозы на 20-е и 40-е сут эксперимента. О необходимости доведения глюкозы судили по спектрофотометрическому анализу содержания углевода в культуральной среде родококков (таблица 8).

Таблица 8 – Динамика содержания глюкозы в культуральных жидкостях родококков в процессе биодеструкции 50 мг/л ДН

Экспозиция, сут	ОП ₅₀₀	Концентрация глюкозы, мм/л
0	1,3±0,21	27,1±3,31
10	0,7±0,14	15,5±2,22
20	0,2±0,10	4,2±1,14
30	0,8±0,15	17,3±2,15*
40	0,4±0,09	8,8±1,07
50	0,9±0,07	15,9±1,75*
60	0,8±0,08	14,1±2,16

Примечание. После доведения глюкозы на * 20 и ** 40 сут эксперимента.

Полученные данные подтверждены результатами определения дыхательной активности родококков (рисунок 16). Респираторная активность родококков в присутствии ДН была значительно выше по сравнению с контрольными

вариантами опыта. Рассчитанные средние показатели (18,9 мкл/мин) скорости потребления O_2 родококками в процессе биодеструкции ДН в 1,5 раза превалировали таковые показатели (12,6 мкл/мин) в контроле (рисунок 16А). Максимальные значения (22,7 мкл/мин) скорости потребления O_2 клетками в присутствии ДН регистрировались на 10 сут эксперимента. После 10 сут в контрольном варианте фиксировалось значительное снижение скорости поглощения O_2 , в то время как в присутствии ДН отмечался лишь небольшой спад. В процессе биодеструкции ДН через 14 сут эксперимента клетки поглощали 15930 мкл O_2 , тогда как в присутствии только глюкозы бактерии потребляли 12095 мкл O_2 (рисунок 16Б). В абиотическом контроле значения респирации были равны нулю. Эти данные можно рассматривать как подтверждение тому, что процесс разложения ДН полностью зависел от каталитической активности клеток и катализируется оксигеназами.

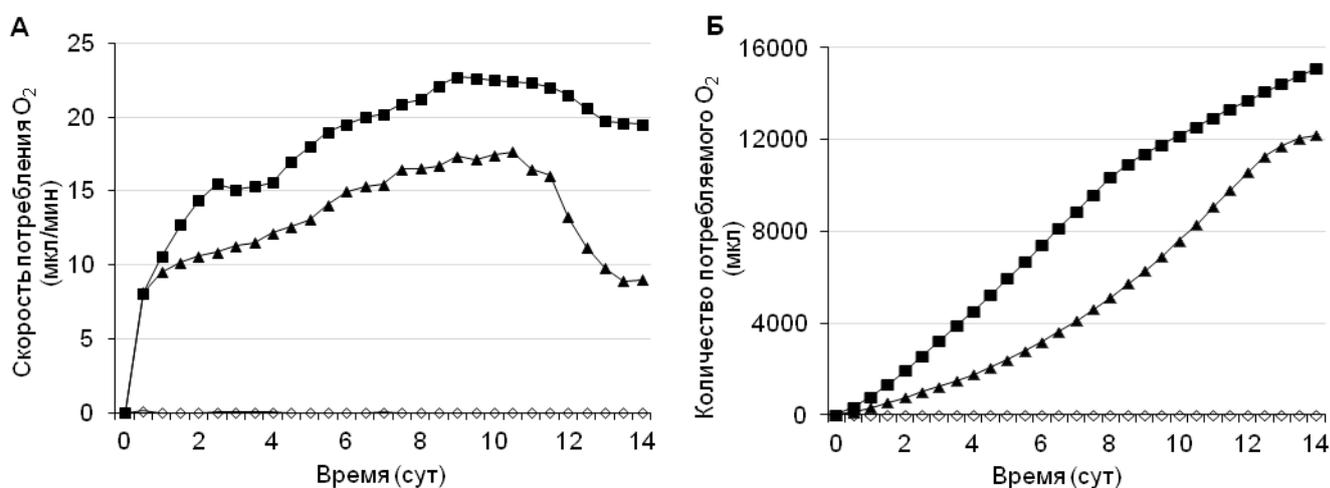


Рисунок 16 – Респираторная активность *R. ruber* ИЭГМ 346 в процессе биодеструкции 50 мг/л ДН. А – скорость потребления кислорода, Б – количество потребляемого кислорода. (■) в присутствии ДН и глюкозы, (▲) биотический контроль в присутствии глюкозы, (◇) контроль абиотической деструкции.

3.3. Биодеструкция диклофенака иммобилизованными родококками

Иммобилизация клеток – широко распространенный в природе феномен, обеспечивающий эффективную выживаемость бактерий в контрастных условиях среды и позволяющий поддерживать высокий уровень каталитических

возможностей. Иммуобилизация бактерий на различных носителях повсеместно используется в процессах биодegradации и биотрансформации сложных органических соединений гидрофобной природы (Демаков и др., 2008; Елькин, 2011; Омарова и др., 2012; Серебренникова, 2014; Кылосова, 2016; Черемных, 2018; Garcia *et al.*, 2019), что обусловлено повышенной устойчивостью закрепленных микроорганизмов к негативным внешним условиям среды, высокой операционной стабильностью, многократностью использования и увеличенной продуктивностью процессов (Ефременко, 2018). В настоящей работе в сравнительных экспериментах по биодеструкции ДН использовали два типа иммобилизации бактериальных клеток: включение в криогель на основе ПВС, а также адсорбция на твердых носителях (древесные опилки и полипропиленовые диски). Для увеличения степени сродства липофильных клеток к поверхности адсорбента его предварительно гидрофобизовали с использованием *n*-гексадекана, биосурфактанта, олифы (Криворучко, 2008). По нашим данным, наиболее эффективными адсорбентами родококков являлись полипропиленовые диски, а также древесные опилки, гидрофобизованные *n*-гексадеканом или олифой, адсорбционная емкость которых составляла 79,43, 89,15 и 71,98 % соответственно (таблица 9, рисунок 17).

Таблица 9 – Адсорбция клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 на поверхности полипропиленовых дисков и древесных опилок

Материал носителя	ОП суспензии до иммобилизации	ОП суспензии после иммобилизации	Адсорбционная емкость, %	Адсорбция, сут
Полипропиленовые диски	1,05±0,05	0,22±0,03	79,43±2,04	3
Древесные опилки	1,07±0,07	0,34±0,05	68,22±4,63	5
Древесные опилки + биосурфактант	1,08±0,02	0,45±0,06	58,51±6,10	6
Древесные опилки + <i>n</i> -гексадекан	1,08±0,06	0,12±0,03	89,15±2,99	3
Древесные опилки + олифа	1,13±0,04	0,32±0,04	71,98±2,89	5

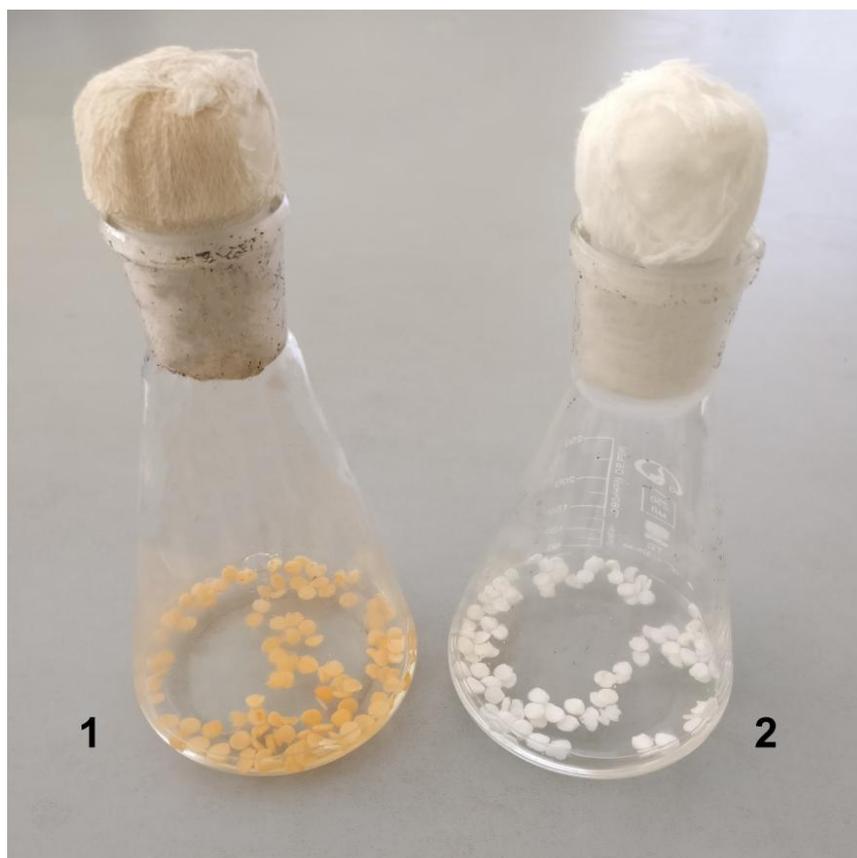


Рисунок 17 – Иммобилизация клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 на полипропиленовых дисках (1). 2 – абиотический контроль.

Процесс закрепления клеток составлял 3–5 сут. Наименее эффективными иммобилизаторами являлись необработанные древесные опилки, а также опилки, модифицированные биосурфактантом в связи со сравнительно низкой адсорбционной емкостью и длительным процессом адсорбции.

По нашим данным, иммобилизованные на твердом носителе клетки сохраняли способность к биодеструкции ДН. При использовании клеток *R. ruber* ИЭГМ 346, иммобилизованных на модифицированном древесном носителе, наибольшая убыль ДН наблюдалась в случае применения в качестве гидрофобизатора паров *n*-гексадекана (рисунок 18). В этих условиях остаточное содержание ДН составляло 47,88 %. Однако во всех вариантах использования древесных опилок отмечалась высокая сорбция фармвещества на адсорбент: от 29,3 % на опиле, обработанном биосурфактантом, до 44,9 % на немодифицированном древесном носителе.

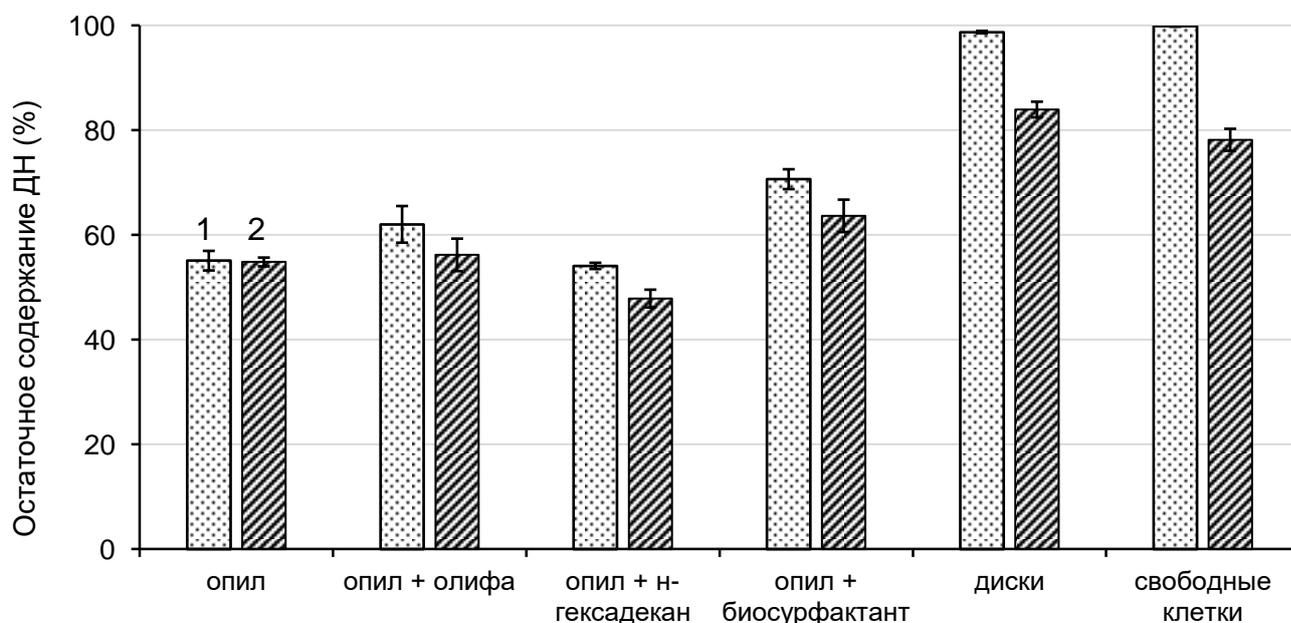


Рисунок 18 – Биодеструкция 50 мг/л ДН свободными и иммобилизованными на твердых носителях клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 (2). 1 – контроль абиотической деструкции. Приведены данные после 20 сут эксперимента.

В процессе биодеструкции ДН клетками, закрепленными на полипропиленовых дисках, содержание фармсоединения в культуральной среде на 20 сут эксперимента составляло 83,16 %. При этом сорбция фармвещества на дисках составляла лишь 1,24 %.

Остаточное содержание ДН на 20 сут при включении бактериальных клеток в криогель на основе ПВС составляло 73,63 и 78,55 % для *R. ruber* ИЭГМ 231 и *R. ruber* ИЭГМ 346 соответственно (рисунок 19). В абиотическом контроле наблюдалась убыль ДН на 14,53 %, что свидетельствовало о возможной сорбции вещества на иммобилизатор.

В связи с высокой адсорбционной емкостью используемых иммобилизаторов в отношении ДН определяли относительную (чистую) убыль фармвещества за счет биodeградирующей активности бактерий (таблица 10). По нашим данным, наиболее высокая (15,6 %) убыль ДН наблюдалась в присутствии родококков, иммобилизованных на полипропиленовых дисках. Известно, что полипропилен обладает высокой гидрофобностью и способствует эффективному

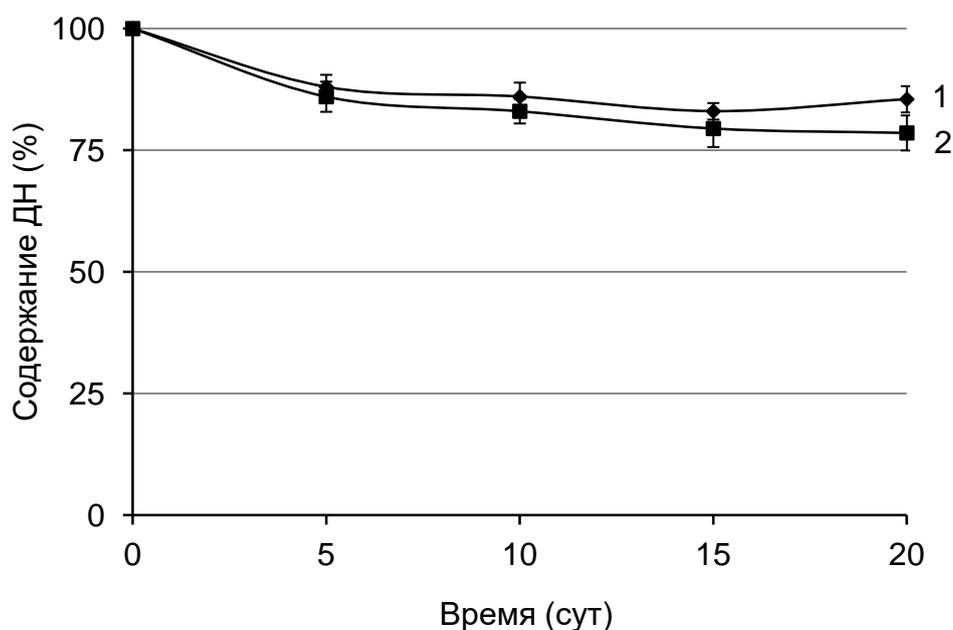


Рисунок 19 – Биодеструкция 50 мг/л ДН клетками *R. ruber* ИЭГМ 346, иммобилизованными в криогель на основе ПВС (2). 1 – контроль абиотической деструкции.

закреплению бактерий с гидрофобной клеточной поверхностью (Verrier *et al.*, 1987). Полипропилен успешно использовали в качестве катализатора биodeградации нефти в том числе в условиях высокой (180 г/л) солености (Díaz *et al.*, 2002). Иммобилизованный на полипропиленовых гранулах *Acinetobacter* sp. DW-1 демонстрировал способность к эффективной биodeградации фенола (Gu *et al.*, 2017).

Таблица 10 – Относительная биодеструкция ДН иммобилизованными и свободными клетками *R. ruber* ИЭГМ 346

Вариант	ПВС	Диски	Опил	Опил + олифа	Опил + биосурфактант	Опил + <i>n</i> -гексадекан	Свободные клетки
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 346	6,9±1,25	15,6±2,14	0,3±0,10	5,8±0,47	7,0±1,58	6,2±0,87	21,8±1,33

Примечание. Приведены данные после 20 сут эксперимента.

По нашим данным, ни один из использованных приемов иммобилизации актинобактерий не привел к существенному ускорению биоразложения ДН.

Данный феномен (сниженная биокаталитическая активность иммобилизованных родококков) отмечался в процессах биоконверсии сложных органических субстратов, таких как смоляные кислоты и фармацевтические препараты (Мухутдинова, 2015; Черемных, 2018). Кроме того, неэффективная биодеградация фармполлютанта может быть обусловлена недостаточной оптимизацией процесса (Самонин, Еликова, 2004) закрепления родококков на носитель, и решение этой проблемы требует дальнейших исследований.

3.4. Кинетическое моделирование процесса биодеструкции диклофенака

Сведения, полученные в экспериментах по биодеструкции ДН, были использованы для математического прогноза продолжительности этого процесса (рисунок 15А). Математический прогноз продолжительности процесса биодеструкции ДН проводили на основании данных изменения концентрации ДН в течение 35 сут с шагом по времени 5 сут (таблица 13).

По нашим данным, процесс биодеструкция ДН идет по интенсивному типу, поскольку максимум скорости биодеструкции наблюдается в начальный период времени, а затем ее величина постепенно уменьшается, то есть скорость убыли концентрации пропорциональна величине концентрации. Поэтому в качестве математической модели изменения концентрации ДН во времени в каждой реализации можно использовать классическое кинетическое уравнение первого порядка:

$$dx/dt = -kx \quad (9)$$

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

С учетом рассчитанных значений k для каждой из 10-ти реализаций (повторностей) процесса (таблица 13) построены кинетические кривые биоразложения ДН (рисунок 20). Математическая модель (9) показала адекватность экспериментальным данным по изменению концентрации ДН в процессе биодеструкции родококками. Поведение кинетических кривых на рисунке 20 говорит о ламинарном течении случайного процесса.

Таблица 13 – Изменение концентрации ДН (50 мг/л) при биодegradации в экспериментах на повторяемость (x, % от начальной концентрации)

t, сут	Номер реализации									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	94,22	92,89	98,73	96,23	93,17	93,35	98,59	91,52	92,24	89,85
10	89,57	91,05	91,27	91,62	87,16	88,49	92,31	84,63	83,31	84,48
15	85,25	87,13	86,44	86,52	83,66	84,47	86,57	80,74	77,98	77,66
20	82,11	80,61	79,51	80,20	80,53	78,14	79,09	76,13	72,21	74,48
25	79,10	77,42	76,34	73,60	73,51	73,86	73,32	72,37	69,58	67,92
30	77,31	74,15	74,00	68,53	67,67	70,09	70,57	69,25	66,90	64,83
35	69,69	67,74	67,87	64,40	62,54	64,17	64,08	63,03	63,49	58,72
Параметр математической модели, k сут ⁻¹										
	0,0102	0,0108	0,0093	0,0107	0,0128	0,0123	0,0098	0,0144	0,0155	0,0164

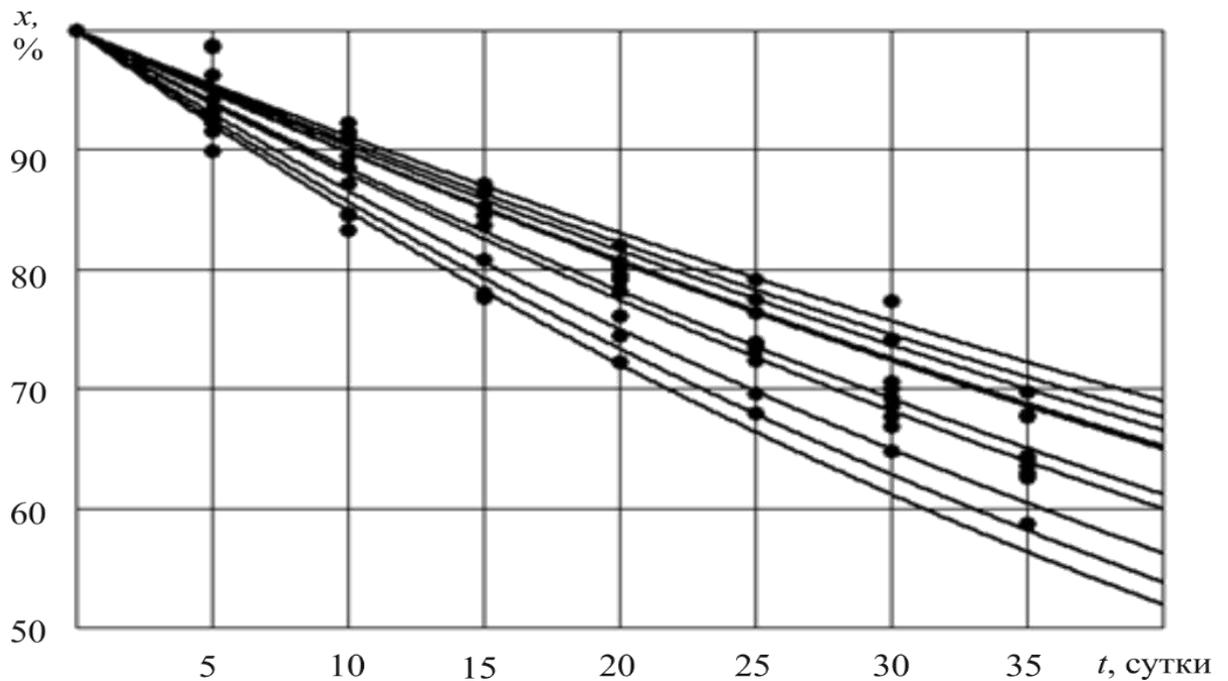


Рисунок 20 – **Кинетические кривые для реализаций процесса биодеструкции ДН.** (•) экспериментальные данные.

Разброс относительных значений концентрации ДН в пределах наблюдения возрастает со временем, что подтверждает необходимость прогноза поведения кинетических кривых за пределом эксперимента.

Как следует из данных таблицы 13 и разброса соответствующих кинетических кривых изменения концентрации ДН, процесс биодеструкции ДН является случайным, причем с необходимостью анализа в условиях малой выборки. Параметр k кинетического уравнения (9) в данном случае следует воспринимать как случайную величину. Из-за ограниченного набора реализаций и соответствующих значений констант k применена математическая статистика в условиях малой выборки (Гмурман, 1997), что позволило определить для случайного параметра скорости биодеструкции выборочный аналог математического ожидания $m_k = 0,0122 \text{ сут}^{-1}$ и выборочную дисперсию $D_k = 6,23 \cdot 10^{-6} \text{ сут}^{-2}$.

Согласно математической модели (9) для реализаций случайный процесс изменения концентрации ДН описывается обычной функцией (Вентцель, Овчаров, 1991) случайного параметра (10).

$$X(t) = x_0 e^{-kt} \quad (10)$$

Для прогноза времени уменьшения концентрации ДН в 100 раз с вероятностью 95 % использовали верхнюю границу доверительного интервала течения процесса биодеструкции ДН. Для построения доверительного интервала необходима информация о типе закона распределения случайного параметра k в выражении (10). С целью сравнения получаемого прогноза времени далее использовали логнормальный закон распределения (рисунок 21А) и нормальный закон распределения (рисунок 21Б), плотности распределения $f(k)$ для которых однозначно определяются выборочным аналогом математического ожидания m_k и выборочной дисперсией D_k .

Представление случайного процесса в виде (10) при заданном типе закона распределения $f(k)$ случайного параметра k позволило определить зависимости от времени выборочных аналогов математического ожидания m_x и дисперсии D_x для изменения концентрации x ДН в процессе биодеструкции родококками. Для этого использовали значения выборочных аналогов математического ожидания m_k и дисперсии D_k , которые были получены по экспериментальным данным из таблицы 13.

На рисунке 22 приведена зависимость от времени выборочного аналога математического ожидания m_x изменения концентрации x ДН. Зависимость выборочного аналога математического ожидания m_x изменения концентрации ДН не зависит от выбора указанных законов распределения и хорошо согласуется с соответствующими значениями аналога математического ожидания, полученными по временным сечениям процесса на основе экспериментальных данных. Этот факт подтверждает адекватность математической модели для данного процесса при обоих типах закона распределения случайного параметра k . Однако для верификации математической модели процесса в качестве случайного этого недостаточно, следует оценить качество теоретического описания разброса реализаций процесса.

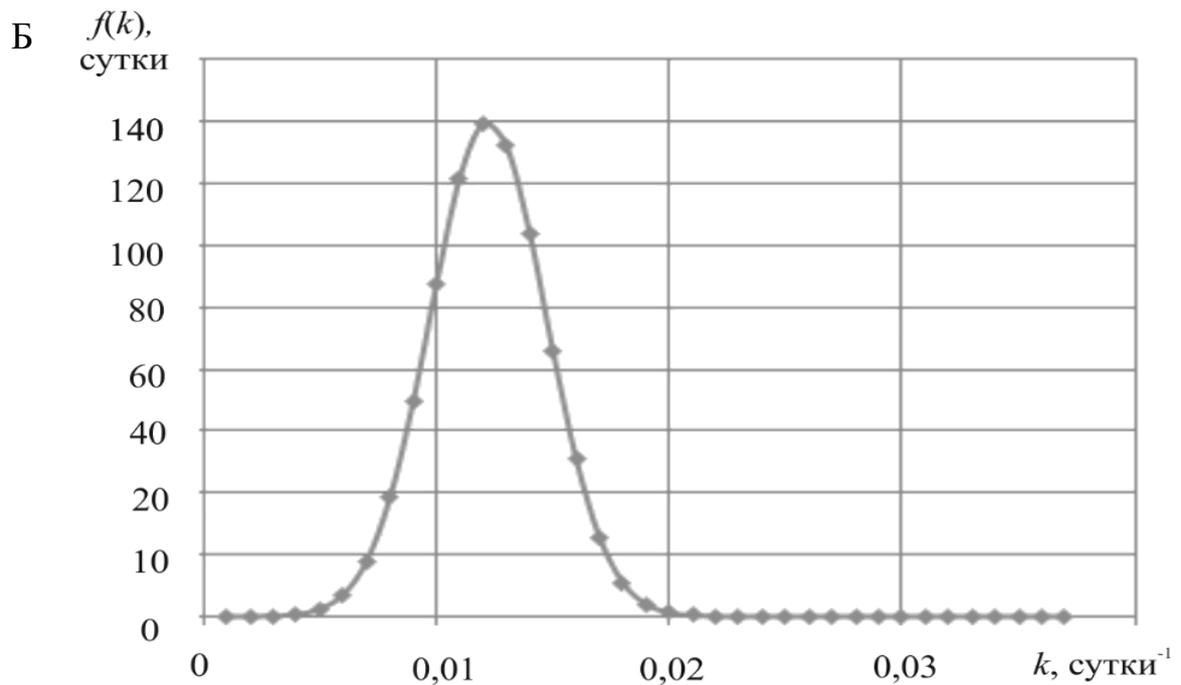
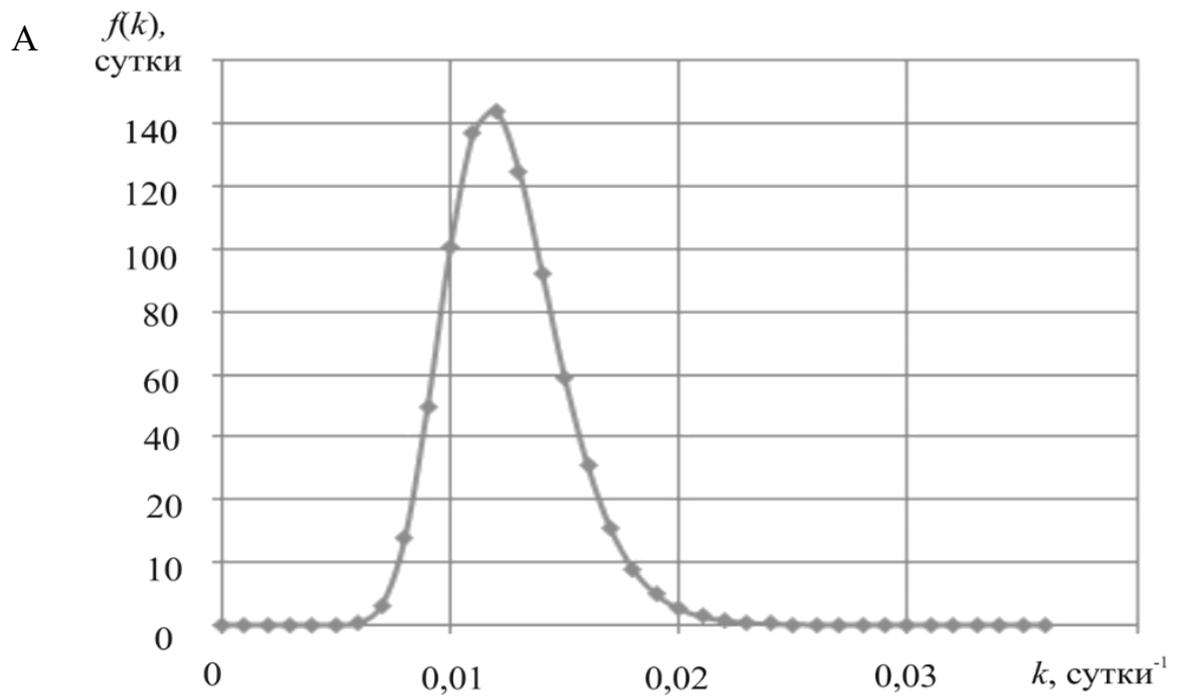


Рисунок 21 – Плотность распределения параметра математической модели процесса биодеструкции ДН. А – логнормальный закон распределения; Б – нормальный закон распределения.

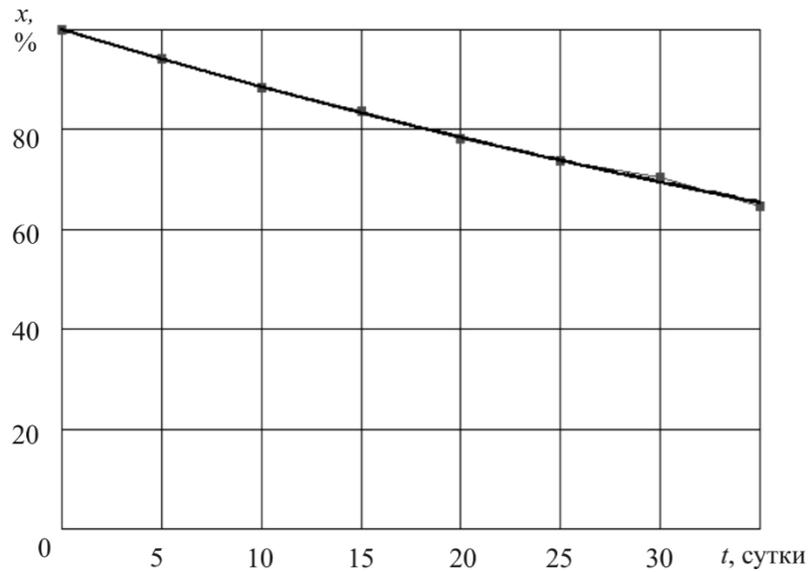


Рисунок 22 – Выборочный аналог математического ожидания изменения концентрации ДН. (●) при логнормальном законе распределения; (—) при нормальном законе распределения; (■) экспериментальные данные.

На рисунке 23 приведена зависимость от времени выборочного аналога дисперсии D_x изменения концентрации x ДН.

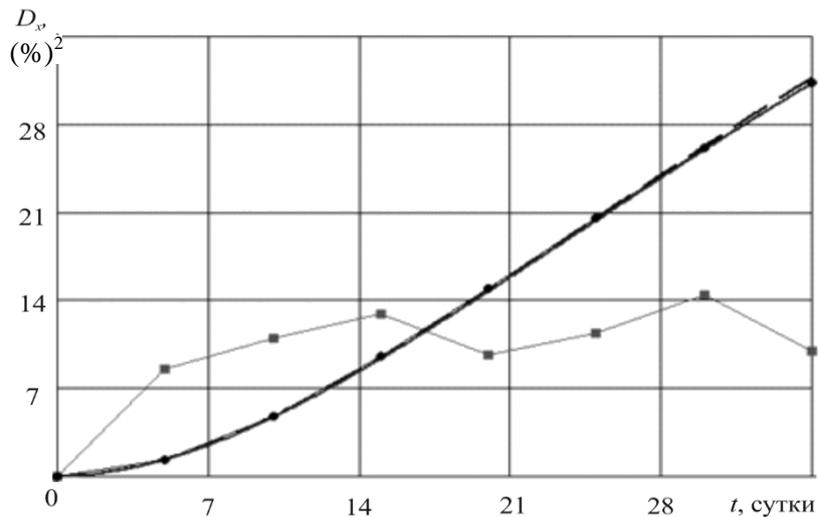


Рисунок 23 – Выборочная дисперсия изменения концентрации ДН. (●) при логнормальном законе распределения; (—) при нормальном законе распределения; (■) экспериментальные данные.

Как следует из рисунка 23, выбор логнормального или нормального типа закона распределения параметра модели практически не влияет на теоретическое описание разброса реализаций. Однако поведение экспериментальных данных по временным сечениям процесса имеет существенные различия с результатами

математического моделирования. Объяснить указанную разницу можно следующим образом. Во-первых, особенностью новой постановки задачи о прогнозе времени завершения процесса, при которой начальные концентрации ДН “стянуты” в одну точку – 100 %. Во-вторых, за первые 35 сут концентрация ДН уменьшилась со 100 % всего лишь в среднем до 65 % (рисунок 22) и скорость процесса при этом уменьшалась, что означает медленное течение процесса разложения ДН. В-третьих, ширина доверительного интервала определяется не дисперсией, а средним квадратичным отклонением, равным квадратному корню из дисперсии, что заметно уменьшает указанную разницу результатов (рисунок 20).

Для прогноза времени уменьшения в 100 раз концентрации ДН с заданной вероятностью 95 % использовали верхнюю границу доверительного интервала изменения его концентрации с соответствующей вероятностью. Согласно методике, разработанной в работах (Селянинов и др., 2013, 2016), найдены значения k^- и k^+ , определяющие нижнюю 2 и верхнюю 1 границы доверительного интервала для процесса биодеструкции ДН с вероятностью 95 % (рисунок 24). Для логнормального закона распределения получили значения $k^- = 0,0390 \text{ сут}^{-1}$ и $k^+ = 0,0088 \text{ сут}^{-1}$, для нормального – $k^- = 0,0260 \text{ сут}^{-1}$ и $k^+ = 0,0082 \text{ сут}^{-1}$. Близкие значения параметра k^+ для верхней границы при использовании логнормального и нормального законов распределения позволяют заранее предположить незначительное различие в прогнозах времени уменьшения в 100 раз концентрации ДН с заданной вероятностью.

На рисунке 24 приведены доверительные интервалы, полученные с применением логнормального и нормального законов распределения параметра математической модели процесса биоконверсии ДН. Нижняя граница (кривая 2) и выборочный аналог математического ожидания (кривая 3) на рисунке 24 приведены в качестве дополнительной информации и для решения поставленной задачи не использовались. Для определения времени уменьшения концентрации в определенное число раз на оси ординат откладывали соответствующее значение концентрации ДН (%) и по кривой 1 на рисунке 24 определяли прогноз времени.

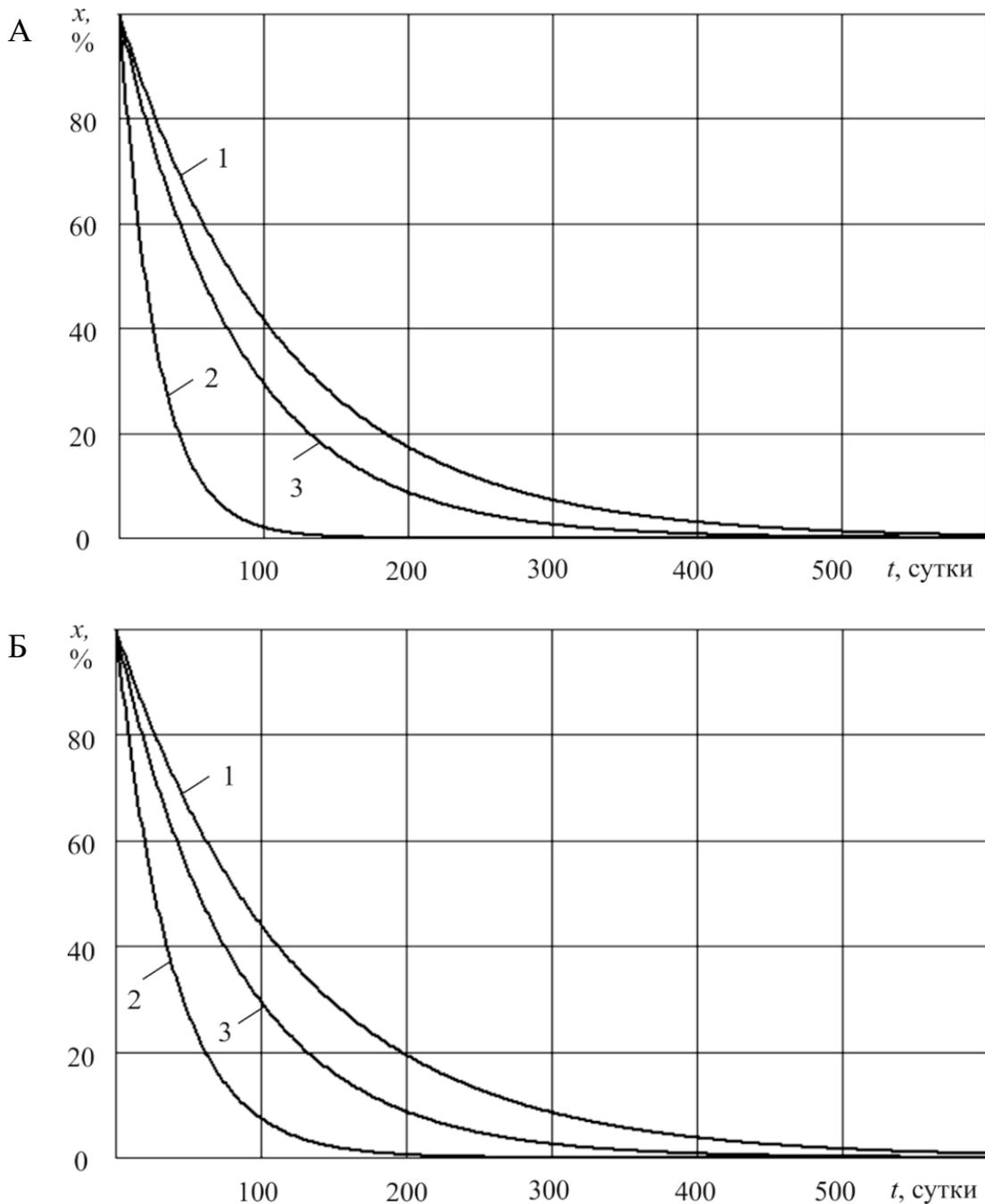


Рисунок 24 – Доверительный интервал для изменения концентрации ДН (50 мг/л) с вероятностью 95 % при логнормальном (А) и нормальном законах распределения (Б). 1 – верхняя граница; 2 – нижняя граница; 3 – выборочный аналог математического ожидания.

Прогноз времени уменьшения концентрации 50 мг/л ДН в процессе биодеструкции родококками в 100 раз с вероятностью 95 % с применением логнормального закона распределения параметра математической модели

составляет 526 сут, а с нормальным – 562 сут (на 35-е сут проведения экспериментов на повторяемость). Разница составила 6,4 %, что означает правомерность применения обоих законов распределения для данного процесса.

Разработанная методика позволяет сделать прогноз времени уменьшения концентрации в любое число раз. При уменьшении концентрации ДН в 2 раза время составляет 79 и 85 сут соответственно.

Глава 4. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РОДОКОККОВ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИКЛОФЕНАКА

4.1. Изменение морфометрических характеристик родококков под воздействием диклофенака

Наиболее типичной реакцией родококков в ответ на действие ДН является формирование в жидкой среде обособленных многоклеточных агрегатов разного размера и неправильной формы (рисунки 25, 26В,Г).

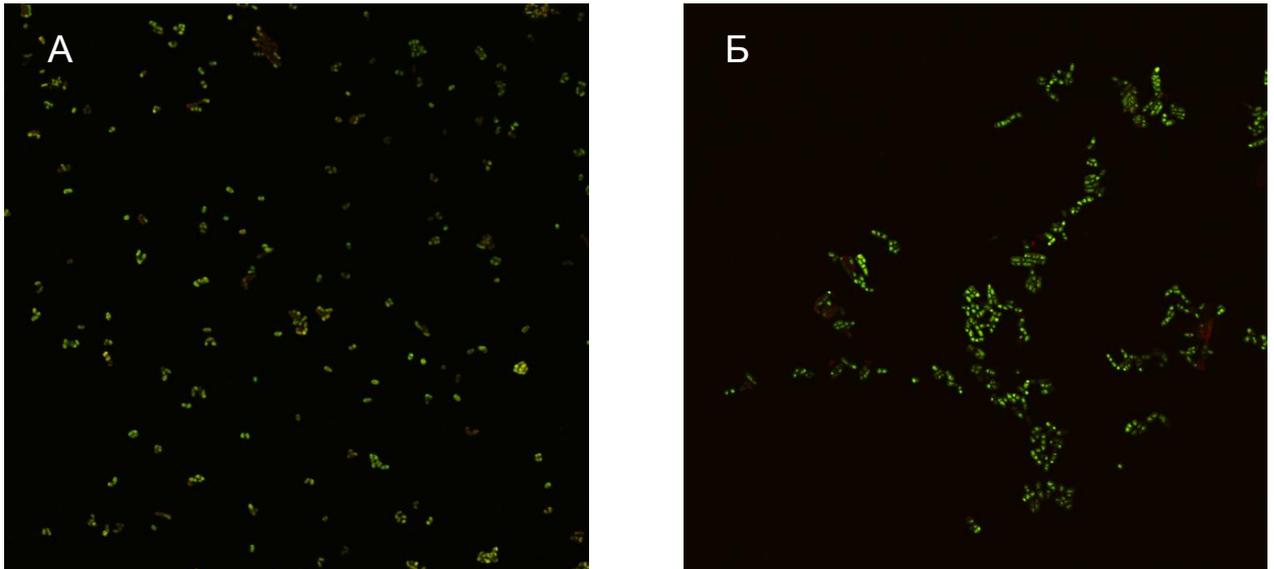


Рисунок 25 – КЛСМ-изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 346. Клетки выращивали в минеральной среде в присутствии глюкозы (А) и в присутствии 50 мкг/л ДН и глюкозы (Б) в течение 10 сут.

“Кооперативная клеточная система”, по-видимому, обеспечивает согласованное функционирование многочисленных ассоциированных клеток, позволяет популяции адаптироваться и расти в жестких условиях, при которых отдельные клетки не способны к размножению и биодеструкции данного экотоксиканта.

Максимальная (и более объемная) агрегация отмечалась в присутствии высоких (50 мг/л) концентраций ДН на 10 сут экспериментов (рисунок 26В). В этих условиях регистрировали максимальный уровень искажения морфологической структуры клеток: изменение формы (плеоморфные палочки) и укрупнение средних размеров вегетативных клеток (преимущественно за счет набухания (рисунок 26В) и изменения их длины), а также площади клеточной

поверхности по сравнению с контрольными показателями (клетками, выращенными в присутствии глюкозы) (таблица 14).

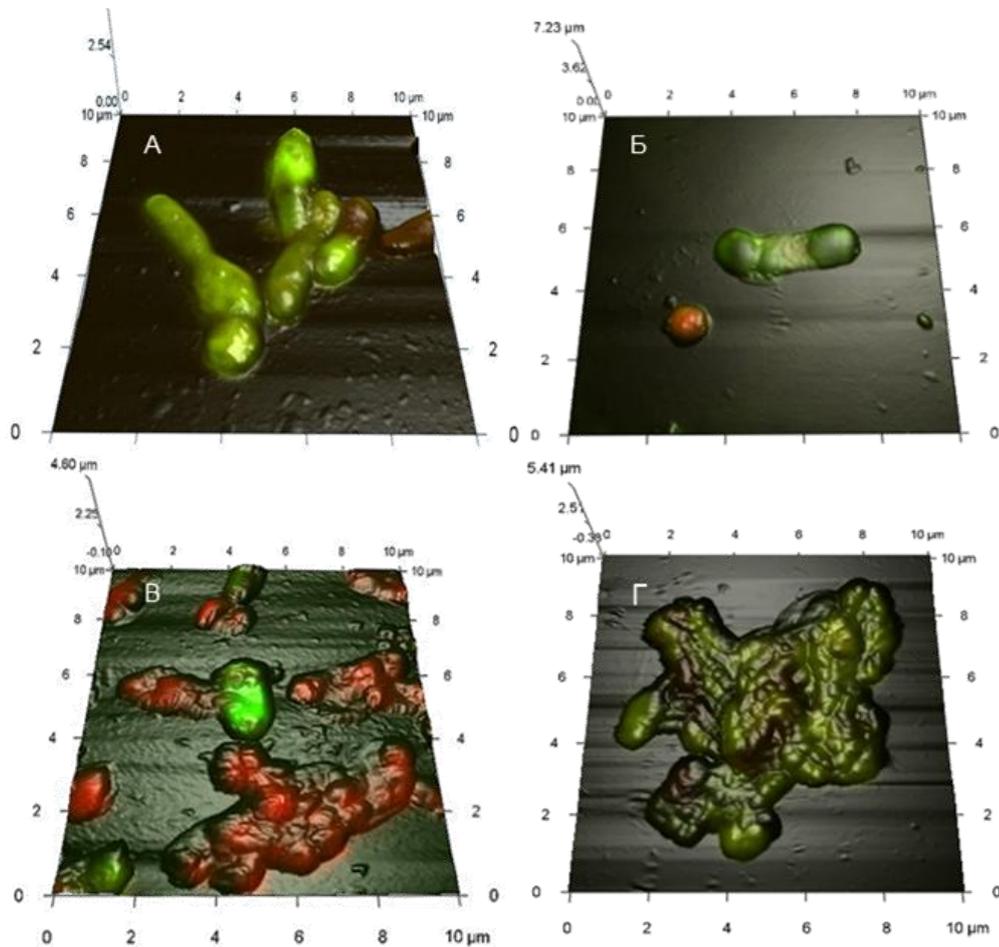


Рисунок 26 – Совмещенные 3D АСМ/КЛСМ-изображения *R. ruber* ИЭГМ 346. А – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы в течение 10 сут; Б, Г – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии 50 мкг/л ДН и глюкозы в течение 10 сут; В – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы в течение 10 сут. Красным свечением отмечены поврежденные клетки.

У одиночных клеток нередко отмечалось повреждение целостности пептидогликанового слоя, сопровождающееся выходом компонентов цитоплазмы во внешнюю среду, и накопление в образце мертвых клеток (рисунки 26В, 28). Деструктивное действие ДН на морфологическом уровне для *R. ruber* ИЭГМ 346 проявлялось в достоверном ($p < 0,001$) уменьшении относительной площади (S/V) бактериальных клеток. Уменьшение поверхности относительно объема клеток,

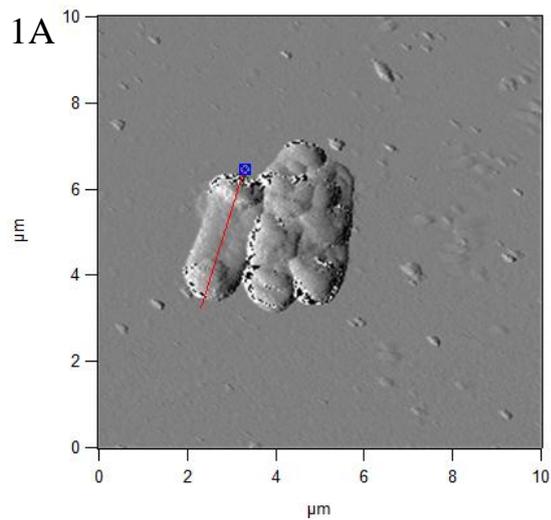
Таблица 14 – Сравнительные морфометрические характеристики клеток *R. ruber* ИЭГМ 346, выращенных в минеральной среде в присутствии глюкозы (контроль) и ДН

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

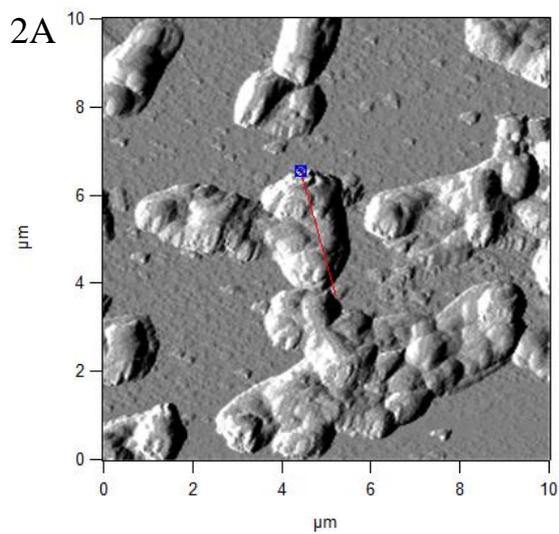
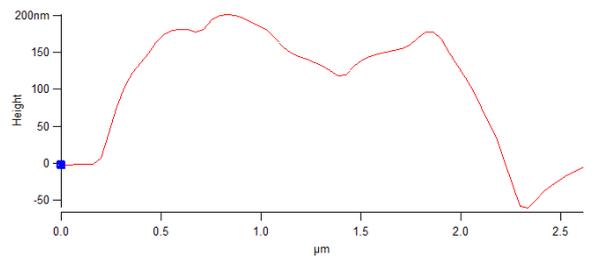
Примечание. Родококки выращивали в течение 10 сут.

по-видимому, играет важную роль в “противостоянии” бактерий токсическому воздействию загрязнителя за счет уменьшения открытой поверхности клеток для контакта с экострессором. Увеличивая свой размер, бактерии уменьшают относительную площадь своей клеточной оболочки, которая, как известно, является основной мишенью для токсического действия ароматических соединений, действующих по механизму мембраноактивных токсинов (Neumann *et al.*, 2005). Полученные результаты косвенно подтверждают токсичное влияние ДН в отношении родококков. Исследование микрогеометрии поверхности живых клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 не выявило существенных изменений величин среднеквадратичной шероховатости (колебания величин не превышали 9 %) и амплитуды микрорельефа (таблица 14, рисунок 27), что свидетельствует о глобальных изменениях, происходящих в клетке под действием высоких концентраций ДН. В присутствии высокой концентрации ДН клетки сильно повреждены (рисунок 26В), тогда как в присутствии более низкой концентрации – сохраняют высокую жизнеспособность (рисунок 26Г).

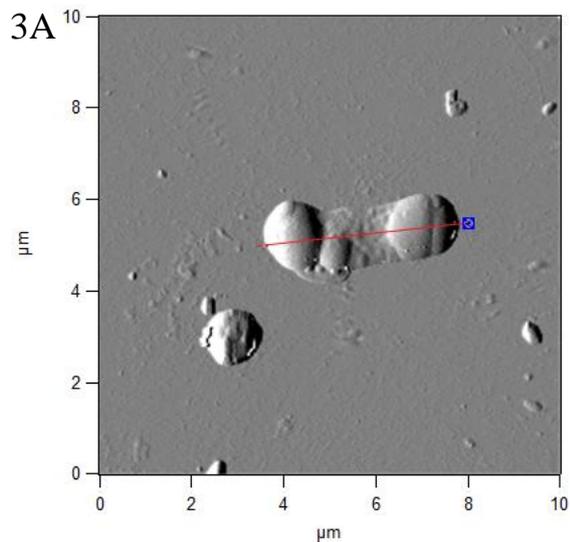
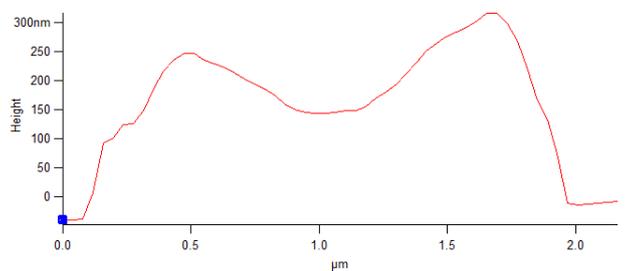
При воздействии более низких (50 мкг/л) концентраций ДН показатели относительной площади (S/V) бактериальных клеток свидетельствовали об обратном: в условиях дефицита по углероду увеличивалась площадь контакта родококков с ДН для лучшего его поглощения и потребления (Veeranagouda *et al.*, 2000).



1Б



2Б



3Б

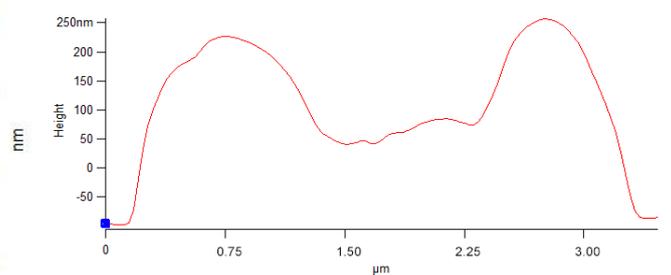


Рисунок 27 – АСМ-изображения (А) и профиль (Б) клеток *R. ruber* ИЭГМ 346, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы (1), в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы (2) и в присутствии 50 мкг/л ДН и глюкозы (3) в течение 10 сут.

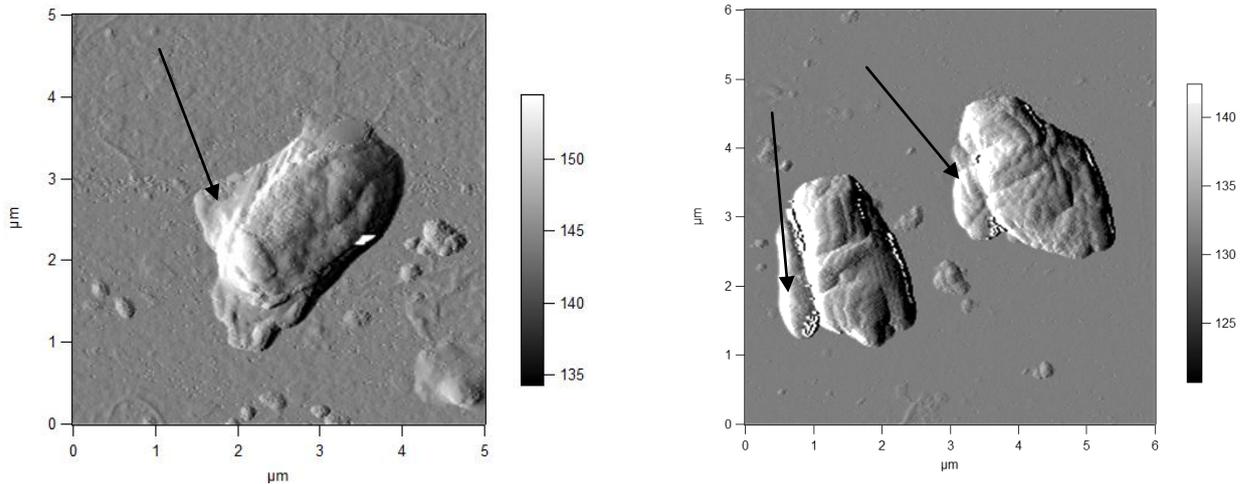


Рисунок 28 – АСМ-изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 346, выращенных в течение 10–15 сут в присутствии 50 мг/л ДН. Стрелками указаны зоны повреждения клеток и изливания клеточного содержимого.

При этом наблюдалось значительное увеличение степени шероховатости их клеточной поверхности (колебания величин превышали 60 %) (таблица 14). Подобная ответная реакция родококков обнаружена нами ранее под влиянием других ксенобиотиков: органических загрязнителей (Korshunova *et al.*, 2016) и смоляных кислот (Cheremnykh *et al.*, 2018). В условиях низких концентраций ДН увеличивается число разнородных по морфологическим признакам клеток: клетки уменьшаются, некоторые очень значительно, приобретают более овальную, нередко сильно раздутую или бобовоподобную форму с выпуклыми краями (рисунок 26Б). Большинство клеток со структурными неровностями (рисунок 29). В культуре родококков в присутствии ДН преимущественно выявляются клетки, формирующие на агаризованной среде гидрофобные колонии в *R*-форме – шероховатые, тусклые, сухие, с неровными краями, неправильных очертаний, с пигментированной выступающей центральной областью и непигментированной плоской периферийной частью. Известно, что клетки, формирующие колонии в *R*-форме, отличаются от типичных *S*-вариантов наличием ригидной утолщенной клеточной стенки с двукратным превышением липидного содержания (Kuyukina *et al.*, 2000). В *R*-формах обнаруживается максимальная концентрация ферментов цепи транспорта электронов (цитохромов, флавинов), максимальная среди диссоциантов интенсивность дыхания (Iwabuchi *et al.*, 2000).

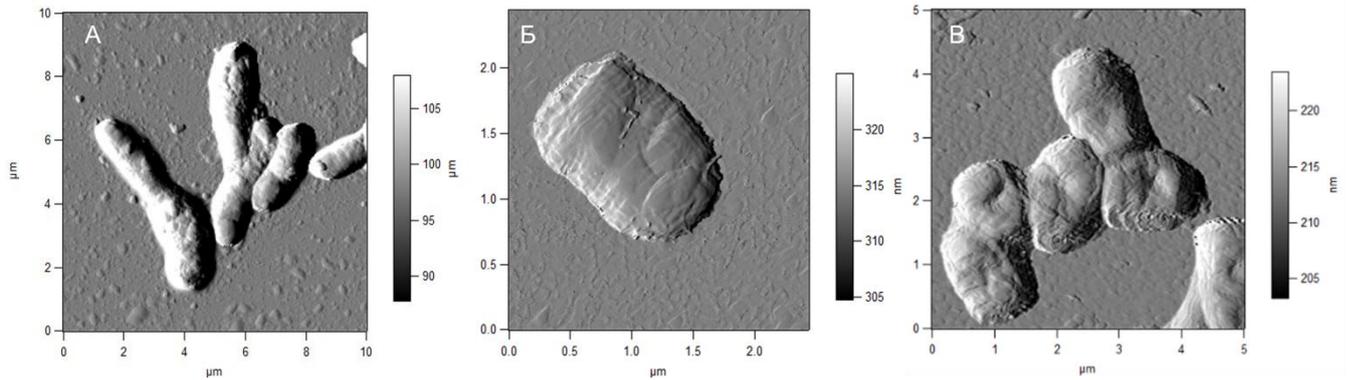


Рисунок 29 – АСМ-изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 346. А – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы в течение 10 сут; Б, В – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии 50 мкг/л ДН и глюкозы в течение 10 сут.

4.2. Влияние диклофенака на физико-химические характеристики родококков

Результатом взаимодействия ДН и родококков является изменение их физико-химических характеристик, в том числе величины ζ -потенциала, отражающего количественно электроповерхностные свойства клетки. ζ -потенциал может быть определен как разность электрических потенциалов на поверхности раздела между водной средой и неподвижным слоем жидкости, сцепленным с поверхностью бактериальной клетки (Halder *et al.*, 2015). ζ -потенциал играет важную роль в поддержании клеточных функций, а изменение данного показателя вследствие электростатических взаимодействий между клеткой и агентами внешней среды может повлечь модификацию проницаемости клеточных оболочек вплоть до гибели клеток. На рисунке 30 представлены результаты измерения электрокинетического потенциала клеточной поверхности родококков под влиянием ДН (50 мг/л) в динамике.

Культивирование клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 в течение первых 10 сут в данных условиях приводило к смещению значения ζ -потенциала с $-35,27 \pm 2,33$ (контроль) до $-31,32 \pm 0,83$ мВ ($p < 0,05$) за счет, по-видимому, присутствия в молекуле ДН катиона натрия и его взаимодействия с карбоксильными группами миколовых кислот клеточной стенки родококков).

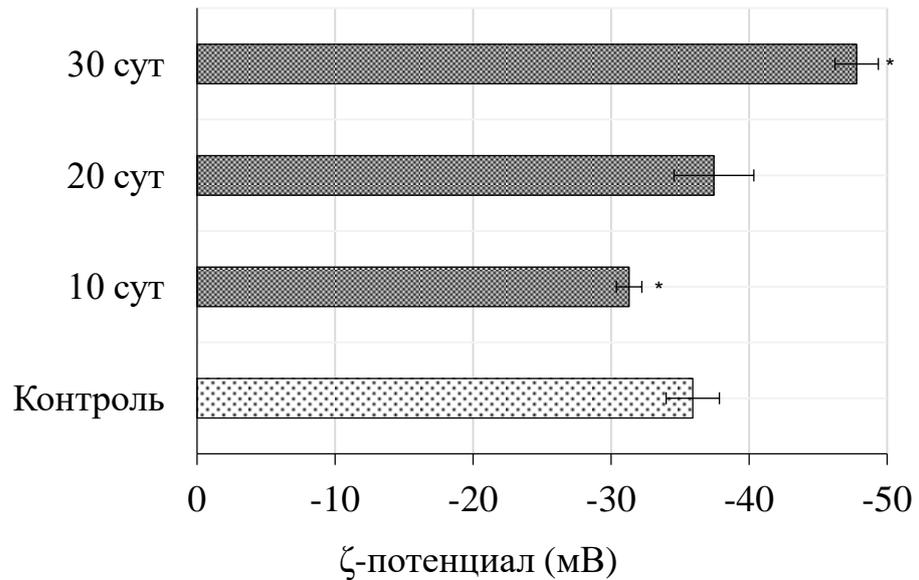


Рисунок 30 – Изменение ζ -потенциала клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 в процессе биодegradации 50 мг/л ДН. (▨) клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы в течение 10 сут (контроль); (■) клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы. * Данные достоверно отличаются от контрольных значений ($p < 0,05$).

Известно, что сдвиг электрокинетического потенциала в сторону нейтральности может приводить к дестабилизации клеточных оболочек и лизису клеток (Arakha *et al.*, 2015; Halder *et al.*, 2015). В этот период отмечается появление значительного числа инволюционных и лизирующихся клеточных форм (см. рисунок 28). По некоторым данным, антибиотики способствуют изменению электрокинетических свойств мембран бактериальных клеток, что в дальнейшем отражается на нарушении клеточного деления (через влияние на систему белков Min) и клеточной морфологии (Stahl, Hamoen, 2010). Изменение морфологии родококков в присутствии ДН подтверждено данными АСМ-сканирования (см. рисунки 27–29). Еще одним подтверждением нахождения клеток в угнетенном состоянии в присутствии ДН могут служить показатели окислительного стресса у бактерий, в частности изменение каталазной активности. Известно, что в процессе окисления ксенобиотиков образуются пероксиды, в детоксикации которых участвует фермент каталаза. Каталазная активность бактерий является индикатором их способности к биодеструкции

ксенобиотиков и способствует выживанию бактерий в условиях окружающей среды (Гоголева, 2012). По нашим данным, культивирование родококков в присутствии ДН приводило к изменению их каталазной активности (рисунок 31).

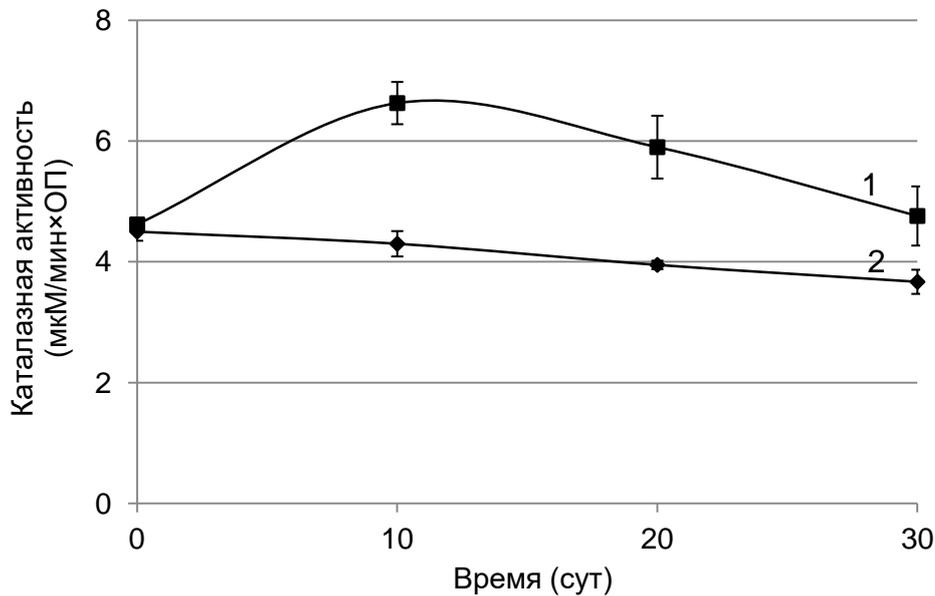


Рисунок 31 – Динамика каталазной активности *R. ruber* ИЭГМ 346 в процессе биодеструкции 50 мг/л ДН (1). 2 – биотический контроль.

Начальные показатели каталазной активности клеток штамма *R. ruber* ИЭГМ 346 составляли $4,5 \pm 0,15$ кММ/мин×ОП. На 10-е сут эксперимента регистрировали значительное увеличение каталазной активности родококков до $6,6 \pm 0,21$ кММ/мин×ОП. По-видимому, в это время интенсификация каталазной активности связана с тем, что в условиях окислительного стресса клетка расходует энергию на ферментативные защитные реакции, поскольку неферментные антиоксидантные системы (гликоген, полисахариды, миколаты трегалозы) не осуществляют эффективную защиту от активных форм кислорода ввиду дестабилизации клеточных оболочек и нарушения целостности мембран (см. рисунок 27) (Гоголева, 2012). В контрольных образцах регистрировали незначительное снижение активности каталазы. На 20–30 сут экспозиции в присутствии ДН наблюдалось снижение каталазной активности родококков.

В это же время регистрировался последовательный сдвиг ζ -потенциала в сторону более отрицательных значений (смещение потенциала в более отрицательную область) – $-37,47 \pm 2,33$ и $-47,81 \pm 2,57$ мВ соответственно. Следует

отметить, что чем дольше по времени клетки контактировали с ДН, тем более отрицательным становился их заряд (рисунок 30).

Клетки, выращенные в присутствии низких (50 мкг/л) концентраций ДН достоверно не отличались по величине ζ -потенциала от клеток, выращенных при высоких концентрациях ДН: численные значения распределялись в том же диапазоне величин ζ -потенциала. Отрицательные значения потенциала бактериальных клеток являются следствием суммарного присутствия отрицательно заряженных молекул липидов, липогликанов, тейхоевых и липотейхоевых кислот в составе клеточной стенки бактерий (Wilson *et al.*, 2001). Родококки имеют необычную структуру и состав клеточной стенки, по сравнению с другими Грам-положительными бактериями. В ней доминируют сложные специфические липиды, в состав которых входят 2-алкил-3-гидрокси разветвленные жирные кислоты, отвечающие за формирование внешнего липидного барьера непроницаемости (Gibson *et al.*, 2003). По нашим данным, количество синтезируемых родококками липидов изменялось в зависимости от состава среды. Присутствие ДН индуцировало существенное (почти в 2 раза) повышение процентного содержания общих клеточных липидов родококков ($70,83 \pm 4,46$ % от веса сухой биомассы), по сравнению с таковым ($43,40 \pm 1,72$ % от веса сухой биомассы) клеток, выращенных в присутствии глюкозы (таблица 15). Увеличение липидного компонента родококков, культивируемых в присутствии ДН, очевидно, способствует сохранению целостности клеточной мембраны и повышению ее стабильности. При этом о стабилизации клеточной мембраны в том числе может свидетельствовать снижение каталазной активности родококков, указывая на приоритет неферментативной антиоксидантной системы (клеточная оболочка) над ферментативной (см. рисунок 31). Полученные данные свидетельствуют о том, что структура развивающейся популяции родококков пластично изменяется по мере биодegradации ДН в сторону более устойчивых к токсичному действию ДН особей. Увеличение содержания липидов в клетках *R. oracius* PD630 рассматривали в качестве механизма толерантности при утилизации фенольных субстратов (Yoneda *et al.*, 2016).

Таблица 15 – Содержание совокупных липидов в клетках *R. ruber* ИЭГМ 346, выращенных в минеральной среде в присутствии глюкозы (контроль) и ДН

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

Примечание. Родококки выращивали в течение 15 сут.

По мере первоначального сдвига ζ -потенциала в процессе биодеструкции ДН наблюдалось интенсивное формирование клеточных агрегатов. Это согласуется с литературными данными (Kłodzińska *et al.*, 2010) о том, что уменьшение численного значения ζ -потенциала у Грам-положительных бактерий усиливает феномен клеточной агрегации. Важную роль в формировании бактериальных агрегатов играет не только свойства ДН и состав бактериальной поверхности, но и степень ее гидрофобности. С использованием SAT показано, что в присутствии ДН усиливаются гидрофобные взаимодействия между родококками, что способствует развитию клеточных агрегатов. Это иллюстрирует рисунок 32: родококки продуцировали стабильные микроагрегаты под действием сравнительно низкой (0,6 М) концентрации сульфата аммония, что указывает на высокую гидрофобность их клеточной поверхности (рисунок 32Б).

Следует отметить, что в присутствии разных начальных концентраций ДН у родококков наблюдалась четкая (более выраженная при высокой концентрации ДН) тенденция к клеточной агломерации: к росту в жидкой минеральной среде в виде дискретных распределенных по всему объему среды и обзриваемых визуально биоконгломератов (глобул) разного размера и консистенции.

Полученные результаты согласуются с данными (Bouchez-Naïtali *et al.*, 2001) о высокой степени гидрофобности флокулообразующих родококков в условиях роста на гидрофобных субстратах и способности высокогидрофобных клеток к самопроизводной агрегации. Подобные образования гидрофобных клеток, по-видимому, способствуют ускорению (облегчению) кооперативного воздействия окислительных ферментов на экотоксикант.

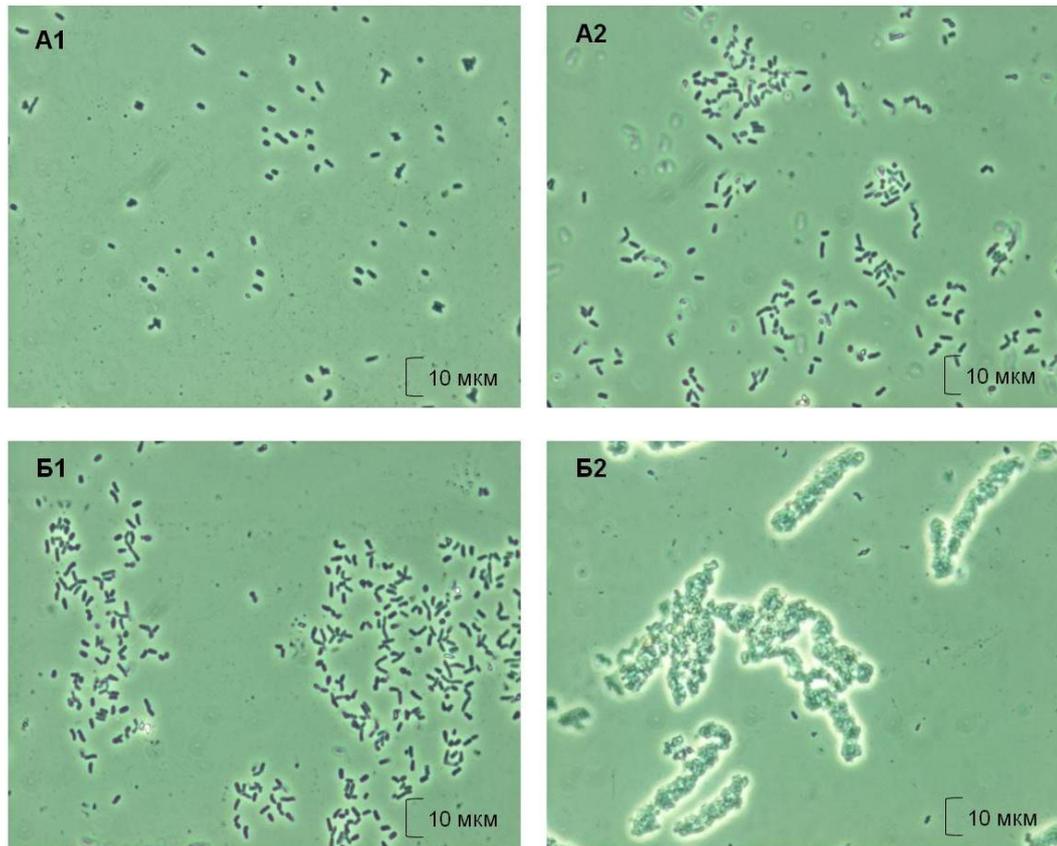


Рисунок 32 – Микрофотографии клеток *R. ruber* ИЭГМ 346. А – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии глюкозы в течение 15 сут; Б – клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии 50 мг/л ДН и глюкозы в течение 15 сут. 1 – без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 – в присутствии 0,6 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ув.×1000.

4.3. Биодеструкция диклофенака с использованием отдельных клеточных фракций

В процессах бактериального окисления фармацевтических поллютантов участвуют ферменты, локализованные преимущественно в цитоплазме или связанные с клеточной мембраной (Karigar, Rao, 2011; Żur *et al.*, 2018). По нашим данным, наибольшая убыль ДН регистрировалась при использовании целых клеток *R. ruber* ИЭГМ 346, а также супернатанта, содержащего цитоплазматические ферменты (таблица 11). По результатам ТСХ и ВЭЖХ, в этих условиях обнаружены первичные метаболиты ДН – 4'-гидрокси- и 5-гидроксидиклофенак. При использовании супернатанта с Тритон-экстрагируемыми мембраносвязанными ферментами убыль фармвещества

составляла 14,7 %. При этом обнаружен метаболит, который соответствовал фенилуксусной кислоте. Соникат клеток с неэкстрагируемыми ферментами оказался неактивным в отношении ДН.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в процессе окисления молекулы ДН, находятся в цитоплазме или связаны с цитоплазматической мембраной. Следует отметить, что эти два комплекса, по-видимому, участвуют на разных этапах биодеструкции экотоксиканта в связи с образованием разных метаболитов.

Таблица 11 – Биодеструкция ДН с использованием отдельных фракций клеток *R. ruber* ИЭГМ 346

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

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

Известно, что в реакции окисления НПВС у микроорганизмов участвуют цитохром Р450-зависимые монооксигеназы. Недавно выделена монооксигеназа СУР116В2 у штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784, катализирующая процесс окисления ДН в 5-гидроксидиклофенак (Klenk *et al.*, 2017). В сравнительных экспериментах по исследованию возможности участия аналогичных ферментов в реакциях окисления ДН родококками использовали ингибиторы оксигеназ – 1-

аминобензотриазол, амиодарон, кетоконазол, имидазол, проадифен (Кылосова, 2016). Как видно из таблицы 12, достоверное ($p < 0,05$) ингибирование процесса биоразложения ДН отмечается в присутствии 1-аминобензотриазола и амиодарона. В присутствии других ингибиторов уровень биоконверсии экотоксиканта существенно не изменялся.

Таблица 12 – Влияние ингибиторов цитохром Р450-зависимых монооксигеназ на деструктирующей активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 346 в отношении ДН

Ингибитор	ДН, %
Без ингибитора	83,0±1,24
1-аминобензотриазол	95,6±2,36*
Амиодарон	98,2±4,79*
Кетоконазол	86,6±3,01
Имидазол	79,3±2,95
Проадифен	85,4±4,21

Примечание. *Данные достоверно отличаются от контроля (без ингибитора). Приведены результаты после 10 сут эксперимента.

Глава 5. ПУТИ БИОДЕСТРУКЦИИ ДИКЛОФЕНАКА. ТОКСИЧНОСТЬ ПРОДУКТОВ ЕГО БИОДЕСТРУКЦИИ

5.1. Предполагаемые пути биодеструкции диклофенака

По результатам ГХ-МС и ТСХ, бактериальная деградация ДН сопровождалась образованием метаболитов. На рисунке 33 представлена возможная схема разложения ДН (соединение **1**) клетками *R. ruber* ИЭГМ 346. В первые 5–10 сут инкубации родококков в присутствии высоких (50 мг/л) концентраций ДН среди продуктов биодеструкции ДН (соединение **2**) детектировались первичные моногидроксиметаболиты ДН – 2-[4'-гидрокси-2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота (4'-ОН-ДН, соединение **3**), 5-гидрокси-2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота (5-ОН-ДН, соединение **4**), а также соединение **5** бензохинониминной структуры и его дигидроксипроизводное (соединение **16**) (рисунки 34–36). Позднее в среде инкубации обнаруживались моно- и дигидроксипроизводные 2,6-дихлоранилина (соединения **6** и **8**), образующиеся в результате разрушения связи С-N у второго атома углерода в нехлорированном ароматическом кольце соединений **3** и **4**; а также фенилуксусная кислота (соединение **7**) и ее гидроксированное производное – 3-гидроксифенилуксусная кислота (соединение **9**) (рисунок 37).

При использовании более низкой (50 мкг/л) концентрации ДН вышеперечисленные продукты обнаруживались в первые 2 сут инкубации родококков. На 4-е сут в среде регистрировались метаболиты со спектроскопическими характеристиками гомогентизиновой (2,5-дигидроксифенилуксусной) кислоты, $m/z=168$ (соединение **10**) и продукта ее окисления 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусной кислоты, $m/z=166$ (соединение **11**), а также фумарилацетоуксусной кислоты, $m/z=200$ (соединение **12**) и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной, $m/z=102$ и фумаровой кислот, $m/z=116$ (соединения **13**, **14** соответственно) (рисунки 38, 39, 40). С помощью ТСХ подтверждено присутствие в составе метаболитов ДН фенилуксусной кислоты (R_f 0,64) на промежуточных этапах процесса биодеструкции ДН и фумаровой кислоты (R_f 0,83) в конце процесса биодеструкции (таблица 16).

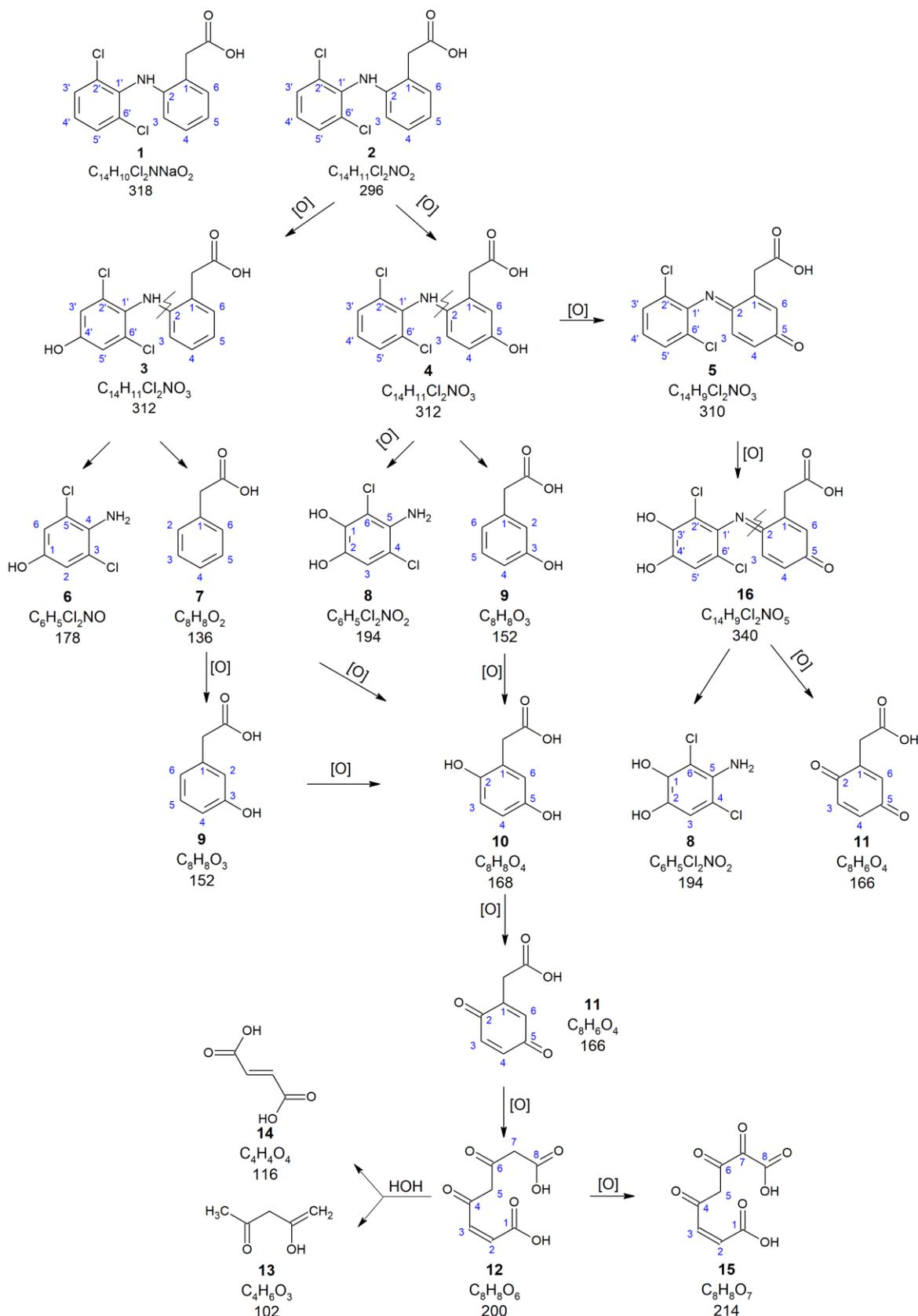
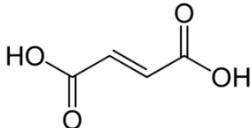
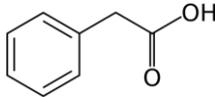
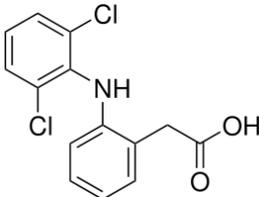


Рисунок 33 – Пути биодegradации ДН с использованием *R. ruber* ИЭГМ 346.

1 – натриевая соль 2-(2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусной кислоты; **2** – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота; **3** – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил-4'-гидрокси]-амино)-фенилуксусная кислота; **4** – 2-(2-[2',6'-

дихлорфенил-5-гидрокси]-амино)-фенилуксусная кислота; **5** – 2-(1-(5-оксоциклогекса-1,3-диенил-2-(2',6'-дихлор-фенилимино)-уксусная кислота; **6** – 4-амино-3,5-дихлорфенол; **7** – фенилуксусная кислота; **8** – 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диол; **9** – 3-гидроксифенилуксусная кислота; **10** – 2,5-дигидрокси-фенилуксусная кислота (гомогентиизиновая кислота); **11** – 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусная кислота; **12** – 4,6-диоксо-окт-2-*транс*-ендиовая кислота (фумарилацетоуксусная кислота); **13** – 3-оксобутановая кислота (ацетоуксусная кислота); **14** – *транс*-бутендиовая кислота (фумаровая кислота); **15** – 4,6,7-триоксоокт-2-ендиовая кислота; **16** – 2-[1-(5-оксоциклогекса-1,3-диенил-2-(3',4'-дигидрокси-2',6'-дихлорфенил)-имино)]-уксусная кислота.

Таблица 16 – Значения R_f ДН и его метаболитов в культуральных жидкостях *R. ruber* ИЭГМ 346

№	Исследуемое вещество	Химическая структура	Значение R_f
1	Фумаровая кислота	 транс-изомер	0,83
2	Фенилуксусная кислота		0,64
3	ДН		0,65
4	Культуральная среда, содержащая 50 % начальной концентрации ДН		0,83 0,65 0,64
5	Культуральная среда, содержащая метаболиты ДН (0 % ДН)		0,83

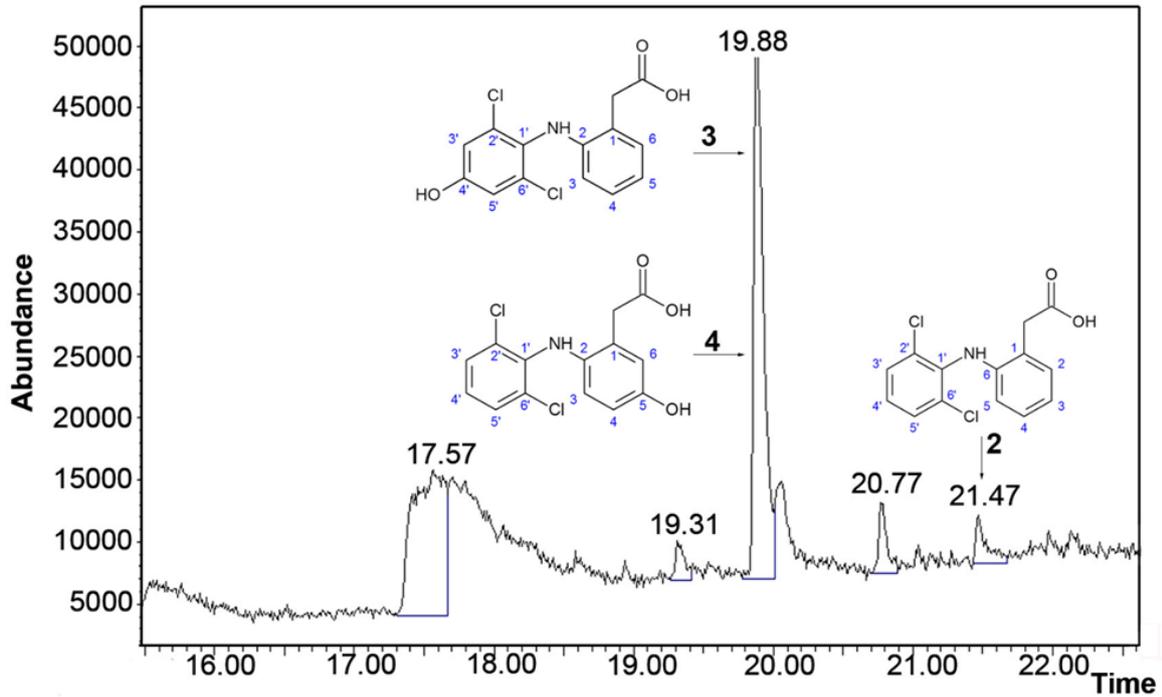


Рисунок 34 – Хроматограмма метаболитов ДН, детектируемых в постферментационной среде родококков в начале процесса биодеструкции. 2 – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил]-амино)-фенилуксусная кислота; 3 – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил-4'-гидрокси]-амино)-фенилуксусная кислота; 4 – 2-(2-[2',6'-дихлорфенил-5-гидрокси]-амино)-фенилуксусная кислота.

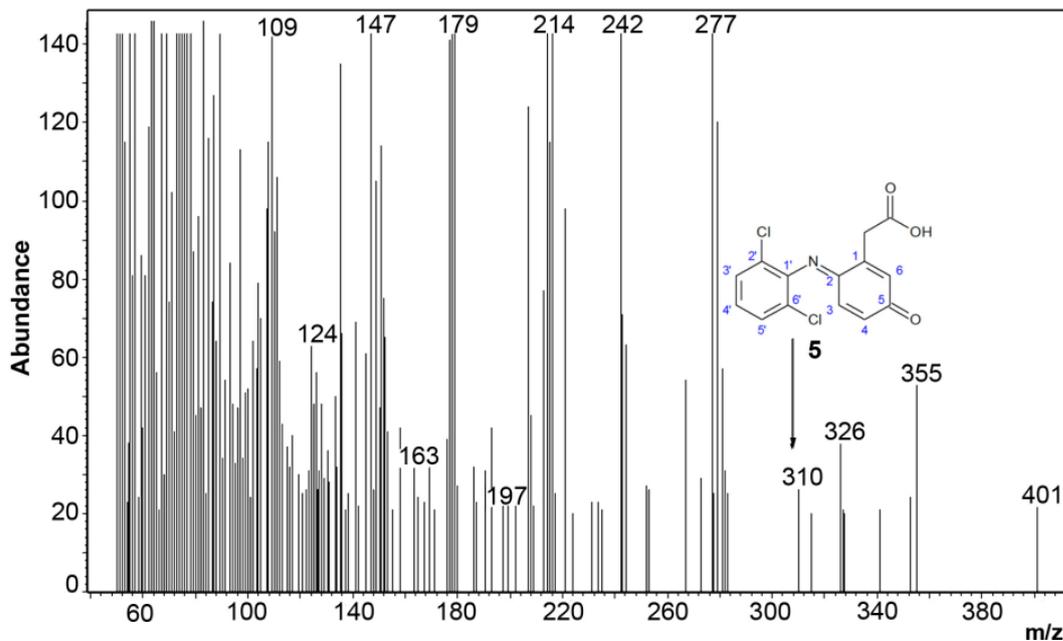


Рисунок 35 – Масс-спектр (5) 2-(1-(5-оксо-циклогекса-1,3-диенил-2-(2',6'-дихлор-фенилимино)-уксусной кислоты ($m/z=310,0$).

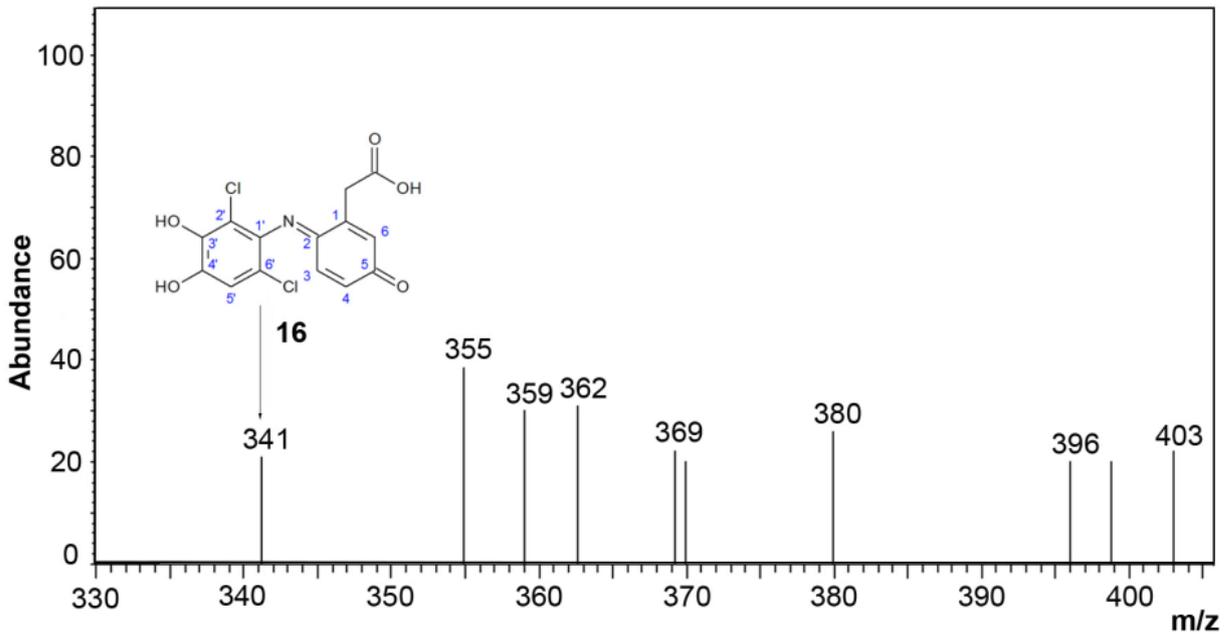


Рисунок 36 – Масс-спектр (**16**) 2-[1-(5-оксочиклогекса-1,3-диенил-2-(3',4'-дигидрокси-2',6'-дихлорфенил)-имино)]-уксусной кислоты ($m/z=340,0$).

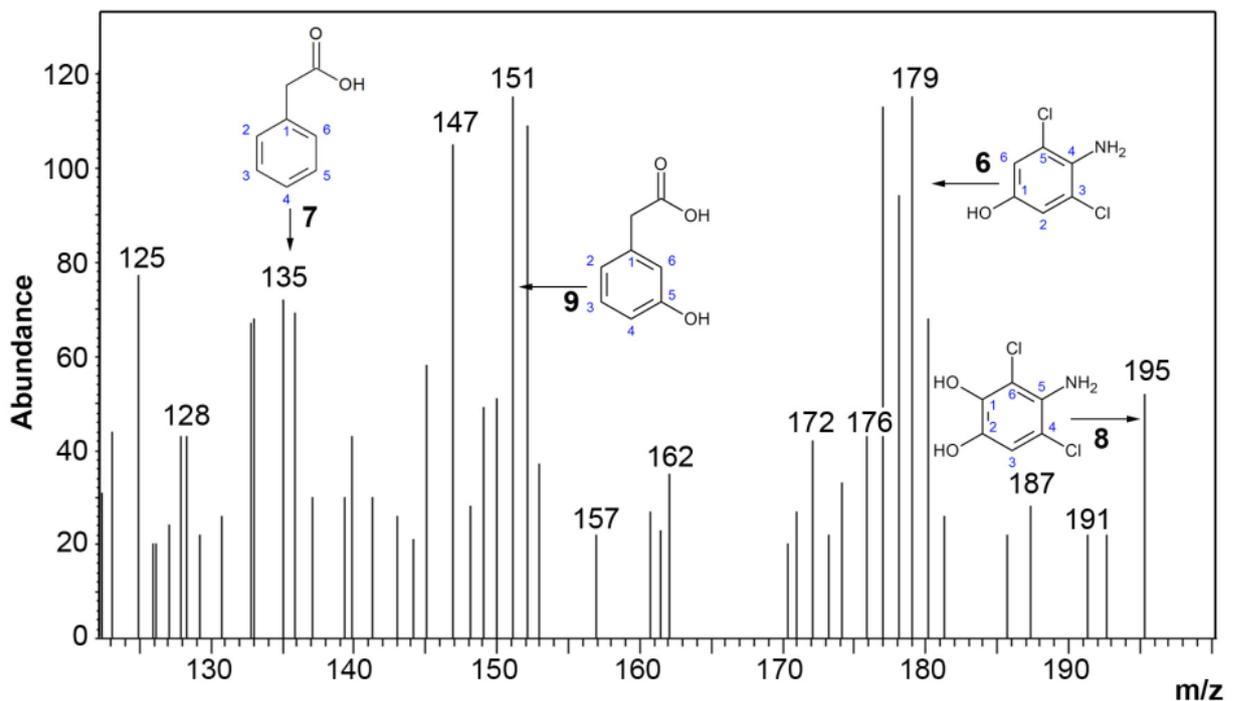


Рисунок 37 – Масс-спектры (**6**) 4-амино-3,5-дихлорфенола ($m/z=178,0$); (**7**) фенилуксусной кислоты ($m/z=136,0$); (**8**) 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диола ($m/z=194,0$); (**9**) – 3-гидроксифенилуксусной кислоты ($m/z=152,0$).

Кроме того, наблюдался интенсивный пик соединения **15** ($m/z=214$), которое, по-видимому, образовалось в результате реакции окисления соединения **12** по седьмому атому углерода за счет подвижности атомов водорода, находящихся между карбоксильной и кетонной группами. С использованием семикарбазида гидрохлорида и бромной воды подтверждено присутствие кетонной группы и двойной связи. В ИК спектрах сухих остатков, полученных после выпаривания смеси продуктов биодеструкции ДН в начале эксперимента, наблюдается характеристическая полоса поглощения фенольного гидроксила в области 3400 см^{-1} , в конце эксперимента – кетонного карбонила в области $1670 - 1680\text{ см}^{-1}$. ДН и вышеуказанные соединения к концу ферментации (на 6 сут эксперимента) не обнаруживались в среде инкубации родококков, что свидетельствовало о дальнейшем превращении метаболитов. В контрольных экспериментах метаболиты ДН не выявлялись.

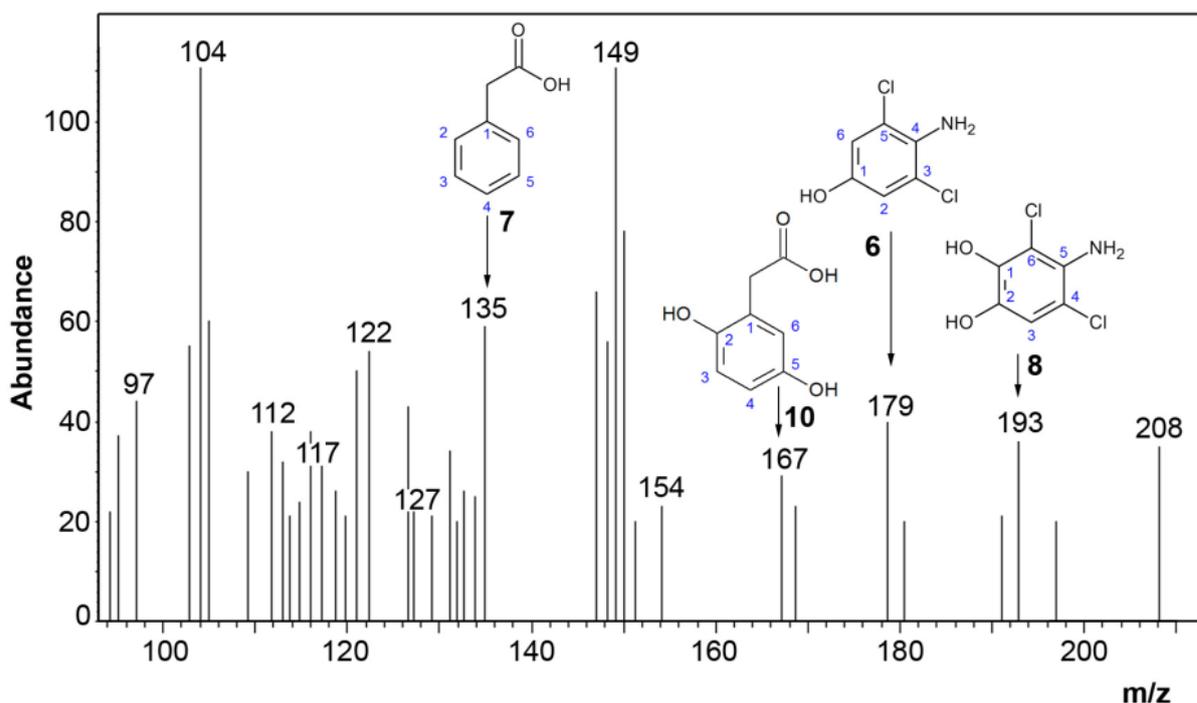


Рисунок 38 – Масс-спектры **(6)** 4-амино-3,5-дихлорфенола ($m/z=178,0$); **(7)** фенилуксусной кислоты ($m/z=136,0$); **(8)** 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диола ($m/z=194,0$); **(10)** 2,5-дигидроксифенилуксусной (гомогентизиновой) кислоты ($m/z=167,0$).

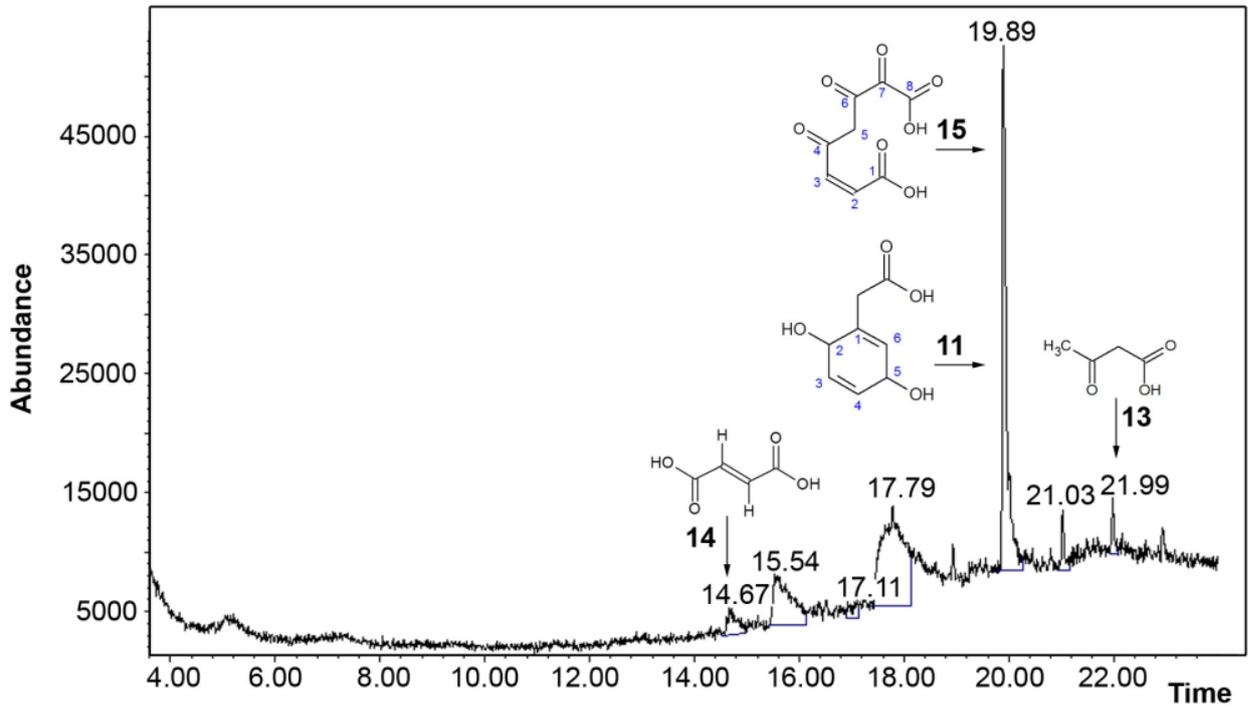


Рисунок 39 – Хроматограмма метаболитов ДН, детектируемых в постферментационной среде родококков в конце процесса биодеструкции. 11 – 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусная кислота; 13 – 3-оксобутановая кислота (ацетоуксусная кислота); 14 – *транс*-бутендиовая кислота (фумаровая кислота); 15 – 4,6,7-триоксоокт-2-ендиовая кислота.

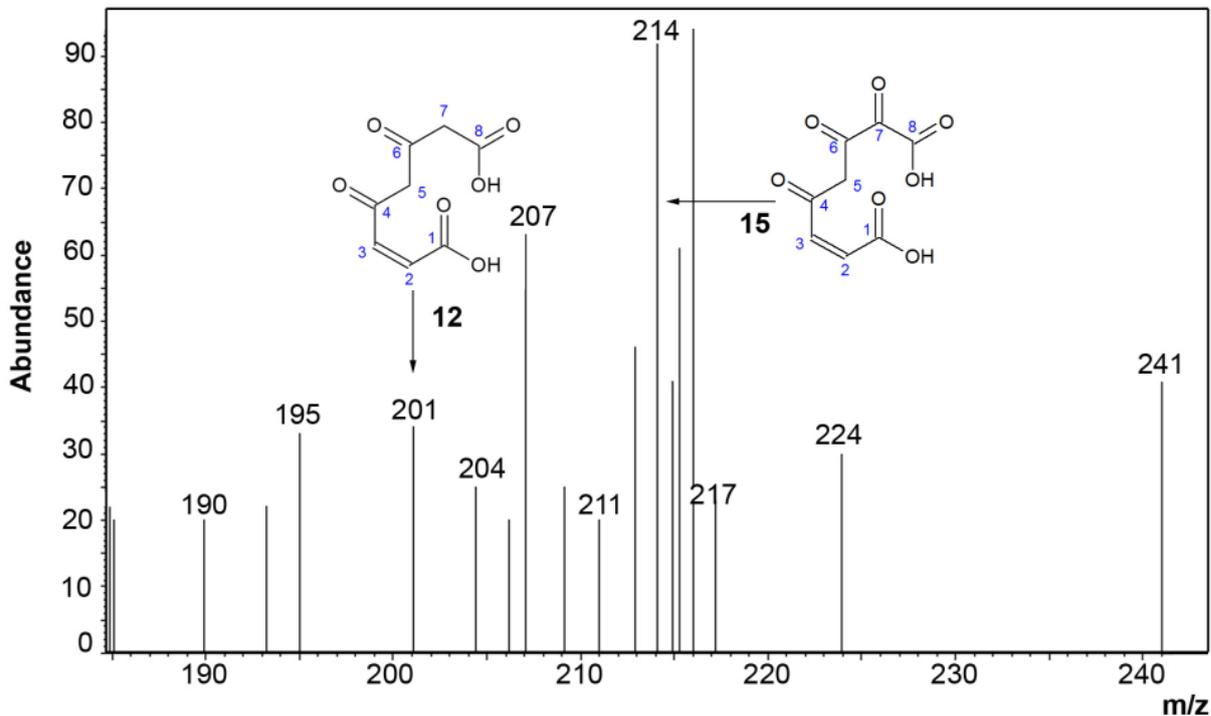


Рисунок 40 – Масс-спектры (12) фумарилацетоуксусной кислоты ($m/z=200,0$); (15) 4,6,7-триоксо-окт-2-ендиовой кислоты ($m/z=214,0$).

О возможном дегалогенировании 4-амино-3,5-дихлорфенола (соединение **6**) и 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диола (соединение **8**) свидетельствовали результаты качественного анализа содержания свободных хлоридов в среде (рисунок 41). Наблюдалось выраженное увеличение содержания хлорид-ионов в среде в первые 20 сут эксперимента (от 0 до 18,7 мМ/л). Наиболее высокие (25,4 мМ/л) показатели содержания хлорид-ионов достигались на 40 сут эксперимента, после чего регистрировали резкое падение до 12,5 мМ/л к 50 сут эксперимента. Высвобождение хлорид-ионов, возможно, приводило к формированию HCl, о чем свидетельствовало некоторое снижение показателя pH среды (с 6,9 до 6,5).

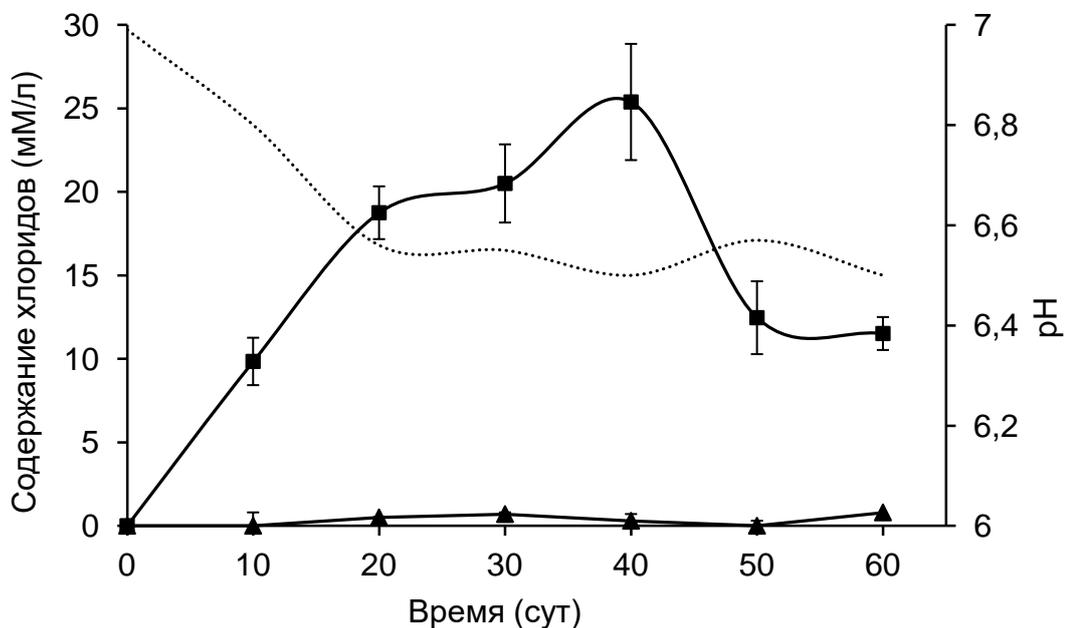


Рисунок 41 – Изменение содержания хлоридов в среде в процессе биодеструкции 50 мг/л ДН клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 (■). ▲ – контроль абiotической деструкции, ... – pH среды.

5.2. Фитотоксичность диклофенака и продуктов его биодеструкции

Установлено, что процесс биодеструкции ДН клетками *R. ruber* ИЭГМ 346 сопровождался формированием метаболитов, которые не обладали выраженной фитотоксичностью (рисунки 42, 43, таблица 17). Согласно расчетам, проведенным с использованием уравнения (7), фитотоксический эффект, оказываемый продуктами биодеструкции ДН, составлял 0,7 %, в то время как ДН в концентрациях от 5 до

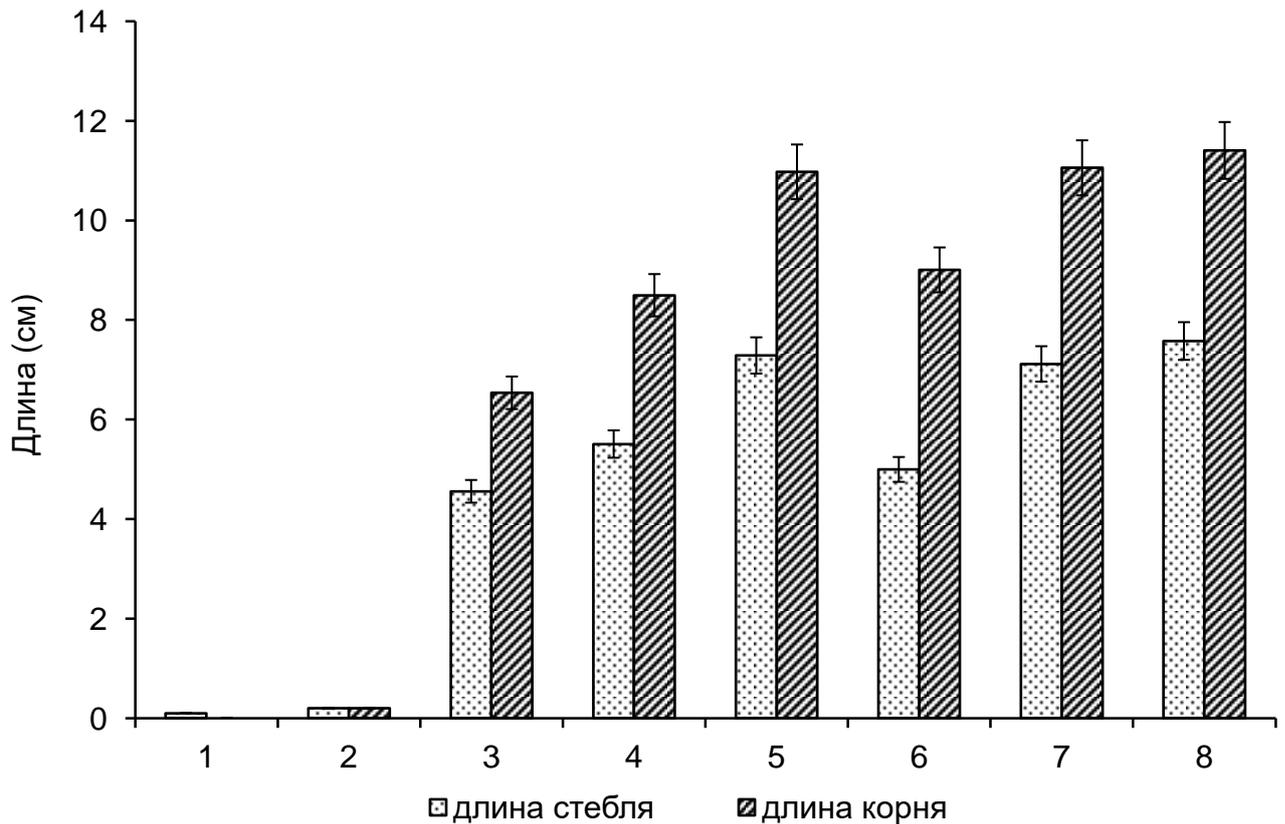


Рисунок 42 – Изменение морфометрических показателей овса посевного *Avena sativa* L. под воздействием ДН и продуктов его биодеструкции. 1 – 500 мг/л ДН; 2 – 50 мг/л ДН; 3 – 25 мг/л ДН; 4 – 5 мг/л ДН; 5 – продукты биодеструкции ДН; 6 – биотический контроль; 7 – абиотический контроль (вода); 8 – контроль среды RS.

Таблица 17 – Фитоэффект, оказываемый ДН и продуктами его биодеструкции

Вариант	Длина корня, см	Фитоэффект, %	Тест-реакция
Контроль (вода)	11,0±2,14	0	Норма
Контроль среды	11,4±0,87	-3,2	
500 мг/л ДН	0,0	100	Эффект торможения
50 мг/л ДН	0,2±0,10	98,2	
25 мг/л ДН	6,5±1,08	40,9	
5 мг/л ДН	8,5±1,41	23,1	
Продукты биодеструкции	10,9±0,55	0,7	Норма
Биотический контроль	9,0±1,08	18,5	



Рисунок 43 – **Изменение морфометрических показателей овса *Avena sativa* L. под воздействием ДН и продуктов его биодеструкции на 7 сут эксперимента.** 1 – продукты биодеструкции ДН, 2 – 25 мг/л ДН; 3 – абиотический контроль.

500 мг/л ингибировал развитие корневой системы овса от 23,1 до 100 % (таблица 17), т.е. являлся токсичным в отношении растения. Помимо ингибирования развития корневой системы, ДН в разных разведениях подавлял развитие побега (рисунки 42, 43).

5.3. Экоотоксичность продуктов биодеструкции диклофенака

Согласно тесту ECOSAR, конечные метаболиты (соединения 12–15) процесса биодеструкции ДН с использованием родококков не являлись токсичными в отношении водных организмов (рыбы, беспозвоночные, водоросли) (таблица 18). Показатели острой токсичности ДН для рыб, дафний и водорослей составляли 37,66, 27,75 и 41,41 мг/л соответственно, что согласно Глобальной гармонизированной системе классификации и маркировки химических веществ соответствует классу “опасных для водных организмов” веществ.

По значениям хронической токсичности ДН относится к высокотоксичным (рыбы и дафнии) и токсичным (водоросли) соединениям. Показатели острой и хронической токсичности продуктов бактериальной детоксикации ДН (фумарилацетоуксусная, ацетоуксусная и фумаровая кислоты) больше 100 и 1000

Таблица 18 – Расчет экотоксичности ДН и продуктов его биодеструкции с использованием программы ECOSAR

Соединение	ECOSAR класс	Концентрация, мг/л						Категория опасности
		Острая токсичность			Хроническая токсичность			
		Рыбы ЛД ₅₀ (96 ч)	Дафнии ЛД ₅₀ (48 ч)	Зеленые водоросли ЭД ₅₀ (96 ч)	Рыбы ЭД ₅₀ (30 сут)	Дафнии ЭД ₅₀ (21 сут)	Зеленые водоросли ЭД ₅₀ (16 сут)	
1	Neutral Organics-acid	37,66	25,75	41,41	4,58	4,22	16,42	II
2	Neutral Organics-acid	37,66	25,75	41,41	4,58	4,22	16,42	II
3	Phenols-acid	68,21	34,80	142,67	8,19	6,61	66,03	III
4	Phenols-acid	68,21	34,80	142,67	8,19	6,61	66,03	III
5	Schiff Bases-Azomethine-acid	7,58	10,04	8,35	0,23	0,68	4,00	II
6	Phenol Amines	10,50	1,09	4,12	0,60	0,36	0,76	II
7	Neutral Organics-acid	3647,34	1964,52	1176,48	334,10	165,41	273,93	IV
8	Phenols, Poly	38,06	434,37	8,49	24,19	172,05	0,99	III
9	Phenols-acid	1665,51	313,93	1599,25	144,13	59,82	761,38	IV
10	Hydroquinones acid	3,17	4,91	7,12	0,28	5,72	13,95	II
11	Quinones-acid	1,60	13,41	0,76	0,16	97,47	0,17	II
12	Diketones-acid	3576,90	2165,74	367,57	3774,68	2930,32	1839,61	IV

Продолжение таблицы 18

Соединение	ECOSAR класс	Концентрация, мг/л						Категория опасности
		Острая токсичность			Хроническая токсичность			
		Рыбы ЛД ₅₀ (96 ч)	Дафнии ЛД ₅₀ (48 ч)	Зеленые водоросли ЭД ₅₀ (96 ч)	Рыбы ЭД ₅₀ (30 сут)	Дафнии ЭД ₅₀ (21 сут)	Зеленые водоросли ЭД ₅₀ (16 сут)	
13	Neutral Organics-acid	399876,37	172315,18	41032,34	28162,12	7792,56	5821,70	IV
14	Neutral Organics-acid	53316,05	25294,80	8964,33	4216,20	1496,17	1573,47	IV
15	Vinyl/Allyl Ketones-acid	78982,13	47149,87	34104,79	977981,33	11420,81	35237,52	IV
16	Phenols, Poly -acid	99,81	655,87	50,78	51,36	238,82	7,25	III

Примечание. ЛД₅₀ – средняя летальная доза, ЭД₅₀ – средняя эффективная доза. I – высокотоксичные, II – токсичные, III – опасные для водных организмов, IV – нетоксичные (United Nations, 2011).

мг/л соответственно, что отвечает требованиям нетоксичных для водных организмов веществ. Следует отметить, что бактериальная деградация экотоксикантов является перспективным, эффективным и экологически безопасным направлением. Несмотря на то, что в отдельных исследованиях абиотическая деструкция приводила к быстрой и полной элиминации ДН, а *in silico* моделирование экологической опасности отдельных продуктов свидетельствовало о снижении их токсичности по сравнению с исходным фармполлютантом (González-Ortegón *et al.*, 2015), использование ферментативной активности микроорганизмов можно способствовать метаболизации ДН до простых и безопасных соединений.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что процесс актинобактериального разложения ДН происходит с разрывом связи C-N и раскрытием ароматического кольца и сопровождается образованием соединений, не обладающих выраженной токсичностью.

5.4. Биологическая активность продуктов биодеструкции диклофенака

С использованием компьютерной программы PASS Online спрогнозированы спектры биоактивности бензохинонимина (соединение 5). Результаты прогноза биоактивности данного метаболита представлены в таблице 19. Наибольшая вероятность обнаружения активности в программе принималась за 1. Согласно проведенному PASS-анализу, бензохинонимин является субстратом CYP2J, GST A (коэффициент вероятности более 0,9) и обладает широкими ингибирующими свойствами (коэффициент вероятности более 0,8), может проявлять достаточно высокую антисеборейную активность и использоваться в лечении ринита, а также фобических расстройств (коэффициент вероятности более 0,7). Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего более углубленного исследования биоактивности данного метаболита ДН.

Таблица 19 – Расчет прогнозируемой биологической активности бензохинонимина (соединение 5) с использованием программы PASS Online

P_a	P_i	Предполагаемая активность
0,929	0,003	Субстрат CYP2J2
0,925	0,003	Субстрат CYP2J
0,887	0,006	Ингибитор хлордекон редуктазы
0,837	0,009	Ингибитор глюконат 2-дегидрогеназы
0,807	0,011	Ингибитор экспрессии HIF1A
0,797	0,012	Антагонист рецепторов анафилатоксина
0,758	0,021	Ингибитор гликозилфосфатидилинозитол фосфолипазы
0,757	0,008	Ингибитор линолеатдиол синтетазы
0,744	0,017	Субстрат GST A
0,744	0,053	Ингибитор цитохром-с редуктазы
0,728	0,023	Ингибитор НАДФН-пероксидазы
0,728	0,064	Лечение фобических расстройств
0,719	0,003	Лечение ринита
0,707	0,036	Антисеборейное действие
0,703	0,054	Агонист целостности мембран

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Серьезная озабоченность присутствием фармполлютантов в открытых экосистемах появилась сравнительно недавно – только в начале 2000-х годов медикаментозное загрязнение окружающей среды начали рассматривать как новую экологическую проблему, несущую растущую реальную, уже не скрытую угрозу человеку и биоте в глобальном масштабе (aus der Beek *et al.*, 2016). Присутствие в окружающей среде фармацевтических веществ создает риск хронического токсического воздействия на живые организмы и дестабилизации природных экосистем (Richards *et al.*, 2011; Gamarra *et al.*, 2015; Pi *et al.*, 2017; Mezzelani *et al.*, 2018; Pusceddu *et al.*, 2018). Одним из наиболее распространенных в окружающей среде фармацевтических загрязнителей является ДН, широкодоступный и часто применяемый в мировой медицинской практике и в ветеринарии НПВС из группы производных фенилуксусной кислоты. Наличие двух атомов хлора в химической структуре, термодинамическая стабильность бензольного кольца обуславливают высокую устойчивость этого ароматического хлорированного азотсодержащего соединения к биоразложению, токсичность, способность к персистированию и, следовательно, опасность для окружающей среды (Oaks *et al.*, 2004; Асуña *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Mezzelani *et al.*, 2018; Sriuttha *et al.*, 2018; Yokota *et al.*, 2018).

Физико-химические способы борьбы с фармацевтическим загрязнением не эффективны и экологически не безопасны, в связи с этим активно разрабатываются биокатализаторы на основе отдельных штаммов микроорганизмов или микробных консорциумов, способных к эффективной детоксикации и выведению этих фармполлютантов из водных и сухопутных экосистем (Ivshina *et al.*, 2012; 2015; Moreira *et al.*, 2018; Palyzová *et al.*, 2018, 2019). В настоящее время наблюдается нарастание фундаментального интереса к изучению степени биодоступности и токсического воздействия фармполлютантов на природные микроорганизмы, играющие роль системы первичного реагирования и инициирующие адаптивные реакции.

Углубленное изучение механизмов и возможных путей детоксикации и биодegradации фармполлутантов и новые штаммы-биодеструкторы с детально изученными биохимическими и каталитическими характеристиками позволят создать предпосылки для реализации в обозримом будущем инновационных технических решений процессов доочистки сточных вод предприятий фармацевтического профиля, а также для разработки экологически безопасных биотехнологических способов обезвреживания и утилизации опасных фармацевтических отходов.

Среди микроорганизмов, участвующих в процессах самоочищения природных экосистем, важную экологическую роль в биологической детоксикации и деконтаминации почв и воды могут играть актинобактерии рода *Rhodococcus* – устойчивые обитатели контрастных экологических условий, в том числе антропогенно нагруженных и загрязненных территорий, обладающие высокой активностью оксидоредуктаз, богатыми адаптивными возможностями в отношении различных стабильных токсических соединений, а также высоким потенциалом для биоремедиации загрязненных объектов (Larkin *et al.*, 2006; Cappelletti *et al.*, 2019; Krivoruchko *et al.*, 2019; Kuyukina, Ivshina, 2019a).

В результате скрининга большого числа (104) штаммов, принадлежащих к роду *Rhodococcus* и поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegmc01.ru, реестровый номер Уникальной научной установки www.skr-rf.ru/usu/73559) отобран *R. ruber* ИЭГМ 346, характеризующийся высокой толерантностью (МПК 200 мг/л) к ДН. Данный штамм способен в течение 6 сут к полной деструкции экотоксичного ДН в концентрации 50 мкг/л при добавлении глюкозы (0,5 %) для обеспечения значительного роста клеток и прединкубации родококков в присутствии низкой (5 мкг/л) концентрации ДН для стимуляции многоцелевого оксигеназного комплекса. При этом процесс биодеструкции ДН катализируется ферментными комплексами,

локализованными в цитоплазме клеток, а также мембраносвязанными ферментами. В процессах начального окисления молекулы ДН задействованы цитохром Р450-зависимые монооксигеназы. Предложена кинетическая модель, позволяющая прогнозировать длительность и время окончания процесса биодеструкции ДН.

Влияние ДН на родококки сопровождается появлением морфологических аномалий клеток, что выражается в изменении их формы и размеров, параметров шероховатости клеточной поверхности. Кроме того, в присутствии ДН происходят значительная агрегация клеток, а также изменение ζ -потенциала, повышение гидрофобности и содержания общих клеточных липидов, изменение каталазной активности. Полученные данные рассматриваются в качестве механизмов адаптации родококков и, как следствие, повышения их устойчивости к токсическому воздействию фармполлютанта.

По данным ГХ-МС, ТСХ и ИК-спектроскопии, родококки разлагают ДН в присутствии глюкозы по трем путям метаболизации первичных гидроксиметаболитов (см. рисунок 33). Путь первый: 4'-ОН-ДН (соединение **3**) разлагается в результате разрыва связи С-N у второго (его) атома углерода в нехлорированном ароматическом кольце с образованием 4-амино-3,5-дихлорфенола (соединение **6**) и фенилуксусной кислоты (соединение **7**). Фенилуксусная кислота (соединение **7**) гидроксيليруется в положениях 2 и 5 ароматического кольца до гомогентизиновой (2,5-дигидроксифенилуксусной) кислоты (соединение **10**), которая окисляется до 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусная кислоты (соединение **11**). В результате последующего окисления соединения **11** разрывается кольцо хинона в положении 5–6 с образованием фумарилацетоуксусной кислоты (соединение **12**), которая гидролизует с образованием ацетоуксусной (соединение **13**) и фумаровой кислот (соединение **14**). Второй путь: 5-ОН-ДН (соединение **4**) в результате разрыва связи С-N у второго (его) атома углерода в нехлорированном ароматическом кольце разрушается с образованием 5-амино-4,6-дихлорбензол-1,2-диола

(соединение **8**) и 3-гидроксифенилуксусной кислоты (соединение **9**). Соединение **9** окисляется с образованием гомогентизиновой кислоты (соединение **10**), которая преобразуется далее до 2-(*p*-бензохинон-2)-уксусной кислоты (соединение **11**). Соединение **11** претерпевает последующие превращения по первому пути с образованием ацетоуксусной (соединение **13**) и фумаровой кислот (соединение **14**). Третий путь: 5-ОН-ДН (соединение **4**) окисляется с образованием бензохинонимина (соединение **5**), который гидроксيليруется с образованием дигидроксипроизводного (соединение **16**). Азометиновая связь в соединении **16** гидролизуется с образованием соединения **8**, а также хинона (соединение **11**) при одновременном окислении структуры по второму атому углерода. Соединение **11** претерпевает вышеописанные изменения по первому пути.

Особо следует отметить два события: разрыв связи C-N в структуре ДН с образованием фенилуксусной кислоты и раскрытие хинонового цикла с образованием фумарилацетоуксусной кислоты и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной и фумаровой кислот, которые могут считаться продуктами детоксикации ДН. По данным *in silico* анализа экотоксичности, проведенного с использованием компьютеризированной системы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationships), и *in vivo* теста фитотоксичности в отношении овса посевного, продукты разложения ДН не обладают выраженной токсичностью и не являются опасными для экосистем.

С использованием программы PASS Online (Prediction of Activity Spectra of Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>) проведен анализ биопотенциала отдельных метаболитов процесса биоконверсии ДН с использованием родококков. Установлено, что соединение **5** является субстратом CYP2J, GST A (коэффициент вероятности более 0,9) и обладает широкими ингибирующими свойствами (коэффициент вероятности более 0,8), может проявлять достаточно высокую антисеборейную активность и использоваться в лечении ринита, а также фобических расстройств (коэффициент вероятности более 0,7). Полученные

результаты указывают на перспективность дальнейшего более углубленного исследования биоактивности данного метаболита ДН.

Из выявленных 16 метаболитов 4 (4'-ОН-ДН, 5-ОН-ДН и два соединения бензохинониминной структуры) аналогичны таковым, обнаруженным ранее при изучении метаболизма ДН (1,7 и 34 мкМ) у альфапротеобактерий *Labrys portucalensis* F11 (Moreira *et al.*, 2018), и 2 метаболита (4'-ОН-ДН и 5-ОН-ДН) аналогичны полученным ранее с использованием Грам-положительных бактерий *Actinoplanes* (Osorio-Lozada *et al.*, 2008). Следует отметить, что во всех обнаруженных ранее метаболитах сохранялась связь С-N при втором атоме углерода в нехлорированном ароматическом кольце ДН. При этом отсутствовали сведения, подтверждающие факт раскрытия ароматического цикла в структуре образующихся соединений.

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

Поскольку *R. ruber* ИЭГМ 346 конвертирует ДН с образованием большого количества метаболитов, которые сравнительно легко детектировать, выделять и идентифицировать, а также обнаруживает сходство с метаболизмом ДН у млекопитающих, данный штамм может быть использован в качестве бактериальной модели, альтернативной модельным системам млекопитающих (Asha, Vidyavathi, 2009), для изучения метаболизма полициклических ароматических фармсоединений и синтеза их метаболитов. К тому же родококки имеют высокий уровень экспрессии ферментов P450 (Ivshina *et al.*, 2017), которые участвуют в метаболизме лекарств посредством изменения функциональных групп исходной молекулы.

ВЫВОДЫ

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

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 4'-ОН-ДН – 4'-гидроксидиклофенак
- 5-ОН-ДН – 5-гидроксидиклофенак
- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия
- ДН – диклофенак натрия
- ЕС – Европейский союз
- ИК – инфракрасный
- КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- ИЭГМ – Институт экологии и генетики микроорганизмов
- ЛД₅₀ – средняя летальная доза
- МПБ – мясопептонный бульон
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- НПВС – нестероидные противовоспалительные средства
- ОП – оптическая плотность
- ПАУ – полиароматические углеводороды
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ЦОГ – циклооксигеназа
- ЭД₅₀ – средняя эффективная доза
- INT – йодонитротетразолия хлорид
- CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- CYP – Цитохром P450-зависимая монооксигеназа
- ECOSAR – Ecological Structure Activity Relationships

EPA – Environmental Protection Agency

EPI – Estimation Programs Interface

GST – Glutathione S-transferase

HIF – Hypoxia-Inducible Factor

MDR – Multidrug Resistance

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances

SAT – Salt Aggregation Test

WDCM – World Data Centre for Microorganisms

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баренбойм, Г.М. Загрязнение поверхностных и сточных вод лекарственными препаратами / Г.М. Баренбойм, М.А. Чиганова // Вода: химия и экология. – 2012. – № 10. – С. 40–46.
2. Баренбойм, Г.М. Особенности загрязнения поверхностных водных объектов компонентами лекарственных средств / Г.М. Баренбойм, М.А. Чиганова, И.В. Березовская // Водное хозяйство России. – 2014. – Т. 3. – С. 131–141.
3. Вентцель, Е.С. Теория случайных процессов и ее инженерные приложения / Е.С. Вентцель, Л.А. Овчаров. – М.: Наука, 1991. – 384 с.
4. Веслополова, Е.М. Микрометод определения численности колонеобразующих единиц микроорганизмов / Е.М. Веслополова // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 2. – С. 279–284.
5. Гмурман, Е.В. Теория вероятностей и математическая статистика / Е.В. Гмурман // М.: Высшая школа, 1997. – 479 с.
6. Гоголева, О.А. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Гоголева Ольга Александровна. – Оренбург, 2012. – 147 с.
7. Данилов, А.Б. Диклофенак в лечении болевых синдромов / А.Б. Данилов // Лечащий врач. – 2009. – № 5. – С. 58–63.
8. Демаков, В.А. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты / В.А. Демаков, Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов // Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 30–45.
9. Елькин, А.А. Биокаталитическое окисление тиоанизола свободными и иммобилизованными клетками родококков: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Елькин Андрей Анатольевич. – Пермь, 2011. – 121 с.
10. Ефременко, Е.Н. Иммобилизованные клетки в биокатализаторах и биопленках: свойства и общие закономерности их изменения / Е.Н. Ефременко // Иммобилизованные клетки: Биокатализаторы и процессы / Под ред. Ефременко Е.Н. – М.: РИОР, 2018. – С. 17–61.

11. Жураховская, Д.В. Маркетинговый анализ фармацевтического рынка нестероидных противовоспалительных препаратов на региональном уровне / Д.В. Жураховская, Е.Е. Лоскутова, И.А. Виноградова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 1–8.
12. Ившина, И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: Иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 / Ившина Ирина Борисовна. – Пермь, 1997. – 197 с.
13. Ившина, И.Б. Большой практикум “Микробиология”: Учебное пособие / И.Б. Ившина. – М.: Проспект Науки, 2014. – 112 с.
14. Ившина, И.Б. Пропанокисляющие родококки / И.Б. Ившина, Р.А. Пшеничнов, А.А. Оборин. – Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. – 123 с.
15. Коршунова, И.О. Влияние органических растворителей на морфофункциональные и наномеханические свойства родококков: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Коршунова Ирина Олеговна. – 2016. – 128 с.
16. Криворучко, А.В. Адсорбционная иммобилизация клеток алканотрофных родококков: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Криворучко Анастасия Владимировна. – Пермь, 2008. – 174 с.
17. Кылосова, Т.И. Энантиселективное окисление органических сульфидов с использованием актинобактерий рода *Gordonia*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Кылосова Татьяна Ивановна. – Пермь, 2016. – 137 с.
18. Методические рекомендации: Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 15 с.
19. Мухутдинова, А.Н. Биодеструкция дротаверина гидрохлорида актинобактериями рода *Rhodococcus*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Мухутдинова Анна Наилевна. – Пермь, 2015. – 126 с.
20. Олейникова, Т.А. Анализ тенденций развития фармацевтического рынка нестероидных противовоспалительных препаратов в России / Т.А. Олейникова, Д.Н. Пожидаева // Ремедиум. – 2018. – № 5. – С. 14–20.

21. Омарова, Е.О. Иммобилизация бактерий на полимерных матрицах для деградации нефти и нефтепродуктов / Е.О. Омарова [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2012. – № 1. – С. 28–35.
22. Плотников, А.Н. Идентификация продуктов биологической деструкции кодеина фосфата методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии / А.Н. Плотников [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 1–10.
23. Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/> [06.06.2019].
24. Русских, Я.В. Лекарственные соединения в водных объектах Северо-Запада России / Я.В. Русских [и др.] // Региональная экология. – 2014. – Т. 1–2, № 35. – С. 77–83.
25. Самонин, В.В. Изучение закономерностей адсорбции бактериальных клеток на пористых носителях / В.В. Самонин, Е.Е. Еликова // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 6. – Р. 810–816.
26. Селянинов, А.А. Время завершения кинетически моделируемых биомеханических процессов / А.А. Селянинов, А.А. Баранова, Е.В. Вихарева // Российский журнал биомеханики. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 368–377.
27. Селянинов, А.А. Стохастический анализ повторяемости процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида / А.А. Селянинов [и др.] // Российский журнал биомеханики. – 2013. – Т. 17, № 1. – С. 41–54.
28. Серебренникова, М.К. Биodeградация нефтяных углеводородов иммобилизованными родококками в колоночном биореакторе: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Серебренникова Марина Константиновна. – Пермь, 2014. – 159 с.
29. Черемных, К.М. Биодеструкция дегидроабиеитиновой кислоты актинобактериями рода *Rhodococcus*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Черемных Ксения Михайловна. – Пермь, 2018. – 133 с.
30. Асуña, V. Balancing the health benefits and environmental risks of

pharmaceuticals: Diclofenac as an example / V. Acuña [*et al.*] // *Environment International*. – 2015. – V. 85. – P. 327–333.

31. Agunbiade, F.O. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa / F.O. Agunbiade, B. Moodley // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2016. – V. 35, N. 1. – P. 36–46.

32. Aissaoui, S. Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 isolated from activated sludge / S. Aissaoui [*et al.*] // *Current Microbiology*. – 2017a. – V. 74, N. 3. – P. 381–388.

33. Aissaoui, S. Toxicity assessment of diclofenac and its biodegradation metabolites toward mice / S. Aissaoui [*et al.*] // *Toxicology and Environmental Health Sciences*. – 2017b. – V. 9, N. 5. – P. 284–290.

34. Ajima, M.N.O. Chronic diclofenac (DCF) exposure alters both enzymatic and haematological profile of African catfish, *Clarias gariepinus* / M.N.O. Ajima [*et al.*] // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2015. – V. 38, N. 4. – P. 383–390.

35. Ali, A.M. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in effluent-dominated Saudi Arabian coastal waters of the Red Sea / A.M. Ali [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2017. – V. 175. – P. 505–513.

36. Alkimin, G.D. Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba* / G.D. Alkimin [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2019. – V. 657. – P. 926–937.

37. Alsop, D. Waterborne pharmaceutical uptake and toxicity is modified by pH and dissolved organic carbon in zebrafish / D. Alsop, J.Y. Wilson // *Aquatic Toxicology*. – 2019. – V. 210. – P. 11–18.

38. Altman, R. Advances in NSAID development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology / R. Altman [*et al.*] // *Drugs*. – 2015. – V. 75, N. 8. – P. 859–877.

39. Alygizakis, N.A. Occurrence and spatial distribution of 158

pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater / N.A. Alygizakis [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2016. – V. 541. – P. 1097–1105.

40. Apriceno, A. A new laccase-mediator system facing the biodegradation challenge: Insight into the NSAIDs removal / A. Apriceno [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2019. – V. 215. – P. 535–542.

41. Aracagök, Y.D. Biodegradation of diclofenac with fungal strains / Y.D. Aracagök, H. Göker, N. Cihangir // *Archives of Environmental Protection*. – 2018. – V. 44, N. 1. – P. 55–62.

42. Arakha, M. The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticle / M. Arakha [*et al.*] // *Scientific Reports*. – 2015. – V. 5. – P. 1–10.

43. Asha, S. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review / S. Asha, M. Vidyavathi // *Biotechnology Advances*. – 2009. – V. 27, N. 1. – P. 16–29.

44. aus der Beek, T. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives / T. aus der Beek [*et al.*] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2016. – V. 35, N. 4. – P. 823–835.

45. Aycan, İ.Ö. Diclofenac induced gastrointestinal and renal toxicity is alleviated by thymoquinone treatment / İ.Ö. Aycan [*et al.*] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2018. – V. 118. – P. 795–804.

46. Baena-Nogueras, R.M. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation / R.M. Baena-Nogueras, E. González-Mazo, P.A. Lara-Martín // *Science of the Total Environment*. – 2017. – V. 590–591. – P. 643–654.

47. Bácsi, I. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages / I. Bácsi [*et al.*] // *Environmental Pollution*. – 2016. – V. 212. – P. 508–518.

48. Balbi, T. Diclofenac affects early embryo development in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* / T. Balbi [*et al.*] // *Science of the Total*

Environment. – 2018. – V. 642. – P. 601–609.

49. Barra Caracciolo, A. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review / A. Barra Caracciolo, E. Topp, P. Grenni // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2015. – V. 106. – P. 25–36.

50. Bashaar, M. Disposal practices of unused and expired pharmaceuticals among general public in Kabul. / M. Bashaar [*et al.*] // *BMC Public Health*. – 2017. – V. 17, N. 1. – P. 1–8.

51. Bayen, S. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: Influence of hydrodynamics and physical–chemical properties / S. Bayen [*et al.*] // *Environmental Pollution*. – 2013. – V. 182. – P. 1–8.

52. Benotti, M.J. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water / M.J. Benotti [*et al.*] // *Environmental Science and Technology*. – 2009. – V. 43, N. 3. – P. 597–603.

53. Bessa, V.S. Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge / V.S. Bessa [*et al.*] // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2017. – V. 120. – P. 135–142.

54. Bessone, F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? / F. Bessone // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – V. 16, N. 45. – P. 5651–5661.

55. Biel-Maeso, M. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain) / M. Biel-Maeso [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2018. – V. 612. – P. 649–659.

56. Bo, L. Biodegradation of trace pharmaceutical substances in wastewater by a membrane bioreactor / L. Bo, T. Urase, X. Wang // *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*. – 2009. – V. 3, N. 2. – P. 236–240.

57. Boisseaux, P. Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea*

stagnalis under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: Diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A / P. Boisseaux [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2017. – V. 139. – P. 358–366.

58. Borràs, E. Soil colonization by *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic materials: Substrate selection and naproxen degradation / E. Borràs [et al.] // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2011. – V. 65, N. 6. – P. 846–852.

59. Borgmann, U. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations / U. Borgmann [et al.] // *Chemosphere*. – 2007. – V. 66, N. 7. – P. 1278–1283.

60. Botero-Coy, A.M. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater / A.M. Botero-Coy [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2018. – V. 642. – P. 842–853.

61. Bouchez-Naïtali, M. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: The importance of cell flocculation / M. Bouchez-Naïtali [et al.] // *Microbiology*. – 2001. – V. 147, N. 9. – P. 2537–2543.

62. Bouju, H. Elucidation of biotransformation of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac during biological wastewater treatment / H. Bouju [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2016. – V. 301. – P. 443–452.

63. Bragança, I. Cometabolic degradation of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals by a pentane enrichment culture / I. Bragança [et al.] // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2016. – V. 227, N. 7. – P. 1–11.

64. Cappelletti, M. Genomics of *Rhodococcus* / M. Cappelletti [et al.] // *Biology of Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 23–60.

65. Carmona, E. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water / E. Carmona, V. Andreu, Y. Picó // *Science of the Total Environment*. – 2014. – V. 484. – P. 53–63.

66. Carpova, N. V. Transformation of Δ^4 -3-ketosteroids by free and immobilized cells of *Rhodococcus erythropolis* actinobacterium / N. V. Carpova [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2011. – V. 47, N. 4. – P. 386–

392.

67. Carter, L.J. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-plant systems / L.J. Carter [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – V. 62, N. 4. – P. 816–825.

68. Casas, M.E. Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by staged Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR) / M.E. Casas [*et al.*] // *Water Research*. – 2015. – V. 83. – P. 293–302.

69. List of species and strains of IEGM Collection [Электронный ресурс] / IEGM Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms // Режим доступа: <http://www.iegmcollection.ru/strains/index.html> [05.07.2019].

70. Česen, M. The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river / M. Česen [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2019. – V. 650. – P. 2446–2453.

71. Chen, G. Ecotoxicogenomic assessment of diclofenac toxicity in soil / G. Chen [*et al.*] // *Environmental Pollution*. – 2015. – V. 199. – P. 253–260.

72. Chen, S. Thermophilic biodesulfurization and its application in oil desulfurization / S. Chen [*et al.*] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018a. – V. 102, N. 21. – P. 9089–9103.

73. Chen, Z. Intracellular metabolic changes of *Rhodococcus* sp. LH during the biodegradation of diesel oil / Z. Chen [*et al.*] // *Marine Biotechnology*. – 2018b. – V. 20, N. 6. – P. 803–812.

74. Cheremnykh, K.M. Bioconversion of ecotoxic dehydroabietic acid using *Rhodococcus* actinobacteria / K.M. Cheremnykh [*et al.*] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2018. – V. 346. – P. 103–112.

75. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100 // Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). – Wayne, PA. – 2019. – 250 p.

76. Collard, H.J. Toxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) and two freshwater invertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*)

after chronic exposure to mefenamic acid / H.J. Collard [*et al.*] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2013. – V. 94. – P. 80–86.

77. Comeau, F. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada / F. Comeau [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2008. – V. 396, N. 2–3. – P. 132–146.

78. European Commission. Implementation Decision 2015/495 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 // *Official Journal of the European Union*. – 2015. – P. 40–42.

79. Corcoll, N. Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents / N. Corcoll [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2014. – V. 112. – P. 185–193.

80. Cunha, S.C. Mussels as bioindicators of diclofenac contamination in coastal environments / S.C. Cunha, A. Pena, J.O. Fernandes // *Environmental Pollution*. – 2017. – V. 225. – P. 354–360.

81. Cycoń, M. Variable effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on selected biochemical processes mediated by soil microorganisms / M. Cycoń [*et al.*] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 1–19.

82. Czech, B. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process / B. Czech, I. Joško, P. Oleszczuk // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2014. – V. 104, N. 1. – P. 247–253.

83. Damsten, M.C. Application of drug metabolising mutants of cytochrome P450 BM3 (CYP102A1) as biocatalysts for the generation of reactive metabolites / M.C. Damsten [*et al.*] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008. – V. 171, N. 1. – P. 96–107.

84. Dasenaki, M.E. Multianalyte method for the determination of

pharmaceuticals in wastewater samples using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M.E. Dasenaki, N.S. Thomaidis // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2015. – V. 407, N. 15. – P. 4229–4245.

85. Dastidar, S.G. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis / S.G. Dastidar [*et al.*] // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2000. – V. 14, N. 3. – P. 249–251.

86. Dawas-Massalha, A. Co-metabolic oxidation of pharmaceutical compounds by a nitrifying bacterial enrichment / A. Dawas-Massalha [*et al.*] // Bioresource Technology. – 2014. – V. 167. – P. 336–342.

87. de Carvalho, C.C.C.R. Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents / C.C.C.R. de Carvalho // Biology of *Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. – P. 109–131.

88. de Carvalho, C.C.C.R. Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents / C.C.C.R. de Carvalho // Biology of *Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 103–135.

89. de Carvalho, C.C.C.R. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* / C.C.C.R. de Carvalho [*et al.*] // Frontiers in Physiology. – 2014. – V. 5. – P. 1–13.

90. De Felice, B. Gene expression profiling in zebrafish embryos exposed to diclofenac, an environmental toxicant / B. De Felice, L. Copia, M. Guida // Molecular Biology Reports. – 2012. – V. 39, N. 3. – P. 2119–2128.

91. de García, S.O. Dose-response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products / S.O. de García, P.A. García-Encina, R. Irusta-Mata // Ecotoxicology. – 2016. – V. 25, N. 1. – P. 141–162.

92. De Oliveira, L.L.D. Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna* / L.L.D. De Oliveira [*et al.*] // Drug and Chemical Toxicology. – 2015. – V. 39, N. 1. – P. 13–21.

93. de Wilt, A. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams / A. de Wilt [*et al.*] // Journal of

Hazardous Materials. – 2016. – V. 304. – P. 84–92.

94. Díaz, M.P. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers / M.P. Díaz [*et al.*] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2002. – V. 79, N. 2. – P. 145–153.

95. Di Canito, A. Genome-based analysis for the identification of genes involved in o-xylene degradation in *Rhodococcus opacus* R7 / A. Di Canito [*et al.*] // *BMC Genomics*. – 2018. – V. 19. – P. 1–17.

96. Di Nica, V. Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: Experimental results for single compounds and considerations of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms / V. Di Nica, S. Villa, A. Finizio // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2017. – V. 36, N. 3. – P. 807–814.

97. Diniz, M.S. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*) / M.S. Diniz [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2015. – V. 505. – P. 282–289.

98. Domaradzka, D. Toxicity of diclofenac and its biotransformation by *Raoultella* sp. DD4 / D. Domaradzka [*et al.*] // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2016. – V. 25, N. 5. – P. 2211–2216.

99. Domaradzka, D. Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs / D. Domaradzka, U. Guzik, D. Wojcieszńska // *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. – 2015. – V. 14, N. 2. – P. 229–239.

100. Dutta, N.K. Antimycobacterial activity of the anti-inflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin / N.K. Dutta [*et al.*] // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2004. – V. 35, N. 4. – P. 316–323.

101. Effenberger, F. Preparation of (*S*)-naproxen by enantioselective hydrolysis of racemic naproxen amide with resting cells of *Rhodococcus erythropolis* MP50 in organic solvents / F. Effenberger, B.W. Graef, S. Oßwald // *Tetrahedron Asymmetry*. – 1997. – V. 8, N. 16. – P. 2749–2755.

102. Ericson, H. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels / H. Ericson, G. Thorsén, L. Kumblad // *Aquatic Toxicology*. – 2010. – V. 99, N. 2. – P. 223–231.

103. Escapa, C. Zebrafish embryo bioassays for a comprehensive evaluation of microalgae efficiency in the removal of diclofenac from water / C. Escapa [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2018. – V. 640–641. – P. 1024–1033.

104. Evangelista, S. The recalcitrance of clofibric acid to microbial degradation / S. Evangelista, V. Yargeau, D.G. Cooper // *WIT Transactions on Ecology and the Environment*. – 2008. – V. 111. – P. 273–278.

105. Facey, S.J. Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms / S.J. Facey [et al.] // *Environmental Technology and Innovation*. – 2018. – V. 10. – P. 55–61.

106. Fatta-Kassinos, D. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research / D. Fatta-Kassinos, S. Meric, A. Nikolaou // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – V. 399, N. 1. – P. 251–275.

107. Fekete-Kertész, I. *Tetrahymena pyriformis* phagocytic activity test for rapid toxicity assessment of aquatic micropollutants / I. Fekete-Kertész [et al.] // *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. – 2018. – V. 62, N. 2. – P. 167–174.

108. Félix-Cañedo, T.E. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources / T.E. Félix-Cañedo, J.C. Durán-Álvarez, B. Jiménez-Cisneros // *Science of the Total Environment*. – 2013. – V. 454–455. – P. 109–118.

109. Ferrari, B. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac / B. Ferrari [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2003. – V. 55, N. 3. – P. 359–370.

110. Ferrer, I. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in

water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry / I. Ferrer, E.M. Thurman // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – V. 1259. – P. 148–157.

111. Fischer, K. Photocatalytic degradation and toxicity evaluation of diclofenac by nanotubular titanium dioxide-PES membrane in a static and continuous setup / K. Fischer [*et al.*] // *RSC Advances*. – 2015. – V. 5, N. 21. – P. 16340–16348.

112. Flippin, J.L. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes* / J.L. Flippin, D. Huggett, C.M. Foran // *Aquatic Toxicology*. – 2007. – V. 81, N. 1. – P. 73–78.

113. Gamarra, J.S. Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: A public health perspective / J.S. Gamarra [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2015. – V. 120. – P. 462–469.

114. Gao, X. Comparative study of the toxicity between three non-steroidal anti-inflammatory drugs and their UV/Na₂S₂O₈ degradation products on *Cyprinus carpio* / X. Gao [*et al.*] // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – P. 1–11.

115. Garcia, A.C.F.S. Fluoranthene biodegradation by *Serratia* sp. AC-11 immobilized into chitosan beads / A.C.F.S. Garcia [*et al.*] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2019. – V. 188, N. 4. – P. 1168–1184.

116. Gauthier, H. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism / H. Gauthier, V. Yargeau, D.G. Cooper // *Science of the Total Environment*. – 2010. – V. 408, N. 7. – P. 1701–1706.

117. Genus *Rhodococcus* [Электронный ресурс] / List of prokaryotic names with standing in nomenclature: LPSN // Режим доступа: <http://www.bacterio.net/rhodococcus.html> [10.09.2019].

118. Geret, F. Differential protein expression in *Corbicula fluminea* exposed to a mixture of pharmaceutical products / F. Geret [*et al.*] // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2010. – V. 157. – P. S46–S47.

119. Ghattas, A.-K. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment / A.-K. Ghattas [et al.] // *Water Research*. – 2017. – V. 116. – P. 268–295.
120. Gibson, K.J.C. Structural and functional features of *Rhodococcus ruber* lipoarabinomannan / K.J.C. Gibson [et al.] // *Microbiology*. – 2003. – V. 149, N. 6. – P. 1437–1445.
121. Gogoleva, O.A. Catalase activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria / O.A. Gogoleva, N.V. Nemtseva, O.V. Bukharin // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2012. – V. 48, N. 6. – P. 552–556.
122. Gómez-Oliván, L.M. Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyaella azteca* / L.M. Gómez-Oliván [et al.] // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2014. – V. 186, N. 11. – P. 7259–7271.
123. Gómez-Oliván, L.M. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna* / L.M. Gómez-Oliván [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. – 2014. – V. 164. – P. 21–26.
124. Gonda, S. Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L. / S. Gonda [et al.] // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2016. – V. 108. – P. 115–121.
125. González-Alonso, S. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region / S. González-Alonso [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2017. – V. 229. – P. 241–254.
126. González-González, E.D. Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) / E.D. González-González [et al.] // *Archives of Environmental Contamination and*

Toxicology. – 2014. – V. 67, N. 2. – P. 281–295.

127. González-Ortegón, E. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals on larval development of the estuarine shrimp *Palaemon longirostris* / E. González-Ortegón [et al.] // Science of the Total Environment. – 2015. – V. 540. – P. 260–266.

128. González-Pérez, D.M. Behaviour of the main nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a membrane bioreactor treating urban wastewater at high hydraulic- and sludge-retention time / D.M. González-Pérez, J.I. Pérez, M.A. Gómez // Journal of Hazardous Materials. – 2017. – V. 336. – P. 128–138.

129. Gonzalez-Rey, M. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis* / M. Gonzalez-Rey, M.J. Bebianno // Aquatic Toxicology. – 2014. – V. 148. – P. 221–230.

130. González, S. Biodegradation studies of selected priority acidic pesticides and diclofenac in different bioreactors / S. González [et al.] // Environmental Pollution. – 2006. – V. 144, N. 3. – P. 926–932.

131. Goordial, J. Cold adaptive traits revealed by comparative genomic analysis of the eurypsychrophile *Rhodococcus* sp. JG3 isolated from high elevation McMurdo Dry Valley permafrost, Antarctica / J. Goordial [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – V. 92, N. 2. – P. 1–11.

132. Goswami, L. Biological treatment of wastewater containing a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons using the oleaginous bacterium *Rhodococcus opacus* / L. Goswami [et al.] // Journal of Cleaner Production. – 2018. – V. 196. – P. 1282–1291.

133. Gröning, J. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate / J. Gröning [et al.] // Chemosphere. – 2007. – V. 69, N. 4. – P. 509–516.

134. Gu, Q. *Acinetobacter* sp. DW-1 immobilized on polyhedron hollow polypropylene balls and analysis of transcriptome and proteome of the bacterium during phenol biodegradation process / Q. Gu [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – P. 1–18.

135. Guengerich, F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. / F.P. Guengerich // *The AAPS journal*. – 2006. – V. 8, N. 1. – P. 101–111.
136. 1. Guevara, G. New insights into the genome of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4 / G. Guevara [et al.] // *BMC Genomics*. – 2019. – V. 20. – P. 1–21.
137. Gumbi, B.P. Detection and quantification of acidic drug residues in South African surface water using gas chromatography-mass spectrometry / B.P. Gumbi [et al.] // *Chemosphere*. – 2017. – V. 168. – P. 1042–1050.
138. Gundersen, C.B. Growth response of environmental bacteria under exposure to nitramines from CO₂-capture / C.B. Gundersen [et al.] // *International Journal of Greenhouse Gas Control*. – 2018. – V. 79. – P. 248–251.
139. Halder, S. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents / S. Halder [et al.] // *SpringerPlus*. – 2015. – V. 4. – P. 1–14.
140. Han, S. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa* / S. Han [et al.] // *Aquatic Toxicology*. – 2010. – V. 98, N. 3. – P. 256–264.
141. Hassan, I.Z. Could the environmental toxicity of diclofenac in vultures been predictable if preclinical testing methodology were applied? / I.Z. Hassan [et al.] // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2018. – V. 64. – P. 181–186.
142. Hata, T. Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation / T. Hata [et al.] // *Biodegradation*. – 2010. – V. 21, N. 5. – P. 681–689.
143. He, Y. Effects of dissolved organic matter and nitrification on biodegradation of pharmaceuticals in aerobic enrichment cultures / Y. He [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2018a. – V. 630. – P. 1335–1342.
144. He, Y. Fate and distribution of pharmaceutically active compounds in

mesocosm constructed wetlands / Y. He [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2018b. – V. 357. – P. 198–206.

145. HELCOM. BASE project 2012-2014: Pilot activity to identify sources and flow patterns of pharmaceuticals in St. Petersburg to the Baltic Sea // HELCOM. – 2014. – 121 p.

146. Helenkár, A. The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography-mass spectrometry / A. Helenkár [et al.] // Talanta. – 2010. – V. 82, N. 2. – P. 600–607.

147. Hernández, M.A. Central metabolism of species of the genus *Rhodococcus* / M.A. Hernández [et al.] // Biology of *Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 61–85.

148. Hom-Diaz, A. Performance of a microalgal photobioreactor treating toilet wastewater: Pharmaceutically active compound removal and biomass harvesting / A. Hom-Diaz [et al.] // Science of the Total Environment. – 2017. – V. 592. – P. 1–11.

149. Horie, Y. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium induces abnormal embryogenesis and delayed lethal effects in early life stage zebrafish (*Danio rerio*) / Y. Horie [et al.] // Journal of Applied Toxicology. – 2019. – V. 39, N. 4. – P. 622–629.

150. Huebner, M. Rapid analysis of diclofenac in freshwater and wastewater by a monoclonal antibody-based highly sensitive ELISA / M. Huebner [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2015. – V. 407, N. 29. – P. 8873–8882.

151. Huerta, B. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry / B. Huerta [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2013. – V. 1288. – P. 63–72.

152. Isidori, M. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products / M. Isidori [et al.] // Science of the Total Environment. – 2005. – V. 348, N. 1-3. – P. 93–101.

153. Ivshina, I.B. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochromus* IEGM 608 / I.B. Ivshina [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – V. 28, N. 10. – P. 2997–3006.
154. Ivshina, I.B. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by Alkanotrophic rhodococci / I.B. Ivshina [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology – 2006. – V. 42, N. 4. – P. 392–395.
155. Ivshina, I.B. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* / I.B. Ivshina [et al.] // Current Microbiology. – 2015. – V. 70, N. 3. – P. 307–314.
156. Ivshina, I.B. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, A.V. Krivoruchko // Microbial Resources / ed. I.B. Kurtböke. – London: Elsevier, 2017. – P. 121–148.
157. Iwabuchi, N. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochromus* / N. Iwabuchi [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – V. 66, N. 11. – P. 5073–5077.
158. Jewell, K.S. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm–activated sludge processes / K.S. Jewell [et al.] // Water Research. – 2016. – V. 105. – P. 559–567.
159. Ji, K. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish / K. Ji [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2013. – V. 254–255, N. 1. – P. 242–251.
160. Jia, X. *n*-Hexadecane and pyrene biodegradation and metabolization by *Rhodococcus* sp. T1 isolated from oil contaminated soil / X. Jia [et al.] // Chinese Journal of Chemical Engineering. – 2019. – V. 27, N. 2. – P. 411–417.
161. Jiang, C. Impact of selected non-steroidal anti-inflammatory pharmaceuticals on microbial community assembly and activity in sequencing batch reactors / C. Jiang [et al.] // PLOS One. – 2017. – V. 12. – P. 1–16.

162. Jing, R.-Y. Removal behavior of ibuprofen and diclofenac in different constructed wetlands / R.-Y. Jing [*et al.*] // *Huanjing Kexue*. – 2016. – V. 37, N. 7. – P. 2577–2585.
163. Jones, A.L. *Rhodococcus* / A.L. Jones, M. Goodfellow // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – 2015. – P. 1–50.
164. Jurado, A. Occurrence, fate and environmental risk assessment of the organic microcontaminants included in the Watch Lists set by EU Decisions 2015/495 and 2018/840 in the groundwater of Spain / A. Jurado, M. Walther, M.S. Díaz-Cruz // *Science of the Total Environment*. – 2019. – V. 663. – P. 285–296.
165. K'oreje, K.O. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya / K.O. K'oreje [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2016. – V. 149. – P. 238–244.
166. Kapelewska, J. Occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of emerging organic contaminants in leachates, groundwaters and wastewaters / J. Kapelewska [*et al.*] // *Microchemical Journal*. – 2018. – V. 137. – P. 292–301.
167. Karigar, C.S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review / C.S. Karigar, S.S. Rao // *Enzyme Research*. – 2011. – V. 2011. – P. 1–11.
168. Kasprzyk-Hordern, B. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK / B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy // *Water Research*. – 2008. – V. 42, N. 13. – P. 3498–3518.
169. Khan, A. Prevalence of selected pharmaceuticals in surface water receiving untreated sewage in northwest Pakistan / A. Khan [*et al.*] // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2018. – V. 190. – P. 1–10.
170. Khan, U. Human health relevance of pharmaceutically active compounds in drinking water / U. Khan, J. Nicell // *The AAPS Journal*. – 2015. – V. 17, N. 3. – P. 558–585.
171. Kim, D. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative

pathways / D. Kim [et al.] // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – V. 28, N. 7. – P. 1037–1051.

172. Kim, Y.U. Steroid 9 α -hydroxylation during testosterone degradation by resting *Rhodococcus equi* cells / Y.U. Kim [et al.] // Archiv der Pharmazie. – 2007. – V. 340, N. 4. – P. 209–214.

173. Kimura, T. Production of a pharmaceutical intermediate via biohydroxylation using whole cells of *Rhodococcus rubropertinctus* N82 / T. Kimura [et al.] // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2014. – V. 78, N. 10. – P. 1772–1776.

174. Klenk, J.M. The self-sufficient P450 RhF expressed in a whole cell system selectively catalyses the 5-hydroxylation of diclofenac / J.M. Klenk [et al.] // Biotechnology Journal. – 2017. – V. 12, N. 3. – P. 1–23.

175. Kłodzińska, E. Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation / E. Kłodzińska [et al.] // Electrophoresis. – 2010. – V. 31, N. 9. – P. 1590–1596.

176. Korshunova, I.O. The effect of organic solvents on the viability and morphofunctional properties of *Rhodococcus* / I.O. Korshunova [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2016. – V. 52, N. 1. – P. 43–50.

177. Kosjek, T. Metabolism studies of diclofenac and clofibrac acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry / T. Kosjek [et al.] // Journal of Hydrology. – 2009. – V. 372, N. 1-4. – P. 109–117.

178. Kosjek, T. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant / T. Kosjek, E. Heath, B. Kompare // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2007. – V. 387, N. 4. – P. 1379–1387.

179. Kot-Wasik, A. Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants / A. Kot-Wasik, A. Jakimska, M. Sliwka-Kaszynska // Environmental Monitoring and Assessment. – 2016. – V. 188. – P. 1–13.

180. Koumaki, E. Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory

drugs in river water/sediment systems / E. Koumaki, D. Mamais, C. Noutsopoulos // *Journal of Hazardous Materials*. – 2017. – V. 323. – P. 233–241.

181. Krivoruchko, A. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies / A. Krivoruchko, M. Kuyukina, I. Ivshina // *Catalysts*. – 2019. – V. 9. – P. 1–19.

182. Kruglova, A. Bacterial diversity and population shifts driven by spotlight wastewater micropollutants in low-temperature highly nitrifying activated sludge / A. Kruglova [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2017. – V. 605–606. – P. 291–299.

183. Kruglova, A. Biodegradation of ibuprofen, diclofenac and carbamazepine in nitrifying activated sludge under 12°C temperature conditions / A. Kruglova [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2014. – V. 499. – P. 394–401.

184. Kulakova, A.N. Plasmid pRTL1 controlling 1-chloroalkane degradation by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064 / A.N. Kulakova [et al.] // *Plasmid*. – 1995. – V. 33, N. 3. – P. 208–217.

185. Kuyukina, M.S. Assessment of bacterial resistance to organic solvents using a combined confocal laser scanning and atomic force microscopy (CLSM/AFM) / M.S. Kuyukina [et al.] // *Journal of Microbiological Methods*. – 2014. – V. 107. – P. 23–29.

186. Kuyukina, M.S. Effect of cell lipid composition on the formation of nonspecific antibiotic resistance in alkanotrophic rhodococci / M.S. Kuyukina [et al.] // *Microbiology*. – 2000. – V. 69, N. 1. – P. 51–57.

187. Kuyukina, M.S. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant / M.S. Kuyukina [et al.] // *Journal of Microbiological Methods*. – 2006. – V. 65, N. 3. – P. 596–603.

188. Kuyukina, M.S. Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina // *Biology of Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019a. – P. 231–270.

189. Kuyukina, M.S. Production of trehalolipid biosurfactants by

Rhodococcus / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina // *Biology of Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019b. – P. 271–298.

190. Laczi, K. Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons / K. Laczi [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – V. 99, N. 22. – P. 9745–9759.

191. Lai, W.W.P. Occurrence of pharmaceuticals and perfluorinated compounds and evaluation of the availability of reclaimed water in Kinmen / W.W.P. Lai [et al.] // *Emerging Contaminants*. – 2016. – V. 2, N. 3. – P. 135–144.

192. Landa, P. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* roots to naproxen and praziquantel / P. Landa [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – V. 166. – P. 301–310.

193. Langenhoff, A. Microbial removal of the pharmaceutical compounds ibuprofen and diclofenac from wastewater / A. Langenhoff [et al.] // *BioMed Research International*. – 2013. – V. 2013. – P. 1–9.

194. Larcher, S. Biodegradation of 17 α -ethinylestradiol by heterotrophic bacteria / S. Larcher, V. Yargeau // *Environmental Pollution*. – 2013. – V. 173. – P. 17–22.

195. Larcher, S. Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria / S. Larcher, V. Yargeau // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – V. 91, N. 1. – P. 211–218.

196. Larkin, M.J. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: Biochemistry, physiology, and genetic adaptation / M.J. Larkin, L.A. Kulakov, C.C.R. Allen // *Advances in Applied Microbiology*. – 2006. – V. 59, N. 6. – P. 1–29.

197. Larkin, M.J. Genomes and plasmids in *Rhodococcus* / M.J. Larkin, L.A. Kulakov, C.C.R. Allen // *Biology of Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. – P. 73–90.

198. Lawrence, J.R. Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac / J.R. Lawrence [et al.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2007. – V. 26, N. 4. – P. 573–

582.

199. Lee, H.J. Enzymatic and microbial transformation assays for the evaluation of the environmental fate of diclofenac and its metabolites / H.J. Lee [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2012. – V. 87, N. 8. – P. 969–974.

200. Lee, S.D. *Rhodococcus subtropicus* sp. nov., a new actinobacterium isolated from a cave / S.D. Lee, Y.-J. Kim, I.S. Kim // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2019. – P. 1–10.

201. Letsinger, S. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals in UK estuaries / S. Letsinger [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2019. – V. 678. – P. 74–84.

202. Li, S. The desulfurization pathway in *Rhodococcus* / S. Li, T. Ma // *Biology of Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 203–229.

203. Li, X. Discovery of potential pathways for biological conversion of poplar wood into lipids by co-fermentation of *Rhodococci* strains / X. Li [*et al.*] // *Biotechnology for Biofuels*. – 2019. – V. 12, N. 1. – P. 1–16.

204. Lindahl, M. A new test based on “salting out” to measure relative hydrophobicity of bacterial cells / M. Lindahl [*et al.*] // *BBA – General Subjects*. – 1981. – V. 677, N. 3–4. – P. 471–476.

205. Lindholm-Lehto, P.C. Widespread occurrence and seasonal variation of pharmaceuticals in surface waters and municipal wastewater treatment plants in central Finland / P.C. Lindholm-Lehto [*et al.*] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – V. 23, N. 8. – P. 7985–7997.

206. Liu, J. Biocatalytic synthesis of highly enantiopure 1,4-benzodioxane-2-carboxylic acid and amide / J. Liu [*et al.*] // *Chinese Journal of Chemistry*. – 2006. – V. 24, N. 11. – P. 1665–1668.

207. Liu, Y. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna* / Y. Liu [*et al.*] // *Aquatic Toxicology*. – 2017. – V. 183. – P. 104–113.

208. Lloret, L. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and

estrogens / L. Lloret [*et al.*] // *Biochemical Engineering Journal*. – 2010. – V. 51, N. 3. – P. 124–131.

209. Lolić, A. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk / A. Lolić [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2015. – V. 508. – P. 240–250.

210. Lonappan, L. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity – A review / L. Lonappan [*et al.*] // *Environment International*. – 2016a. – V. 96. – P. 127–138.

211. Lonappan, L. Diclofenac in municipal wastewater treatment plant: quantification using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry approach in comparison with an established liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method / L. Lonappan [*et al.*] // *Journal of Chromatography A*. – 2016b. – V. 1433. – P. 106–113.

212. Lu, H. Degradation pathways and kinetics of anthraquinone compounds along with nitrate removal by a newly isolated *Rhodococcus pyridinivorans* GF3 under aerobic conditions / H. Lu [*et al.*] // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 285. – P. 1–8.

213. Lu, X. Degradation of diclofenac by UV-activated persulfate process: Kinetic studies, degradation pathways and toxicity assessments / X. Lu [*et al.*] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2017. – V. 141. – P. 139–147.

214. Ma, R. Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk / R. Ma [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2016. – V. 557–558. – P. 268–275.

215. Madikizela, L.M. Determination of ibuprofen, naproxen and diclofenac in aqueous samples using a multi-template molecularly imprinted polymer as selective adsorbent for solid-phase extraction / L.M. Madikizela, L. Chimuka // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2016. – V. 128. – P. 210–215.

216. Maia, A.S. Enantioselective degradation of ofloxacin and levofloxacin by the bacterial strains *Labrys portucalensis* F11 and *Rhodococcus* sp. FP1 / A.S. Maia, M.E. Tiritan, P.M.L. Castro // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – V. 155. – P. 144–151.
217. Marchlewicz, A. Exploring the degradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): The new pathway and factors affecting degradation / A. Marchlewicz [et al.] // *Molecules*. – 2017. – V. 22. – P. 1–17.
218. Marco-Urrea, E. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR / E. Marco-Urrea [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2010. – V. 176, N. 1–3. – P. 836–842.
219. Márquez Brazón, E. Photodegradation of pharmaceutical persistent pollutants using hydroxyapatite-based materials / E. Márquez Brazón [et al.] // *Journal of Environmental Management*. – 2016. – V. 182. – P. 486–495.
220. Marsik, P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic / P. Marsik [et al.] // *Chemosphere*. – 2017. – V. 171. – P. 97–105.
221. Márta, Z. Simultaneous determination of ten nonsteroidal anti-inflammatory drugs from drinking water, surface water and wastewater using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system / Z. Márta [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2018. – V. 160. – P. 99–108.
222. Maruya, K.A. Multimedia screening of contaminants of emerging concern (CECS) in coastal urban watersheds in southern California (USA) / K.A. Maruya [et al.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2016. – V. 35, N. 8. – P. 1986–1994.
223. Mathias, F.T. Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen* / F.T. Mathias [et al.] // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2018. – V. 59. – P. 105–113.
224. Mattos-Guaraldi, A.L. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by

different methods / A.L. Mattos-Guaraldi, L.C.D. Formiga, A.F.B. Andrade // *Current Microbiology*. – 1999. – V. 38, N. 1. – P. 37–42.

225. McEneff, G. A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves / G. McEneff [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2014. – V. 476–477. – P. 317–326.

226. McLeod, M.P. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse / M.P. McLeod [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103, N. 42. – P. 15582–15587.

227. McRae, N.K. Acute exposure to an environmentally relevant concentration of diclofenac elicits oxidative stress in the culturally important galaxiid fish *Galaxias maculatus* / N.K. McRae [et al.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2018. – V. 37. – P. 224–235.

228. Mehinto, A.C. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / A.C. Mehinto, E.M. Hill, C.R. Tyler // *Environmental Science and Technology*. – 2010. – V. 44, N. 6. – P. 2176–2182.

229. Mezzelani, M. Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, ibuprofen and ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes / M. Mezzelani [et al.] // *Chemosphere*. – 2018. – V. 198. – P. 238–248.

230. Mir-Tutusaus, J.A. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review / J.A. Mir-Tutusaus [et al.] // *Water Research*. – 2018. – V. 138. – P. 137–151.

231. Mohd Zanuri, N.B. Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra[®]) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates / N.B. Mohd Zanuri, M.G. Bentley, G.S. Caldwell // *Marine Environmental Research*. – 2017. – V. 127. – P. 126–136.

232. Moreau, M. A baseline assessment of emerging organic contaminants in New Zealand groundwater / M. Moreau [et al.] // Science of the Total Environment. – 2019. – V. 686. – P. 425–439.

233. Moreira, I.S. Biodegradation of diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11 / I.S. Moreira [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2018. – V. 152. – P. 104–113.

234. Muter, O. Removal of pharmaceuticals from municipal wastewaters at laboratory scale by treatment with activated sludge and biostimulation / O. Muter [et al.] // Science of the Total Environment. – 2017. – V. 584–585. – P. 402–413.

235. Nawong, C. Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from soil samples / C. Nawong, K. Umsakul, N. Sermwittayawong // Brazilian Journal of Microbiology. – 2018. – V. 49, N. 3. – P. 481–488.

236. Nebot, C. Introduction of human pharmaceuticals from wastewater treatment plants into the aquatic environment: A rural perspective / C. Nebot [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – V. 22, N. 14. – P. 10559–10568.

237. Neumann, G. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size / G. Neumann [et al.] // Extremophiles. – 2005. – V. 9, N. 2. – P. 163–168.

238. Nguyen, L.N. Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac on activated sludge microbial communities / L.N. Nguyen [et al.] // Science of the Total Environment. – 2019. – V. 657. – P. 739–745.

239. Nguyen, L.N. Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi / L.N. Nguyen [et al.] // Bioresource Technology. – 2013. – V. 148. – P. 234–241.

240. Nieto, E. Influence of temperature on toxicity of single pharmaceuticals and mixtures, in the crustacean *A. desmarestii* / E. Nieto [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2016. – V. 313. – P. 159–169.

241. Niu, X. Diclofenac toxicity in human intestine *ex vivo* is not related to the formation of intestinal metabolites / X. Niu [*et al.*] // Archives of Toxicology. – 2015. – V. 89. – P. 107–119.

242. Novoa-Luna, K.A. Oxidative stress induced in *Hyaella azteca* by an effluent from a NSAID-manufacturing plant in Mexico / K.A. Novoa-Luna [*et al.*] // Ecotoxicology. – 2016. – V. 25, N. 7. – P. 1288–1304.

243. Nowrotek, M. Removal of diclofenac and sulfamethoxazole from synthetic municipal waste water in microcosm downflow constructed wetlands: Start-up results / M. Nowrotek [*et al.*] // International Journal of Phytoremediation. – 2016. – V. 18, N. 2. – P. 157–163.

244. O'Grady, D. Removal of aqueous 17 α -ethinylestradiol by *Rhodococcus* species / D. O'Grady, S. Evangelista, V. Yargeau // Environmental Engineering Science. – 2009. – V. 26, N. 9. – P. 1393–1400.

245. Oaks, J.L. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. / J.L. Oaks [*et al.*] // Nature. – 2004. – V. 427, N. 6975. – P. 630–633.

246. Olicón-Hernández, D.R. Evaluation of diclofenac biodegradation by the ascomycete fungus *Penicillium oxalicum* at flask and bench bioreactor scales / D.R. Olicón-Hernández [*et al.*] // Science of the Total Environment. – 2019. – V. 662. – P. 607–614.

247. Olicón-Hernández, D.R. Overview on the biochemical potential of filamentous fungi to degrade pharmaceutical compounds / D.R. Olicón-Hernández, J. González-López, E. Aranda // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 1–17.

248. Ortiz de García, S.A. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants / S.A. Ortiz de García [*et al.*] // Ecotoxicology. – 2014. – V. 23, N. 8. – P. 1517–1533.

249. Osorio-Lozada, A. Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: Case study of diclofenac metabolism by

Actinoplanes species / A. Osorio-Lozada [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 2008. – V. 36, N. 2. – P. 234–240.

250. Pacwa-Płociniczak, M. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil / M. Pacwa-Płociniczak [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2019. – V. 169. – P. 615–622.

251. Paíga, P. Development of a SPE-UHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater / P. Paíga [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2015. – V. 106. – P. 61–70.

252. Paje, M.L.F. Inhibition of lotic biofilms by diclofenac / M.L.F. Paje [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – V. 59, N. 4–5. – P. 488–492.

253. Palli, L. Preliminary evaluation of *Pleurotus ostreatus* for the removal of selected pharmaceuticals from hospital wastewater / L. Palli [et al.] // Biotechnology Progress. – 2017. – V. 33, N. 6. – P. 1529–1537.

254. Palyzová, A. Characterization of the catabolic pathway of diclofenac in *Raoultella* sp. KDF8 / A. Palyzová [et al.] // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2019. – V. 137. – P. 88–94.

255. Palyzová, A. Potential of the strain *Raoultella* sp. KDF8 for removal of analgesics / A. Palyzová [et al.] // Folia Microbiologica. – 2018. – V. 63, N. 3. – P. 273–282.

256. Pantziarka, P. Repurposing drugs in oncology (ReDO) – Diclofenac as an anti-cancer agent / P. Pantziarka [et al.] // Ecancermedicalscience. – 2016. – V. 10. – P. 1–28.

257. Papageorgiou, M. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece / M. Papageorgiou, C. Kosma, D. Lambropoulou // Science of the Total Environment. – 2016. – V. 543. – P. 547–569.

258. Park, J. Removal of pharmaceuticals and personal care products by ammonia oxidizing bacteria acclimated in a membrane bioreactor: Contributions of cometabolism and endogenous respiration / J. Park [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2017. – V. 605–606. – P. 18–25.

259. Parolini, M. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* / M. Parolini, A. Binelli, A. Provini // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2011. – V. 74, N. 6. – P. 1586–1594.

260. PASS online [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php> [06.05.2019].

261. Pereira, C.D.S. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone / C.D.S. Pereira [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2016. – V. 548–549. – P. 148–154.

262. Pérez, S. Acute toxicity of selected organic pollutants to saltwater (mysid *Siriella armata*) and freshwater (cladoceran *Daphnia magna*) ecotoxicological models / S. Pérez, D. Rial, R. Beiras // *Ecotoxicology*. – 2015. – V. 24, N. 6. – P. 1229–1238.

263. Pezzilli, R. NSAIDs and acute pancreatitis: A systematic review / R. Pezzilli, A.M. Morselli-Labate, R. Corinaldesi // *Pharmaceuticals*. – 2010. – V. 3, N. 3. – P. 1–14.

264. Pi, N. Bioaccumulation of pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in aquatic macrophytes: Results of hydroponic experiments with *Echinodorus horemanii* and *Eichhornia crassipes* / N. Pi, J.Z. Ng, B.C. Kelly // *Science of the Total Environment*. – 2017. – V. 601–602. – P. 812–820.

265. Pi, Y. Microbial degradation of four dispersed crude oils by *Rhodococcus* sp. evaluated using carbon stable isotope analysis / Y. Pi [et al.] // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2019. – V. 94, N. 6. – P. 1800–1807.

266. Pierattini, E.C. Poplar and diclofenac pollution: A focus on physiology, oxidative stress and uptake in plant organs / E.C. Pierattini [et al.] //

Science of the Total Environment. – 2018. – V. 636. – P. 944–952.

267. Pino-Otín, M.R. Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms / M.R. Pino-Otín [*et al.*] // Science of the Total Environment. – 2017. – V. 595. – P. 441–450.

268. Pino, M.R. Acute toxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* of 18 common pharmaceuticals in artificial soil / M.R. Pino [*et al.*] // Science of the Total Environment. – 2015. – V. 518–519. – P. 225–237.

269. Plotnikov, A.N. Determination of codeine phosphate in the culture fluid of *Rhodococcus* by high-performance liquid chromatography / A.N. Plotnikov [*et al.*] // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2017. – V. 72, N. 6. – P. 328–332.

270. Podorozhko, E.A. Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber* / E.A. Podorozhko [*et al.*] // Bioresource Technology. – 2008. – V. 99, N. 6. – P. 2001–2008.

271. Poirier-Larabie, S. Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions / S. Poirier-Larabie, P.A. Segura, C. Gagnon // Science of the Total Environment. – 2016. – V. 557–558. – P. 257–267.

272. Praskova, E. Assessment of diclofenac LC₅₀ reference values in juvenile and embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*) / E. Praskova [*et al.*] // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2011. – V. 14, N. 4. – P. 545–549.

273. Praveena, S.M. Pharmaceuticals residues in selected tropical surface water bodies from Selangor (Malaysia): Occurrence and potential risk assessments / S.M. Praveena [*et al.*] // Science of the Total Environment. – 2018. – V. 642. – P. 230–240.

274. Prior, J.E. Identification and characterization of a bacterial cytochrome P450 for the metabolism of diclofenac / J.E. Prior [*et al.*] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V. 85, N. 3. – P. 625–633.

275. Pusceddu, F.H. Environmental risk assessment of triclosan and

ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints / F.H. Pusceddu [*et al.*] // *Environmental Pollution*. – 2018. – V. 232. – P. 274–283.

276. Quintana, J.B. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor / J.B. Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma // *Water Research*. – 2005. – V. 39, N. 12. – P. 2654–2664.

277. Ramaprasad, E.V.V. *Rhodococcus electrodiphilus* sp. nov., a marine electro active actinobacterium isolated from coral reef / E.V.V. Ramaprasad [*et al.*] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68, N. 8. – P. 2644–2649.

278. Rangasamy, B. Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen / B. Rangasamy [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2018. – V. 213. – P. 423–433.

279. Ravi, K. Bacterial conversion of depolymerized Kraft lignin / K. Ravi [*et al.*] // *Biotechnology for Biofuels*. – 2019. – V. 12, N. 1. – P. 1–14.

280. Richards, N.L. Qualitative detection of the NSAIDs diclofenac and ibuprofen in the hair of Eurasian otters (*Lutra lutra*) occupying UK waterways with GC-MS / N.L. Richards [*et al.*] // *European Journal of Wildlife Research*. – 2011. – V. 57, N. 5. – P. 1107–1114.

281. Rivera-Jaimes, J.A. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment / J.A. Rivera-Jaimes [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2018. – V. 613–614. – P. 1263–1274.

282. Rodarte-Morales, A.I. Evaluation of two fungal strains for the degradation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) / J.M. Rodarte-Morales, A.I. Moreira, M.T. Feijoo, G. Lema // *Chemical Engineering Transactions*. – 2010. – V. 20. – P. 31–36.

283. Safronova, N.A. Bacteria *Rhodococcus* sp. as potential destructors of detonation nanodiamonds / N.A. Safronova, O.A. Koksharova // *Nanotechnologies in Russia*. – 2018. – V. 13, N. 7–8. – P. 439–442.

284. Salem-Milani, A. Antibacterial effect of diclofenac sodium on *Enterococcus faecalis* / A. Salem-Milani, E. Balaei-Gajan // Journal of Dentistry. – 2013. – V. 10. – P. 16–22.
285. Sangal, V. Refined systematics of the genus *Rhodococcus* based on whole genome analyses / V. Sangal [et al.] // Biology of *Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 1–21.
286. Saravanan, M. Toxicological effects of clofibrac acid and diclofenac on plasma thyroid hormones of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* during short and long-term exposures / M. Saravanan [et al.] // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2014. – V. 38, N. 3. – P. 948–958.
287. Saunders, L.J. Pharmaceutical concentrations in screened municipal wastewaters in Victoria, British Columbia: A comparison with prescription rates and predicted concentrations / L.J. Saunders, A. Mazumder, C.J. Lowe // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2016. – V. 35, N. 4. – P. 919–929.
288. Schmidt, M. Diclofenac use and cardiovascular risks: Series of nationwide cohort studies / M. Schmidt, H.T. Sørensen, L. Pedersen // BMJ Online. – 2018. – V. 362. – P. 1–10.
289. Schmidt, W. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests / W. Schmidt [et al.] // Marine Pollution Bulletin. – 2011. – V. 62, N. 7. – P. 1389–1395.
290. Schröder, P. Status of hormones and painkillers in wastewater effluents across several European states – considerations for the EU watch list concerning estradiols and diclofenac / P. Schröder [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – V. 23, N. 13. – P. 12835–12866.
291. Schwarz, S. Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario* / S. Schwarz [et al.] // Science of the Total Environment. – 2017. – V. 607–608. – P. 1026–1036.
292. Selderslaghs, I.W.T. Feasibility study of the zebrafish assay as an

alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds / I.W.T. Selderslaghs, R. Blust, H.E. Witters // *Reproductive Toxicology*. – 2012. – V. 33, N. 2. – P. 142–154.

293. Sengupta, A. The occurrence and fate of chemicals of emerging concern in coastal urban rivers receiving discharge of treated municipal wastewater effluent / A. Sengupta [*et al.*] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2014. – V. 33, N. 2. – P. 350–358.

294. Shintani, M. Biodegradation of A-fuel oil in soil samples with bacterial mixtures of *Rhodococcus* and *Gordonia* strains under low temperature conditions / M. Shintani [*et al.*] // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2019. – V. 127, N. 2. – P. 197–200.

295. Sim, W.J. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures / W.J. Sim [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2011. – V. 82, N. 2. – P. 179–186.

296. Simazaki, D. Occurrence of selected pharmaceuticals at drinking water purification plants in Japan and implications for human health / D. Simazaki [*et al.*] // *Water Research*. – 2015. – V. 76. – P. 187–200.

297. Singh, K.P. Occurrence of pharmaceuticals in urban wastewater of north Indian cities and risk assessment / K.P. Singh [*et al.*] // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2014. – V. 186, N. 10. – P. 6663–6682.

298. Sogani, M. Treatment of industrial wastewater containing amides using novel bacterium in semi-continuous reactor / M. Sogani, A. Dongre, K. Sonu // *Frontiers International Conference on Wastewater Treatment and Modelling* / ed. G. Mannina. – Cham: Springer, 2017. – P. 354–359.

299. Spongberg, A.L. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters / A.L. Spongberg [*et al.*] // *Water Research*. – 2011. – V. 45, N. 20. – P. 6709–6717.

300. Sriuttha, P. Hepatotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: A systematic review of randomized controlled trials / P. Sriuttha, B. Sirichanchuen,

U. Permsuwan // International Journal of Hepatology. – 2018. – V. 2018. – P. 1–13.

301. Stafford, D.E. Metabolic engineering of indene bioconversion in *Rhodococcus* sp. / D.E. Stafford, K.S. Yanagimachi, G. Stephanopoulos // Metabolic Engineering / ed. J. Nielsen. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. – P. 85–101.

302. Stancova, V. Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (*Tinca tinca*) / V. Stancova [et al.] // Veterinarni Medicina. – 2017. – V. 62, N. 2. – P. 90–97.

303. Stenholm, Å. Removal of diclofenac from a non-sterile aqueous system using *Trametes versicolor* with an emphasis on adsorption and biodegradation mechanisms / Å. Stenholm [et al.] // Environmental Technology. – 2018. – V. 40, N. 19. – P. 2460–2472.

304. Stylianou, K. Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: Microbial intermediates and ecotoxicological assessment / K. Stylianou [et al.] // Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2018. – V. 6, N. 2. – P. 3242–3248.

305. Subashchandrabose, S.R. Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: Overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP / S.R. Subashchandrabose [et al.] // Science of the Total Environment. – 2019. – V. 651. – P. 813–821.

306. Sui, Q. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review / Q. Sui [et al.] // Emerging Contaminants. – 2015. – V. 1. – P. 14–24.

307. Sutcliffe, I.C. The rhodococcal cell envelope: Composition, organisation and biosynthesis / I.C. Sutcliffe, A.K. Brown, L.G. Dover // Biology of *Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. – P. 29–71.

308. Taheran, M. Covalent immobilization of laccase onto nanofibrous

membrane for degradation of pharmaceutical residues in water / M. Taheran [*et al.*] // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2017. – V. 5, N. 11. – P. 10430–10438.

309. Tanoue, R. Uptake and tissue distribution of pharmaceuticals and personal care products in wild fish from treated-wastewater-impacted streams / R. Tanoue [*et al.*] // *Environmental Science and Technology*. – 2015. – V. 49, N. 19. – P. 11649–11658.

310. Tarasova, E.V. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation / E.V. Tarasova, V.V. Grishko, I.B. Ivshina // *Process Biochemistry*. – 2017. – V. 52. – P. 1–9.

311. Tas, D.O. Fate and biodegradability potential of an emerging micropollutant diclofenac in subsurface environment / D.O. Tas [*et al.*] // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2018. – V. 15, N. 6. – P. 1201–1210.

312. Thelusmond, J.R. Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected / J.R. Thelusmond [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2018. – V. 640–641. – P. 1393–1410.

313. Thelusmond, J.R. Carbamazepine, triclocarban and triclosan biodegradation and the phylotypes and functional genes associated with xenobiotic degradation in four agricultural soils / J.R. Thelusmond, T.J. Strathmann, A.M. Cupples // *Science of the Total Environment*. – 2019. – V. 657. – P. 1138–1149.

314. Tiehm, A. Biodegradation of pharmaceutical compounds and their occurrence in the Jordan Valley / A. Tiehm [*et al.*] // *Water Resources Management*. – 2011. – V. 25, N. 4. – P. 1195–1203.

315. Todd, P.A. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy diclofenac sodium / P.A. Todd, E.M. Sorkin // *Drugs*. – 1988. – V. 285. – P. 244–285.

316. Toušová, Z. Analytical and bioanalytical assessments of organic micropollutants in the Bosna River using a combination of passive sampling,

bioassays and multi-residue analysis / Z. Toušová [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2019. – V. 650. – P. 1599–1612.

317. Tran, N.H. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review / N.H. Tran, M. Reinhard, K.Y.H. Gin // *Water Research*. – 2018. – V. 133. – P. 182–207.

318. Tran, N.H. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds / N.H. Tran, T. Urase, O. Kusakabe // *Journal of Hazardous Materials*. – 2009. – V. 171, N. 1–3. – P. 1051–1057.

319. Triebkorn, R. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*) / R. Triebkorn [*et al.*] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – V. 387, N. 4. – P. 1405–1416.

320. United Nations. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) / New York and Geneva: United Nations, 2011. – 562 p.

321. UNESCO, HELCOM. Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region – A status report / UNESCO Emerging Pollutants in Water Series. – Paris: UNESCO Publishing, 2017. – 120 p.

322. Valcárcel, Y. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain / Y. Valcárcel [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2011. – V. 82, N. 7. – P. 1062–1071.

323. van Leeuwen, J.S. Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system / J.S. van Leeuwen [*et al.*] // *Toxicology Letters*. – 2011. – V. 200, N. 3. – P. 162–168.

324. Veeranagouda, Y. *Enterobacter* sp. VKGH12 growing with *n*-butanol as the sole carbon source and cells to which the alcohol is added as pure toxin

show considerable differences in their adaptive responses / Y. Veeranagouda [*et al.*] // FEMS Microbiology Letters. – 2006. – V. 254, N. 1. – P. 48–54.

325. Verrier, D. Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers / D. Verrier, B. Mortier, G. Albagnac // Biotechnology Letters. – 1987. – V. 9, N. 10. – P. 735–740.

326. Vieno, N. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – A review / N. Vieno, M. Sillanpää // Environment International. – 2014. – V. 69. – P. 28–39.

327. Vystavna, Y. Pharmaceuticals in rivers of two regions with contrasted socio-economic conditions: Occurrence, accumulation, and comparison for Ukraine and France / Y. Vystavna [*et al.*] // Water, Air, and Soil Pollution. – 2012. – V. 223, N. 5. – P. 2111–2124.

328. Wahla, A.Q. Optimizing the metribuzin degrading potential of a novel bacterial consortium based on Taguchi design of experiment / A.Q. Wahla [*et al.*] // Journal of Hazardous Materials. – 2019. – V. 366. – P. 1–9.

329. Wang, S. Degradation of emerging contaminants by acclimated activated sludge / S. Wang, J. Wang // Environmental Technology. – 2018. – V. 39, N. 15. – P. 1985–1993.

330. Wang, L. *Rhodococcus daqingensis* sp. nov., isolated from petroleum-contaminated soil / L. Wang [*et al.*] // Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. – 2019a. – V. 112, N. 5. – P. 695–702.

331. Wang, Y. Degradation of 17 β -estradiol and products by a mixed culture of *Rhodococcus equi* DSSKP-R-001 and *Comamonas testosteroni* QYY20150409 / Y. Wang [*et al.*] // Biotechnology and Biotechnological Equipment. – 2019b. – V. 33, N. 1. – P. 268–277.

332. Węgrzyn, A. Isolation of bacterial endophytes from *Phalaris arundinacea* and their potential in diclofenac and sulfamethoxazole degradation / A. Węgrzyn, E. Felis // Polish Journal of Microbiology. – 2018. – V. 67, N. 3. – P. 321–331.

333. Wilson, W.W. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge / W.W. Wilson [*et al.*] // *Journal of Microbiological Methods*. – 2001. – V. 43. – P. 153–164.
334. Xie, Z. Occurrence, bioaccumulation, and trophic magnification of pharmaceutically active compounds in Taihu Lake, China / Z. Xie [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2015. – V. 138. – P. 140–147.
335. Xu, J. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils / J. Xu, L. Wu, A.C. Chang // *Chemosphere*. – 2009. – V. 77, N. 10. – P. 1299–1305.
336. Xu, Y. Biotransformation of pharmaceuticals by ammonia oxidizing bacteria in wastewater treatment processes / Y. Xu, Z. Yuan, B.J. Ni // *Science of the Total Environment*. – 2016. – V. 566–567. – P. 796–805.
337. Yam, K.C. Catabolism of aromatic compounds and steroids by *Rhodococcus* / K.C. Yam, R. van der Geize, L.D. Eltis // *Biology of Rhodococcus* / ed. Alvarez H. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. – P. 133–169.
338. Yang, C.W. Biodegradation of tetrabromobisphenol-A in Mangrove sediments / C.W. Yang [*et al.*] // *Sustainability (Switzerland)*. – 2018. – V. 11. – P. 1–13.
339. Yang, L. Occurrence, distribution, and attenuation of pharmaceuticals and personal care products in the riverside groundwater of the Beiyun River of Beijing, China / L. Yang [*et al.*] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2017. – V. 24, N. 18. – P. 15838–15851.
340. Yang, S. Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions / S. Yang [*et al.*] // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2013. – V. 85. – P. 483–490.
341. Ye, X. A novel dehydrogenase 17B-HSDx from *Rhodococcus* sp. P14 with potential application in bioremediation of steroids contaminated environment / X. Ye [*et al.*] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2019. – V. 362. – P. 170–177.
342. Yokota, H. Chronic exposure to diclofenac induces delayed mandibular defects in medaka (*Oryzias latipes*) in a sex-dependent manner / H.

Yokota [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2018. – V. 210. – P. 139–146.

343. Yoneda, A. Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630 / A. Yoneda [*et al.*] // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – V. 44, N. 5. – P. 2240–2254.

344. Yoshida, N. Oligotrophic growth of *Rhodococcus* / N. Yoshida // *Biology of Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 87–101.

345. Yoshimoto, T. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates / T. Yoshimoto [*et al.*] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – V. 70, N. 9. – P. 5283–5289.

346. Zampolli, J. Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus* / J. Zampolli [*et al.*] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 103, N. 3. – P. 1069–1080.

347. Zeng, J. Isolation of diverse pyrene-degrading bacteria via introducing readily utilized phenanthrene / J. Zeng [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2019. – V. 222. – P. 534–540.

348. Zhan, H. Kinetics and novel degradation pathway of permethrin in *Acinetobacter baumannii* ZH-14 / H. Zhan [*et al.*] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1–12.

349. Zhang, Y. Typical pharmaceuticals in major WWTPs in Beijing, China: Occurrence, load pattern and calculation reliability / Y. Zhang [*et al.*] // *Water Research*. – 2018a. – V. 140. – P. 291–300.

350. Zhang, X. Removal of acidic pharmaceuticals by small-scale constructed wetlands using different design configurations / X. Zhang [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2018b. – V. 639. – P. 640–647.

351. Zhang, H. Two *dcm* gene clusters essential for the degradation of diclofop-methyl in a microbial consortium of *Rhodococcus* sp. JT-3 and *Brevundimonas* sp. JT-9 / H. Zhang [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2018c. – V. 66, N. 46. – P. 12217–12226.

352. Zhang, Y. The enhancement of pyridine degradation by *Rhodococcus* KDPy1 in coking wastewater / Y. Zhang [*et al.*] // *FEMS Microbiology Letters*. –

2019a. – V. 366, N. 1. – P. 1–13.

353. Zhang, Y. Biodegradation of picolinic acid by *Rhodococcus* sp. PA18 / Y. Zhang [*et al.*] // Applied Sciences. – 2019b. – V. 9, N. 5. – P. 1006.

354. Zhao, H.M. Biodegradation pathway of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Rhodococcus pyridinivorans* XB and its bioaugmentation for remediation of DEHP contaminated soil / H.M. Zhao [*et al.*] // Science of the Total Environment. – 2018. – V. 640–641. – P. 1121–1131.

355. Žur, J. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria / J. Žur [*et al.*] // Environmental Science and Pollution Research. – 2018. – V. 25, N. 22. – P. 21498–21524.