

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР УРАЛЬСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
“ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ УРАЛЬСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК”

На правах рукописи

Черемных Ксения Михайловна

**БИОДЕСТРУКЦИЯ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCUS***

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор,  
академик РАН **Ирина Борисовна Ившина**,  
кандидат химических наук, доцент  
**Гришко Виктория Викторовна**

Пермь – 2018

<b>Введение</b> .....	4
Обзор литературы	
<b>Глава 1. Биодеструкция смоляных кислот</b> .....	11
1.1. Строение и свойства смоляных кислот.....	11
1.2. Биодеструкция смоляных кислот.....	19
1.3. Биотрансформация смоляных кислот для получения биоактивных соединений.....	29
1.4. Актинобактерии как потенциальные биодеструкторы смоляных кислот.....	36
1.5. Биоинформатический анализ актинобактериальных систем деструкции смоляных кислот.....	44
Экспериментальная часть	
<b>Глава 2. Материалы и методы исследований</b> .....	48
2.1. Рабочая коллекция бактериальных культур.....	48
2.2. Определение минимальной подавляющей концентрации.....	48
2.3. Условия культивирования актинобактерий.....	53
2.4. Получение актинобактериальных клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания.....	54
2.5. Иммуобилизация бактериальных клеток.....	55
2.6. Получение отдельных фракций актинобактериальных клеток.....	58
2.7. Выделение <i>Rhodococcus</i> -биосурфактантов.....	60
2.8. Микроскопические исследования.....	60
2.9. Определение жизнеспособности бактериальных клеток.....	61
2.10. Определение дыхательной активности актинобактерий.....	62
2.11. Определение электрокинетического потенциала.....	62
2.12. Качественный и количественный анализ дегидроабиетиновой кислоты и ее метаболитов.....	62
2.13. Препаративное выделение и идентификация продуктов биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты.....	63
2.14. Исследование биологического потенциала метаболитов дегидроабиетиновой кислоты.....	64

2.15. Статистическая обработка результатов.....	64
<b>Глава 3. Исследование способности коллекционных штаммов актинобактерий к деструкции и трансформации дегидроабиетиновой кислоты.....</b>	<b>65</b>
3.1. Исследование устойчивости актинобактерий к воздействию дегидроабиетиновой кислоты.....	65
3.2. Исследование каталитического потенциала актинобактерий по отношению к дегидроабиетиновой кислоте.....	66
<b>Глава 4. Адаптивные реакции актинобактерий на токсическое воздействие дегидроабиетиновой кислоты.....</b>	<b>74</b>
4.1. Клеточные приспособления актинобактерий к воздействию экотоксиканта.....	74
4.2. Биодеструкция дегидроабиетиновой кислоты с использованием отдельных фракций бактериальных клеток.....	81
<b>Глава 5. Оптимизация процесса биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты.....</b>	<b>83</b>
5.1. Биодеструкция дегидроабиетиновой кислоты клетками в стадии стационарной фазы роста, отмытыми от источников питания.....	83
5.2. Биодеструкция дегидроабиетиновой кислоты иммобилизованными актинобактериями.....	89
5.3. Использование предварительно адаптированных к дегидроабиетиновой кислоте бактериальных клеток.....	92
<b>Глава 6. Пути биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты актинобактериями.....</b>	<b>98</b>
6.1. Исследование продуктов биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты.....	98
6.2. Анализ путей актинобактериальной биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты.....	104
<b>Заключение.....</b>	<b>106</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>110</b>
<b>Список сокращений.....</b>	<b>112</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>113</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Смоляные кислоты – трициклические дитерпеноиды, продуцируемые хвойными растениями семейства *Pinaceae*. В процессе получения целлюлозы в результате механического и химического воздействия на древесину смоляные кислоты накапливаются (до 1500 мг/л) в сточных водах целлюлозно-бумажной промышленности. Они аккумулируются в природных экосистемах и оказывают токсическое воздействие на живые организмы, что может приводить к нарушению экологического баланса. Показатель острой токсичности смоляных кислот в отношении различных тестовых организмов составляет от 0,07 до 6,5 мг/л (Peng, Roberts, 2000).

Доминирующим (от 35 до 60 %) компонентом сточных вод среди смоляных кислот является дегидроабиетиновая кислота (ДАК), которая может служить индикатором загрязнения природной среды экопеллютантами данной группы. Сочетание высокой устойчивости ДАК к факторам окружающей среды (Volkman *et al.*, 1993) и способности к естественной биоаккумуляции обуславливает ее широкое распространение не только в сточных водах, но и морской/речной воде (Volkman *et al.*, 1993), донных отложениях и почве (Pérez-de-Mora *et al.*, 2008), а также в живых организмах (Hernández *et al.*, 2008). Актуальным является поиск эффективных способов снижения концентрации смоляных кислот, в том числе ДАК в составе сточных вод.

Химические методы очистки промышленных стоков не обеспечивают полную нейтрализацию смоляных кислот и предполагают применение агрессивных реагентов. Приоритет отдается природоподобным технологиям, основанным на использовании ферментативной активности микроорганизмов. Известно, что микроорганизмы проявляют биодеструктирующую активность при концентрации ДАК в среде культивирования не более 250 мг/л (Vicho *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1999; Gouiric *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; van Beek *et al.*, 2007; Choudhary *et al.*, 2014). Большинство описанных микробных изолятов относится к грамотрицательным микроорганизмам, в частности протеобактериям, биотехнологическое использование которых небезопасно ввиду потенциальной

патогенности большинства их представителей. Грамположительные бактериодеструкторы представлены лишь несколькими штаммами, принадлежащими к родам *Bacillus* и *Mycobacterium* (Côté, Otis 1989; Martin, Mohn 1999; Yu, Mohn 1999). В связи с этим необходим дальнейший поиск перспективных штаммов, способных к биодеструкции ДАК в условиях более высоких концентраций, а также эффективных способов нейтрализации экотоксичной ДАК.

Производные ДАК могут использоваться в качестве возможных интермедиатов синтеза фармакологически значимых соединений (González, 2015). В настоящее время известны производные ДАК, обладающие противовирусной (Tagat *et al.*, 1994; González *et al.*, 2010), противомикробной (Savluchinske-Feio *et al.*, 2006), противоязвенной (Wada *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 2014), фунгицидной (Savluchinske-Feio *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010), анксиолитической (Tolmacheva *et al.*, 2006), противоопухолевой (Huang *et al.*, 2013) активностью.

При поиске новых биодеструкторов сложных органических соединений большая роль принадлежит микробным коллекциям, предоставляющим ценную информацию о свойствах и биотехнологическом потенциале депонированных штаммов. В Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmcol.ru/>, реестровый номер Уникальной научной установки [www.ckp-rf.ru/usu/73559](http://www.ckp-rf.ru/usu/73559)) широко представлены непатогенные штаммы актинобактерий, характеризующиеся большим разнообразием деградируемых экополлютантов. Типично бактериальный характер роста, наличие многоцелевых ферментных систем, а также способность метаболизировать в экстремальных условиях среды обуславливают целесообразность и перспективность поиска активных биодеструкторов ДАК среди коллекционных штаммов актинобактерий.

**Цель настоящей работы** – анализ способности коллекционных культур актинобактерий к деструкции и трансформации ДАК.

### **Основные задачи исследования**

1. На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов изучить способность актинобактерий к деструкции и трансформации ДАК.

2. Определить динамику и условия оптимизации процесса биоконверсии ДАК.

3. Изучить влияние ДАК на морфометрические характеристики актинобактерий.

4. Определить основные продукты и возможные пути биоконверсии ДАК.

**Научная новизна.** С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов впервые показана способность актинобактерий к деструкции ДАК (500 мг/л) в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %). Показано, что представители *Gordonia rubripertincta* и *Rhodococcus erythropolis* трансформируют ДАК с образованием ранее не описанных метаболитов – 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК и соединения 15,16,17-тринор-абитанового типа. Адаптивной реакцией актинобактериальных клеток на токсическое воздействие ДАК является образование многоклеточных агрегатов, изменение морфометрических параметров (увеличение размеров и степени среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности), а также величины электрокинетического потенциала клеточной поверхности. Экспериментально обосновано, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в биодеструкции ДАК, локализованы в цитоплазме бактериальных клеток, тогда как окисление ДАК до 5 $\alpha$ -гидрокси-производного катализируют ферменты, прочно связанные с плазматической мембраной. Показано, что с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 происходит полное разрушение ДАК через окисление молекулы исходного соединения по атому С-7 углеродного кольца с последующим дигидроксилированием ароматического цикла и его *мета*-расщеплением. Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 267 способен трансформировать

ДАК через окисление молекулы исходного соединения по атому С-5 углеродного кольца с последующим деизопропилированием ароматического кольца и образованием метаболитов с прогнозируемой биоактивностью.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные данные расширяют представление о каталитическом потенциале актинобактерий *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* и их возможном вкладе в детоксикацию смоляных кислот в природных экосистемах. Отобраны наиболее эффективные штаммы актинобактерий, способные к полной деструкции (*R. rhodochrous* ИЭГМ 107), а также к трансформации (*G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 120, ИЭГМ 132, *R. erythropolis* ИЭГМ 267) ДАК с образованием ранее не описанных метаболитов. Обоснована возможность существенного сокращения (с 7 до 3 сут) продолжительности процесса биодеструкции с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания. Использование приема предварительной адаптации клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 к ДАК обеспечивало максимальный (87 %) уровень продукции метаболитов (5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК и соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа) с прогнозируемой биоактивностью. Способ биодеструкции ДАК с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, депонированного во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ АС-2065, защищен Патентом на изобретение РФ. Результаты диссертационного исследования используются в лекционном курсе “Биоразнообразие микроорганизмов и их биотехнологический потенциал” для магистрантов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о наиболее активных штаммах-биодеструкторах ДАК включена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет ([www.iegmcol.ru/strains/index.html](http://www.iegmcol.ru/strains/index.html)).

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Актинобактерии родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %) способны к биодеструкции ДАК. Штаммы

*G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 120, ИЭГМ 132 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 трансформируют ДАК с образованием ранее не описанного метаболита – 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК.

2. Воздействие ДАК на актинобактерии рода *Rhodococcus* сопровождается образованием многоклеточных агрегатов, изменением морфометрических параметров клеток и величины электрокинетического потенциала поверхности клеток. Процесс биодеструкции ДАК катализируется ферментными комплексами, локализованными в цитоплазме клеток, окисление ДАК с образованием 5 $\alpha$ -гидрокси-производного – ферментами, прочно связанными с цитоплазматической мембраной.

3. Использование клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания, приводит к сокращению продолжительности процесса деструкции ДАК с 7 до 3 сут в слабощелочных (рН 8,0) условиях среды. Использование предварительной адаптации к ДАК клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 обеспечивает максимальный уровень продукции 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК, а также образование нового соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа.

4. С использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 происходит полное разрушение ДАК через окисление молекулы исходного соединения по атому С-7 углеродного кольца с последующим дигидроксилированием ароматического цикла и его *meta*-расщеплением. Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 267 способен трансформировать ДАК через окисление молекулы исходного соединения по атому С-5 углеродного кольца с последующим деизопропилированием ароматического кольца с образованием метаболитов с прогнозируемой биоактивностью.

**Апробация работы и публикации.** Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на VII, VIII Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов “Симбиоз–Россия”, Екатеринбург, 2014, Новосибирск, 2016, Казань, 2017; X Студенческом региональном конкурсе научных проектов по программе УМНИК, Пермь, 2014;



Всероссийской конференции “Теория и практика хроматографии”, Самара, 2015; II Всероссийской школе-конференции молодых ученых “Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии”, Пермь, 2015; 20-ой и 22-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пущино, 2016, 2018; Всероссийской научно-практической с международным участием конференции “Научоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”, Пермь, 2016; XXI Международной экологической студенческой конференции “Экология России и сопредельных территорий”, Новосибирск, 2016; IV Международной конференции “Микробное разнообразие: ресурсный потенциал (ICOMID)”, Москва, 2016; V Всероссийской конференции с международным участием “Енамины в органическом синтезе”, Пермь, 2017; II Международной научной конференции “Высокие технологии, определяющие качество жизни”, Пермь, 2018; Региональной студенческой научной конференции с международным участием “Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии”, Пермь, 2018; VI Международной научно-практической конференции “Биотехнология: наука и практика”, Ялта, 2018.

По теме диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 2 в журналах, входящих в национальную библиографическую базу данных научного цитирования РИНЦ и 2 в изданиях, входящих в международные системы научного цитирования Web of Science и Scopus. Получен Патент 2656145 на изобретение Российской Федерации “Способ биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты с использованием штамма *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107”.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 36 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 189 наименований работ, в том числе 19 отечественных и 170 зарубежных авторов.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.**

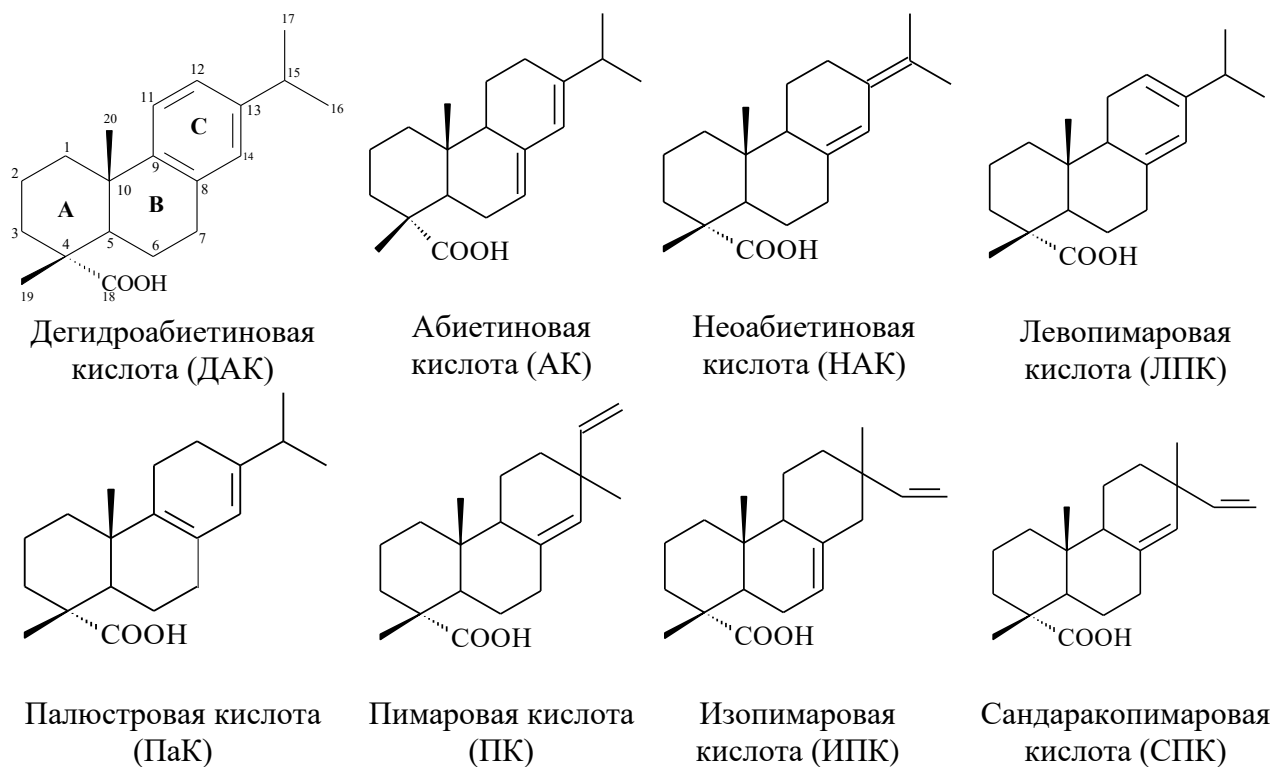
Работа выполнена в соответствии с планом НИР “ИЭГМ УрО РАН” – филиала ПФИЦ УрО РАН, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций ФАНО (2016, 2017) и Госзаданий 6.1194.2014/К, 6.3330.2017/ПЧ Минобрнауки РФ, Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект 15-12-4-10, 18-4-8-21), и поддержана грантом «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К) 4328ГУ1/2014 от 17.12.2014. 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. Идентификацию продуктов биодеструкции ДАК проводили на базе лаборатории биологически активных соединений (зав. лабораторией – к.х.н. Гришко В.В.) “ИТХ УрО РАН” – филиала ПФИЦ УрО РАН.

## Глава 1. БИОДЕСТРУКЦИЯ СМОЛЯНЫХ КИСЛОТ

### 1.1. Строение и свойства смоляных кислот

Влияние токсичных сточных вод целлюлозно-бумажных производств на экологический статус окружающей среды – тема многочисленных исследований, начиная с 80-х годов прошлого столетия. Ранее предполагалось, что основной вклад в общую токсичность сточных вод вносят их хлорсодержащие органические фракции. Однако позже было показано, что снижение содержания последних более чем на 90 % за счет улучшения технологий производства и очистки не привело к положительным результатам. В настоящее время считается, что наибольший вклад в проявление общей токсичности сточных вод вносят экстрактивные органические вещества древесины – смоляные кислоты (Liss *et al.*, 1997).

Смоляные кислоты – дитерпеновые трициклические монокарбоновые соединения, продуцируемые растениями семейства *Pinaceae* (Taylor *et al.*, 1988; Liss *et al.*, 1997). Смоляные кислоты представлены двумя структурно-стереохимическими группами: абиетана и пимарана. Структура кислот абиетанового типа включает изопропильную группу при атоме С-13, в то время как производные пимаранового типа содержат в положении С-13 два заместителя – виниловый и метильный (Mutton, 1962; Stoltes, Zinkel, 1989). Среди обнаруженных в отработанных водах целлюлозно-бумажных комбинатов (ЦБК) абиетановых кислот – абиетиновая (АК), дегидроабиетиновая (ДАК), неоабиетиновая (НАК), левопимаровая (ЛПК) и палюстровая (ПаК) кислоты, в то время как среди соединений пимаранового типа зарегистрированы изопимаровая (ИПК), пимаровая (ПК) и сандаракопимаровая (СПК) кислоты (рисунок 1).



**Рисунок 1 – Структурные формулы смоляных кислот, обнаруживаемых в составе сточных вод ЦБК.**

Смоляные кислоты входят в состав экстрактивных веществ генеративных и вегетативных органов хвойных (сосна, ель, пихта) растений (Пентегова и др., 1987; Михайлов, Серов, 1988; Liss *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999). Исследование состава липофильных экстрактов семян нескольких видов пихты и ели показало, что смоляные кислоты и их производные относятся к доминирующим компонентам экстрактов (таблица 1), уступая лишь ди- и триглицеридам (Wajs-Bonikowska *et al.*, 2016). Соотношение смоляных кислот варьирует в зависимости от природы источников их выделения. В семенах хвойных растений рода *Picea* преобладает (до 41 %) АК, в то время как для представителей *Abies* характерно присутствие (до 35 %) ПаК (Wajs-Bonikowska *et al.*, 2016).

Таблица 1 – Состав экстрактов семян хвойных растений (% от общей массы сухого экстракта)

Соединение	Пихта кефалинийская <i>Abies cephalonica</i>	Пихта одноцветная <i>A. concolor</i>	Ель восточная <i>Picea orientalis</i>	Ель голубая <i>P. pungens</i>
Смоляные кислоты	6,67	9,55	5,74	16,94
Спирты, альдегиды, эфиры смоляных кислот	3,72	6,73	1,41	1,97
Стероиды	0,06	0,18	1,09	0,26
Эфиры стероидов и жирных кислот	0,06	0,18	1,71	0,26
Жирные кислоты	0,42	0,83	1,08	0,36
Ди- и триглицериды	2,23	15,52	35,11	30,43

Примечание. Цит. по Wajs-Bonikowska *et al.*, 2016.

Содержание смоляных кислот в древесине варьирует в зависимости от объекта, сезона и климатических условий произрастания хвойных растений. Исследование сезонной динамики концентрации смоляных кислот в древесине сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) показало, что содержание последних возрастает с 3,17 (июль) до 5,39 % (январь) от общего веса сухой древесины. Качественный состав смоляных кислот также подвержен сезонным колебаниям. Отмечено (Фуксман, 1999), что в осенне-зимний период происходит накопление ДАК от 2,00 (июль) до 11,93 % (ноябрь). Сравнительный анализ образцов древесины сосны в различных географических точках (от 59 до 68° с.ш.) свидетельствует о том, что с продвижением на север происходит увеличение в них общего содержания смоляных кислот с преобладанием ПК. Предполагается, что смоляные кислоты участвуют в процессах, способствующих адаптации сосны к низким температурам (Фуксман, 1999). Помимо этого антибактериальные (Söderberg *et al.*, 1996; Choudhary *et al.*, 2014), противогрибковые (González *et al.*, 2010), противовоспалительные (Kang *et al.*, 2008) свойства смоляных кислот обеспечивают защиту дерева от вредителей и возбудителей различных заболеваний (Janocha, 2013).

Наиболее богатым (до 75 % от общей массы) источником смоляных кислот является живица, которая выделяется при повреждении коры хвойных растений (Атаманчуков, 1968). Распределение смоляных кислот в живице разнообразно и также зависит от природы источника. Например, живица сибирского кедра (*P. sibirica*) отличается относительно равномерным содержанием нескольких (от пяти и более) смоляных кислот, в то время как доминирующим компонентом живицы большинства остальных сосен и елей является ДАК (таблица 2) (Племенков и др., 2004).

Таблица 2 – Смоляные кислоты (%) в живицах хвойных растений

Кислота	Сосна обыкновенная <i>P. silvestris</i>	Ель обыкновенная <i>P. excels</i>
Абиетиновая	7,86	13,95
Дегидроабиетиновая	64,58	50,08
Пимаровая	10,86	7,57
Изопимаровая	8,26	18,83
Не идентифицированная	8,43	9,55

Примечание. *Цит.* по Племенков и др., 2004.

Использование хвойных пород древесины в деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности приводит к концентрированию (до 1500 мг/л) в сточных водах и последующему попаданию смоляных кислот в окружающую среду, где они оказывают токсическое воздействие, в первую очередь, на водную фауну. Токсичность большинства смоляных кислот изучена на примере таких тестовых организмов, как дафнии и рыбы. Как видно из таблицы 3, значение показателя острой токсичности зависит от степени растворимости смоляных кислот. В ряду ДАК > АК > ЛПК > НАК > ПК > СПК > ИПК растворимость снижается с 5,11 до 1,70 мг/л, в то время как ИПК является наиболее токсичной по отношению ко всем тестовым организмам.

Таблица 3 – Растворимость и токсичность смоляных кислот

Смоляные кислоты	Растворимость, мг/л	Острая токсичность (ЛД <sub>50</sub> ), мг/л				
		Большая дафния <i>Daphnia magna</i> , 48 ч	Радужная форель <i>Oncorhynchus mykiss</i> , 96 ч	Нерка <i>Oncorhynchus nerka</i> , 96 ч	Кижуч <i>Oncorhynchus kisutch</i> , 96 ч	Гольян <i>Pimephales promelas</i> , 96 ч
ДАК	5,11	1,28–6,35	0,77–1,32	0,50–2,10	0,75–1,85	2,10–3,20
АК	2,75	0,68	0,72–1,53	0,20	0,40	2,38
ЛПК	2,54	0,50	0,61–1,00	–	–	–
НАК	2,31	0,35	0,63–0,71	–	–	1,30–1,70
ПК	2,17	0,26	0,74–1,23	–	0,32	–
СПК	1,82	0,13	–	–	0,36	–
ИПК	1,70	0,07	0,40–1,00	0,70	0,20	–

Примечание. Цит. по Leach, Thakore, 1976; Zanella *et al.*, 1983; Taylor *et al.*, 1988; Liss *et al.*, 1997; Peng, Roberts, 2000.

Следует отметить, что на уровень токсичности и растворимости влияют рН, температура и жесткость воды, в которую попадают кислоты (Nyren, Back, 1958; Zanella, 1983; Suckling, Hua, 1990). Например, при изменении рН с 6,5 по 10,0 показатель острой токсичности ДАК по отношению к дафниям и рыбам увеличивается до 76,9 и 45,5 мг/л, соответственно (Zanella, 1983).

Распространенный способ утилизации сточных вод ЦБК – разбавление и сброс их в речные и морские водоемы. Анализ проб воды на присутствие ДАК показало, что по мере удаления от места сброса промышленных стоков общая концентрация смоляных кислот уменьшается, в то время как содержание ДАК в составе смоляных кислот увеличивается с 34 до 66 %. Данный факт указывает на высокую устойчивость ДАК к абиотическим факторам внешней среды и возможность использования ДАК в качестве индикатора загрязнения открытых экосистем сточными водами ЦБК (Volkman *et al.*, 1993). Водные системы, неоспоримо, способствуют снижению концентрации смоляных кислот за счет разбавления. Однако некоторые авторы полагают, что смоляные кислоты (благодаря их липофильной природе) быстро адсорбируются на твердых взвешенных частицах и оседают. В работе (Volkman *et al.*, 1993) отмечено, что смоляные кислоты обнаружены (87 мг/кг сухой массы) в осадочных породах вблизи места сброса промышленных стоков. Применение методов фильтрации малоэффективно для удаления ДАК и АК. Анализ проб сточных вод ЦБК после фильтрации показал, что в воде обнаруживаются только ДАК и АК, как наиболее растворимые смоляные кислоты. При этом с помощью ГХ-МС анализа фильтрата было зарегистрировано присутствие в осадке таких смоляных кислот, как ДАК, АК, ПК, НАК (Leppanen *et al.*, 1998).

Снижение концентрации смоляных кислот в водоемах возможно за счет биоаккумуляции последних в водных организмах, например, рыбах (Hernández *et al.*, 2008). Концентрация поллютанта в рыбе может превышать аналогичный показатель в воде (Oikari *et al.*, 1982). Смоляные кислоты обнаружены в различных органах и тканях морских и речных рыб. Наиболее существенное накопление зарегистрировано в плазме крови и печени рыб (таблица 4). Изучение



процесса аккумуляции индивидуальных смоляных кислот показало, что последние проявляют различную способность к накоплению в тканях живых организмов. Так, в работе (Oikari *et al.*, 1982) отмечено, что в тканях рыб в наибольшей степени аккумулируются абиетановые кислоты, в то время как пимарановые накапливаются в значительно меньших количествах. Возможно, данная закономерность связана с меньшей биодоступностью и растворимостью кислот пимаранового типа. Аккумулированные в крови смоляные кислоты попадают в печень и оказывают сильное токсическое воздействие на организм. В литературе описано влияние смоляных кислот на энергетику эритроцитов и гепатоцитов на примере радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). Внесение ДАК вызывает резкое увеличение потребления кислорода и выработку тепла, что приводит к АТФ-истощению. У рыб, отравленных смоляными кислотами, как правило, вследствие гемолиза эритроцитов и повреждения гепатоцитов обнаруживается желтуха (Bushnell *et al.*, 1985; Rissanen *et al.*, 2003). Подобное влияние описано и для клеток центральной нервной системы: внесение ДАК провоцирует увеличение потребления кислорода, снижение уровня АТФ и способствует выходу  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных хранилищ (Zheng, Nicholson, 1998).

Помимо широкого распространения в речных и морских водоемах, присутствие смоляных кислот зарегистрировано (до 8 мкг/м<sup>3</sup>) в воздухе рабочих зон лесопильных предприятий в виде распыляемых частиц (Teschke *et al.*, 1999). По результатам анализа дыма от сгорания хвойной древесины, в составе взвешенных мелких (2,5 мкм) твердых частиц зарегистрировано присутствие ДАК, АК, ПК, ИПК и их оксо- и гидроксипроизводных. При этом из всей массы обнаруженных веществ (алифатические и ароматические углеводороды, спирты, кислоты, фенолы) ДАК обнаруживалась в наибольшей концентрации (23,8 мкг/г экстракта) (Simoneit *et al.*, 2000).

Существуют данные о миграции смоляных кислот в продукты питания из канифоли, бумаги или картона (Ozaki *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2014a;

Таблица 4 – Биоаккумуляция смоляных кислот в органах рыб

Объекты исследования	Концентрация	Условия	Ссылка
Перуанский паралихт <i>Paralychtyx adspersus</i> Малоглазый паралихт <i>P. microps</i>			
Желчь	30,5–41,9 мкг/г общее содержание смоляных кислот	Выловлены вблизи места сброса сточных вод ЦБК.	Hernández <i>et al.</i> , 2008
Радужная форель <i>Oncorhynchus mykiss</i>			
Желчь	< 200 мкг/г ДАК.	Через 57 сут экспозиции со стоками ЦБК.	Lindesjö <i>et al.</i> , 2002
Плазма крови	155–318 мкг/г ДАК.	После 4 сут экспозиции в воде с ДАК 1,2 мг/л.	Oikari <i>et al.</i> , 1982
Печень	98–103 мкг/г ДАК.	После 4 сут экспозиции с ДАК 1,2 мг/л.	Oikari <i>et al.</i> , 1982
	202–351 мкг/г общее содержание смоляных кислот.	После 2 сут экспозиции в воде с 1,4 мг/л смеси смоляных кислот.	Oikari <i>et al.</i> , 1982
Почки	47–114 мкг/г ДАК.	После 4 сут экспозиции с ДАК 1,2 мкг/л.	Oikari <i>et al.</i> , 1982
	72–115 мкг/г общее содержание смоляных кислот.	После 2 сут экспозиции в воде с 1,4 мг/л смеси смоляных кислот.	Oikari <i>et al.</i> , 1982

Zhu *et al.*, 2014b). В настоящее время в стоматологии в качестве компонентов пародонтальных повязок и цементов, а также для герметизации корневых каналов используется канифоль, состоящая более чем на 70 % из смоляных кислот (Sunzel *et al.*, 1997). Следует отметить, что многие смоляные кислоты устойчивы к внешним факторам окружающей среды. Например, ДАК сохраняется в компосте сосновой коры в течение 12 месяцев (Тарабанько и др., 2010).

Благодаря повсеместному распространению, смоляные кислоты могут оказывать воздействие не только на водную фауну, но и человека. Для смеси индивидуальных смоляных кислот характерна высокая (в зависимости от концентрации) цитотоксичность по отношению к эпителиальным клеткам, полиморфноядерным лейкоцитам и фибробластам десен человека (Söderberg *et al.*, 1996; Sunzel *et al.*, 1997). Есть данные о воздействии смоляных кислот, которое может провоцировать развитие у работников деревоперерабатывающих производств развитие астмы и хронических заболеваний легких. Смоляные кислоты вызывают лизис альвеолярных эпителиальных клеток (Ayars *et al.*, 1989). Несмотря на явное токсическое влияние на организм человека, отдельные смоляные кислоты потенциально могут быть использованы для разработки лекарственных средств, поскольку они обладают антиатеросклеротической (Suh *et al.*, 2012), противовоспалительной (Kang *et al.*, 2008), противодиабетической (Kang *et al.*, 2009), противоязвенной (Wada *et al.*, 1985) и противоопухолевой (Huang *et al.*, 2013) активностью.

## 1.2. Биодеструкция смоляных кислот

Биологическая очистка сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности традиционно основывается на методах, успешно используемых для переработки бытовых сточных вод. Различают аэробную и анаэробную биоочистку. Аэробные процессы с использованием аэрированных лагун и систем с активным илом являются основными инструментами, с помощью которых природные микроорганизмы полностью деградируют органический материал до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  либо превращают его в экологически безопасные вещества. По данным некоторых авторов (McFarlane, Clark, 1988; Stuthridge *et al.*, 1991; Belmonte *et al.*,

2005), применение активного ила и аэрируемых лагун позволяет снизить уровень абиетановых смоляных кислот в стоках ЦБК на 90 %. При этом утилизация кислот пимаранового типа менее продуктивна, она составляет не более 60 %.

Общепринято, что большая часть смоляных кислот может быть удалена вышеупомянутыми системами биологической очистки. Вместе с тем, изменение состава сточных компонентов, доступность питательных веществ и состояние микробного сообщества влияют на эффективность системы очистки и в ряде случаев могут привести к выбросу, наоборот, более токсичных и устойчивых соединений в окружающую среду (Liss, Allen, 1992; Liss *et al.*, 1997). Для предотвращения подобных нарушений необходимо детальное исследование состава микробного сообщества и роли каждого отдельного вида микроорганизма в системах биоочистки.

Благодаря широкому распространению смоляных кислот в природе, в период с 70-х годов прошлого столетия по настоящее время, биodeградирующая активность в отношении этих экотоксикантов обнаружена в различных образцах из речных водоемов (Hemingway, Greaves 1973), систем биологической очистки (Bicho *et al.*, 1995; Morgan, Wyndham, 1996), лесных, сельскохозяйственных и арктических почв (Mohn *et al.*, 1999a; Yu *et al.*, 2000). Это позволило выделить большое количество чистых культур биодеструкторов – представителей бактерий и грибов. Большинство аэробных бактериальных изолятов могут использовать смоляные кислоты в качестве единственного источника углерода, однако существуют данные о бактериях, трансформирующих смоляные кислоты, но не растущих на них. Примером таких бактериальных культур могут служить протеобактерии, выделенные из компоста группой канадских ученых (Yu, Mohn, 1999). Грибные культуры, как правило, не используют смоляные кислоты в качестве источника углерода, а трансформируют их в гидроксипроизводные.

Биоразнообразие микробных биодеструкторов смоляных кислот представлено в основном протеобактериями  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -подклассов (таблица 5).

Таблица 5 – Микроорганизмы-биодеструкторы смоляных кислот

Вид, род	Субстрат	Ссылка
<i>Alcaligenes</i> sp. D11-13	ДАК	Morgan, Wyndham, 1996
<i>Bacillus psychrophilus</i>	ДАК	Côté, Otis, 1989
<i>Burkholderia cepacia</i> F45L5	ДАК, АК, ИПК	Lindberg <i>et al.</i> , 2001
<i>Burkholderia</i> sp. DhA-54	ДАК	Mohn <i>et al.</i> , 1999b
<i>Burkholderia</i> sp. IpA-51	ИПК	Mohn <i>et al.</i> , 1999b
“ <i>Flavobacterium resinovorum</i> ” ( <i>Novospingobium resinovorum</i> )*	ДАК	Biellmann, Branlant, 1973
<i>Mycobacterium</i> sp. DhA-55	ДАК	Mohn <i>et al.</i> , 1999a
<i>Mycobacterium</i> sp. IpA-13	ИПК	Wilson <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas abietaniphila</i> ВКМЕ-9	ДАК, АК	Bicho <i>et al.</i> , 1996
<i>P. fluorescens</i> NRRL B21432	Смесь смоляных кислот	Burnes <i>et al.</i> , 2000
<i>P. marginalis</i> E-001624	Смесь смоляных кислот	Kallioinen <i>et al.</i> , 2003
<i>P. mohnii</i> IpA-2 <sup>T</sup>	ИПК	Cámara <i>et al.</i> , 2007
<i>P. moorei</i> RW10 <sup>T</sup>	ИПК	Cámara <i>et al.</i> , 2007
“ <i>Pseudomonas multiresinivorans</i> ” ( <i>P. nitroductent</i> )* IpA-1	ИПК	Wilson <i>et al.</i> , 1996
<i>P. reinekei</i> Mt1	ИПК	Cámara <i>et al.</i> , 2007
<i>P. resinovorans</i>	ДАК	Biellmann <i>et al.</i> , 1968
<i>Pseudomonas</i> sp. A19-6a	АК	Morgan, Wyndham, 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. DhA-92	ДАК	Yu <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas</i> sp. IpA-2	ИПК	Wilson <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. IpA-93	ИПК	Yu <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas</i> sp. IpA-95	ИПК	Yu <i>et al.</i> , 2000
<i>P. vancouverensis</i> Dha-51	ДАК	Mohn <i>et al.</i> , 1999b
<i>Ralstonia</i> sp. ВКМЕ-6	ДАК	Bicho <i>et al.</i> , 1995
<i>Serratia marcescens</i> NRRL B21429	Смесь смоляных кислот	Burnes <i>et al.</i> , 2000
<i>Sphingomonas</i> sp. DhA-33	ДАК	Mohn <i>et al.</i> , 1995, 1999a
<i>Sphingomonas</i> sp. DhA-95	ДАК	Yu <i>et al.</i> , 2000
<i>Xanthomonas campestris</i> NRRL B21430	Смесь смоляных кислот	Burnes <i>et al.</i> , 2000
<i>Zoogloea ramigera</i> DhA-35	ДАК	Mohn, 1995
$\beta$ - <i>Proteobacterium</i> DhA-71	ДАК	Yu, Mohn, 1999
$\beta$ - <i>Proteobacterium</i> DhA-73	ДАК	Yu, Mohn, 1999

Примечание. \*Невалидные виды или устаревшие названия таксонов бактерий (согласно существующим правилам) приведены прямым шрифтом и в кавычках. В скобках приведены современные названия таксонов (если таковые имеются).

Данные об использовании грамположительных бактерий для биодеструкции смоляных кислот единичны.

Первые сведения об аэробной бактериальной деструкции смоляных кислот на примере ДАК с использованием “*F. resinovorum*” (Biellmann, Branlant, 1973), *Alcaligenes* sp. и *Pseudomonas* sp. (Biellmann *et al.*, 1973) приведены в 1973 г. При этом пути деструкции предложены на основании промежуточных метаболитов, выделенных из среды культивирования бактерий с применением ингибиторов оксигеназных ферментных систем. Позднее (Martin, Mohn, 1999, 2000; Morgan, Wyndham, 2002) был предложен общий путь деструкции ДАК (рисунок 2) на основании молекулярно-генетических исследований штаммов *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 и *P. diterpeniphila* А19-6а – биодеструкторов абиетановых смоляных кислот, выделенных из сточных вод ЦБК. При этом результаты проведенных генетических исследований полностью совпадали с результатами, полученными ранее (Biellmann *et al.*, 1973).

По данным J. Biellmann, G. Branlant (1973), первый этап биодеструкции включает С-7 гидрокселирование ДАК (путь А) или С-3 окисление с последующим декарбоксилированием до 3-оксо-4-норметилдегидроабиетина **9** (путь Б). Одновременное обнаружение в культуральной среде “*F. resinovorum*” соединений **1** и **9** не позволяет судить о направлении первичной окислительной реакции по С-3 или С-7 положению. В связи с этим предложено два альтернативных пути образования продукта **6** (Biellmann, Branlant 1973). В пользу направления А свидетельствует обнаружение диоксигеназного ферментного комплекса DitA *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 (Martin, Mohn 1999), который катализирует образование 7-оксо-11,12-дигидрокси-8,13-абиетадиеновой кислоты **3** из 7-оксопроизводного **2**. Предположительно ароматизацией диола **3** посредством 11,12-дегидрирования получен 7-оксо-11,12-диол **4**, последующее С-3 окисление и декарбоксилирование которого приводит к образованию продукта **6** (Biellmann, Branlant, 1973; Biellmann *et al.*, 1973). Идентификация диоксигеназы процесса *мета*-расщепления (DitC) дитерпеноидов *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 и

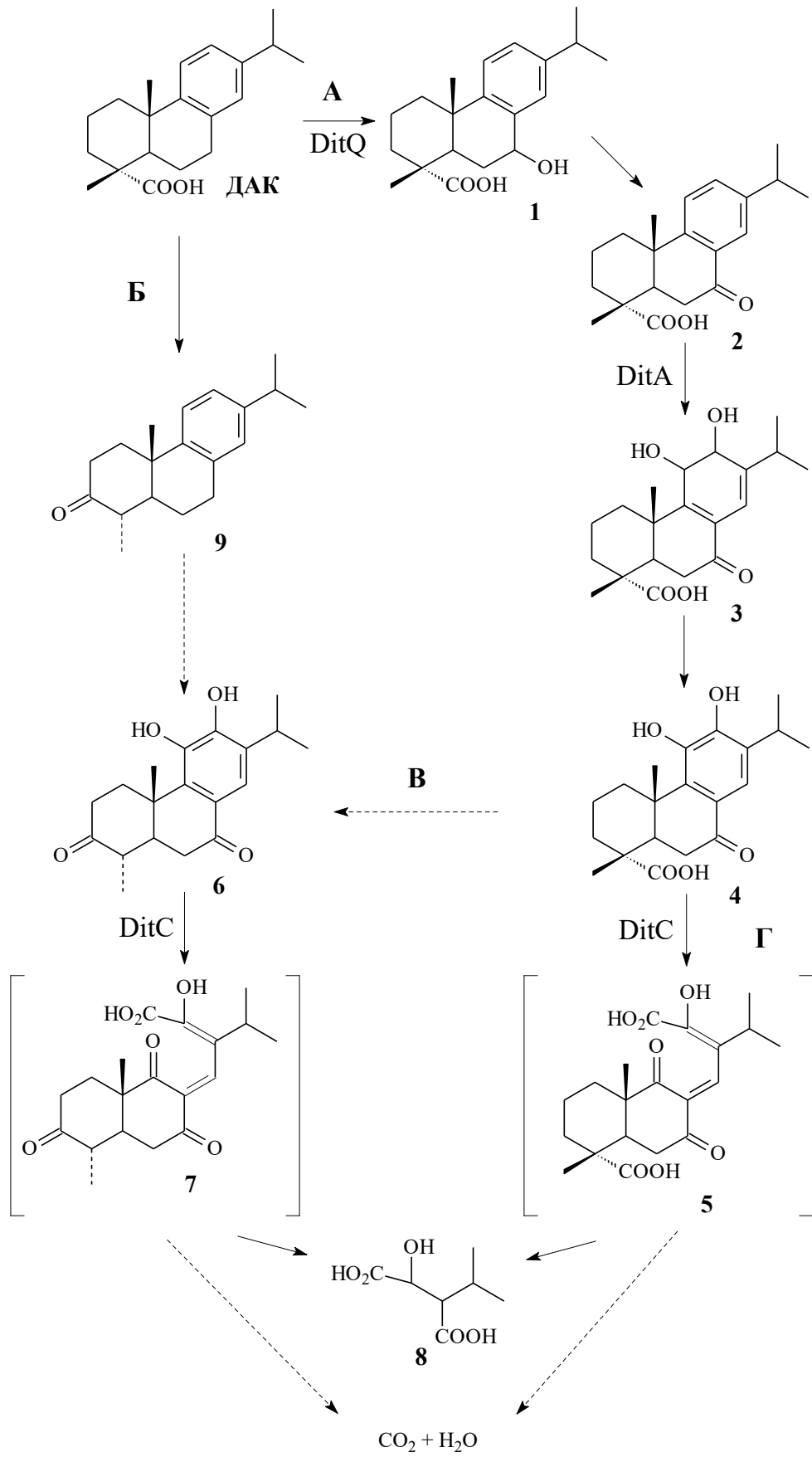


Рисунок 2 – Предполагаемый биохимический путь деградации смоляных кислот абиеганового типа (цит. по Martin *et al.*, 1999).

выделение 2-изопропил-яблочной кислоты **8** предполагает, что дальнейшая деструкция диолов **4** и **6** может протекать посредством расщепления ароматического кольца через формирование возможных интермедиатов **5** и **7** (Martin *et al.*, 1999; Martin, Mohn, 2000). Авторы (Martin *et al.*, 1999) предлагают, что общий путь биодеструкции ДАК в некоторой степени аналогичен начальным путям бактериальной деструкции полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) (рисунок 3).

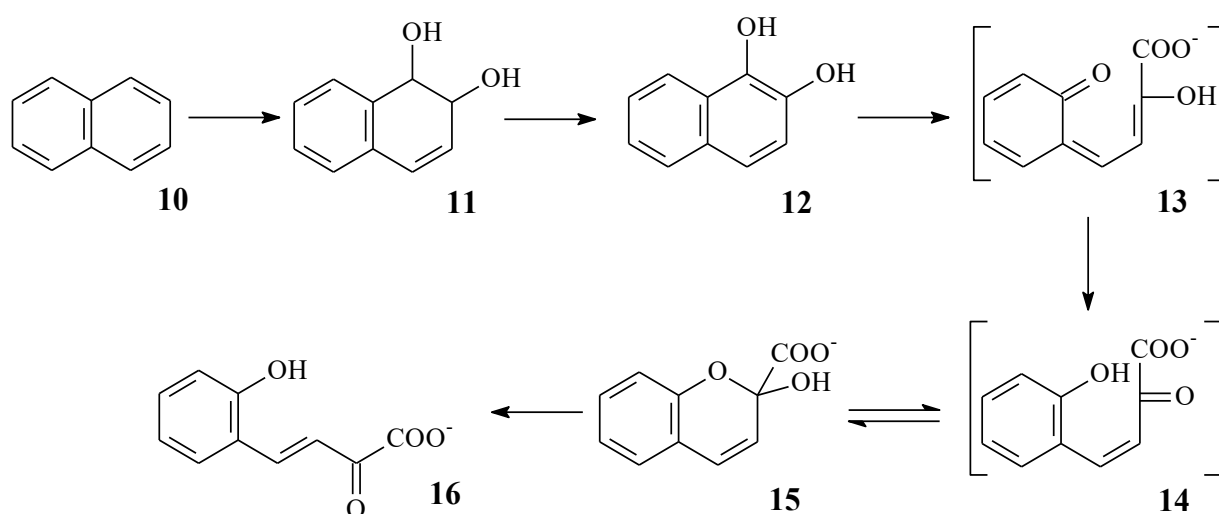


Рисунок 3 – Бактериальная деструкция ПАУ на примере нафталина (*цит.* по Eaton, Chapman, 1992).

На примере нафталина **10** показано (Eaton, Chapman, 1992), что первоначально бактериальная диоксигеназа катализирует образование дигидродиола **11**, ароматизация которого посредством дегидрогеназы приводит к 1,2-дигидрокси нафталину **12**. Дальнейшее расщепление диола **12** протекает с образованием нестабильных соединений **13**, **14** и гемикетала **15**. Последний спонтанно или ферментативно изомеризуется до *транс-о*-гидроксибензилиденпирувата **16**. Если предположить, что биодеструкция ДАК протекает аналогично ПАУ через промежуточный гемикеталь, становится явным, почему соединения **5** и **7** не обнаруживаются среди продуктов биodeградации (Martin *et al.*, 1999).



Проводимые с начала 90-х годов исследования субстратной специфичности бактерий-деструкторов смоляных кислот показали, что способность изолятов использовать ДАК в качестве единственного источника углерода совпадает с их способностью расти на любых абиетановых производных (Bicho *et al.*, 1995; Mohn, 1995). Ранее предполагалось, что абиетаны метаболизируются через ДАК. Однако позднее с использованием мутантных штаммов *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 было показано, что мутация по гену *ditQ* ограничивает рост псевдомонад в присутствии ДАК, но мало влияет на деструкцию неароматических кислот типа АК и ПаК (Martin, Mohn, 1999; Smith *et al.*, 2004). На основании проведенных молекулярно-генетических исследований биодеструкторов *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 (Martin, Mohn, 1999, 2000) и *B. xenovorans* LB400 (Smith *et al.*, 2008) предложен общий конвергентный путь биодegradации абиетановых смоляных кислот, который сводится к образованию интермедиата **2** (рисунок 4).

Предположительно, первый этап биодеструкции АК включает окисление до 7,8-эпокси-АК-интермедиата **17** (путь **А**), который перегруппировывается в 7-оксо-ПаК **19** с раскрытием оксиранового кольца (Martin, Mohn, 1999, 2000; Smith *et al.*, 2004, 2007, 2008). Этот механизм объясняет обнаружение соединения **19** в среде культивирования *B. xenovorans* LB400 при деструкции АК (Smith *et al.*, 2008). Накопление 7-оксо-ДАК **2** в среде деструкции АК, возможно, происходит за счет ароматизации 7-оксо-ПаК **19** с образованием 7-оксо-ДАК **2** (Smith *et al.*, 2008). Минерализация ПаК осуществляется по двум альтернативным путям: через С-7 гидроксирование (соединение **18**) и последующее образование 7-оксо-производного **19** (путь **Б**) или через ключевую стадию ароматизации до ДАК (путь **В**) (Martin, Mohn, 1999, 2000; Smith *et al.*, 2004, 2007, 2008). Путь **Б** согласуется с результатами D. Smith с соавт. (2008), согласно которым зарегистрировано образование 7-оксо-ПаК **19** в среде культивирования штамма *B. xenovorans* LB400, инкубируемого с ПаК. Таким образом, 7-оксо-ПаК **19** является точкой пересечения метаболизма АК и ПаК, а 7-оксо-ДАК **2** – всех абиетановых смоляных кислот.

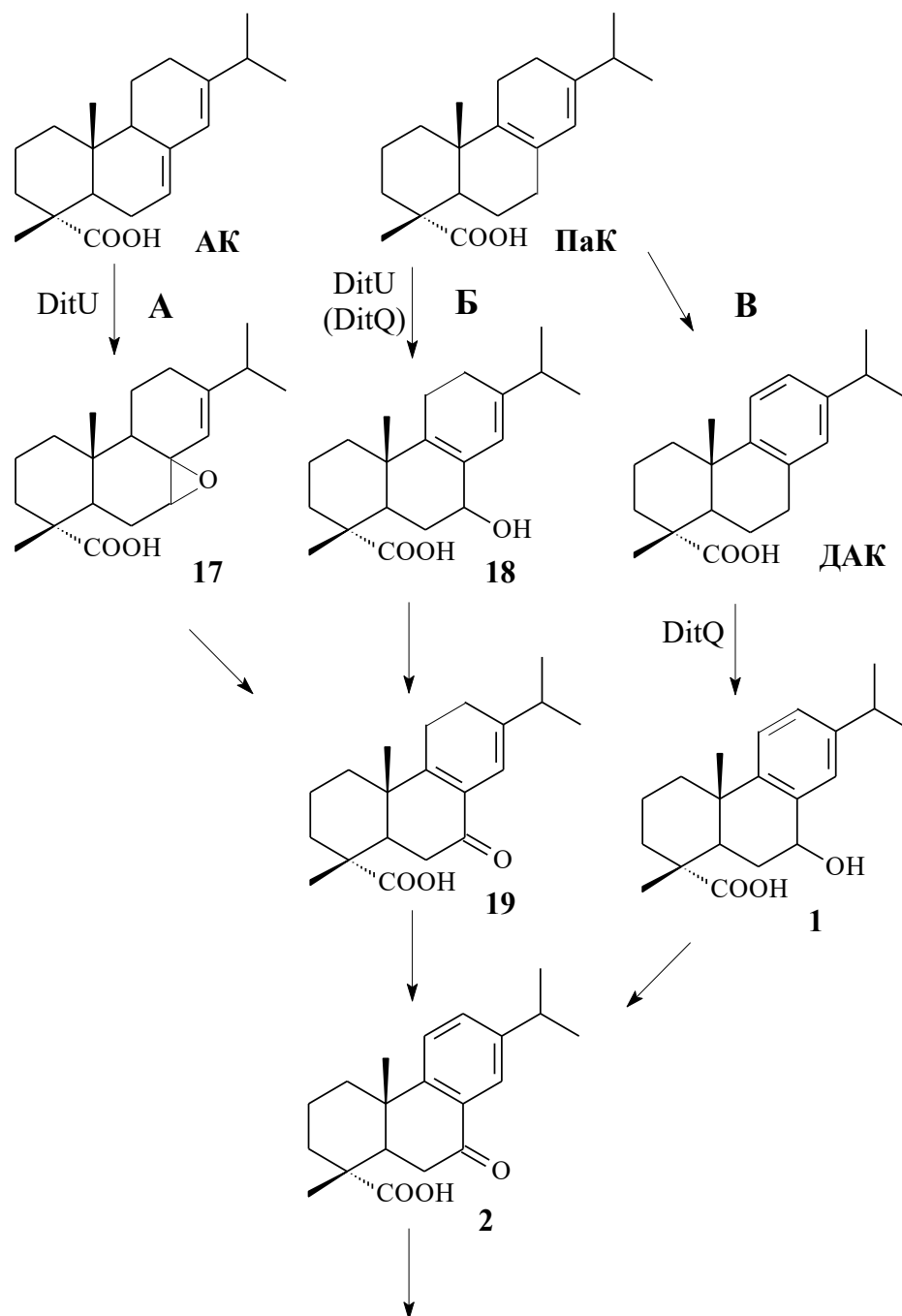


Рисунок 4 – Предполагаемый конвергентный путь биодеструкции смоляных кислот абиеганового типа (цит. по Martin, Mohn, 2000; Smith *et al.*, 2008).

Данные о путях биодеструкции смоляных кислот типа пимарана единичны. Известно, что аэробные грамотрицательные бактерии, растущие на абиеганах, не могут использовать пимарановые кислоты в качестве источника углерода. Изоляты, растущие на пимаранах, способны утилизировать как пимарановые, так и абиегановые кислоты (Bicho *et al.*, 1995; Mohn, 1995; Wilson *et al.*, 1996). По-

видимому, решающую роль в определении путей биодеструкции смоляных кислот играет наличие или отсутствие изопропильной группы в молекуле данного класса соединений (Martin *et al.*, 1999). Показано (Wilson *et al.*, 1996), что изоляты *Pseudomonas* sp. IpA-1 и IpA-2, полученные из накопительной культуры, выращенной в присутствии ИПК, проявляли разную деградирующую активность в отношении абиетанов. Для эффективной утилизации абиетанов клетками *Pseudomonas* sp. IpA-1 необходимо присутствие ИПК, в то время как штамм IpA-2 способен к использованию абиетанов в качестве единственного источника углерода.

Вышеприведенные примеры деструкции смоляных кислот разных типов описаны главным образом для аэробных микроорганизмов. В бескислородных условиях смоляные кислоты могут быть биотрансформированы, однако нет убедительных доказательств полной деградации их углеродного остова. В работе (Mohn *et al.*, 1999a) показано, что смоляные кислоты в анаэробных условиях трудно деградируются. При этом чистые анаэробные культуры, способные использовать смоляные кислоты в качестве источника углерода, пока не выделены. Несмотря на значительные трудности деструкции смоляных кислот в анаэробных условиях, в 1997 г. группой новозеландских ученых под руководством доктора М. Tavendale (1997a,b) было проведено масштабное исследование биотрансформации ДАК, АК и ПК в анаэробных условиях до нейтральных метаболитов и впервые описаны пути их бескислородной биоконверсии. После 264 сут инкубирования смоляных кислот с анаэробными донными отложениями выделено несколько соединений, структура которых позволила составить предположительный путь анаэробного метаболизма АК, ДАК и ИПК (рисунок 5). В качестве основных продуктов анаэробной биодеструкции ДАК зарегистрированы 20-норметилдегидроабиетан **20** и тетрагидроретен **21**. Предположительно тетрагидроретен **21** образуется альтернативными путями через ароматизацию кольца В 20-норметилдегидроабиетана **20** или путем декарбоксилирования абиета-4(10),6,8(9),11,13-пентаеновой кислоты **22**. Тетрагидроретен **21** в небольшом

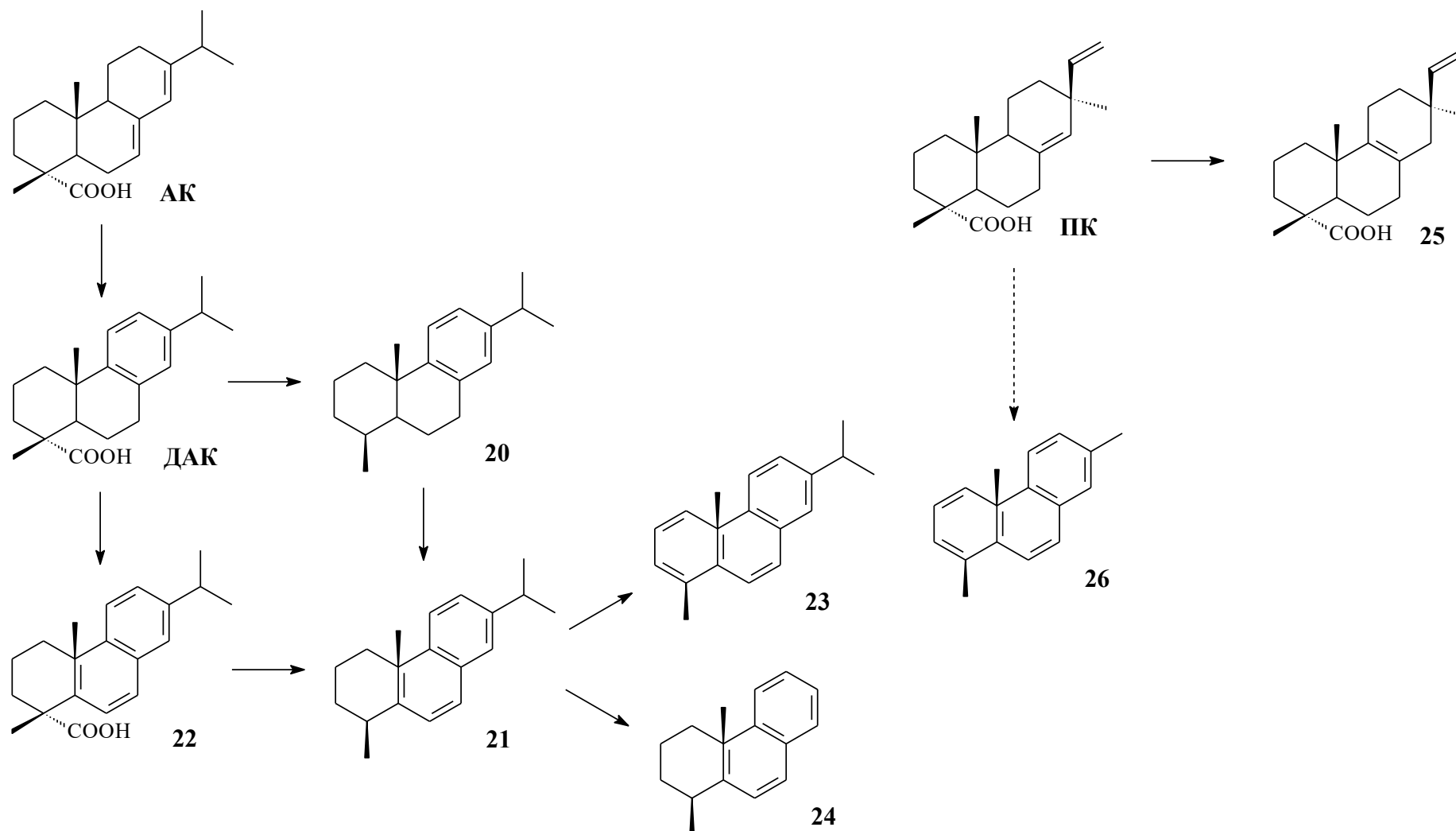


Рисунок 5 – Предположительные анаэробные пути биотрансформации абиединовой, дегидроабиединовой и пимаровой кислот (цит. по Wakeham *et al.*, 1980; Tavendale *et al.*, 1997a,b; Martin *et al.*, 1999).

количестве преобразуется в ретен **23** и метилтетрагидрофенантрен **24**. Отмечена также деструкция АК в анаэробных условиях. Однако природа данного процесса неоднозначна (биотический или абиотический характер), поскольку снижение концентрации АК в контрольных экспериментах имело аналогичный характер (Tavendale *et al.*, 1997a, 1997b). Что касается смоляных кислот пимаранового ряда, то их деструкция в бескислородных условиях малопонятна. Обнаружено незначительное повышение концентрации пимар-8-еновой кислоты **25**. Возможно, анаэробный биокатализ пимарановых кислот протекает аналогично абиетановым с образованием пимантрена **26** в многоэтапном процессе (Wakeham *et al.*, 1980; McFarlane, Clark, *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1999).

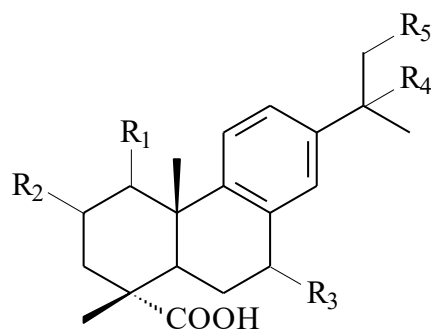
Следует отметить, что полномасштабные процессы анаэробной обработки широко не применяются для очистки сточных вод от смоляных кислот. Помимо довольно большой затраты времени, использование замкнутой системы приводит к концентрированию сточных вод. При этом смоляные кислоты в высоких концентрациях оказывают ингибирующее воздействие на ферментные системы анаэробных микроорганизмов (Liss *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2016).

### **1.3. Биотрансформация смоляных кислот для получения биоактивных соединений**

Наряду с поиском технологий утилизации токсичных смоляных кислот, перспективна разработка методов получения на их основе новых соединений с биологической активностью. В настоящее время описаны производные смоляных кислот с разнообразным фармакологическим действием: противоязвенным (Wada *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 2014), противомикробным (Savluchinske-Feio *et al.*, 2006), фунгицидным (Savluchinske-Feio *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010), анксиолитическим (Tolmacheva *et al.*, 2006), противовирусным (Tagat *et al.*, 1994; González *et al.*, 2010), противоопухолевым (González *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013). Кроме того, производные смоляных кислот могут использоваться в качестве интермедиатов в синтезе биологически активных соединений (González, 2015). Для получения новых производных с биологическими свойствами используют различные приемы, в частности химическую трансформацию. Однако

методы химического синтеза требуют применения дорогостоящих катализаторов и введения защитных групп реакционно-активных функциональных центров молекулы. Известные химические превращения смоляных кислот, как правило, включают набор классических трансформаций по кольцу **B** и **C** (González, 2015), поскольку осуществлять регио- и стереоселективные реакции по кольцу **A** химическими методами весьма затруднительно. Альтернативным подходом к структурной модификации природных соединений, в том числе и смоляных кислот, является микробная биотрансформация, которая не требует применения агрессивных реагентов, процесс протекает в одну технологическую стадию, с высокой степенью регио- и стереоселективности (Loughlin, 2000; Huang *et al.*, 2012). Применение ингибиторов ферментных систем позволило получить некоторые интермедиаты процесса микробной биодеструкции смоляных кислот с выраженной биологической активностью. Например, 7-гидрокси-ДАК **1** проявляет антимикробное, фунгицидное и селективное противоопухолевое действие (Gouiric *et al.*, 2004; Savluchinske-Feio *et al.*, 2006, 2007; Yang *et al.*, 2010; Ozsen *et al.*, 2017). Использование приема направленной микробной трансформации дает возможность получать новые продукты, нехарактерные для предложенных ранее путей биодеструкции смоляных кислот.

Многочисленные примеры биоконверсии смоляных кислот абиетанового ряда описаны с применением грибных культур. Как правило, грибы модифицируют молекулу субстрата путем гидроксирования. При этом гидроксильные группы могут быть введены в различные положения молекулы. В случае смоляных кислот наиболее часто регистрируется реакция гидроксирования по C-1, C-2, C-7, C-15 и C-16 атомам углерода. В качестве субстратов для направленной грибной трансформации, как правило, используют ДАК и АК.



**27:** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>4</sub>= R<sub>5</sub>= H

**28:** R<sub>2</sub>= OH, R<sub>1</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>4</sub>= R<sub>5</sub>= H

**29:** R<sub>4</sub>= OH, R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>5</sub>= H

**30:** R<sub>5</sub>= OH, R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>4</sub>= H

**31:** R<sub>1</sub>= R<sub>3</sub>= OH, R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub>= R<sub>5</sub>= H

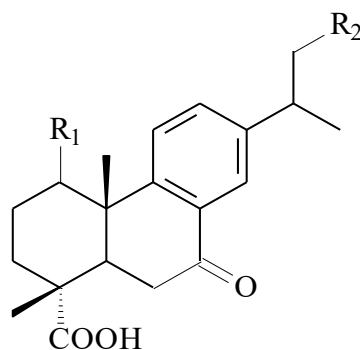
**32:** R<sub>1</sub>= R<sub>5</sub>= OH, R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>4</sub>= H

**33:** R<sub>1</sub>= R<sub>4</sub>= OH, R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>5</sub>= H

**34:** R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub>= OH, R<sub>1</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>5</sub>= H

**35:** R<sub>3</sub>= R<sub>5</sub>= OH, R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub>= H

**36:** R<sub>1</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>5</sub>= OH, R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub>= H



**37:** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= H

**38:** R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= OH

В таблице 6 приведены примеры моногидроксипроизводных с биологической активностью, полученных с помощью применения грибных культур. Грибы могут трансформировать смоляные кислоты в ди- и тригидроксипроизводные по вышеуказанным положениям. Так, среди продуктов биотрансформации ДАК с использованием клеток *Aspergillus niger* и *Phlebiopsis gigantea* наряду с 1-гидрокси- **27** и 7-гидрокси-ДАК **1** зарегистрировано 1,7-дигидрокси-производное **31**, которое проявляет антимикробную активность (Gouiric *et al.*, 2004; van Beek *et al.*, 2007). Использование клеток *M. isabellina* обеспечивает гидроксילирование ДАК с образованием 1,16-дигидрокси- **32** и 2,15-дигидрокси-ДАК **34** (Kutney *et al.*, 1985, 1988). Большое разнообразие ди- и

Таблица 6 – Продукты грибной биотрансформации абietenовых смоляных кислот и их биологическая активность

Соединение	Биологическая активность	Биокатализатор	Авторы
1- гидрокси-ДАК (27)	Антимикробная, ингибирующая активность в отношении $\alpha$ -глюкозидаз	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cephalosporium aphidicola</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Phlebiopsis gigantea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Tapia <i>et al.</i> , 1997 van Beek <i>et al.</i> , 2007 Choudhary <i>et al.</i> , 2014 Gouiric <i>et al.</i> , 2004 Ozsen <i>et al.</i> , 2017
2-гидрокси-ДАК (28)	Антимикробная, селективная противоопухолевая	<i>Mortierella isabellina</i> , <i>Mucor ramannianus</i>	Kutney <i>et al.</i> , 1985 Ozsen <i>et al.</i> , 2017
7-гидрокси-ДАК (1)	Антимикробная, фунгицидная, селективная противоопухолевая	<i>A. niger</i> , <i>N. crassa</i>	Gouiric <i>et al.</i> , 2004 Savluchinske-Feio <i>et al.</i> , 2006, 2007 Yang <i>et al.</i> , 2010 Ozsen <i>et al.</i> , 2017
15-гидрокси-ДАК (29)	Противовоспалительная. Интермедиат синтеза противовирусных и противоопухолевых соединений	<i>C. aphidicola</i> , <i>C. elegans</i> , <i>G. fujkuroi</i> , <i>M. isabellina</i> , <i>R. stolonifer</i>	Kutney <i>et al.</i> , 1985 Choudhary <i>et al.</i> , 2014 González, 2015
16-гидрокси-ДАК (30)	Антимикробная	<i>C. aphidicola</i> , <i>C. elegans</i> , <i>G. fujkuroi</i> , <i>R. stolonifer</i>	Choudhary <i>et al.</i> , 2014



тригидроксипроизводных (соединения **32**, **33**, **35**, **36**) ДАК обнаружено в среде трансформации *Phlebiopsis gigantea* и *Trametes versicolor* (van Beek *et al.*, 2007). Помимо гидроксирования ДАК клетками *P. gigantea* и *T. versicolor* отмечена трансформация ДАК в 7-оксо-производные: 1-гидрокси-7-оксо-ДАК **37** и 1,16-дигидрокси-7-оксо-ДАК **38** (van Beek *et al.*, 2007).

Примеры направленной грибной трансформации смоляных кислот пимаранового ряда немногочисленны, поскольку ПК и ИПК являются труднодоступными субстратами для микроорганизмов. Известно лишь несколько работ по биоконверсии ИПК с использованием клеток *M. isabellina* (Kutney *et al.*, 1982, 1988) (рисунок 6).

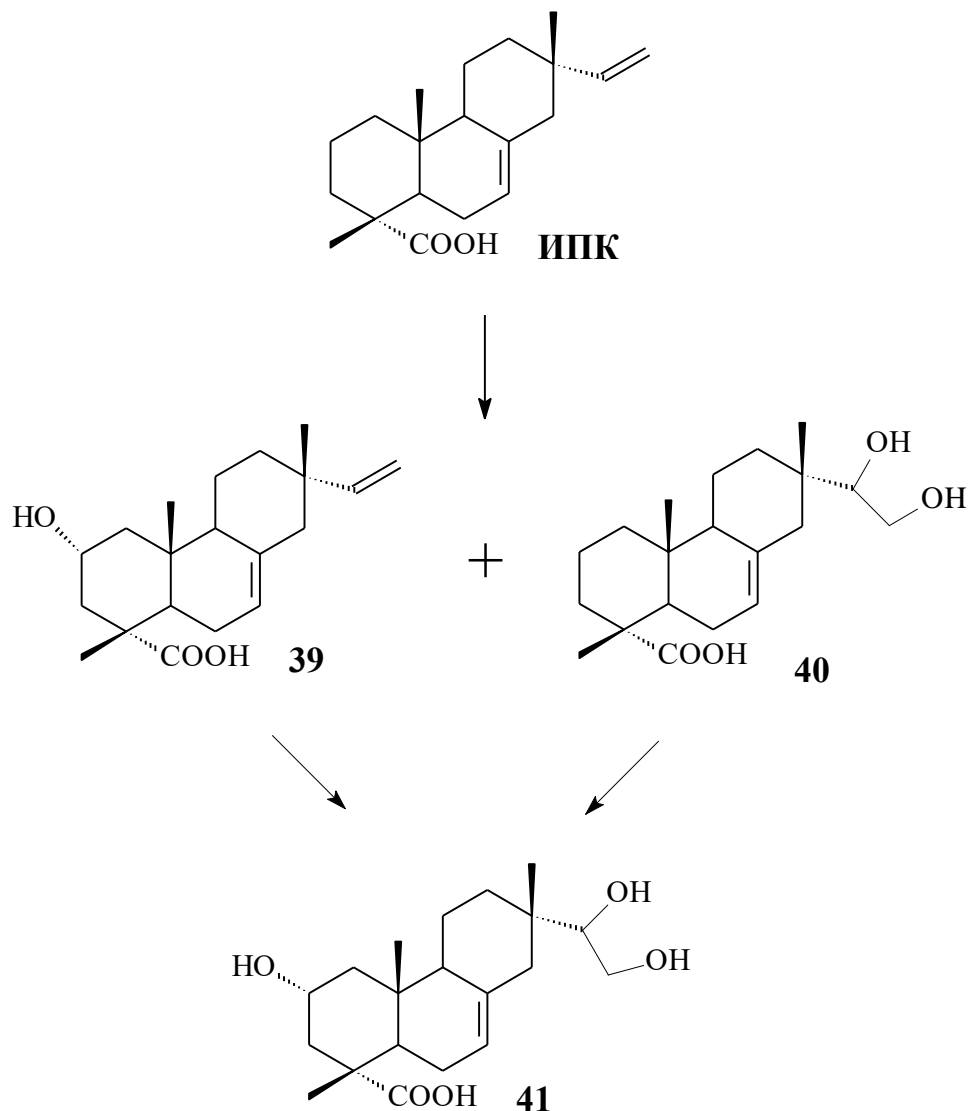
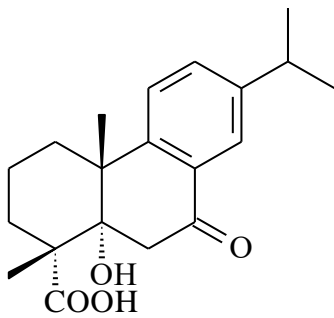


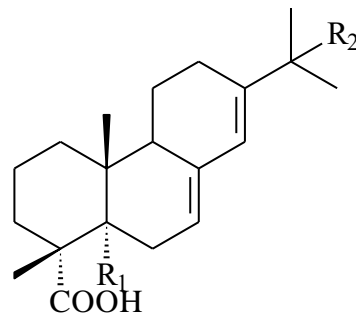
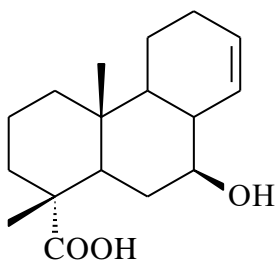
Рисунок 6 – Возможные пути биоконверсии ИПК с использованием клеток *M. isabellina* (цит. по Kutney *et al.*, 1982, 1988).

Авторы предполагают, что биотрансформация ИПК протекает путем С-2 гидроксирования (39) или С-15 и С-16 дигидроксилирования (40), при этом процессы не зависят друг от друга. Образование тригидроксипроизводного 41 возможно как из 2-гидрокси-ИПК 39, так и из 15,16-дигидрокси-ИПК 40.

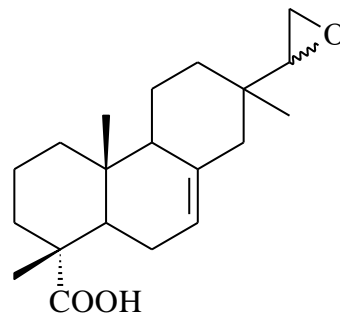
Направленная биотрансформация абиетановых смоляных кислот бактериальными клетками в соединения, нехарактерных для описанных выше путей биодеструкции (рисунок 2, 4), изучена в меньшей степени. Например, с использованием клеток *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp. и *Pseudomonas* sp. с модифицированным участком гена *ditA1* в процессе трансформации ДАК в среде культивирования накапливаются 7-оксо- 2 и 5 $\alpha$ -гидрокси-7-оксо-ДАК 42 (Witzig *et al.*, 2007). Бактерии рода *Alcaligenes* способны трансформировать АК в 5 $\alpha$ -гидрокси-АК 43 и 7 $\beta$ -гидрокси-абиета-13-еновую кислоту 45 (Cross, Myers, 1968).



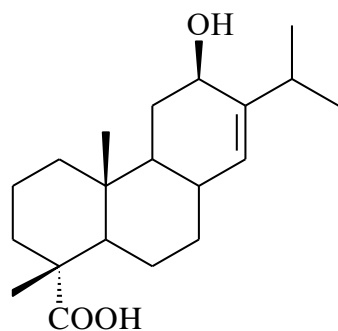
42

43: R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub> = H44: R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub> = OH

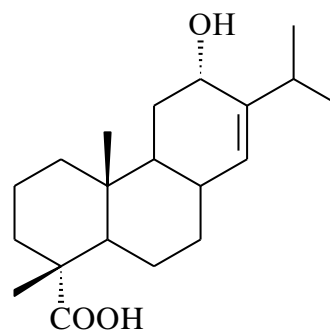
45



46



47



48

Для деградации и трансформации смоляных кислот нередко используются наряду с целыми бактериальными клетками ферментативные комплексы. Для их получения, как правило, используют модифицированные (путем генетической трансформации или клонирования генов) клетки *Escherichia coli* с высокой продуктивностью ферментов. В литературе описаны цитохром-зависимые ферменты бактериального происхождения – CYP105A1 и CYP106A2, специфичные в отношении смоляных кислот (Bleif *et al.*, 2011; Janocha, 2013; Janocha *et al.*, 2013). Так, CYP105A1 из *Streptomyces griseolus* катализируют образование 15-гидроксипроизводных **29** и **44** на основе ДАК, АК, а также 15,16-эпокси-изопимаровой кислоты **46** из ИПК (Janocha *et al.*, 2013). 12-Гидроксипроизводные **47** и **48** зарегистрированы в реакционной среде в присутствии АК с ферментами CYP106A2, выделенными из клеток *Bacillus megaterium* (Bleif *et al.*, 2011). Ферментные системы катализируют определенный тип реакций, что позволяет контролировать процесс биотрансформации. Однако данный метод требует значительных затрат времени и средств на выделение ферментов в чистом виде.

Следует особо отметить, что в исследованиях по биодеструкции и биотрансформации смоляных кислот, как правило, используются смоляные кислоты в концентрациях до 250 мг/л (Biellmann, Branlant, 1973; Biellmann *et al.*, 1973; Martin, Mohn, 2000; Mohn, 2001; Muttray *et al.*, 2001; Yu, Mohn, 2002). В то время как в сточных водах они могут находиться в концентрации, превышающей это значение (500 мг/л и более, в частности) (Liss *et al.*, 1997). Доминирующей смоляной кислотой в стоках ЦБК, речных и морских водоемах является ДАК. При

этом биодеструкторы смоляных кислот (в том числе ДАК) представлены, в основном, граммотрицательными протеобактериями  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -подклассов, использование которых потенциально опасно ввиду их возможной патогенности. Применение грибных культур, способных осуществлять широкий круг реакций, также предполагает определенные риски в связи с характером их посевного (спорового) материала и способности к синтезу микотоксинов. В связи с этим остается актуальным дальнейший поиск устойчивых и эффективных биокатализаторов процессов биодеструкции смоляных кислот в высоких концентрациях.

#### 1.4. Актинобактерии как потенциальные биодеструкторы смоляных кислот

Сравнительно новым объектом промышленного использования являются актинобактерии, характеризующиеся наличием полифункциональных ферментных систем и присутствием в составе клеточной стенки миколовых кислот. Наличие миколовых кислот, представляющих собой  $\alpha$ -разветвленные  $\beta$ -гидроксилированные жирные кислоты, является уникальной биохимической особенностью актинобактерий. Данные соединения придают клеточной стенке липофильный характер и, как следствие, высокое сродство к углеводородным субстратам (Ившина, 2014). Актинобактерии обнаруживаются в различных природных и антропогенных местах обитания (Warnecke, 2004).

Актинобактерии подпорядка *Corynebacterineae*, содержащие миколовые кислоты, представлены 12 родами. Члены данного таксона имеют много общих свойств, образуют четкую филогенетическую линию в дереве генов 16S рРНК и могут быть отнесены к семи семействам на основе сочетания генотипических и фенотипических признаков (Koerner *et al.*, 2009). В биотопах с повышенным содержанием ксенобиотиков, нефтеполлютантов, а также тяжелых металлов, доминирующее положение занимают актинобактерии родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* (Ившина, 2012).

Впервые название рода “*Rhodococcus*” использовано Zopf в 1891 г. (Bell *et al.*, 1998). В работе M. Goodfellow и J. Alderson (1977) название было возрождено и пересмотрено для внесения в него штаммов комплекса “*rhodochrous*”, которые

напоминали, но не принадлежали к установленным родам *Nocardia*, *Corynebacterium* и *Mycobacterium* (Goodfellow, Alderson, 1977; Bell *et al.*, 1998). Род *Rhodococcus* включал виды *R. bronchialis*, *R. coprophilus*, *R. corallinus*, *R. erythropolis*, *R. equi*, *R. rhodochrous*, *R. rhodnii*, *R. ruber*, *R. rubropertinctus* и *R. terrae* (Goodfellow, Alderson, 1977). Позднее на основе хемотаксономических и филогенетических исследований были выделены отдельные роды *Dietzia* (Raine *et al.*, 1995) и *Gordonia* (Stackebrandt *et al.*, 1988). Согласно современной классификации, представители *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* имеют следующее таксономическое положение (<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html>):

Тип *Actinobacteria*

Класс *Actinobacteria*

Порядок *Actinomycetales*

Подпорядок *Corynebacterineae*

Семейство *Dietziaceae*

Род *Dietzia*

Семейство *Nocardiaceae*

Род *Gordonia*

Род *Rhodococcus*

На настоящий момент род *Dietzia* включает 13 (<http://www.bacterio.net/dietzia.html/23.09.2018>), *Gordonia* – 40 (<http://www.bacterio.net/gordonia.html/23.09.2018>), *Rhodococcus* – 62 валидных видов (<http://www.bacterio.net/rhodococcus.html/23.09.2018>).

Актинобактерии родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* описаны как аэробные, грамположительные, неподвижные, не кислотоустойчивые, не образующие спор, нокардиоформные актинобактерии (Raine *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1998; Koerner *et al.*, 2009; Andalibi, Fatahi-Bafghi, 2017). Термин “нокардиоформные” является морфологически описательным и относится к росту мицелия с фрагментацией на палочковидные или коккоидные элементы. Для диетций, гордоний и родококков характерен сложный морфогенетический цикл развития: короткие палочковидные (2–12 мкм), нитевидные (15–18 мкм) или

ветвящиеся клетки – рудиментарный или хорошо развитый первичный мицелий – палочковидные клетки или кокки (Ившина, 1997; Ившина и др., 2007). При этом продолжительность жизненного цикла и степень выраженности плеоморфизма зависит от видовой и штаммовой принадлежности, возраста культуры, состава питательной среды для культивирования. Диетции, как правило, формируют блестящие, оранжевые и кораллово-красные колонии с цельным краем (Koerner *et al.*, 2009). Оранжевое, розовое и красное пигментирование колоний наблюдается при росте гордоний на твердых питательных средах (Andalibi, Fatahi-Bafghi, 2017). Родококки более разнообразны по цветовой гамме и могут формировать колонии как ярко окрашенные в желтый, красный, лососевый и розовый цвета (*R. ruber*, *R. rhodochrous*), так и менее яркие – кремовые, бежевые и белые колонии (*R. erythropolis*, *R. rhodnii*). Форма и цвет колоний могут различаться в пределах вида в зависимости от среды культивирования. Следует отметить, что актинобактерии вышеописанных родов способны к образованию колоний *M*-, *S*- и *R*- формы, которые варьируют от слизистых и глянцевых до шероховатых и неровных. В настоящее время для разделения диетций, гордоний и родококков используют не только генетические методы, основанные на секвенировании гена 16S рРНК, но также целый комплекс морфологических, биохимических и хемотаксономических методов. Некоторые характеристики представителей родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* представлены в таблице 7.

Диетции, гордонии и родококки широко распространены в природе. Источниками выделения актинобактерий служат водные экосистемы (речная и морская вода, содовые озера, глубоководные донные отложения), сточные воды очистных сооружений и заводов, активный ил и биофильтры, почвы различного происхождения (Ившина, 2012; Duckworth *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 2006; Martínková *et al.*, 2009; Drzyzga, 2012).

Актинобактерии являются олиго-, нитро-, алкано-, политрофами и способны использовать в качестве источника углерода и энергии коротко- и длинноцепочечные углеводороды, галогенированные, циклические и

Таблица 7 – Характеристика представителей родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus*

Параметры	<i>Dietzia</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Rhodococcus</i>
Морфология клеток	Короткие палочки и кокки	Палочки и кокки или умеренно разветвляющиеся гифы	Палочки, сильно ветвящийся мицелий; на последней стадии развития палочки и кокки
Воздушные гифы	Не образуют	Не образуют	Не образуют
Время роста до видимых колоний	1–3 сут	1–3 сут	1–3 сут
Состав жирных кислот	Прямоцепочечные, ненасыщенные, присутствует туберкулостреариновая кислота	Прямоцепочечные, ненасыщенные, присутствует туберкулостреариновая кислота	Прямоцепочечные, ненасыщенные, присутствует туберкулостреариновая кислота
Тип мурамовой кислоты	Ацетилированная	Гликолизированные	Гликолизированные
Миколовые кислоты			
<i>Количество атомов углерода</i>	34–38	46–66	30–54
<i>Количество двойных связей</i>	0–1	1–4	0–4
Нуклеиновый состав ДНК, % ГЦ пар	66–73	63–69	63–73

Примечание. *Цит.* по Koerner *et al.*, 2009; Gürtler, Seviour, 2010.

ароматические соединения (Ившина, 1997, 2012; Bell *et al.*, 1998; de Carvalho, da Fonseca, 2005; Larkin *et al.*, 2006; de Carvalho *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2017). При этом они способны выживать при низких концентрациях углеродного субстрата или в условиях голодания. Актинобактерии обладают способностью расти в присутствии газообразных и жидких *n*-алканов, что делает их наименее зависимыми от внешней среды (Ившина, 1997).

Важным фактором выживания диетций, гордоний и родококков в неблагоприятных условиях является их исключительная экологическая пластичность, которая выражается в широком спектре адаптивных реакций на воздействие абиотических факторов: образование капсулоподобных структур, склонность к клеточной агрегации, выраженные поверхностно-активные и эмульгирующие свойства за счет активной продукции биосурфактантов, гидрофобная природа клеточной стенки, устойчивость к органическим растворителям (Ившина и др., 2007; Коршунова и др., 2016; Martínková *et al.*, 2009; Drzyzga, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Помимо повсеместного распространения и способности выживать в неблагоприятных условиях, представители *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* отличаются выраженной деградирующей активностью в отношении широкого спектра труднодоступных для других микроорганизмов органических соединений (бензола, толуола, ксилола, этилбензола, изопропилбензола, бифенила, в частности) (Na *et al.*, 2005; von der Weid *et al.*, 2007; Martínková *et al.*, 2009; <http://www.iegmcol.ru/strains/23.09.2018>). Некоторые штаммы родококков и диетций способны утилизировать ПАУ. Так, штаммы *Rhodococcus* sp., представленные в работах (Walter *et al.*, 1991; Dean-Ross *et al.*, 2002), используют фенантрен, антрацен, пирен, флуорантен и хризан в качестве единственного источника углерода. При исследовании ПАУ-загрязненных образцов морских отложений Чукотского плато и бассейна Макарова с целью определения биоразнообразия бактерий-деструкторов показано, что *in situ* диетции играют важную роль в минерализации ПАУ (Dong *et al.*, 2015). Более 50 % диетций, гордоний и родококков, выделенных из муниципальных и промышленных



очистных сооружений Испании, способны к биодеструкции нафталина (Soler *et al.*, 2018).

Одними из доминирующих загрязнителей сточных вод предприятий, осуществляющих газификацию угля, нефтеперерабатывающих и коксовых заводов являются фенолы и их производные. Токсичность фенолов часто препятствует применению биологической очистки. Однако обнаружено, что для эффективной биодеструкции фенольных соединений возможно использование иммобилизованных клеток *R. erythropolis* ССМ 2595, фенолгидроксилаза которых проявляет широкую субстратную специфичность и обеспечивает окислительную деструкцию *n*-хлорфенола, *n*-нитрофенола, резорцинола и *n*-крезола (Šejková *et al.*, 2005). Ген *catA*, кодирующий фенолгидроксилазу, обнаружен у 27 изолятов диетций, гордоний и родококков, выделенных из очистных сооружений Испании (Soler *et al.*, 2018), что указывает на возможность использования последних в качестве эффективных биодеструкторов фенола и его производных. Моно-, ди- и тригалогенированные ароматические поллютанты (хлорфенолы, хлорбензолы и полихлорированные бифенилы), присутствующие в грунтовых водах, эффективно утилизируются родококками *in situ* (Briglia *et al.*, 1996; Vogt *et al.*, 2004). Для большинства микроорганизмов труднодоступны такие поллютанты, как гетероциклы, в частности алкипиридины и триазины. Известно лишь небольшое число бактериальных штаммов, способных к минерализации S-триазинов, среди которых *G. rubripertincta* DSM 10347 (Thompson *et al.*, 2005) и более 10 природных изолятов *Rhodococcus* spp. (Behki *et al.*, 1993).

Родококки и гордонии широко используются в процессе биотрансформации различных органических соединений. В отличие от диетций, накоплен значительный экспериментальный материал, касающийся особенностей биодеструкции и биотрансформации нитрилов, моно и полициклических терпеноидов, стеролов, стероидов и их структурных аналогов с использованием родококков и гордоний. Известно, что ферментативные системы актинобактерий, принадлежащих к родам *Gordonia* и *Rhodococcus*, катализируют широкий круг регио- и стереоселективных реакций: гидроксילирование, окислительно-

восстановительное превращение кислородных заместителей, дегидрирование, гидролиз. Это позволяет широко применять актинобактериальные культуры для получения ценных физиологически активных продуктов. Так, известны родококки (например, *Rhodococcus* sp. N774, “*Rhodococcus butanica*” ATCC 21197, *R. erythropolis* JCM 2892, JCM6823, *R. rhodochrous* J1), проявляющие нитрилгидратазную активность. Нитрилазная активность (синтез карбоновой кислоты без образования амидного интермедиата) зарегистрирована у штаммов *R. rhodochrous* NCIMB 11215, NCIMB 11216 и K22 (Bunch, 1998; Chen *et al.*, 2009). Среди гордоний описано только несколько штаммов, принадлежащих к видам *G. namibiensis* и *G. terrae*, проявляющих трансформирующую активность по отношению к нитрилам (Brandão *et al.*, 2001; Kumar, Bhalla, 2013).

Актинобактериальная трансформация природных терпеновых соединений в ценные производные является одним из перспективных направлений современной биотехнологии. Использование родококков для этой цели хорошо известно. Так, показана биотрансформация ациклического монотерпеноида мерцена клетками *R. erythropolis* MLT1 в гераниол, применяемого в косметической и парфюмерной промышленности (Thompson *et al.*, 2010; Grogan, Thompson., 2012). Описана возможность селективного получения ценного для пищевой промышленности карвеола из лимонена с использованием штаммов *R. opacus* PWD4 и PW4 (Duetz *et al.*, 2001). 2-Эндо-гидрокси-, 2-экзо-гидрокси- и 2-оксо-производные были обнаружены в среде культивирования клеток *Rhodococcus* sp. (лабораторный штамм, выделенный из почвы) с 1,8-цинеолом – широко известным субстратом для получения фармацевтических препаратов (Williams *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 2006). Описано (Grogan *et al.*, 2002; Eaton, Sandusky, 2009) окисление бициклических монотерпеноидов, таких как камфора и 2-метилизоборнеол, с использованием клеток *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784, *R. ruber* T1 и *R. wratislaviensis* DLC-sam с образованием соответствующих 6-гидрокси-, 5-гидрокси- и 3-гидроксипроизводных. Известна способность родококков трансформировать полициклические терпеноиды с образованием биоактивных соединений. Например, с использованием клеток *R. rhodochrous* IEGM 66 описано

окисление бетулина до бетуллона (Grishko *et al.*, 2013), обладающего антилейшманийной (Alakurtti *et al.*, 2010), противопаразитарной (Gachet *et al.*, 2011), противовоспалительной (Reyes *et al.*, 2006), противоопухолевой (Liu *et al.*, 2012) активностью.

Отдельные представители родококков и гордоний метаболизируют стеролы и стероиды. В частности, описаны штаммы родококков, активно (70–100 %) деградирующие производные холестерина, андростана и эстрогена (Yoshimoto *et al.*, 2004). Обнаружена способность представителей рода *Rhodococcus* трансформировать стеролы и стероиды путем окисления  $3\beta$ -гидроксильной группы и  $9\alpha$ -гидроксилирования (Angelova *et al.*, 2005). Холестеролоксидаза из родококков подробно изучена и активно используется в пищевой промышленности и при получении стероидных лекарственных препаратов. Продуценты данного фермента эффективно трансформируют холестерин до холест-4-ен-3-она (Tabatabaei *et al.*, 2001; Lashkarian *et al.*, 2010). Отмечена биоконверсия стеролов с насыщенным углеродным остовом на примере  $5\alpha$ -холестана в  $5\alpha$ -холестан-3-ол культурами родококков, принадлежащих к видам *R. erythropolis* и *R. ruber* (Бажутин и др., 2015). Штаммы *R. ruber* ИЭГМ 233 и *R. erythropolis* ИЭГМ 487 трансформируют  $\beta$ -ситостерол с образованием стигмаст-4-ен-3-она (Ноговицина и др., 2010). Среди представителей *G. sihwensis*, *G. hydrophobica*, *G. australis* широко распространена способность к биодеструкции холестерина, а клетки *G. cholesterolivorans* используют холестерин в качестве единственного источника углерода и энергии (Drzyzga, 2012). Одной из уникальных особенностей гордоний *G. neofelifaecis* является биотрансформация холестерина в ценный интермедиат синтеза стероидных соединений – андроста-1,4-диен-3,17-дион (Liu *et al.*, 2011).

Однако, несмотря на значительный экспериментальный материал по использованию актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* в качестве эффективных биодеструкторов и биотрансформаторов различных экополлютантов, данные о биоконверсии смоляных кислот пока еще единичны (Vorob'ev *et al.*, 2001). В данной работе приведены результаты экспериментов по

биodeградации и биотрансформации смоляных кислот абietenового ряда (на примере ДАК) с использованием клеток актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* и показана их способность к биоконверсии ДАК.

### 1.5. Биоинформатический анализ актинобактериальных систем деструкции смоляных кислот

В рамках генетических исследований процесса биоконверсии ДАК актинобактериями осуществлен поиск генов, кодирующих ферменты метаболизма трициклических дитерпеноидов. Следует отметить, что микробные ферменты демонстрируют широкий спектр реакций в отношении дитерпеновых соединений, в том числе введение оксо- и гидроксильных групп в позиции, окисление по которым трудно осуществить химическими методами, селективное расщепление боковых цепей, селективный разрыв кольца, перегруппировки углеродного скелета реакции изомеризации и формирования С-С связей. При этом восстановление карбоксильных групп и гидроксילирование являются наиболее перспективными ферментативными реакциями для получения новых биологически активных метаболитов. В результате биоинформатического анализа известных секвенированных штаммов родококков, гординий и диетций идентифицированы гены монооксигеназ, диоксигеназ, гидроксилаз, дегидрогеназ, трансгидрогеназ, гликозилтрансфераз и т.д., которые могут участвовать в биоконверсии ДАК (таблица 8).

По литературным данным, цитохром P450-зависимые монооксигеназы участвуют в процессах стерео- и региоселективного окисления смоляных кислот (Smith *et al.*, 2004, 2008). В геномах *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (MRBQ00000000.1) и *R. ruber* ИЭГМ 231 (CCSD01000001) обнаружено 7 и 23 генов, кодирующих синтез цитохром P450-зависимых монооксигеназ, соответственно (Ivshina *et al.*, 2014). Исследование доступной генетической информации в базе NCBI секвенированных штаммов *G. rubripertincta* NBRC 101908 (BANB00000000.1) и *D. maris* DSM 43672 (LVFF00000000.1) позволило также обнаружить 22 и 11

Таблица 8 – Гены, предположительно кодирующие ферменты актинобактерий

Фермент	Катализируемая реакция	Число кодирующих последовательностей			
		<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231	<i>G. rubripertincta</i> NBRC 101908	<i>D. maris</i> DSM 43672
Моноксигеназа	$C-H + O_2 + 2H \rightarrow C-OH + H_2O$	94	54	44	16
Диоксигеназа	$H-C-C-H + O_2 + 2H \rightarrow HO-CH-CH-OH$	42	36	29	11
Гидроксилаза	$C-H + O_2 + 2H \rightarrow C-OH + H_2O$	15	15	19	3
Дегидрогеназа	$C^{n1} + \text{акцептор}_{\text{окисл}} \rightarrow C^{n2} + \text{акцептор}_{\text{восст}} - mH$ , где n – степень окисления атома углерода $n1 < n2$ ; m – количество перенесенных на акцептор гидридионов.	322	251	226	133
Трансгидрогеназа	$НАДН + НАДФ \rightleftharpoons НАД + НАДФН$	4	3	3	2
Гликозил-трансфераза	Перенос остатков моносахаридов от углевода-донора на молекулу-акцептор	10	23	16	18

*Продолжение таблицы 8*

Гликозил- гидролаза (гликозидаза)	Гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов	5	1	1	1
Эпоксидгидролаза	Гидролиз эпоксидов с образованием диолов	6	2	2	-
Эстераза	Гидролиз сложно-эфирных связей	67	57	54	29
Липаза	Гидролиз липидных связей	29	18	18	8
Циклаза	Циклизация различных химических соединений	38	20	17	8
Лактоназа	Расщепление лактонового кольца	4	2	2	2

участков генома, кодирующих синтез цитохром P450-зависимых монооксигеназ, соответственно. В геноме актинобактерий в достаточно высоком количестве обнаружены последовательности, кодирующие синтез диоксигеназ, которые играют важную роль в процессе биодеструкции смоляных кислот абietetанового типа. Так, в результате генетического анализа известных биодеструкторов смоляных кислот обнаружены диоксигеназы дигидроксилирования 7-оксо-ДАК (2) и процесса *meta*-расщепления (DitC) ароматического кольца C дитерпеноидов (Martin *et al.*, 1999; Martin, Mohn, 2000). Другая перспективная группа ферментов, выполняющая важную роль в конверсии смоляных кислот, гидроксилазы (в геноме *R. erythropolis* ИЭГМ 267 обнаружено 15 генов гидроксилаз; *R. ruber* – 15; *G. rubripertincta* – 19; *D. maris* – 3). В частности, описаны гидроксилазы (Bleif *et al.*, 2011; Janocha *et al.*, 2013), катализирующие 12 $\alpha$ - и 15 $\alpha$ -гидроксилирование ДАК и АК. В последние годы поиск новых путей ферментативной конверсии дитерпеноидов с образованием биологически активных производных обусловил повышенное внимание к использованию гидролитической активности эстераз и липаз, которые в значительном количестве присутствуют в протеоме исследованных штаммов актинобактерий. По результатам биоинформатического анализа, наибольшим разнообразием ферментных систем обладают родококки, в то время как диетции отличаются меньшим количеством генов, кодирующих синтез аналогичных ферментов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высоком метаболическом потенциале актинобактерий родов *Rhodococcus* > *Gordonia* > *Dietzia* по отношению к смоляным кислотам.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Рабочая коллекция бактериальных культур

В работе использовали 147 штаммов актинобактерий, принадлежащих к видам *D. maris*, *G. rubripertincta*, *G. terrae*, *R. erythropolis*, *R. qingshengii*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* и поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекции культур, <http://www.iegmc.org/strains/index.html>) (таблица 9). Выбор штаммов обоснован географией и источником их выделения, а также известной деструктирующей и трансформирующей активностью по отношению к гидрофобным органическим соединениям.

### 2.2. Определение минимальной подавляющей концентрации

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ДАК (99,1 %, Mosinter Group Limited, Китай) в отношении актинобактерий определяли методом двукратных серийных разведений (Performance Standards ..., 2017) с использованием 96-луночных полистероловых планшетов. Растворенную в этаноле (1:10) ДАК вносили в лунку в начальной концентрации 50 г/л с последующим серийным двукратным разведением. В лунки добавляли по 10 мкл бактериальной суспензии ( $2 \times 10^6$  кл/мл). Антимикробную активность ДАК и экстрактов ее метаболитов определяли с использованием бактериальных тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Планшеты выдерживали при оптимальной для тест-культур температуре (28 или 37 °C) в течение 1–3 сут. В качестве контроля влияния растворителя использовали этанол в аналогичной концентрации, препаратами сравнения служили антибиотические вещества (ампициллин и эритромицин).



Таблица 9 – Коллекционные штаммы, использованные в работе

Коллекционный номер	Характеристика	Источник выделения	География выделения
<i>D. maris</i>			
ИЭГМ 44, ИЭГМ 55 <sup>T</sup> , ИЭГМ 294, ИЭГМ 295, ИЭГМ 297, ИЭГМ 298	Используют <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Почва, загрязненная нефтью	Украина
ИЭГМ 46, ИЭГМ 52, ИЭГМ 53, ИЭГМ 54, ИЭГМ 166, ИЭГМ 167, ИЭГМ 168, ИЭГМ 169	Используют <i>n</i> -алканы, растут в автотрофных условиях с водородом и двуокисью углерода	Пластовая вода, вода, загрязненная нефтью	Пермская обл., Россия
ИЭГМ 290, ИЭГМ 291	Используют <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Донные отложения	р. Пим, Тюменская обл., Россия
ИЭГМ 293	Используют <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Вода	Сургутская обл., Россия
<i>G. rubripertincta</i>			
ИЭГМ 95, ИЭГМ 96, ИЭГМ 97, ИЭГМ 98, ИЭГМ 109, ИЭГМ 110, ИЭГМ 118, ИЭГМ 119, ИЭГМ 120, ИЭГМ 121, ИЭГМ 122, ИЭГМ 124, ИЭГМ 126, ИЭГМ 127, ИЭГМ 128, ИЭГМ 132, ИЭГМ 133, ИЭГМ 134, ИЭГМ 135, ИЭГМ 138, ИЭГМ 139, ИЭГМ 140	Используют этанол, бутан-1-ол, бутан-2-ол, <i>n</i> -гексадеканнафталин, анилин, фенол, фенилуксусную кислоту, ксилол, сырую нефть в качестве источника углерода	Нефтезагрязненная почва	Украина
ИЭГМ 100, ИЭГМ 101, ИЭГМ 103, ИЭГМ 104, ИЭГМ 105, ИЭГМ 106	Используют <i>n</i> -алканы и сырую нефть в качестве источника углерода	Вода	р. Днепр, Украина
ИЭГМ 723, ИЭГМ 724, ИЭГМ 725, ИЭГМ 730	Используют <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Пена, завод аэротации сточных вод активным илом	Ирвин, Шотландия, Великобритания

## Продолжение таблицы 9

<i>G. terrae</i>			
ИЭГМ 130, ИЭГМ 136, ИЭГМ 143 <sup>T</sup> , ИЭГМ 144, ИЭГМ 146, ИЭГМ 162, ИЭГМ 163, ИЭГМ 150, ИЭГМ 152	Используют этанол, <i>n</i> -гексадекан, фенол, толуол, нафталин, сырую нефть в качестве источника углерода, трансформируют прохиральные сульфиды	Почва, загрязненная нефтью	Украина
ИЭГМ 145, ИЭГМ 151, ИЭГМ 153, ИЭГМ 154, ИЭГМ 155, ИЭГМ 156, ИЭГМ 157, ИЭГМ 158, ИЭГМ 159, ИЭГМ 160, ИЭГМ 161	Используют бутан-2-ол, гексан-1-ол, <i>n</i> -гексадекан, нафталин, фенол, ксилол в качестве источника углерода	Вода	р. Днепр, Украина
ИЭГМ 164	Использует пропан-2-ол, глицерин в качестве источника углерода	Супесчаная почва	берег р.Чона, Якутия, Россия
<i>R. erythropolis</i>			
ИЭГМ 7 <sup>T</sup> , ИЭГМ 11, ИЭГМ 12, ИЭГМ 14, ИЭГМ 18, ИЭГМ 19, ИЭГМ 20, ИЭГМ 21	Используют <i>n</i> -алканы, бутан-1-ол, бутан-2-ол, этанол, пропан-1-ол, пропан-2-ол, пропан-1,2,3-триол, нафталин, фенол, фенилуксусную кислоту в качестве источника углерода	Почва, загрязненная нефтью; озокеритовые пласты	Украина
ИЭГМ 22, ИЭГМ 23, ИЭГМ 24, ИЭГМ 25, ИЭГМ 26, ИЭГМ 98, ИЭГМ 179, ИЭГМ 180, ИЭГМ 181, ИЭГМ 182, ИЭГМ 183, ИЭГМ 184, ИЭГМ 185, ИЭГМ 186, ИЭГМ 267	Используют <i>n</i> -алканы, бутан-1-ол, бутан-2-ол, этанол, октан-1-ол, нафталин, фенол, ксилол, <i>m</i> -оксибензойную, <i>n</i> -оксибензойную кислоты в качестве источника углерода	Пластовая вода, вода и почва, загрязненные нефтью	Пермская обл., Россия
ИЭГМ 187, ИЭГМ 188, ИЭГМ 189	Используют <i>n</i> -алканы, этанол, гексан-1-ол, пропан-1,2,3-триол, фенол, ксилол в качестве источника углерода	Донные отложения, загрязненные нефтью	Тюменская обл., Россия

## Продолжение таблицы 9

<i>R. qingshengii</i>			
ИЭГМ 247	Используют <i>n</i> -алканы и сырую нефть в качестве источника углерода, деградирует фталевую кислоту	Почва, производство полиэфирного волокна лавсана	Беларусь
ИЭГМ 550	Использует пропан, <i>n</i> -алканы, бутан-1-ол, ксилол в качестве источника углерода	Промышленно загрязненная почва	Пермский край, Россия
ИЭГМ 1016 <sup>T</sup>	Использует <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода, деградирует карбендазим	Почва, загрязненная карбендазимом	Провинция Джиангсу, Китай
<i>R. rhodochrous</i>			
ИЭГМ 63, ИЭГМ 64, ИЭГМ 66, ИЭГМ 107	Используют <i>n</i> -алканы и сырую нефть в качестве источника углерода, трансформируют тиоанизол, продуцируют холестерол-оксидазу	Вода	р. Днепр, Украина
ИЭГМ 65	Использует <i>n</i> -алканы и сырую нефть в качестве источника углерода, продуцирует нитрилазы	Вода	р. Миссисипи, США
ИЭГМ 67	Использует пропан, <i>n</i> -алканы, окисляет короткоцепочечные первичные, вторичные спирты (C <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> ), циклические и ароматические спирты, формирует эпоксиды из этенов	Почва	Великобритания
ИЭГМ 608, ИЭГМ 609, ИЭГМ 629, ИЭГМ 633, ИЭГМ 646, ИЭГМ 647, ИЭГМ 639, ИЭГМ 757, ИЭГМ 1138, ИЭГМ 1162	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, нормальные углеводороды, сырую нефть, деградируют дротаверина гидрохлорид и мелоксикам, трансформируют тиоанизол, продуцируют холестеролоксидазу	Вода, снег, почва, загрязненная нефтью	Пермский край, Россия

## Продолжение таблицы 9

<i>R. ruber</i>			
ИЭГМ 70 <sup>Т</sup> , ИЭГМ 74, ИЭГМ 94, ИЭГМ 93	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> ), этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол, бензоат, гентизат, 3-гидрокси-бензоат, 4-гидроксибензоат, фенол в качестве единственного источника углерода, трансформируют тиоанизол, деградируют 4-метоксибензоат, ванилит, фталат	Песчаник ордовикского возраста	Иркутская обл., Россия
ИЭГМ 80, ИЭГМ 81, ИЭГМ 84, ИЭГМ 472, ИЭГМ 474	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, нафталин, фенол в качестве единственного источника углерода, деградируют диметилфталат, дибутилфталат, трансформируют тиоанизол	Песчаная порода	Беларусь
ИЭГМ 82, ИЭГМ 172, ИЭГМ 223, ИЭГМ 224, ИЭГМ 225, ИЭГМ 226, ИЭГМ 227, ИЭГМ 228, ИЭГМ 229, ИЭГМ 230, ИЭГМ 231	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> ), этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол в качестве единственного источника углерода	Грунтовая вода, пластовая вода, почва	Пермская обл., Россия
ИЭГМ 83, ИЭГМ 85, ИЭГМ 86, ИЭГМ 90, ИЭГМ 91, ИЭГМ 92	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> ), этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол в качестве единственного источника углерода, трансформируют β-ситостерол и тиоанизол	Вода, поверхностный водоем	п-ов Таймыр, Россия
ИЭГМ 87, ИЭГМ 88	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> ), этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол в качестве единственного источника углерода	Керн	Ульяновская обл., Россия
ИЭГМ 219, ИЭГМ 220, ИЭГМ 221, ИЭГМ 222	Используют пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> ) в качестве единственного источника углерода, трансформируют β-ситостерол	Вода	р. Илыч, Россия

### 2.3. Условия культивирования актинобактерий

Актинобактерии выращивали в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с объемом среды 100 мл при перемешивании 160 об/мин и температуре 28 °С. В экспериментах использовали минеральную среду следующего состава (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3$  – 0,001; дрожжевой экстракт (Микроген, Россия) – 0,1 %; раствор микроэлементов по Постгейту – 0,1 об. % (Романенко, Кузнецов, 1974; Каталог штаммов..., 1994). В качестве дополнительного источника углерода вносили *n*-гексадекан (0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 и 3,0 об. %) или глюкозу (1,0 г/л). В отдельных экспериментах для культивирования актинобактерий использовали мясопептонный бульон (МПБ) производства ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия. В качестве инокулята использовали бактериальные клетки, предварительно выращенные в течение 2 сут на мясопептонном агаре (МПА) производства ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия и суспендированные в 0,5 %-ом растворе хлорида натрия. Бактерии вносили в среду культивирования до конечной концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл. ДАК (500 мг/л), растворенную в этаноле (1:10), вносили в питательную среду через 48 ч культивирования бактериальных клеток. В экспериментах с предварительно адаптированными актинобактериями ДАК (500 мг/л) вносили в минеральную среду одновременно с инокулятом. Для этого бактериальные клетки предварительно выращивали в течение 2 сут в присутствии 0,06 об. % *n*-гексадекана, затем дополнительно инкубировали (2 сут) в присутствии ДАК (500 мг/л). В экспериментах с использованием предварительно адаптированных клеток *n*-гексадекана в среду культивирования родококков не вносили.

В качестве контролей использовали (1) стерильный раствор ДАК (500 мг/л) в минеральной среде (для оценки абиотической стабильности ДАК); (2) минеральную среду, содержащую *n*-гексадекан и бактериальные клетки (для разграничения возможных метаболитов).

## 2.4. Получение актинобактериальных клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания

Актинобактерии предварительно выращивали в МПБ, а также в минеральной среде с *n*-гексадеканом (1 об. %) или глюкозой (1 г/л) в течение 2–5 сут (рисунок 7). В стационарной фазе роста бактериальные клетки осаждали центрифугированием 3000 об/мин в течение 10 мин и трижды отмывали эквивалентным объемом фосфатного буферного раствора (рН 7,0). Отмытые клетки ресуспендировали в 50 мл фосфатного буфера (рН 6,0; 7,0; 8,0) и доводили ОП<sub>600</sub> до значений 1,5, 2,0 и 2,5. Продолжительность процесса биодеструкции ДАК составляла 5 сут.



Рисунок 7 – Схема получения клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания.

## 2.5. Иммуобилизация бактериальных клеток

Клетки закрепляли на поверхности твердых носителей (техническая ткань из СВМ нитей (сверхвысокомолекулярные нити) производства ООО “УкрматериалИнвест”, Украина; полипропиленовые диски производства “Wuhu Ecotech Trade Co”, Китай) (рисунок 8) или в макропористый гетерофазный криогель на основе поливинилового спирта (ПВС) производства ОАО “Невинномысский азот”, Невинномысск, Россия.

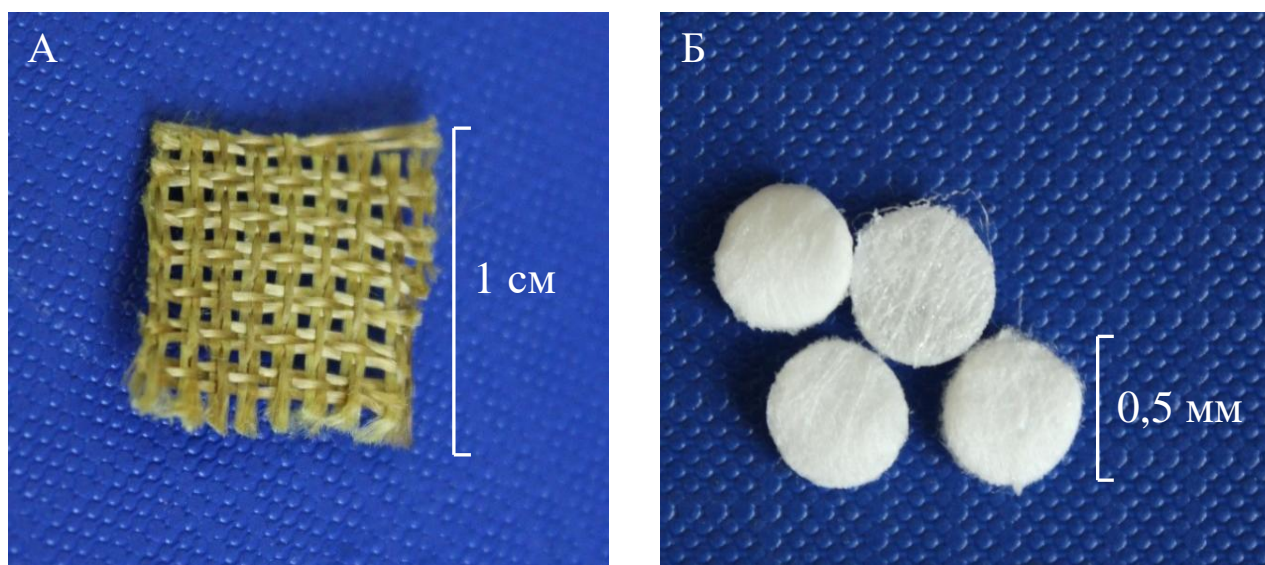


Рисунок 8 – Твердые носители для поверхностной иммобилизации. А – фрагмент технической ткани, Б – полипропиленовые диски.

Для закрепления бактериальных клеток, предварительно выращенных в МПБ, минеральной среде с *n*-гексадеканом (1 об. %) или глюкозой (1 г/л), образцы технической ткани (10 шт,  $S_{\text{образца}} = 1,0 \text{ см}^2$ ) и полипропиленовых дисков (200 шт,  $d_{\text{диска}} = 0,5 \text{ мм}$ ) помещали в 100 мл клеточной суспензии с ОП<sub>600</sub> 1,0 в фосфатном буфере (рН 7,0) (рисунок 9).

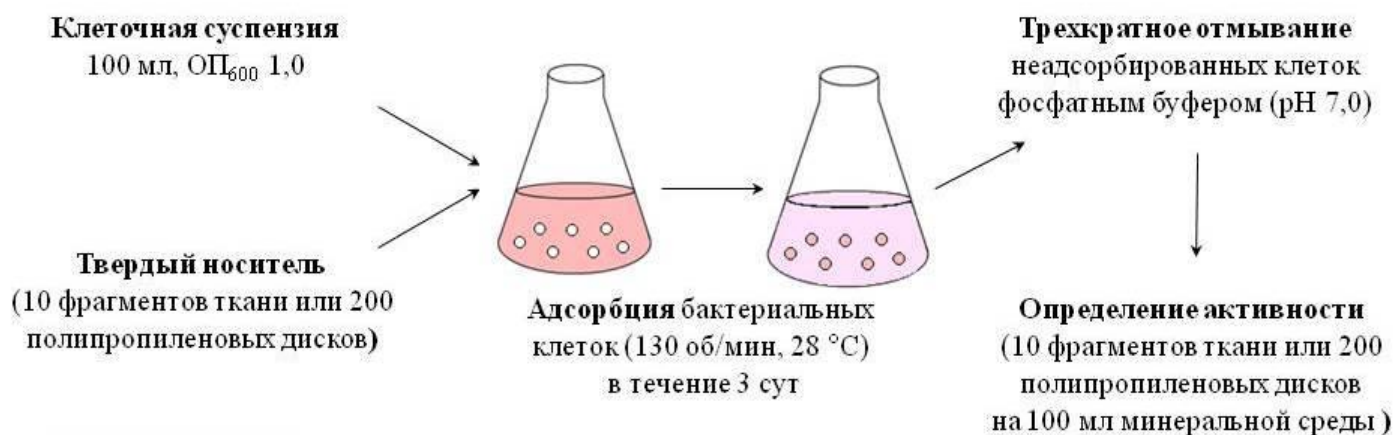


Рисунок 9 – Схема иммобилизации актинобактерий на поверхности твердых носителей.

Процесс адсорбции осуществляли при перемешивании 130 об/мин и температуре 28 °С в течение 3 сут. Степень адсорбции бактериальных клеток на поверхности носителя вычисляли по формуле:

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

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.

Закрепление актинобактерий в матрицу ПВС осуществляли согласно методике (Кузюкина *et al.*, 2006). Для этого клетки предварительно выращивали в течение 72 ч при 28 °С в минеральной среде в присутствии 3 об. % *n*-гексадекана. Бактериальную суспензию (ОП<sub>600</sub> 1,6) смешивали со стерильным раствором ПВС (12 %) в соотношении 1:2 v/v. Этапы гранулирования, замораживания и оттаивания осуществляли согласно схеме (рисунок 10). В сравнительных экспериментах по биодеструкции ДАК использовали одинаковое количество –  $5 \times 10^7$  кл/мл.

Хранение полученного биокатализатора осуществляли при 4 °С. Перед использованием иммобилизованные клетки предварительно регидратировали в 0,5 %-ном растворе хлорида натрия в течение 24 ч.



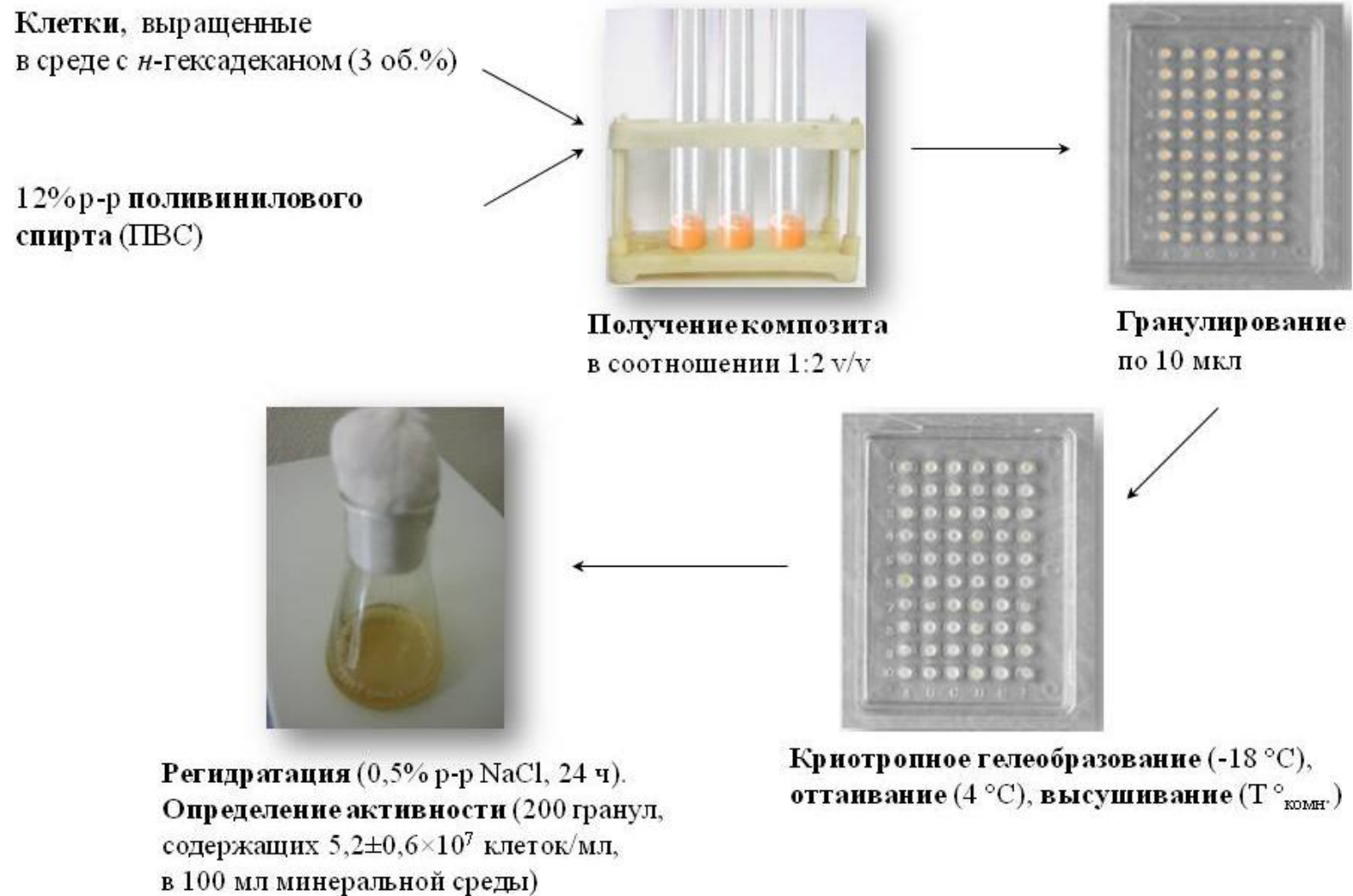


Рисунок 10 – Схема получения бактериальных клеток, иммобилизованных в криогеле на основе ПВС.

## 2.6. Получение отдельных фракций актинобактериальных клеток

Актинобактерии, предварительно выращенные в течение 2-х сут в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана, трижды отмывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (рН 7,0) (рисунок 11). Клетки гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (MSE, Великобритания, амплитуда 10 мкм, 45 мин) при обязательном охлаждении. В результате ультразвуковой обработки выживало не более 0,1 % клеток, что подтверждено результатами определения КОЕ/мл микрометодом точечных высевов и микроскопическими исследованиями. Клеточный гомогенат центрифугировали (6000 об/мин, 15 мин, 4 °С) для получения цитоплазматических ферментов (супернатант) (I). Солюбилизацию мембраносвязанных ферментов проводили путем ресуспендирования осадка в 100 мл 1 %-ого раствора Тритона X-100 (Sigma-Aldrich) в фосфатном буфере (рН 7,0) и перемешивания на орбитальном шейкере в течение 30 мин. С помощью центрифугирования (6000 об/мин, 15 мин, 4 °С) получали супернатант с экстрагируемыми мембраносвязанными ферментами (II). Осадок клеточных соникатов с ферментами, прочно связанными с мембраной и не экстрагируемыми детергентом, ресуспендировали в 100 мл фосфатного буфера (рН 7,0). Подготовленные таким образом клеточные фракции включали (I) супернатант с цитоплазматическими ферментами; (II) супернатант с экстрагированными мембраносвязанными ферментами; (III) ресуспендированный соникат с неэкстрагированными ферментами. Клеточные фракции хранили при температуре 4 °С в течение 24 ч (не более) и использовали в сравнительных экспериментах по биодеструкции ДАК. В качестве контроля служили целые бактериальные клетки, предварительно выращенные в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана.

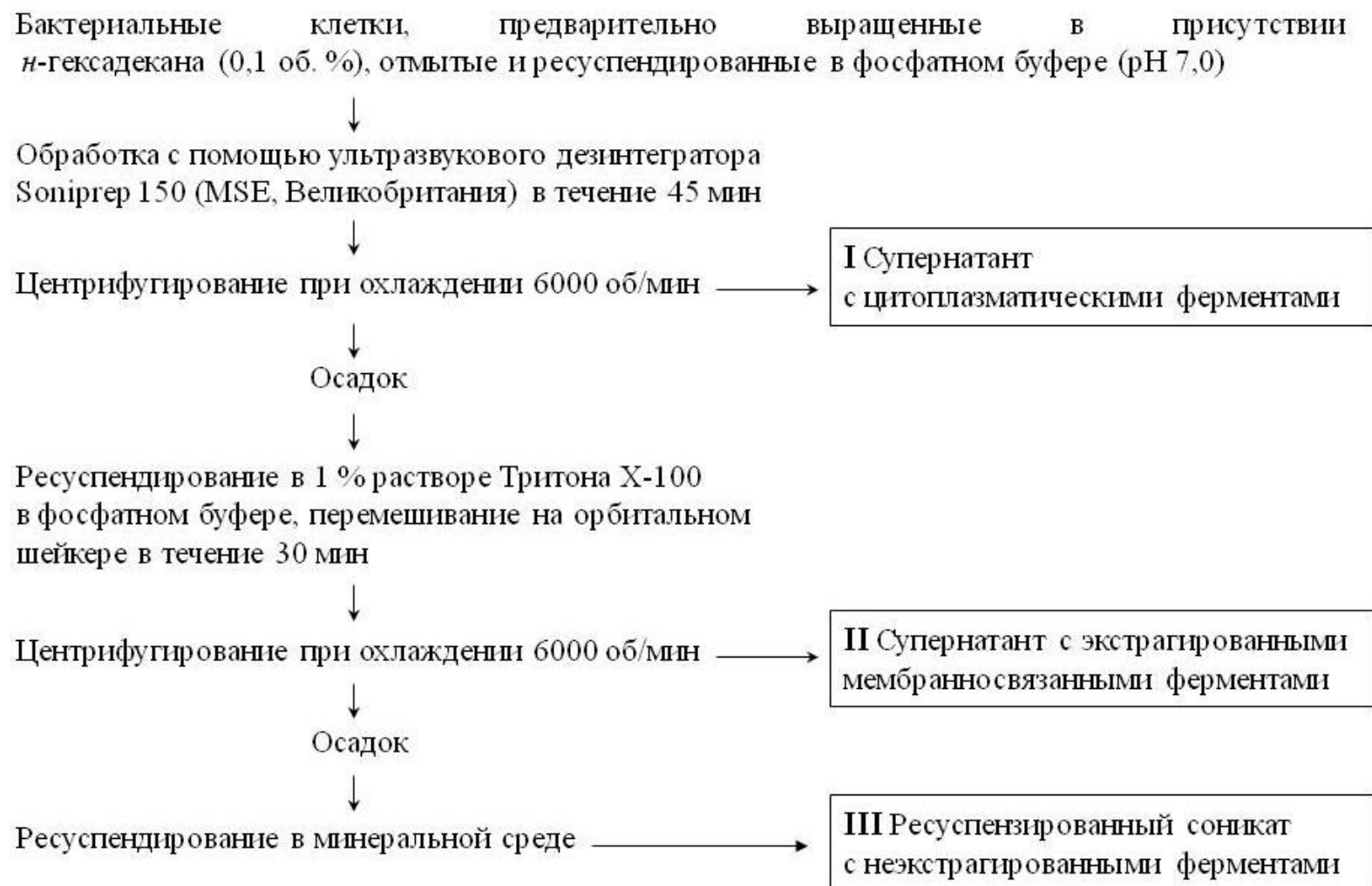


Рисунок 11 – Схема получения клеточных фракций актинобактерий.

## 2.7. Выделение *Rhodococcus*-биосурфактантов

Для выделения биосурфактантов из клеток *R. rhodococcus* ИЭГМ 107 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 применяли методику, описанную в работе (Kuyukina *et al.*, 2001). Культуральную жидкость озвучивали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (MSE, Великобритания, амплитуда 10 мкм, 30 мин) при обязательном охлаждении. Биосурфактант экстрагировали с использованием метил-трет-бутилового эфира, который добавляли к клеточному гомогенату в соотношении 2:1. Экстрагирование проводили при 28 °С на орбитальном шейкере (160 об/мин) в течение 3 ч. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя (Heidolph, Германия).

## 2.8. Микроскопические исследования

*Фазово-контрастная микроскопия.* Микроскопические исследования в режиме фазового контраста проводили с использованием микроскопа AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия). Фотодокументирование полученных изображений и измерение размеров клеточных агрегатов осуществляли с помощью фотокамеры PRO-150ES (Pixera, США) и компьютерной программы ВидеоТест, Размер 5.0 (Санкт-Петербург, Россия).

*Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.* Исследование морфологии бактериальных клеток проводили с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (Asylum Research, США). Для этого каплю (15–20 мкл) клеточной суспензии помещали на покровное стекло, смешивали с эквивалентным объемом флуоресцентного красителя LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и подсушивали в воздухе в темноте в течение 10–15 мин. Препарат промывали деионизированной водой и сканировали с помощью КЛСМ с использованием иммерсионного объектива (×100, числовая апертура 1,4). Для возбуждения флуоресценции SYTO9 и пропидиум йодида, входящих в состав красителя

LIVE/DEAD<sup>®</sup>, применяли аргоновый лазер ( $\lambda=488$  нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ( $\lambda=543$  нм) с 560/660-нм барьерным фильтром, соответственно. Изображения клеток (размер  $0,12 \times 0,12$  мм, разрешение  $1600 \times 1600$  пикселей) получали со скоростью 40 нм/пиксель. Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). Дополнительно рассчитывали объем ( $V$ ) и площадь клеток ( $a$ ) по формулам (Neumann *et al.*, 2005):  $V = r^2\pi h$  (мкм<sup>3</sup>) и  $a = 2r^2\pi + \pi rh$  (мкм<sup>2</sup>), где  $r$  –  $\frac{1}{2}$  ширины клетки,  $h$  – длина клетки,  $\pi$  – 3,14.

КЛСМ-изображение импортировали в программное обеспечение АСМ Igor Pro 6/22A (WaveMetrics, США). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и контактной жесткостью 0,5–4,4 N/m.

## 2.9. Определение жизнеспособности бактериальных клеток

Для определения жизнеспособности клеток использовали метод селективного окрашивания йодонитротетразолием хлоридом (Kuyukina *et al.*, 2006). Для этого 100 мкл культуральной жидкости окрашивали непосредственно в 96-луночном полистероловом планшете путем внесения в лунку 50 мкл 0,2 % водного раствора йодонитротетразолия хлорида. В результате восстановления красителя с образованием нерастворимого в воде формазана наблюдали красно-фиолетовое окрашивание, что свидетельствовало о присутствии в образце активно респираторных бактериальных клеток. Для полного восстановления красителя образцы инкубировали при температуре 28 °С. Через 24 ч измеряли ОП окрашенной суспензии с помощью микропланшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия) при длине волны 630 нм. Число живых клеток рассчитывали по калибровочной кривой зависимости ОП<sub>630</sub> раствора формазана от концентрации клеток, определенной с помощью микрометода точечных высевов.

## 2.10. Определение дыхательной активности актинобактерий

Дыхательную активность актинобактерий определяли с использованием 6-канального респирометра Micro-Oxymax<sup>R</sup> (Columbus Instruments, USA) непрямого замкнутого цикла, подключенного к персональному компьютеру. Эксперименты проводили в стеклянных флаконах Micro-Oxymax (300 мл) в 100 мл минеральной среды. Постоянное перемешивание (300 об/мин, 28±2 °С) осуществляли на многоместной магнитной мешалке RT 10 (Power IKAMAG, Германия). Параметры респираторной активности (количество в мкл и скорость в мкл/мин потребляемого O<sub>2</sub> и выделяемого CO<sub>2</sub>) автоматически регистрировались каждые 42 мин.

## 2.11. Определение электрокинетического потенциала

Измерение электрокинетического (*дзета*) потенциала бактериальных клеток проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) и программного обеспечения Malvern ZetaSizer, v. 2,2. Актинобактерии, отобранные в процессе биодеструкции ДАК, дважды отмывали и ресуспендировали в 10 мМ растворе KNO<sub>3</sub> до достижения ОП<sub>600</sub> 0,2.

## 2.12. Качественный и количественный анализ

### ДАК и ее метаболитов

Для выделения ДАК и ее возможных метаболитов постферментационную среду подкисляли 10 %-ным водным раствором HCl (до pH 4,0) и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные экстракты последовательно промывали 1 %-ным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и дистиллированной водой (до pH 7,0). Полученный этилацетатный экстракт обезвоживали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя (Heidolph, Германия). Смесь метаболитов ДАК метилировали (триметилселил)диазометаном (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч. Качественный состав продуктов биодеструкции ДАК контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах с силикагелем (Merck, Германия). Наличие

продуктов окисления ДАК фиксировали при обработке пластин в системе растворителей этилацетат:гексан (3:7) и опрыскивании пластинок 5 %-ным раствором  $H_2SO_4$  с последующим прогреванием в течение 2–3 мин при температуре 95–100 °С.

Анализ остаточной ДАК и продуктов ее биодеструкции осуществляли методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на хроматографе Agilent 6890N/5975B (Agilent Technologies, США), оборудованном капиллярной колонкой HP-5ms (30 м×0,25 мм, 0,25 мкм) и работавшем в режиме ионизации электронным ударом (70 эВ). В качестве газа-носителя использовали гелий (1 мл/мин). Температуру колонки программировали от 120 до 320 °С. Масс-спектры регистрировали в диапазоне  $m/z$  от 40 до 460 а.е.м. Отнесение масс-спектров подтверждали с помощью библиотеки NIST08. В экспериментах по исследованию динамики биодеструкции ДАК количественный анализ осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа LC Prominence 20AD (Shimadzu, Япония), оборудованного хроматографической колонкой с обращенно-фазным адсорбентом Supelcosil™ LC-18 (150×4,5 мм, 5 мкм) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Подвижная фаза 70 %-ный раствор ацетонитрила; расход подвижной фазы 1 мл/мин; температура колонки 40 °С; длина волны детектирования ДАК 190 нм. В описанных условиях время удерживания ДАК составляло 14,99±0,02 мин. Регистрацию и обработку данных осуществляли с помощью программы LCSolution (v/1.25).

Все химические реагенты, использованные для анализа ТСХ, ГХ-МС и ВЭЖХ имели квалификацию х.ч., ч.д.а. или ос.ч. (НПК Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США).

### 2.13. Препаративное выделение и идентификация продуктов биодеструкции ДАК

Смесь этилацетатных экстрактов (3 г), полученных после биоконверсии ДАК прединкубированными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267, метилировали метилйодидом (Sigma-Aldrich) и разделяли с помощью флеш-хроматографа

(BÜCHI, Швейцария) на картридже (диаметр 40 мм, длина 150 мм, BÜCHI, Швейцария), содержащем 90 г силикагеля 60 (40–63 мкм). Соотношение вещества и сорбента 1:30. Элюирование проводили смесью гексан:этилацетат с градиентом концентраций от 99:1 до 9:1.

ИК-спектр метилового эфира соединения **50** регистрировали с использованием Фурье-спектрометра Bruker 66/S IFS (Bruker, Германия) в тонкой пленке, полученной в результате испарения раствора вещества в  $\text{CHCl}_3$ ; спектры 1D и 2D ЯМР – ЯМР-спектрофотометра Bruker AVANCE II (Bruker BioSpin GmbH, Германия) при частоте 400 и 100 МГц для  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров, соответственно. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin Elmer 341 (Perkin Elmer, США) при длине волны 589 нм для раствора в  $\text{CHCl}_3$ . Точку плавления регистрировали с помощью автоматического прибора измерения температуры OptiMelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) со скоростью нагрева 1 °C/мин.

#### 2.14. Исследование биологического потенциала метаболитов ДАК

Исследование биопотенциала метаболитов ДАК на основе их структурных формул проводили с помощью компьютерной программы PASS online (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). Структуры анализированных соединений были построены в веб-сервисе Marvin JS программы PASS online. Результат исследования биологического потенциала вещества представлял собой список прогнозируемых видов биологической активности с оценкой вероятности обнаружения ( $P_a$ ) и не обнаружения ( $P_i$ ) последней. Наибольшая вероятность обнаружения биоактивности в программе принималась за 1.

#### 2.15. Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Математическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Excel 2007 (Microsoft Inc., 2007). Достоверность различий между средними величинами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.



**Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ  
АКТИНОБАКТЕРИЙ К ДЕСТРУКЦИИ И ТРАНСФОРМАЦИИ  
ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

**3.1. Исследование устойчивости актинобактерий  
к воздействию ДАК**

По нашим данным, большинство из 147 исследованных культур актинобактерий не сохраняли жизнеспособность в присутствии ДАК в концентрации выше 20 мг/л, что указывало на высокую токсичность данного соединения. В таблице 10 представлены штаммы диетций, гордоний и родококков, характеризующиеся высокими показателями МПК. Оказалось, что наиболее устойчивые к воздействию ДАК штаммы *D. maris* ИЭГМ 55 (МПК 390), *G. rubripertincta* ИЭГМ 104 (МПК 390), *G. terrae* ИЭГМ 150 (МПК 390), *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (МПК 780) были изолированы из нефтезагрязненной почвы и воды реки Днепр, в бассейне которой сконцентрированы крупные предприятия нефтехимической, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности Украины и Беларуси.

Таблица 10 – МПК (мг/л) ДАК в отношении актинобактерий

Штамм	МПК, мг/л	Штамм	МПК, мг/л
<i>D. maris</i> ИЭГМ 295	195	<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 120	48
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55	390	<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 132	97
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 100	97	<i>G. terrae</i> ИЭГМ 150	390
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 104	390	<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267	24
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 105	195	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107	780
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 109	195	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 80	195

Примечание. Для величины МПК значения указаны в пределах точности  $\pm 1 \log 2$  разведения. Различия оценивали как достоверные при  $P < 0,05$ .

### 3.2. Исследование каталитического потенциала актинобактерий по отношению к ДАК

По данным исследований других авторов, многие аэробные бактериальные изоляты, выделенные ранее из отходов и систем биоочистки отработанных вод ЦБК, донных и почвенных образцов, отобранных в непосредственной близости от ЦБК, используют смоляные кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии. Так, изоляты *Burkholderia* sp. DhA-54, *P. abietaniphila* ВКМЕ-9, *Z. resiniphila* DhA-35, “*F. resinovorum*” способны утилизировать ДАК в концентрации до 180 мг/л без внесения дополнительных ростовых субстратов (Biellmann, Branlant, 1973; Vicho *et al.*, 1995; Mohn *et al.*, 1999a; Yu, Mohn, 2001). Исследованные нами коллекционные культуры актинобактерий не используют ДАК в качестве источника углерода, что подтверждается отсутствием ростовой активности в течение 30 сут эксперимента при добавлении смоляной кислоты от 20 до 100 мг/л. Ранее была описана способность актинобактерий к биотрансформации ДАК в присутствии 0,5 об. % *n*-гексадекана (Vorob’ev *et al.*, 2001). В ряде примеров биотрансформации сложных органических соединений с участием актинобактерий оптимальной концентрацией является 0,1 об. % *n*-гексадекана (Ivshina *et al.*, 2005; Elkin *et al.*, 2013).

В связи с этим скрининг деструктирующей активности коллекционных штаммов актинобактерий в отношении ДАК мы проводили в условиях добавления 0,1 об. % *n*-гексадекана, при этом кислоту вносили к двухсуточной культуре. Из всего массива исследованных культур (147 штаммов) отобраны 12 штаммов, способных к биоконверсии ДАК в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %) (таблица 11). Интересно отметить, что отдельные штаммы практически полностью деградировали кислоту. Наибольшей (>98 %) деструктирующей активностью отличался штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. Другие культуры трансформировали ДАК с образованием ранее не описанного метаболита, максимальный выход которого зарегистрирован в случае использования штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267. В масс-спектре данного соединения обнаружили молекулярный ион  $m/z$  330,3. При этом культуры, способные окислять ДАК до

метаболита ( $m/z$  330,3), характеризовались значительно меньшей устойчивостью к воздействию ДАК (МПК <100 мг/л), по сравнению со штаммами, обеспечивающими полную деструкцию ДАК.

Таблица 11 – Биодеструкция ДАК актинобактериями в присутствии *n*-гексадекана

Штамм	Биодеструкция, %	
	Остаточная ДАК	Метаболит ( $m/z$ 330,3)
Абиотический контроль	100,0	–
<i>D. maris</i> ИЭГМ 295	44,6±4,8	–
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55	5,1±2,2	–
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 100	90,5±5,2	9,5±0,9
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 104	9,0±0,5	–
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 105	44,0±5,2	–
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 109	41,0±4,8	–
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 120	98,8±0,9	1,2±0,5
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 132	92,2±3,5	8,18±3,5
<i>G. terrae</i> ИЭГМ 150	35,0±3,79	–
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267	86,0±4,9	14,0±1,2
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107	≤ 2,0	–
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 80	49,0±5,7	–

Примечание. Приведены данные, полученные после 7 сут культивирования актинобактерий в присутствии ДАК (500 мг/л) и *n*-гексадекана (0,1 об. %).

Для наиболее устойчивого к воздействию ДАК штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 и менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 проведено детальное сравнительное исследование процесса биоконверсии ДАК. Пробы для анализа отбирали каждые 24 ч эксперимента для микроскопирования, определения остаточной ДАК и ее метаболитов, количества жизнеспособных клеток, а также для измерения рН реакционной среды и респираторной активности бактериальных клеток.

Как видно из рисунка 12А, в течение 48 ч после внесения ДАК в среду культивирования устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 практически не наблюдалось прироста биомассы.

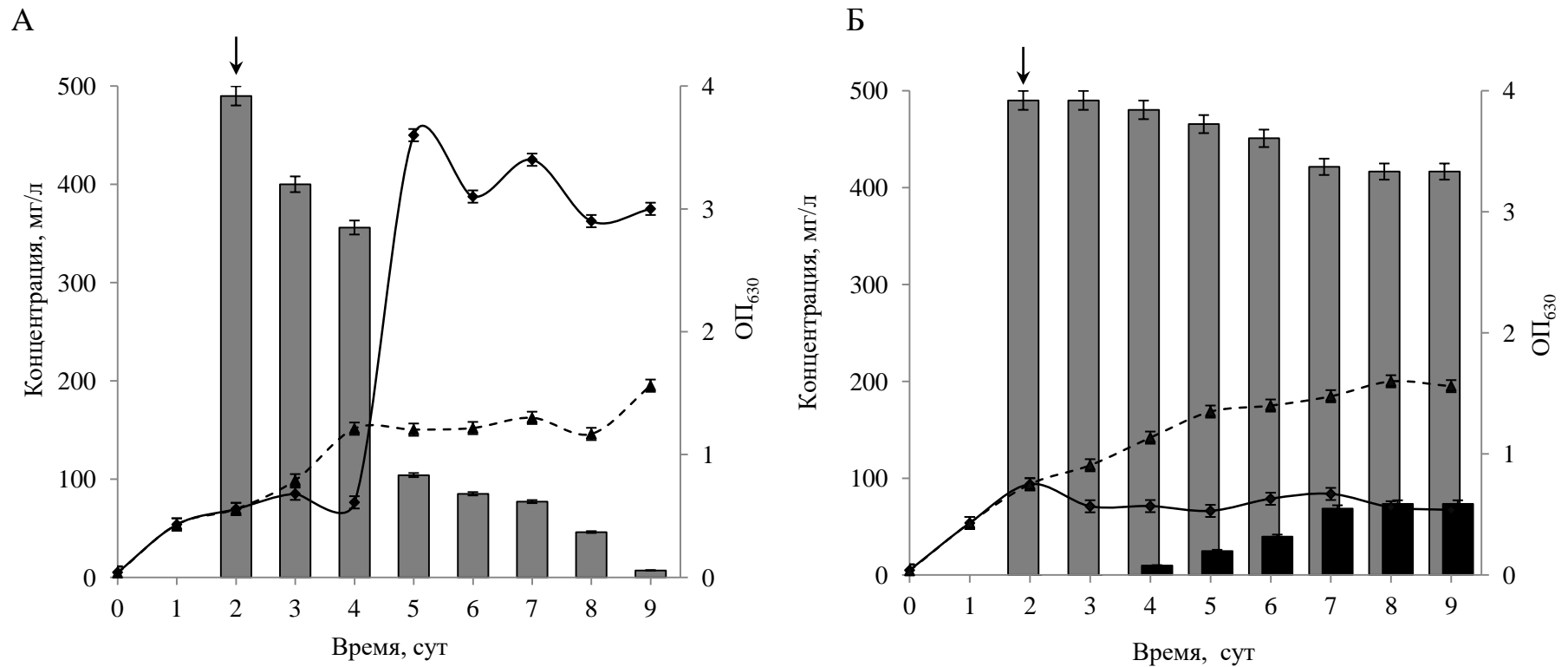


Рисунок 12 – Динамика биодеструкции ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (А) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (Б). Концентрация ДАК (■) и метаболита *m/z* 330,3 (■); ОП<sub>630</sub> в присутствии *n*-гексадекана (▲), после внесения 500 мг/л ДАК (◆). Стрелкой указано время внесения ДАК.

Предположительно данный этап эксперимента соответствовал адаптационному периоду клеток к воздействию ДАК. На 5-е сут отмечалось резкое увеличение численности и деструктирующей активности родококков. В этих условиях в среде культивирования родококков остаточное содержание ДАК составляло 104 мг/л. В результате постепенного снижения концентрации ДАК на 9-е сут эксперимента ее остаточное содержание составляло лишь менее 5 мг/л.

Иная картина наблюдалась в случае использования менее устойчивого к воздействию ДАК штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (рисунок 12Б). Внесение ДАК приводило к заметному угнетению ростовой активности клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (в 1,5–2,8 раза), по сравнению с биотическим контролем на протяжении всего эксперимента. На фоне постепенного снижения концентрации ДАК в среде культивирования регистрировали метаболит ( $m/z$  330,3), содержание (14 %) которого стабилизировалось на 9 сут эксперимента.

Для мониторинга процесса биодеструкции ДАК был проведен анализ респираторной активности бактериальных клеток, как одного из показателей их жизнеспособности и интенсивности метаболических процессов. По нашим данным, динамика дыхательной активности характеризовалась стабильным выделением  $\text{CO}_2$  и потреблением  $\text{O}_2$ , при этом скорости выделения  $\text{CO}_2$  и потребления  $\text{O}_2$  были зеркальным отражением друг друга. Как видно из рисунка 13А,Б, добавление ДАК в среду культивирования актинобактерий в первые двое сут приводило к снижению скорости их респираторной активности.

В случае использования устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 снижение интенсивности дыхания коррелировало с уменьшением количества жизнеспособных клеток. На 5 сут, когда регистрировалось увеличение роста биомассы, отмечено и соответствующее повышение скорости дыхания родококков. Скорости поглощения  $\text{O}_2$  и выделения  $\text{CO}_2$  клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267 не зависели от количества жизнеспособных клеток в течение эксперимента и коррелировали с процессом образования и накопления метаболита. Так, наиболее высокие (13,41–14,28 мкл/мин) показатели интенсивности дыхания после добавления в питательную среду ДАК

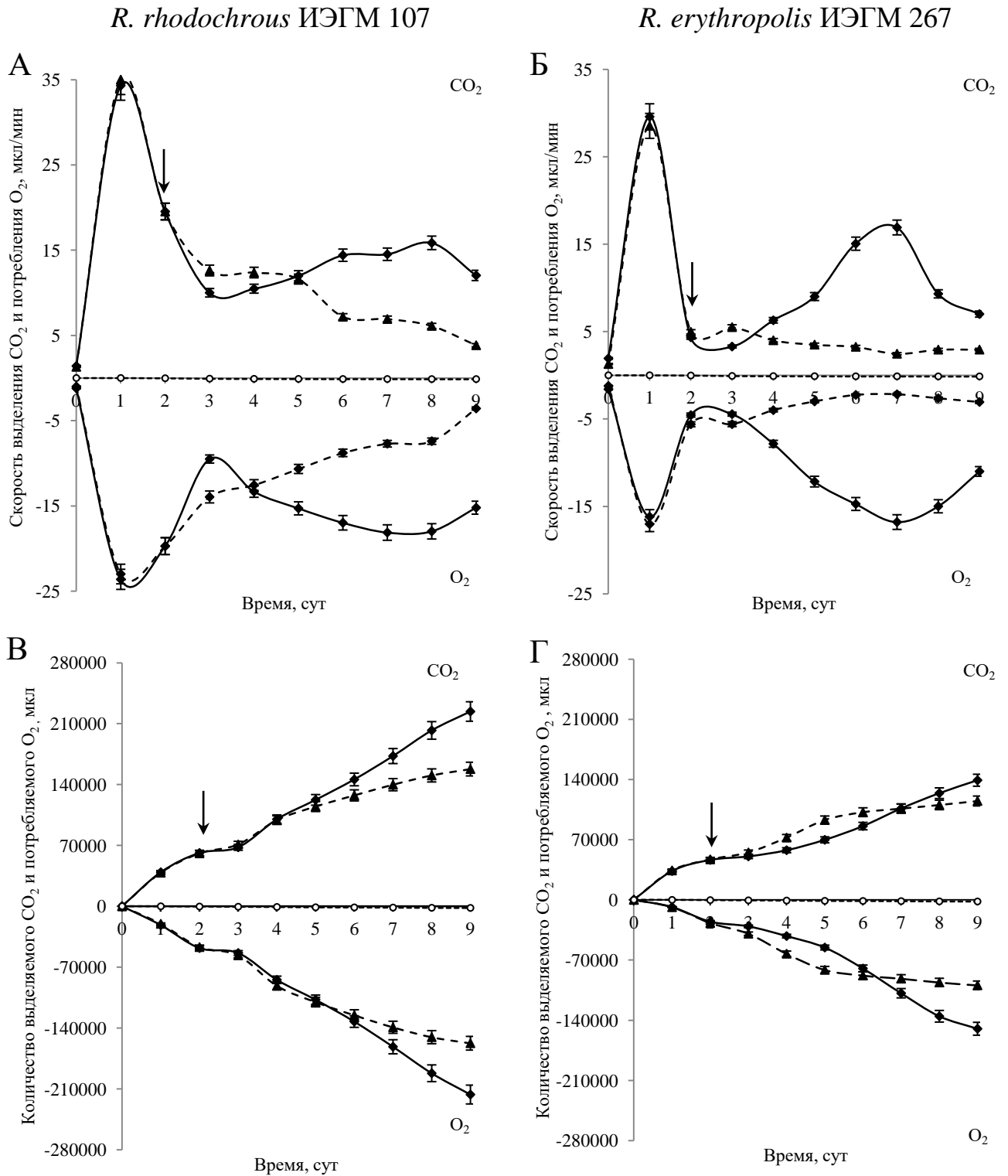


Рисунок 13 – Динамика скорости (А, Б) и общего количества (В, Г) потребляемого  $\text{O}_2$  и выделяемого  $\text{CO}_2$ . Показатель респираторной активности в присутствии *n*-гексадекана (▲), после внесения ДАК (◆), абиотический контроль (○). Стрелкой указано время внесения ДАК.

регистрировали на 7 сут эксперимента (рисунок 13Б). В это же время наблюдался максимальный уровень образования метаболита (см. рисунок 12Б). Общее количество выделенного  $\text{CO}_2$  (223959 мкл) и поглощенного  $\text{O}_2$  (216549 мкл) за 9 сут процесса биодеструкции ДАК с использованием устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в 1,5 раза выше, по сравнению с таковым менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (139088 мкл и 149941 мкл, соответственно). При этом рассчитанная средняя скорость (количество поглощенного  $\text{O}_2$  15 мкл/мин) дыхания клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в течение эксперимента была достоверно выше, по сравнению с аналогичным показателем клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (10 мкл/мин). Необходимо отметить, что респираторная активность родококков в присутствии ДАК была значительно выше таковой, зарегистрированной в контрольных вариантах опыта. Это дает основание предполагать, что процесс разложения экотоксиканта обусловлен деструктирующей активностью бактериальных клеток.

Как видно из рисунка 14, внесение ДАК в минеральную среду с *n*-гексадеканом ожидаемо приводило к сдвигу значений показателя кислотности среды в слабокислую сторону (рН 6,6–6,7). Так, в процессе биодеструкции ДАК с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 по мере снижения концентрации ДАК в культуральной среде наблюдалось изменение уровня рН до слабощелочных значений (рН 7,6). Менее выраженное изменение показателя рН регистрировали в случае использования штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267, что, возможно, связано с высоким содержанием в среде остаточной ДАК. Наблюдаемые изменения рН среды культивирования связаны с деструктирующей активностью актинобактерий, поскольку уровень рН абиотического контроля изменялся незначительно.

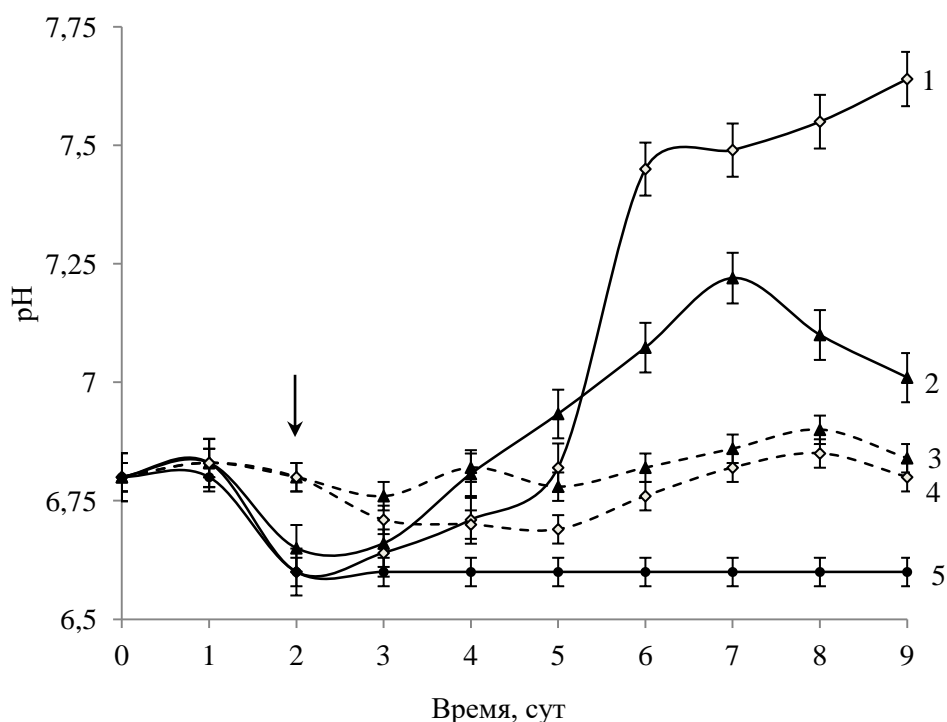


Рисунок 14 – Изменение pH среды в процессе биодеструкции ДАК с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (1) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (2). 3 – культивирование *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в присутствии *n*-гексадекана без добавления ДАК (биотический контроль), 4 – культивирование клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии *n*-гексадекана без добавления ДАК (биотический контроль), 5 – абиотический контроль. Стрелкой указано время внесения ДАК.

Результаты исследования антимикробной активности ДАК, этилацетатных экстрактов остаточной ДАК и ее метаболитов представлены в таблице 12. Наиболее чувствительными к воздействию ДАК оказались грамположительные бактерии. Так, показатели МПК для штаммов *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* NCIMB 196 и *S. aureus* ATCC 25923 составляли от 12 до 97 мг/л ДАК. Более устойчивыми к токсическому воздействию ДАК оказались штаммы грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

По нашим данным, экстракты метаболитов не проявляли выраженной противомикробной активности по сравнению с таковой ДАК.



Таблица 12 – Антимикробная активность (МПК, мг/л) ДАК и экстрактов культуральной жидкости ее метаболитов

Вещество	<i>B. subtilis</i> АТСС 6633	<i>E. coli</i> АТСС 25922	<i>M. luteus</i> NCIMB 196	<i>S. aureus</i> АТСС 25923	<i>P. aeruginosa</i> АТСС 27853
ДАК	12	1560	24	97	12500
Экстракт 1	390	12500	97	780	—*
Экстракт 2	780	12500	780	1560	—*
Этанол	25000	12500	12500	12500	12500
Ампициллин	24	24	12	0,047	—*
Эритромицин	0,047	190	1,5	0,7	190

Примечание. Экстракт 1 получен после инкубации клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в течение 7 сут в присутствии ДАК. Экстракт 2 получен после инкубации клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в течение 7 сут в присутствии ДАК.

\* Антимикробная активность не обнаружена. Для величины МПК значения указаны в пределах точности  $\pm 1 \log 2$  разведения. Различия оценивали как достоверные при  $P < 0,05$ .

## Глава 4. АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ АКТИНОБАКТЕРИЙ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

### 4.1. Клеточные приспособления актинобактерий к воздействию экотоксиканта

В минеральной среде в присутствии *n*-гексадекана родококки формировали компактные клеточные агрегаты размером от 10 до 50 мкм. Добавление ДАК в среду культивирования актинобактерий приводило к укрупнению размеров клеточных агрегатов до 0,5 мм в случае использования устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 и до 5 мм в случае использования менее устойчивого *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (рисунок 15).

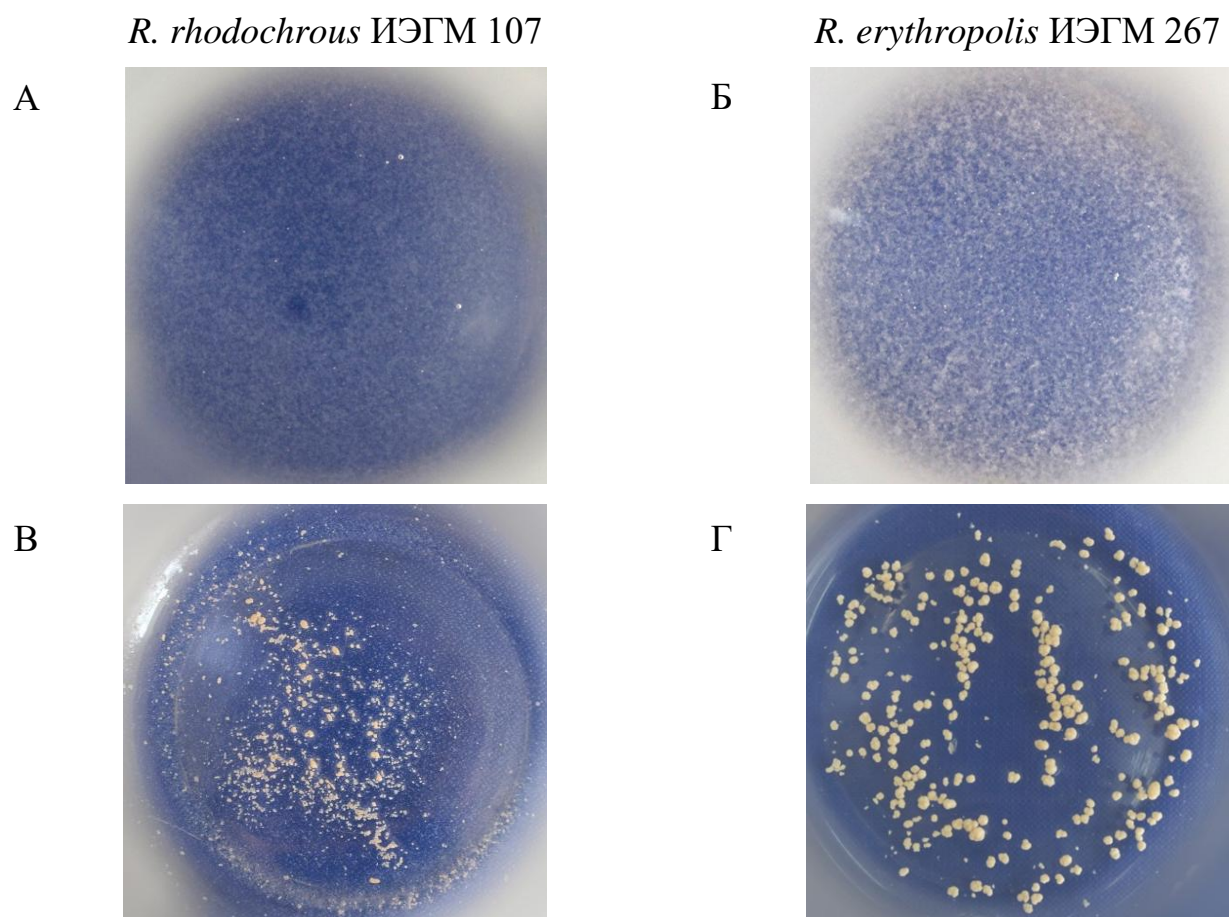


Рисунок 15 – Агрегаты клеток, формирующиеся в среде культивирования родококков в присутствии *n*-гексадекана (А, Б) и после внесения ДАК (В, Г).

По результатам фазово-контрастной микроскопии, агрегаты актинобактерий представляли собой скопление клеток на поверхности частиц ДАК (рисунок 16).

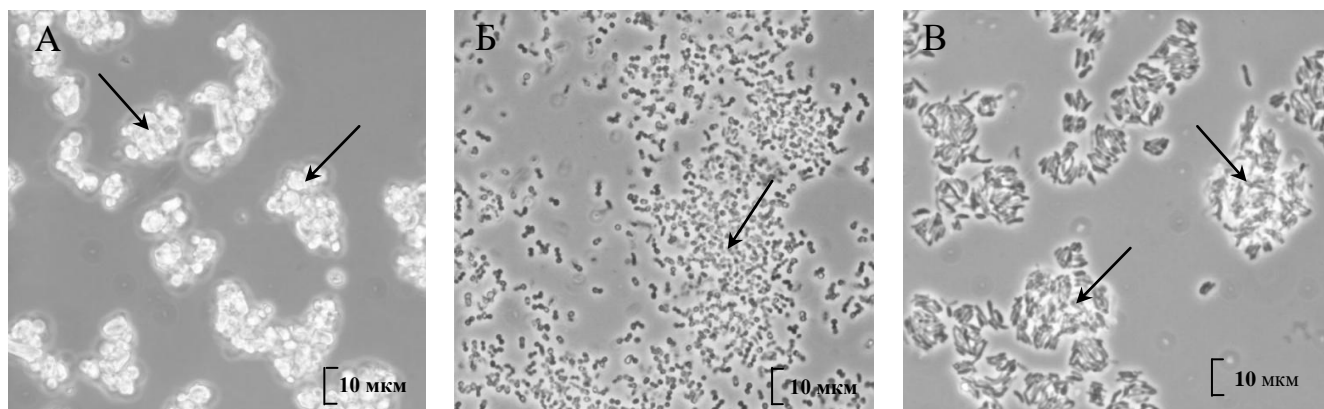


Рисунок 16 – Фазово-контрастная микроскопия ДАК (А) и агрегатов клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (Б) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (В), формирующихся в среде культивирования родококков в присутствии *n*-гексадекана и ДАК. Стрелкой указаны гранулы ДАК.

О физиологическом состоянии актинобактерий в присутствии ДАК свидетельствовали результаты, полученные при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Через 48 ч после добавления ДАК клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 сохраняли жизнеспособность. Однако при анализе КЛСМ-изображений были выявлены клетки с красной флуоресценцией, что свидетельствовало о токсичном влиянии смоляной кислоты. После 72 ч культивирования родококков в присутствии ДАК регистрировали увеличение количества живых (зеленых) клеток (рисунок 17), что, по-видимому, связано с

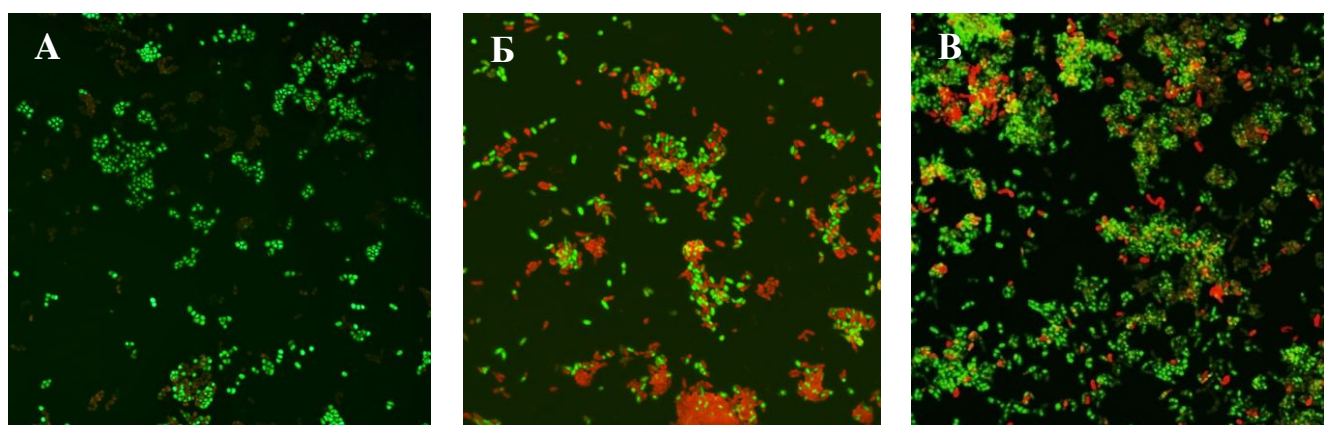


Рисунок 17 – КЛСМ-изображения (100×) бактериальных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 до внесения ДАК (А) и после внесения ДАК через 48 ч (Б), 72 ч (В). Клетки с зеленой флуоресценцией – живые, красной – мертвые.

адаптацией актинобактерий к экотоксиканту.

В среде культивирования менее устойчивого *R. erythropolis* ИЭГМ 267 после 24 ч инкубации клеток в присутствии 500 мг/л ДАК наряду с живыми и мертвыми обнаружены поврежденные клетки (рисунок 18). Характерное “двойное” (зелено-оранжевое) свечение, обнаруживаемое на отдельных участках или всей поверхности клетки, свидетельствовало о повреждении клеточной мембраны жизнеспособных клеток. Двойное свечение клеток, похожее на данный эффект, наблюдалось при окрашивании родококков красителем LIVE/DEAD после воздействия на них органических растворителей в высоких концентрациях (Kuyukina *et al.*, 2014).

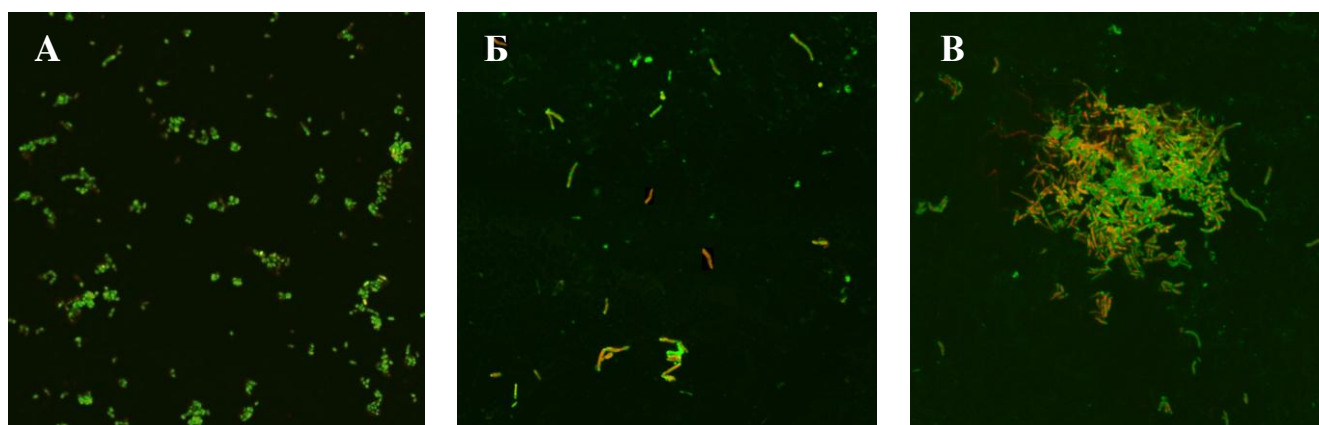


Рисунок 18 – КЛСМ-изображения (100×) клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 до внесения ДАК (А) и после внесения ДАК через 24 ч (Б), 168 ч (В). Клетки с зеленой флуоресценцией – живые, красной – мертвые.

Морфометрические исследования, проведенные с использованием АСМ, позволили определить средние значения размерных параметров клеток. Как видно из таблицы 13, воздействие ДАК индуцировало увеличение длины и ширины клеток. Наиболее ярко выраженные изменения размеров наблюдались при внесении ДАК в среду культивирования штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267. При этом отмечалось увеличение соотношения площади поверхности клетки к ее объему, что, по данным литературы, способствует более эффективному контакту клетки с субстратом (Neumann *et al.*, 2005).

Таблица 13 – Влияние ДАК на морфометрические параметры актинобактерий

Условия культивирования	Длина, мкм	Ширина, мкм	Объем, мкм <sup>3</sup>	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Соотношение площадь/объем
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107					
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом	1,38±0,28	1,13±0,19	1,35±0,16	4,38±0,28	3,22
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом и ДАК	1,82±0,26	1,26±0,24	2,26±0,13	6,09±0,23	2,73
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267					
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом	3,10±1,03	1,01±0,09	2,65±0,28	6,85±0,18	2,58
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом и ДАК	6,83±1,96	0,85±0,11	3,87±0,56	10,24±1,24	2,68

Примечание. Приведены данные АСМ-сканирования бактериальных клеток после 7 сут культивирования в присутствии ДАК (500 мг/л) и *n*-гексадекана (0,1 об. %).

Воздействие ДАК на актинобактерии сопровождалось также изменением свойств их клеточной поверхности. Так, по данным АСМ, характерной особенностью актинобактерий в присутствии ДАК является увеличение показателя среднеквадратичной шероховатости поверхности клеток и изменение их электрокинетического потенциала (таблица 14). Наиболее существенные изменения этих показателей были зарегистрированы при воздействии ДАК на клетки менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267.

Таблица 14 – Изменение свойств клеточной поверхности актинобактерий в присутствии ДАК

Условия культивирования	Шероховатость, нм	Электрокинетический потенциал, мВ
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107		
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом	206,5±10,72	-26,6±0,9
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом и ДАК	365,9±6,92	-27,3±1,1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267		
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом	100,7±9,85	-15,5±1,4
Минеральная среда с <i>n</i> -гексадеканом и ДАК	289,2±12,44	-19,8±1,2

Примечание. Приведены данные АСМ-сканирования и измерения электрокинетического потенциала клеток после 7 сут культивирования родококков в присутствии ДАК (500 мг/л) и *n*-гексадекана (0,1 об. %).

При сканировании клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 при инкубации их в присутствии ДАК во многих исследованных образцах регистрировали образование внеклеточной жидкости (рисунок 19А,Б). Данное явление не может быть следствием лизиса бактериальных клеток, поскольку в клеточной популяции *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 не обнаруживались поврежденные клетки, а при исследовании КЛСМ- и АСМ-изображений в жидкости регистрировали только живые клетки. По-видимому, внеклеточная жидкость представляет собой биосурфактант или смесь биосурфактанта с *n*-гексадеканом и ДАК, так как известно, что синтез биосурфактантов способствует увеличению площади контакта актинобактерий с гидрофобным субстратом и повышению его биодоступности (Ivshina *et al.*, 1998).

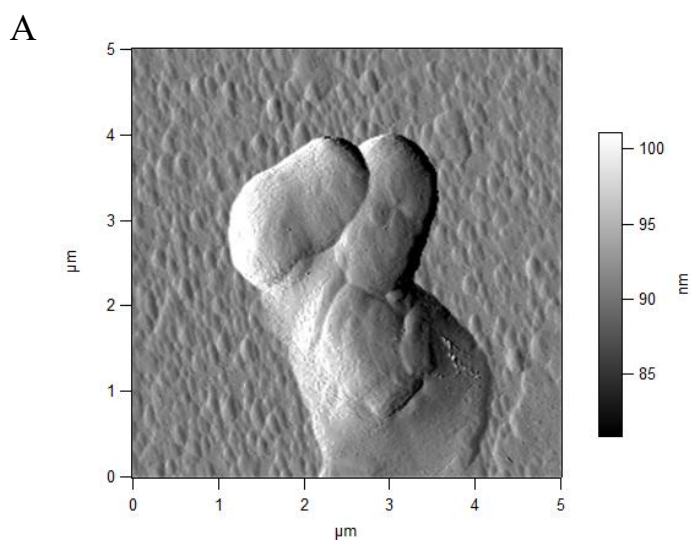
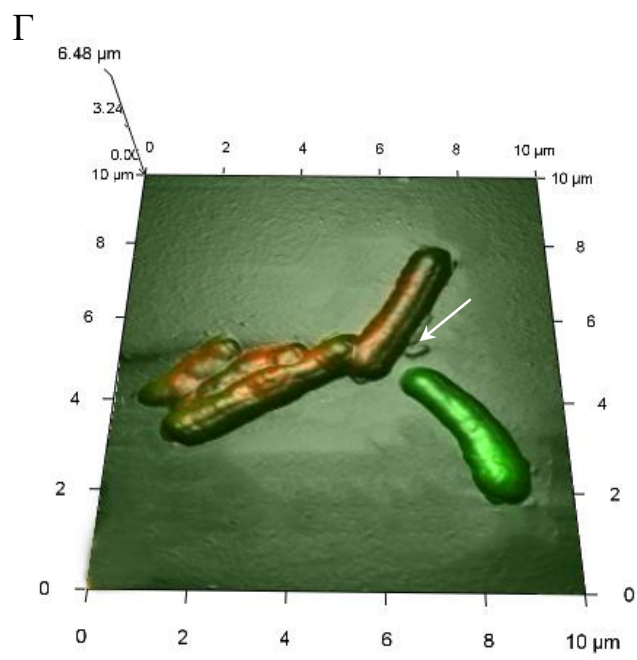
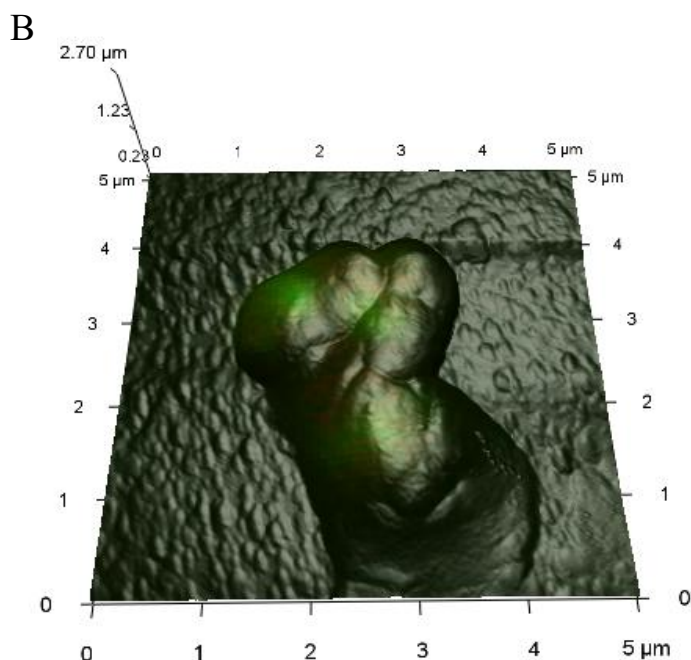
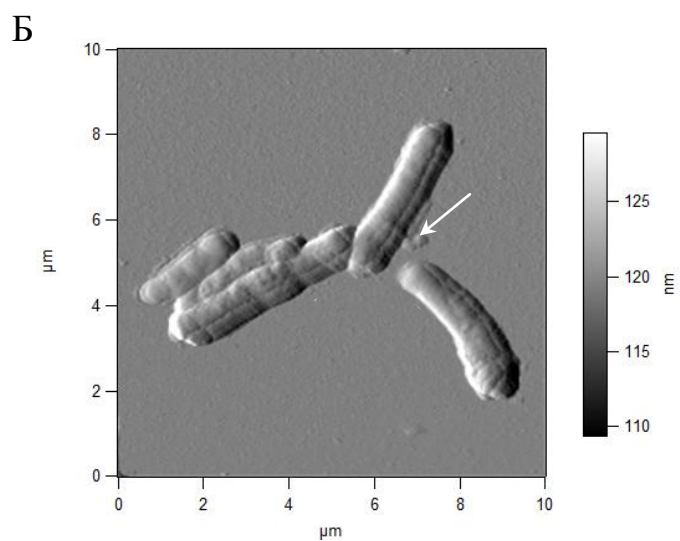
*R. rhodochrous* ИЭГМ 107*R. erythropolis* ИЭГМ 267

Рисунок 19 – АСМ-(А,Б) и АСМ-КЛСМ-(В,Г) изображения клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 после 7 сут культивирования с ДАК. Стрелкой указаны гранулы ДАК.

Аналогичные результаты были получены ранее при сканировании актинобактериальных клеток в процессе биотрансформации пентациклического тритерпеноида бетулина (Tarasova *et al.*, 2017). В работе (Atrat *et al.*, 1991) высказано предположение о возможном образовании многокомпонентной

подвижной липофильной мезофазы в процессе биотрансформации кристаллических гидрофобных соединений ( $\beta$ -ситостерола, в частности), функция которой состоит в постепенном растворении и запуске механизма транспорта субстрата в клетку. В работе (Kuyukina *et al.*, 2016) показано, что при АСМ-сканировании выделенный актинобактериальный биосурфактант, адсорбированный на стекле, образует вокруг бактериальных клеток мицеллы, визикулы и пузырьки. Подобные структуры отмечены и на полученных нами изображениях.

Синтез биосурфактантов, по-видимому, способствует увеличению площади контакта бактериальных клеток с ДАК и, как следствие, биодоступности токсиканта. Данное предположение было подтверждено путем экстракции биосурфактанта, образованного в присутствии ДАК. По нашим данным, клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 синтезировали в 5,5 раз больше ( $310 \pm 11$  мг/л) биосурфактанта в присутствии ДАК, чем в контрольных вариантах опыта ( $58 \pm 9$  мг/мл).

Возможна и другая природа обнаруживаемого факта. Микроорганизмы в окружающей среде могут существовать в виде свободно плавающих и планктонных форм или закреплены в составе биопленок (Чеботарь и др., 2016). Биопленкой называют множество бактериальных клеток, окруженных матриксом из синтезируемого внеклеточного полимерного материала и прикрепленных к поверхности субстрата (Costa *et al.*, 2017). Матрикс выполняет структурно-образующую функцию и способствует объединению микробных клеток в единую систему. В состав матрикса могут входить полисахариды, которые (аналогично биосурфактанту) могут проявлять липофильную природу. Если предположить, что агрегация родококков – это определенный этап формирования биопленки на поверхности кристаллических частиц ДАК, то внеклеточная жидкость, обнаруживаемая нами при АСМ-сканировании, может представлять собой внеклеточный полисахаридный матрикс.

Сканирование клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 после инкубирования их в присутствии ДАК не выявляло эффекта образования внеклеточной жидкости



(рисунок 19Б,Г). При этом концентрация экстрагируемого биосурфактанта ( $61 \pm 8$  мг/л) значительно не отличалась от контрольных вариантов опыта ( $57 \pm 10$  мг/л). На изображениях были замечены лишь адсорбированные гранулы ДАК на поверхности бактериальных клеток.

#### 4.2. Биодеструкция ДАК с использованием отдельных фракций бактериальных клеток

Известно, что ферменты, участвующие в биоокислении ксенобиотиков, локализуются преимущественно в цитоплазме или связаны с клеточной мембраной (Bleif *et al.*, 2011; Janocha *et al.*, 2013). В нашем исследовании наибольшая деструктирующая активность выявлялась при использовании целых клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, а также супернатанта, содержащего цитоплазматические ферментные комплексы (таблица 15). При этом обнаружены метаболиты ( $m/z$  328,1,  $m/z$  362,2), масс-спектры которых соответствуют метилированным производным ДАК – 7-оксо-ДАК (**2**) и 7-оксо-11,12-дигидрокси-8,13-абиетадиеновой кислоты (**3**) (см. рисунок 2). Образование данных соединений описано ранее (Martin, Mohn, 1999) при изучении метаболизма ДАК в использовании клеток *P. abietaniphila* ВКМЕ-9. В условиях использования ресуспендированного клеточного сониката из *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 снижение концентрации ДАК не превышало 17 %. Таким образом, на долю ферментов клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, участвующих в процессе биодеструкции ДАК, более трети приходится на цитоплазматические ферменты.

Сравнительное исследование биodeградирующей активности полученных клеточных фракций штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 показало, что супернатанты с цитоплазматическими и Тритон-экстрагируемыми ферментами неактивны в отношении ДАК (таблица 15). Использование ресуспендированного в буферном растворе (рН 7,0) клеточного сониката родококков, содержащего элементы бактериальных мембран с интегральными ферментами, которые не экстрагируются детергентами, сопровождалось окислением ДАК с образованием метаболита ( $m/z$  330,3).

Таблица 15 – Биодеструкция ДАК с использованием отдельных фракций клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267

Клеточная фракция	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107		<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267	
	ДАК, %	Метаболиты, %	ДАК, %	Метаболит ( <i>m/z</i> 330,3), %
Целые клетки	80,6±0,5	–	98,1±1,9	1,9±0,5
Супернатант с цитоплазматическими ферментами	33,5±3,6	30,3±3	100	–
Супернатант с экстрагированными мембраносвязанными ферментами	100	–	100	–
Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами	84,7±3,4	–	90,3±4,9	8,2±1,0

Примечание. Приведены результаты после 24 ч инкубирования клеточных фракций с ДАК.

При этом количественное содержание данного производного сопоставимо с таковым при использовании целых клеток.

Полученные данные свидетельствуют о прочной связи ферментов, катализирующих окисление ДАК до метаболита (*m/z* 330,3), с клеточной мембраной родококков. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в биодеструкции ДАК, локализованы в цитоплазме и характеризуются более умеренной активностью, по сравнению с ферментами, участвующими в образовании 5 $\alpha$ -гидрокси-производного и прочно связанными с плазматической мембраной.

## Глава 5. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОДЕСТРУКЦИИ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

### 5.1. Биодеструкция ДАК клетками в стадии стационарной фазы роста, отмытыми от источников питания

Одним из распространенных методов оптимизации процесса биоконверсии органических соединений является применение так называемых “нерастущих клеток” (“resting cells”) – клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания. Известно много примеров использования таких клеток для биотрансформации  $\beta$ -ситостерола, андростендиона, бетулина и других соединений (Тарасова, 2014; Angelova *et al.*, 2005; de Carvalho *et al.*, 2009). Данный подход заключается в использовании биомассы, отделенной от среды выращивания и ресуспензированной в буферном растворе. Отсутствие ростовых факторов позволяет регулировать количество биомассы и ее физиологическое состояние, что способствует повышению эффективности и сокращению продолжительности целевого процесса. В то же время, использование в качестве среды биотрансформации или биodeградации буферного раствора позволяет снизить риск бактериального загрязнения, ограничить рост посторонней микрофлоры, облегчить процесс выделения метаболитов (если таковые имеются) (Bicho *et al.*, 1995; Grishko *et al.*, 2013; Tarasova *et al.*, 2017).

В настоящем исследовании показано, что использование “нерастущих” клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 не дало ожидаемого эффекта повышения эффективности процесса биотрансформации ДАК. При этом концентрация ДАК в среде в течение всего срока эксперимента не изменялась (рисунок 20).

“Нерастущие” клетки устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в отличие от менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 сохраняли способность к биодеструкции ДАК. При этом наиболее эффективным оказалось использование клеток, предварительно выращенных в МПБ.

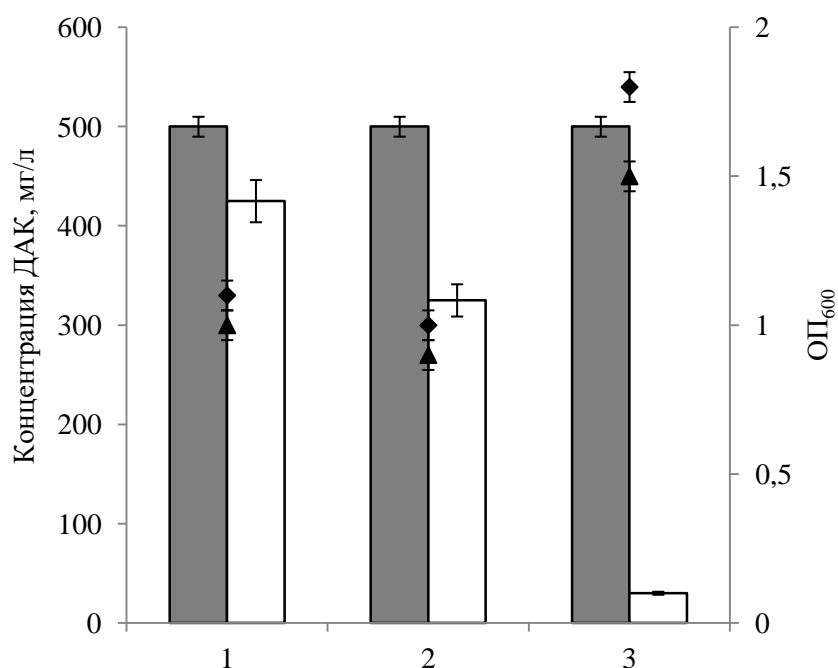


Рисунок 20 – Биодеструкция ДАК “нерастущими” клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (■) и *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (□), полученными в стационарной фазе роста, отмытыми от источников питания и предварительно выращенными в минеральной среде с *n*-гексадеканом (1,0 об. %) (1), глюкозой (1,0 г/л) (2), в МПБ (3). Плотность биомассы (ОП<sub>600</sub>) клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (▲), *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (◆). Приведены результаты после 5 сут культивирования в фосфатном буфере (рН 7,0).

Актинобактерии, предварительно выращенные в минеральной среде с *n*-гексадеканом, образовывали агрегаты, которые было трудно отделять от компонентов среды культивирования, в том числе остаточного *n*-алкана. Использование минеральной среды с глюкозой не позволяло получать большого количества биомассы. Предварительное выращивание в богатой питательной среде (МПБ) позволяло получить суспензию с высокой плотностью и сократить продолжительность процесса биодеструкции. На 5 сут эксперимента концентрация ДАК в реакционной среде составляла 30 мг/л.

В работах (Maniyam *et al.*, 2011; Grishko *et al.*, 2013; Nawawi *et al.*, 2016) по использованию “нерастущих” клеток показана зависимость между количеством использованной биомассы и уровнем деструктирующей или трансформирующей

активности. Подобная закономерность обнаружена при биодеструкции ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. Как видно из рисунка 21, наиболее эффективным оказалось использование бактериальной суспензии (ОП<sub>600</sub> 2,5), что позволяло достигать практически полной (более 99 %) утилизации ДАК в течение 5 сут.

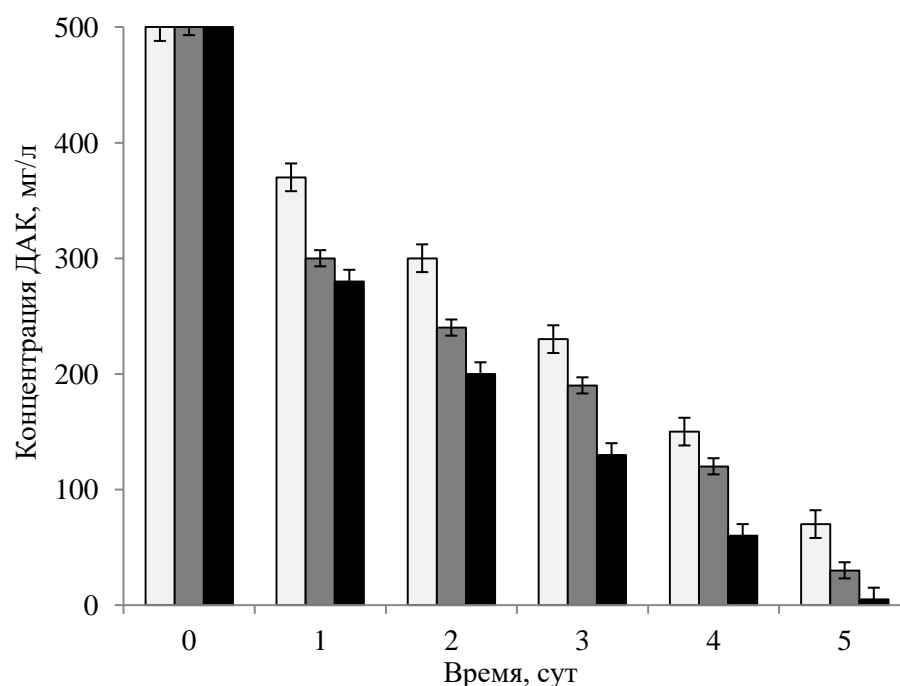


Рисунок 21 – Влияние оптической плотности суспензии “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, полученных в стадии стационарной фазы роста и ресуспендированных в фосфатном буферном растворе (рН 7,0), на уровень биодеструкции ДАК. ОП<sub>600</sub> 1,5 (□); 2,0 (■); 2,5 (■).

По нашим данным, на уровень деструктирующей активности “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 влияет значение рН использованного буферного раствора (рисунок 22). Применение буфера (рН 8,0) существенно сокращало продолжительность процесса биодеструкции ДАК до 3 сут, при этом остаточное содержание исходного токсиканта составляло не более 1 % (5 мг/л).

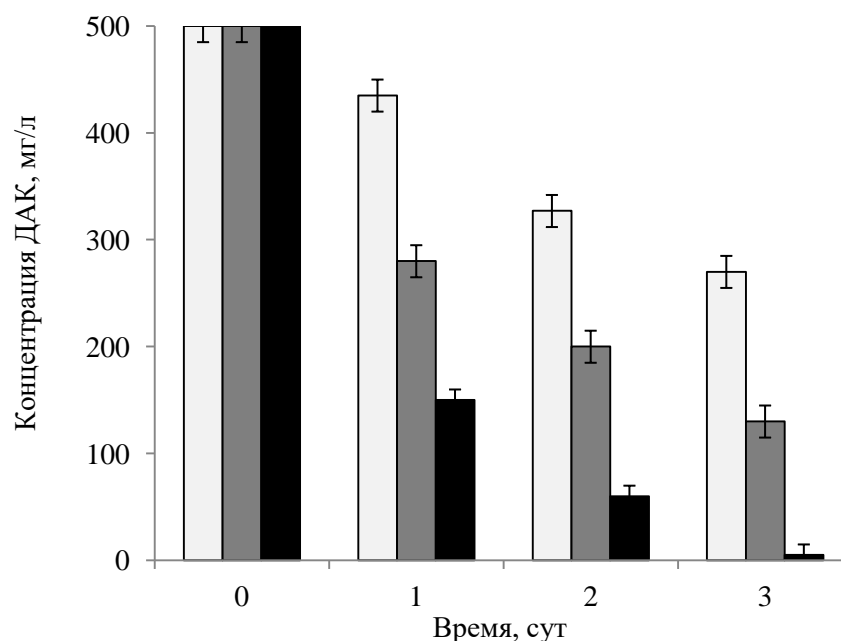


Рисунок 22 – Влияние показателя рН на деструктирующую активность “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. рН 6,0 (□); 7,0 (■); рН 8,0 (■). ОП<sub>600</sub> 2,5.

Исследование интенсивности дыхания “нерастущих” клеток показало, что скорость потребления O<sub>2</sub> и выделения CO<sub>2</sub> зависит от рН буферного раствора. В начале эксперимента максимальную скорость выделения CO<sub>2</sub> “нерастущими” клетками регистрировали при использовании буфера рН 7,0. При ресуспензировании биомассы в буферных растворах рН 6,0 и 8,0 отмечали некоторое снижение респираторной активности клеток. Как видно из рисунка 23А, внесение ДАК в суспензию бактериальных клеток в начале эксперимента приводило к снижению скорости выделения CO<sub>2</sub>, при этом наибольшее влияние ДАК оказывала при использовании буфера рН 8,0. Через 24 ч выявляли увеличение интенсивности дыхания клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. Наиболее существенное (с 6,46 до 25,60 мкл/мин) изменение скорости выделения CO<sub>2</sub> отмечали после внесения ДАК в бактериальную суспензию в буфере рН 8,0. В это же время (через 24 ч) наблюдалось увеличение деструктирующей активности бактериальных клеток (см. рисунок 22). При этом остаточное содержание ДАК составляло лишь 150 мг/л. В целом, респираторная активность “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии ДАК была значительно выше

таковой, выявленной в контрольных вариантах опыта. Использование рН 6,0 (63114,46 мкл) и 8,0 (61776,07 мкл) сопровождалось снижением общего количества выделяемого  $\text{CO}_2$  на 10 и более %, по сравнению таковым при рН 7,0 (70935,41 мкл). При рН 7,0 средняя скорость выделения  $\text{CO}_2$  в течение эксперимента была достоверно выше, чем таковая при рН 6,0 и 8,0.

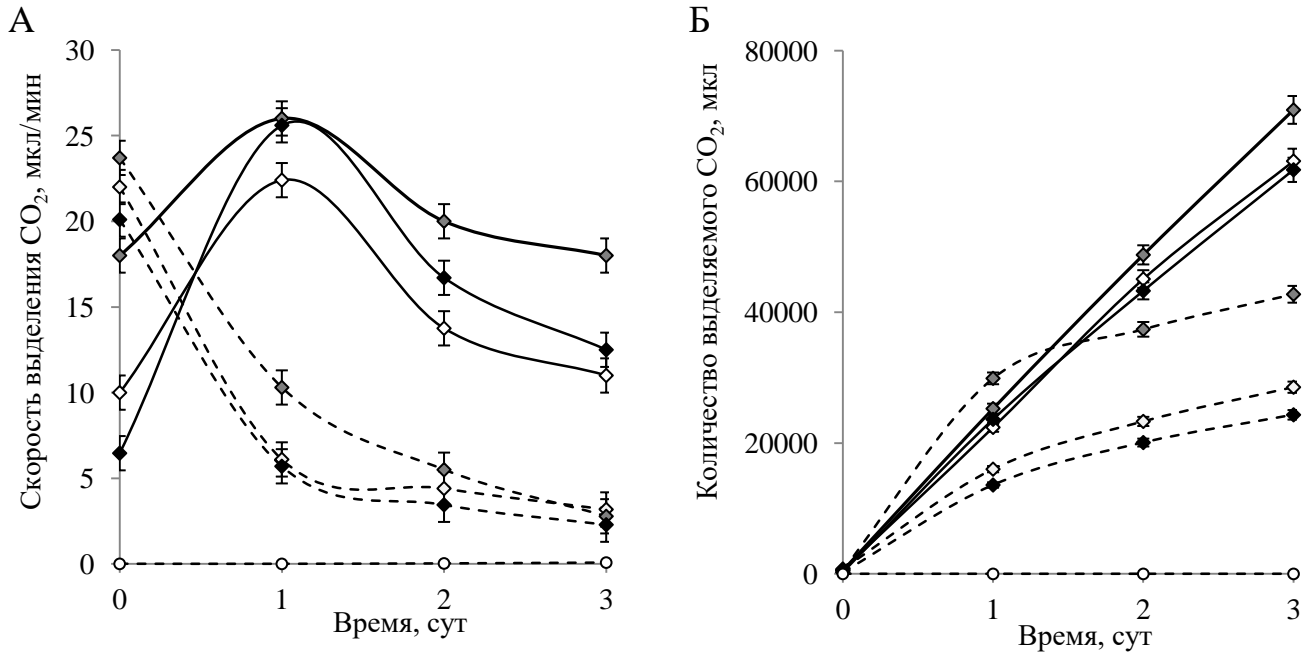


Рисунок 23 – Динамика скорости выделения  $\text{CO}_2$  (А) и общего количества выделяемого  $\text{CO}_2$  (Б) “нерастущими” клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в процессе биодеструкции ДАК (сплошные линии), биотический контроль (пунктирные линии), абиотический контроль (○). ОП<sub>600</sub> 2,5. Фосфатный буфер рН 6,0 (◇), 7,0 (◆); 8,0 (◆).

При АСМ-сканировании “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии ДАК на многих образцах обнаруживали липофильную жидкость (рисунок 24А,Б), подобную той, что была обнаружена нами ранее на АСМ-изображениях клеток, предварительно выращенных в присутствии *n*-гексадекана (см. рисунок 19А,В).

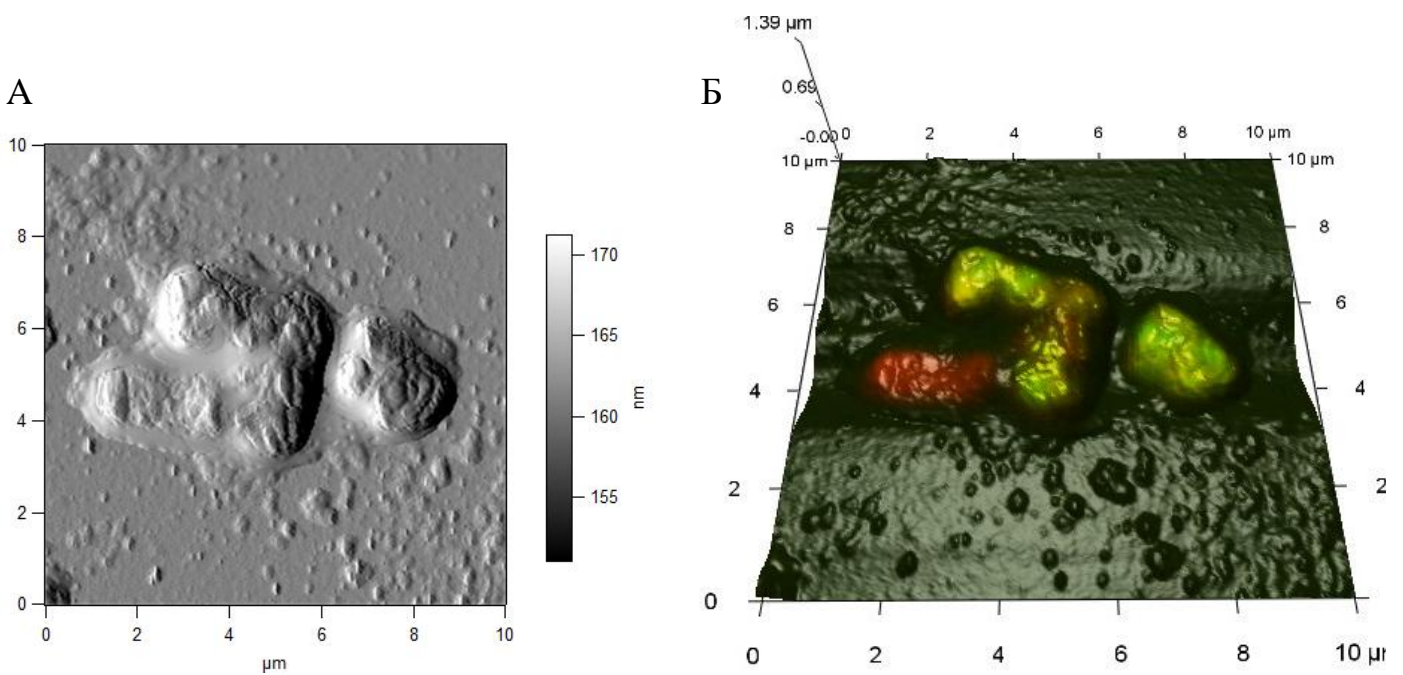


Рисунок 24 – АСМ- (А) и АСМ-КЛСМ-изображение (Б) “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (ОП<sub>600</sub> 2,5) в присутствии ДАК. Приведены результаты после 3 сут культивирования бактериальных клеток в буферном растворе (рН 8,0).

Средние значения размерных параметров, а также среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности и электрокинетического потенциала “нерастущих” клеток в присутствии ДАК достоверно не отличались от таковых в контрольных вариантах опыта (таблица 16).

Таблица 16 – Влияние ДАК свойства “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107

Условия культивирования	Размеры				Шероховатость, нм	Электрокинетический потенциал
	Длина, мкм	Ширина, мкм	Объем, мкм <sup>3</sup>	Площадь, мкм <sup>2</sup>		
В присутствии ДАК	1,2±0,38	1,29±0,37	1,56±0,28	5,04±0,66	308,2±11,3	-17,3±1,1
Биотический контроль	1,1±0,11	1,1±0,19	0,95±0,38	3,79±0,72	297,1±14,1	-17,9±0,9

Примечание. Приведены данные АСМ-сканирования и измерения электрокинетического потенциала “нерастущих” клеток после 3 сут эксперимента в присутствии ДАК в фосфатном буфере (рН 8,0).



Полученные данные свидетельствуют об устойчивости “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 к воздействию ДАК, по сравнению с таковой активно растущих в присутствии *n*-гексадекана (см. таблицы 13, 14).

## 5.2. Биодеструкция ДАК иммобилизованными актинобактериями

Иммобилизация – один из распространенных способов оптимизации процесса биоконверсии гидрофобных органических соединений (Мухутдинова, 2014; Серебренникова, 2014; Ivshina *et al.*, 2012; Kylosova *et al.*, 2016). В настоящей работе для сравнения эффективности биодеструкции ДАК свободными и закрепленными клетками использовали прием адсорбционной иммобилизации бактериальных клеток на твердых носителях, а также включение актинобактерий в криогель на основе ПВС. Как видно из рисунка 25, исследованные бактериальные штаммы обладали различной способностью прикрепления их клеток на твердых поверхностях носителей.

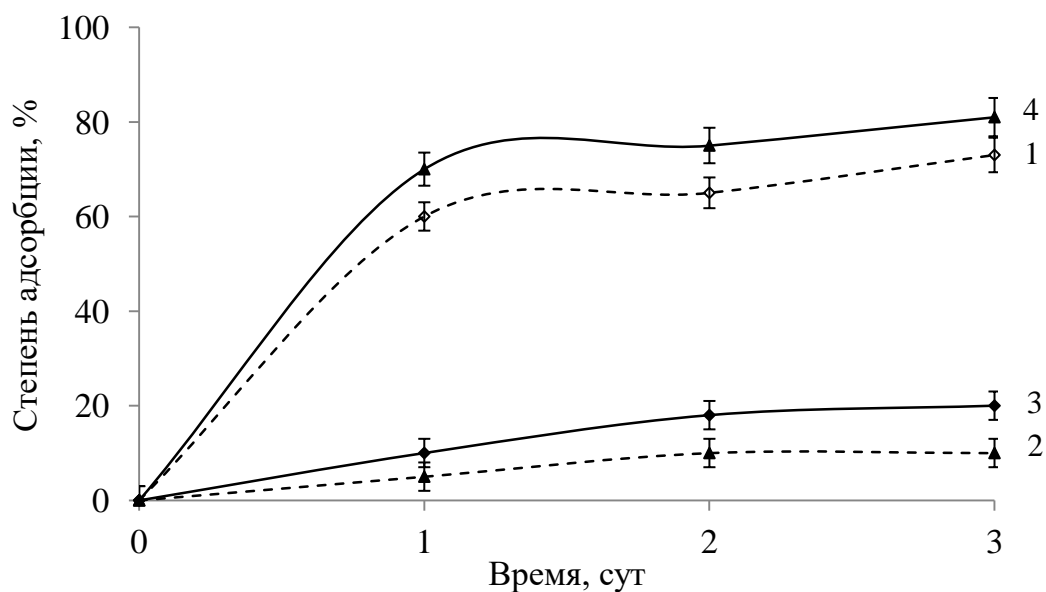


Рисунок 25 – Степень адсорбции (%) бактериальных клеток на поверхности твердых носителей. 1 – клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, закрепленные на технической ткани, 2 – полипропиленовых дисках, 3 – клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 267, закрепленные на технической ткани, 4 – полипропиленовых дисках.

Максимальная (82 %) степень адсорбции клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 зарегистрирована на поверхности технической ткани, тогда как клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 267 лучше адсорбировались на полипропиленовых дисках.

Закрепленные клетки сохраняли способность к биоконверсии ДАК, при этом продолжительность процесса практически не отличалась от таковой с использованием свободных клеток (рисунок 26). Адсорбционная емкость носителя составляла не более 5–10 % от исходной концентрации ДАК.

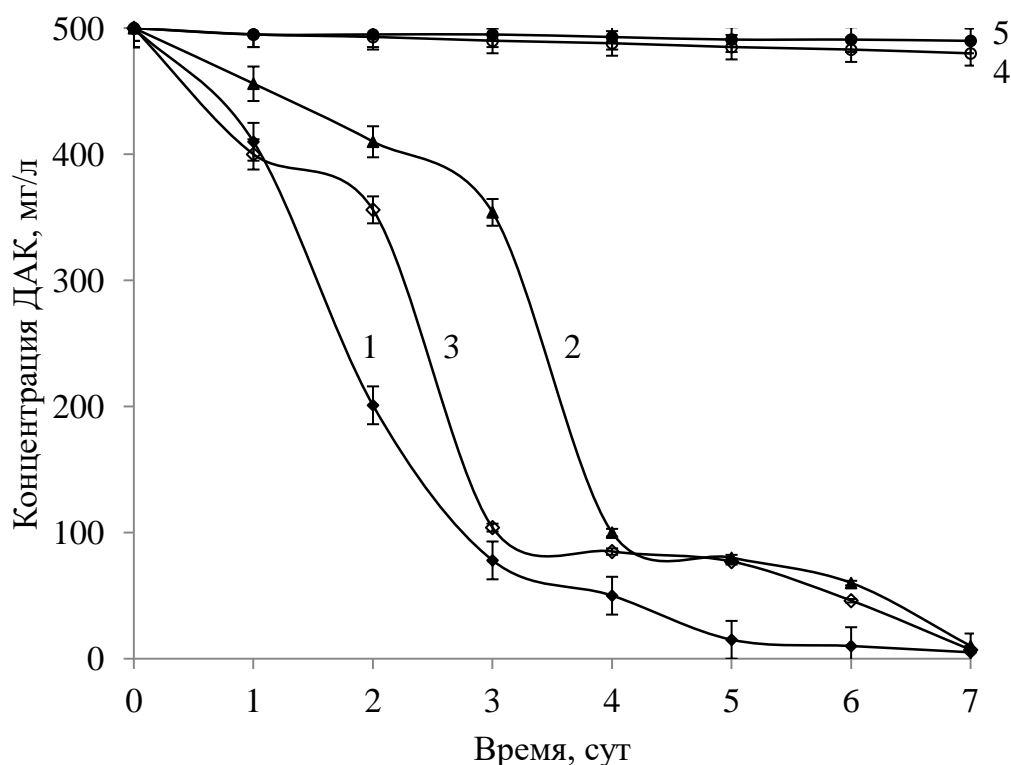


Рисунок 26 – Биодеструкция ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 иммобилизованными на поверхности технической ткани (1) или полипропиленовых дисков (2), свободными клетками (3). Контроль сорбции ДАК на поверхность технической ткани (4) и полипропиленовых дисков (5).

Особо следует отметить, что в случае использования иммобилизованных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 среди выявляемых метаболитов появлялся новый ранее не описанный метаболит ( $m/z$  288,1) (таблица 17).

Таблица 17 – Биоконверсия ДАК иммобилизованными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267

Носитель	Биоконверсия ДАК, %		
	Остаточная ДАК	Метаболит ( $m/z$ 330,3)	Метаболит ( $m/z$ 288,1)
Ткань	86,0±4,2	11,7±2,8	2,3±1,0
Полипропиленовые диски	85,5±6,9	10,2±4,1	4,2±1,9
Свободные клетки	86,0±4,9	14,0±1,2	–

Примечание. Приведены результаты после 7 сут культивирования иммобилизованных актинобактерий в присутствии ДАК.

При использовании в качестве носителя криогеля на основе ПВС установлено, что деструктирующая (с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107) и трансформирующая (с использованием штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267) активность родококков достоверно снижалась (рисунок 27), по сравнению с таковой незакрепленных клеток.

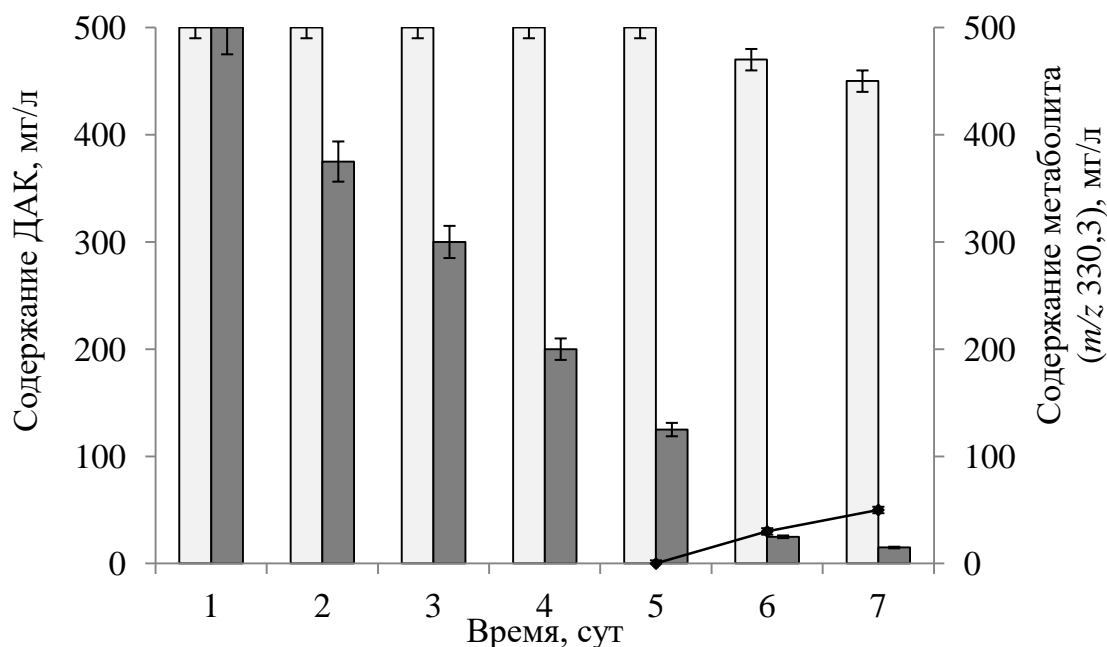


Рисунок 27 – Биодеструкция ДАК (%) с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (■) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (□), иммобилизованных в криогель на основе ПВС. ♦ – образование (%) метаболита ( $m/z$  330,3) клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267.

### 5.3. Использование предварительно адаптированных к ДАК бактериальных клеток

В настоящее время перспективным является не только поиск способов биодеструкции ДАК, но и получение на ее основе новых метаболитов, перспективных для практического использования. В связи с этим последующие эксперименты были направлены на увеличение выхода обнаруженных нами новых метаболитов. Использование “нерастущих” и иммобилизованных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 существенно не увеличивало выход целевых продуктов, поэтому наши исследования были направлены на подбор оптимальных условий биотрансформации ДАК с использованием растущей культуры родококков.

Как было показано ранее, на уровень трансформирующей активности актинобактерий положительно влияет предварительное выращивание их в среде, содержащей *n*-гексадекан (Vorob'ev *et al.*, 2001; Ivshina *et al.*, 2005; Elkin *et al.*, 2013). На рисунке 28 приведены данные по изучению продукции метаболита ( $m/z$  330,3) в зависимости от первоначальной концентрации *n*-гексадекана в среде культивирования клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267.

По нашим данным, внесение более 0,1 об. % *n*-гексадекана не способствовало увеличению выхода целевых метаболитов. Как показано на рисунке 28, предварительное выращивание родококков в присутствии 0,06 об. % *n*-гексадекана приводило к увеличению уровня образования метаболита ( $m/z$  330,3) до 26,74 % (133,7 мг/л). И, хотя, до внесения ДАК значение ОП<sub>630</sub> клеточной суспензии, окрашенной йоднитротетразолием, не превышало 0,57, количество биомассы родококков в конце эксперимента было в среднем на 40 % выше, по сравнению с другими вариантами опыта.

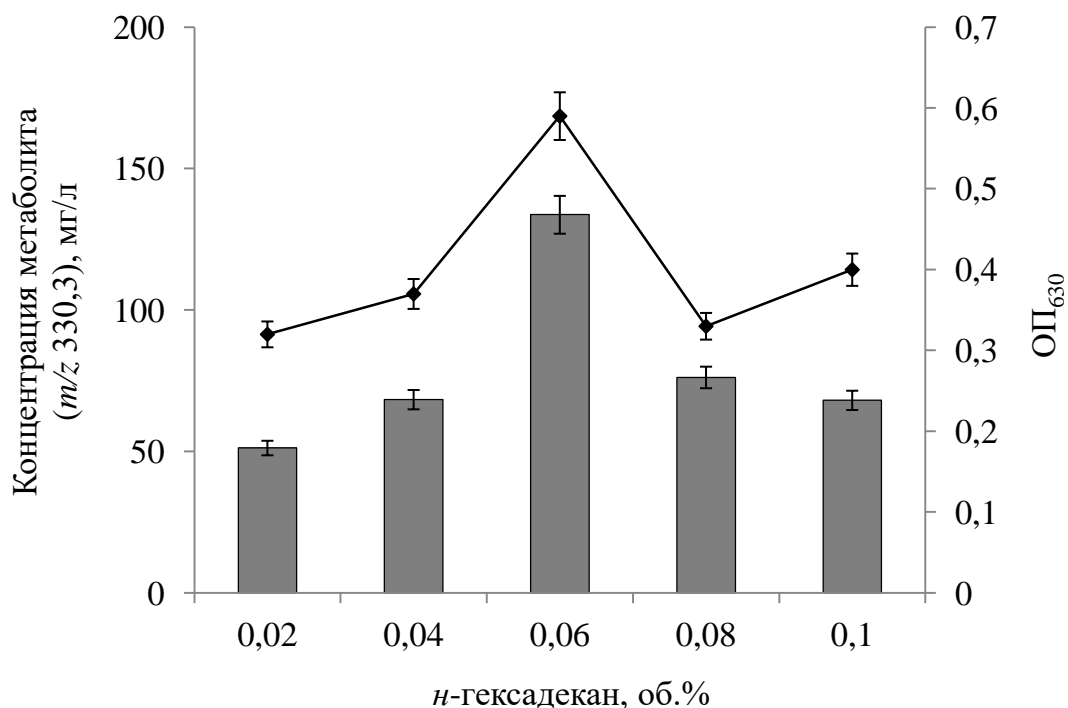


Рисунок 28 – Концентрация метаболита ( $m/z$  330,3) в среде культивирования *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в присутствии ДАК в зависимости от исходной концентрации *n*-гексадекана. Количество (ОП<sub>630</sub>) бактериальных клеток (♦). Приведены результаты ГХ-МС, полученные после 7 сут культивирования актинобактерий в присутствии ДАК.

Исследование динамики образования продуктов биотрансформации ДАК показало, что при использовании клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267, предварительно выращенных в присутствии 0,06 об. % *n*-гексадекана, метаболит ( $m/z$  330,3) образуется уже на 2 сут эксперимента и до 7 сут остается на одном уровне (рисунок 29). Подобранные условия процесса позволяют селективно получать соединение ( $m/z$  330,3) в концентрации до 27 % в течение 2 сут инкубации родококков.

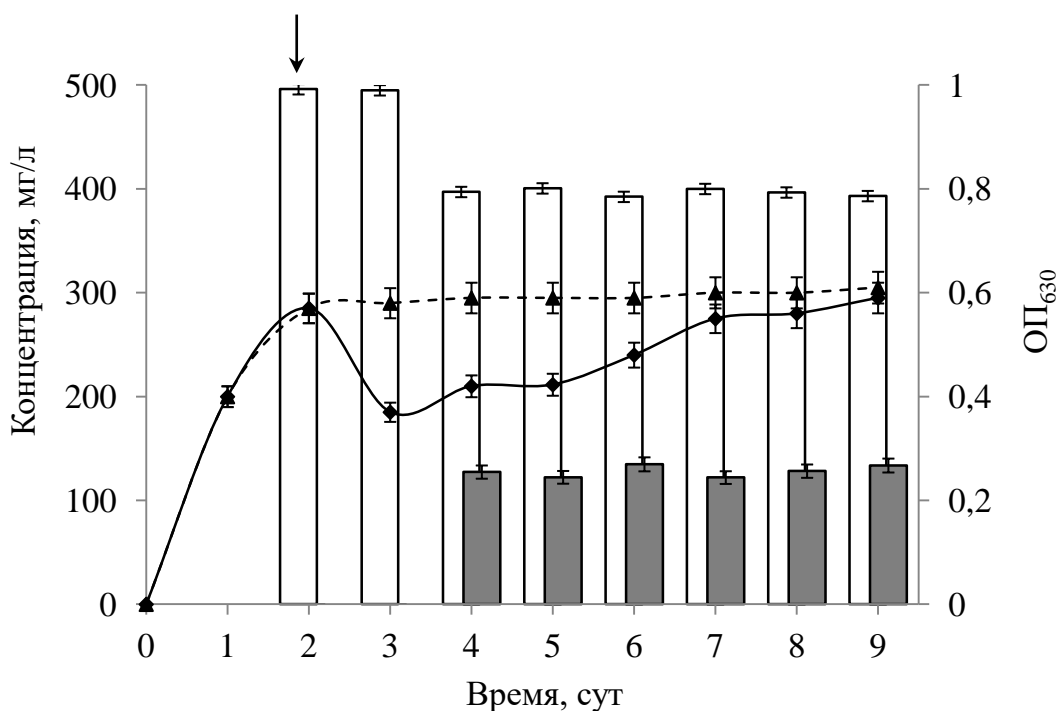


Рисунок 29 – Биодеструкция ДАК клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267, предварительно выращенными в присутствии 0,06 об. % *n*-гексадекана. Концентрация (мг/л) ДАК (□) и метаболита ( $m/z$  330,3) (■); количество (ОП<sub>630</sub>) бактериальных клеток в присутствии *n*-гексадекана (▲), после внесения ДАК (◆).

С целью повышения устойчивости родококков к воздействию экополлютантов, в работах по биодеструкции и биотрансформации токсичных соединений с использованием этой группы актинобактерий нередко используют прием преинкубации бактериальных клеток в присутствии ксенобиотика (Ivshina *et al.*, 2012). Как видно из рисунка 30, использование этого приема привело к повышению уровня трансформирующей активности родококков в отношении ДАК и накоплению продуктов ее трансформации – 244 мг/л метаболита ( $m/z$  330,3) и 190 мг/л метаболита ( $m/z$  288,1). Исследование динамики процесса биоконверсии ДАК показало, что в реакционной среде оба продукта обнаруживались только на 4 сут после внесения ДАК и до 7 сут включительно их количество постепенно увеличивалось.

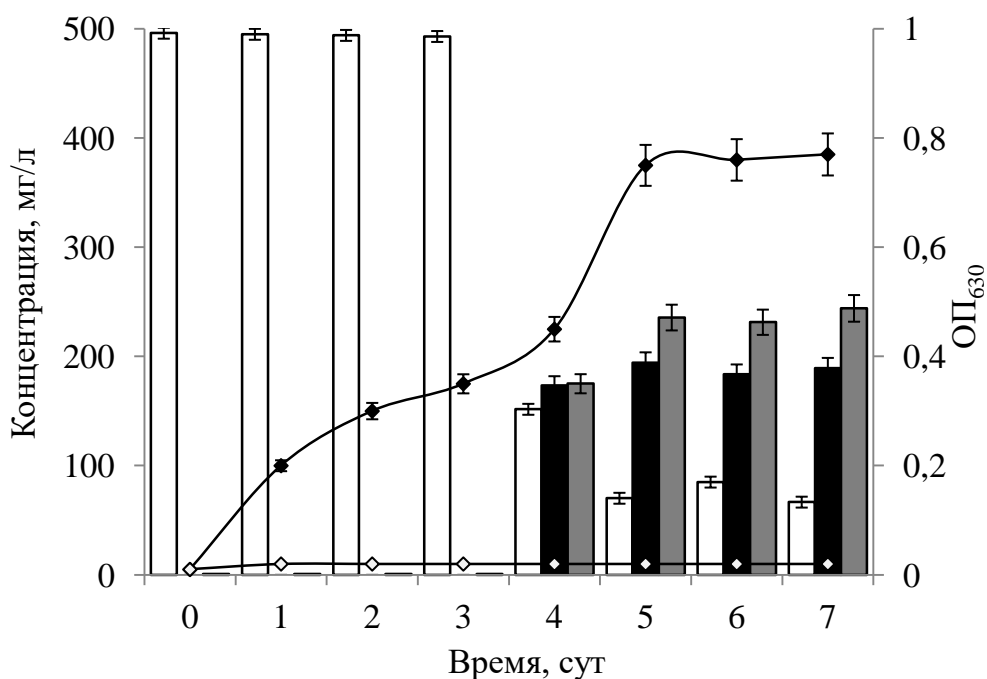


Рисунок 30 – Биодеструкция ДАК предварительно адаптированными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267. Концентрация (мг/л) ДАК (□), метаболитов ( $m/z$  330,3) (■) и ( $m/z$  288,1) (■); ОП<sub>630</sub> в присутствии 500 мг/л ДАК (◆), ОП<sub>630</sub> в биотическом контроле (◇).

Возможно, факт отсроченной регистрации метаболитов (через 4 сут) в минеральной среде связан с изначально меньшей (ОП<sub>630</sub> 0,01) концентрацией клеток на момент внесения ДАК, по сравнению с использованием родококков, предварительно выращенных в присутствии *n*-гексадекана (ОП<sub>630</sub> 0,75). На 4 сут, по-видимому, достигается оптимальная концентрация клеточной биомассы, при которой прединкубированные бактериальные клетки могут проявлять биотрансформирующую активность.

Необходимо особо отметить, что в случае использования предварительно адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 внесение токсиканта не оказывало негативного влияния, как на прирост биомассы (рисунок 30), так и интенсивность дыхания (рисунок 31А,Б). Как видно на рисунке 31А, максимальная скорость выделения СО<sub>2</sub> обнаруживалась на 3 сут культивирования штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в присутствии ДАК, что по-видимому, связано с увеличением биомассы и трансформирующей активности адаптированных

клеток. В целом, средние показатели интенсивности дыхания адаптированных клеток в течение всего периода биоконверсии ДАК были намного выше таковых неадаптированных клеток (выращенных только в присутствии *n*-гексадекана) (см. рисунок 13Б).

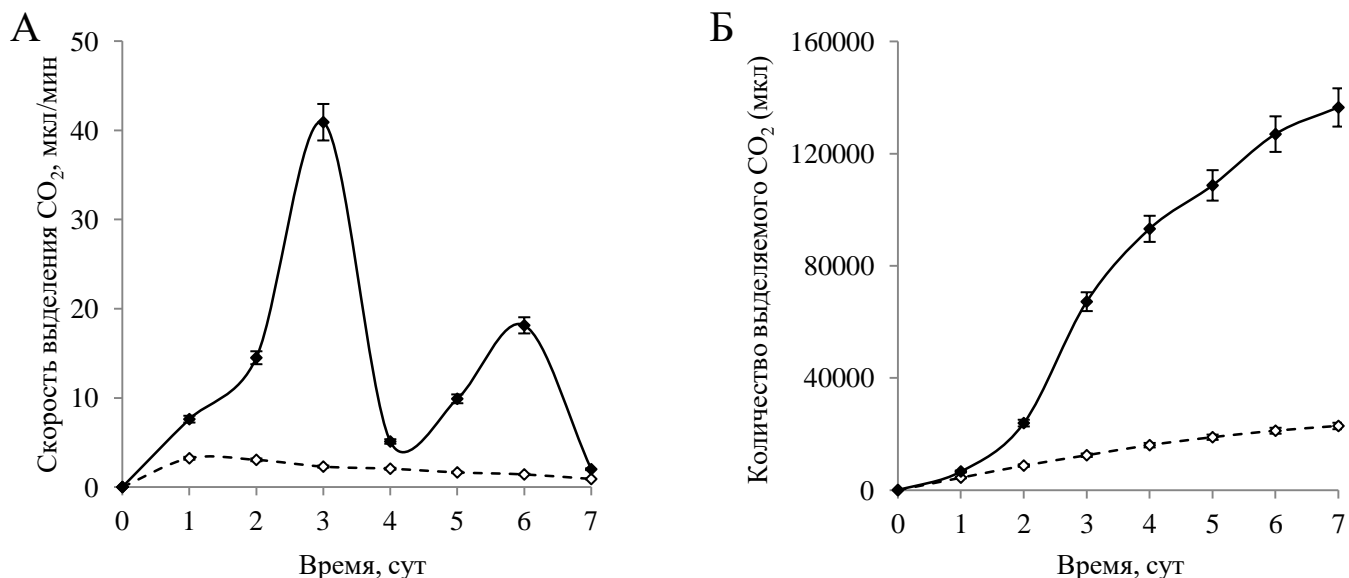


Рисунок 31 – Динамика скорости выделения CO<sub>2</sub> (А) и общего количества выделяемого CO<sub>2</sub> (Б) адаптированными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в процессе биодеструкции ДАК (◆), биотический контроль (◇).

По нашим данным, использование приема предварительной адаптации клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 позволило увеличить значения МПК ДАК с 24 до 390 мг/л, по сравнению с неадаптированными клетками. Ранее (см. п.п. 4.1) было показано, что внесение ДАК в среду культивирования *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в присутствии *n*-гексадекана индуцировало значительное изменение морфометрических параметров и свойств клеточной поверхности. Как видно из таблицы 18, изменение данных показателей адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 менее выражены. Так, размер агрегатов адаптированных клеток не превышал 0,5 мм, а длина и ширина клеток увеличивалась не более, чем на 33 и 12 % соответственно. Показатель среднеквадратичной шероховатости поверхности клеток, предварительно выращенных в присутствии *n*-гексадекана и при последующим добавлении ДАК, изменялся на 65 %, в то время как аналогичный показатель адаптированных клеток увеличивался лишь на 14 %.



Таблица 18 – Влияние ДАК на свойства адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267

Условия культивирования	Размеры клеток					Шероховатость, нм	Электрокинетический потенциал, мВ
	Длина, мкм	Ширина, мкм	Объем, мкм <sup>3</sup>	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Соотношение Объем/площадь		
В присутствии ДАК	6,5±0,4	1,2±0,1	7,8±0,1	15,1±0,1	1,9	317,4±12,4	-23,6±0,6
Биотический контроль	4,3±0,3	1,1±0,1	4,0±0,1	9,3±0,1	2,3	270,7±9,4	-26,9±0,5

Примечание. Приведены данные после 7 сут культивирования родококков в минеральной среде с 500 мг/л ДАК.

Следует отметить, что в отличие от ранее полученных результатов, значение электрокинетического потенциала поверхности клеток в присутствии ДАК увеличивалось. Отмеченного ранее “двойного” (зелено-оранжевого) свечения на КЛСМ и КЛСМ-АСМ изображениях клеток не регистрировалось (рисунок 32Б). Полученные данные свидетельствуют о сравнительной устойчивости адаптированных бактериальных клеток к воздействию ДАК.

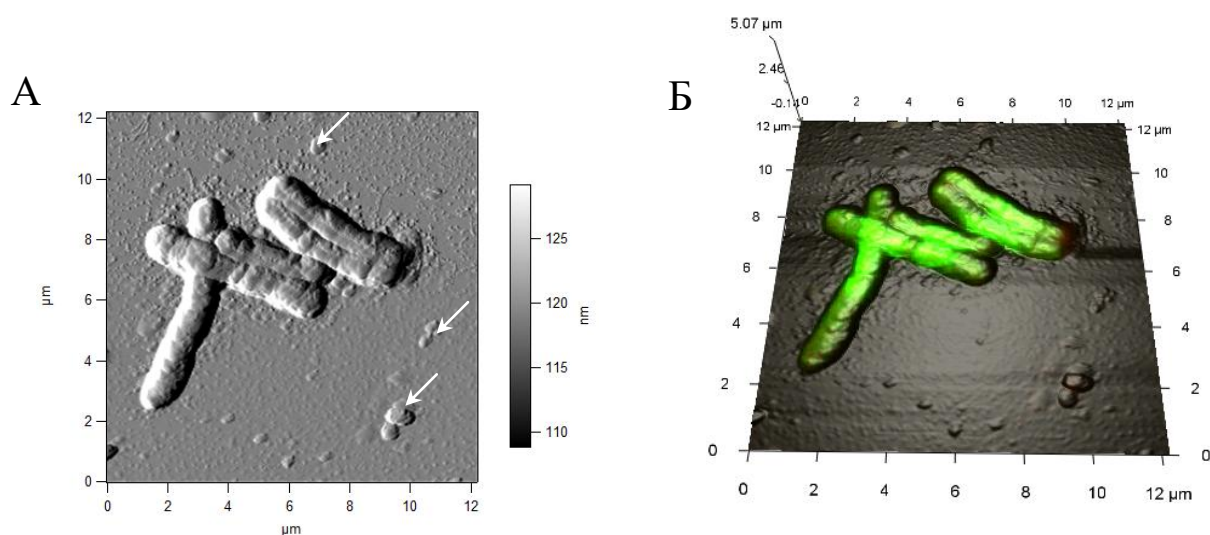


Рисунок 32 – АСМ- (А) и АСМ-КЛСМ-изображения (Б) адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267. Приведены данные после 7 сут культивирования с ДАК. Стрелками обозначены кристаллы ДАК.

## Глава 6. ПУТИ БИОДЕСТРУКЦИИ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ АКТИНОБАКТЕРИЯМИ

### 6.1. Исследование продуктов биодеструкции ДАК

Важен не только поиск эффективных способов нейтрализации токсичной ДАК, но и получение на ее основе новых соединений. В литературе описаны многочисленные примеры биодеструкции ДАК с образованием устойчивых метаболитов (применение ингибиторов) или направленной трансформации ДАК (см. п.п. 1.2., 1.3.). По нашим данным, в среде культивирования адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 наряду с ДАК обнаруживались два соединения дитерпеновой природы с пиком молекулярного иона  $m/z$  330,3 и 288,1 (рисунок 33, 34).

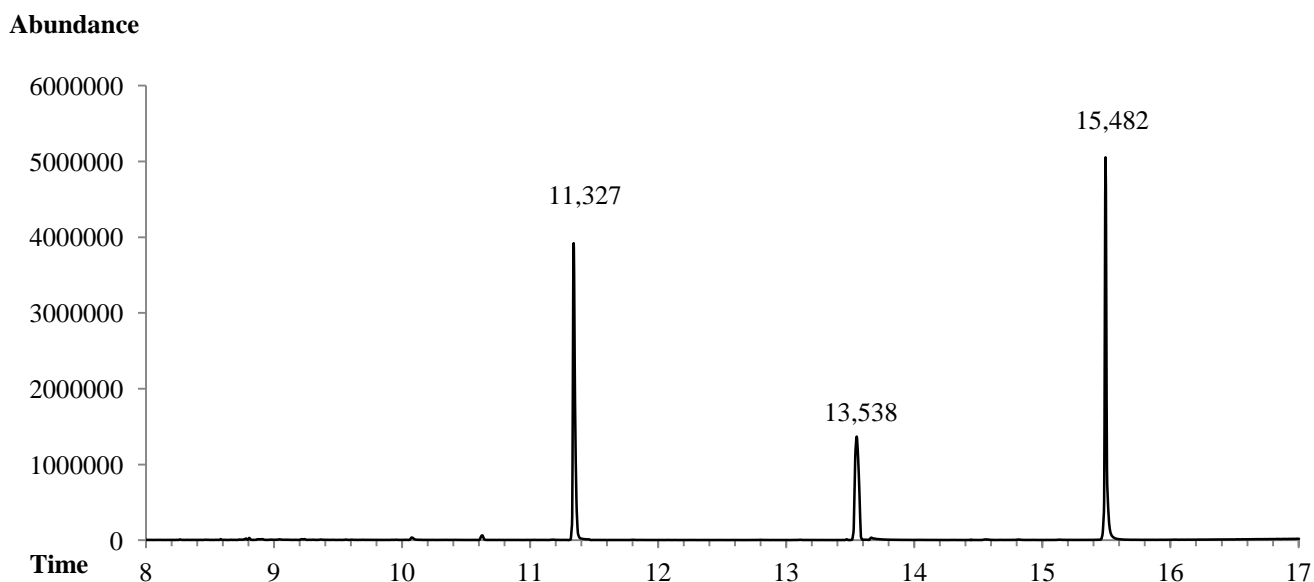


Рисунок 33 – ГХ-МС-хроматограмма продуктов биодеструкции ДАК прединкубированными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267. Пики на хроматограмме соответствуют ДАК (13,538), метаболитам  $m/z$  330,3 (15,482) и  $m/z$  288,1 (11,327).

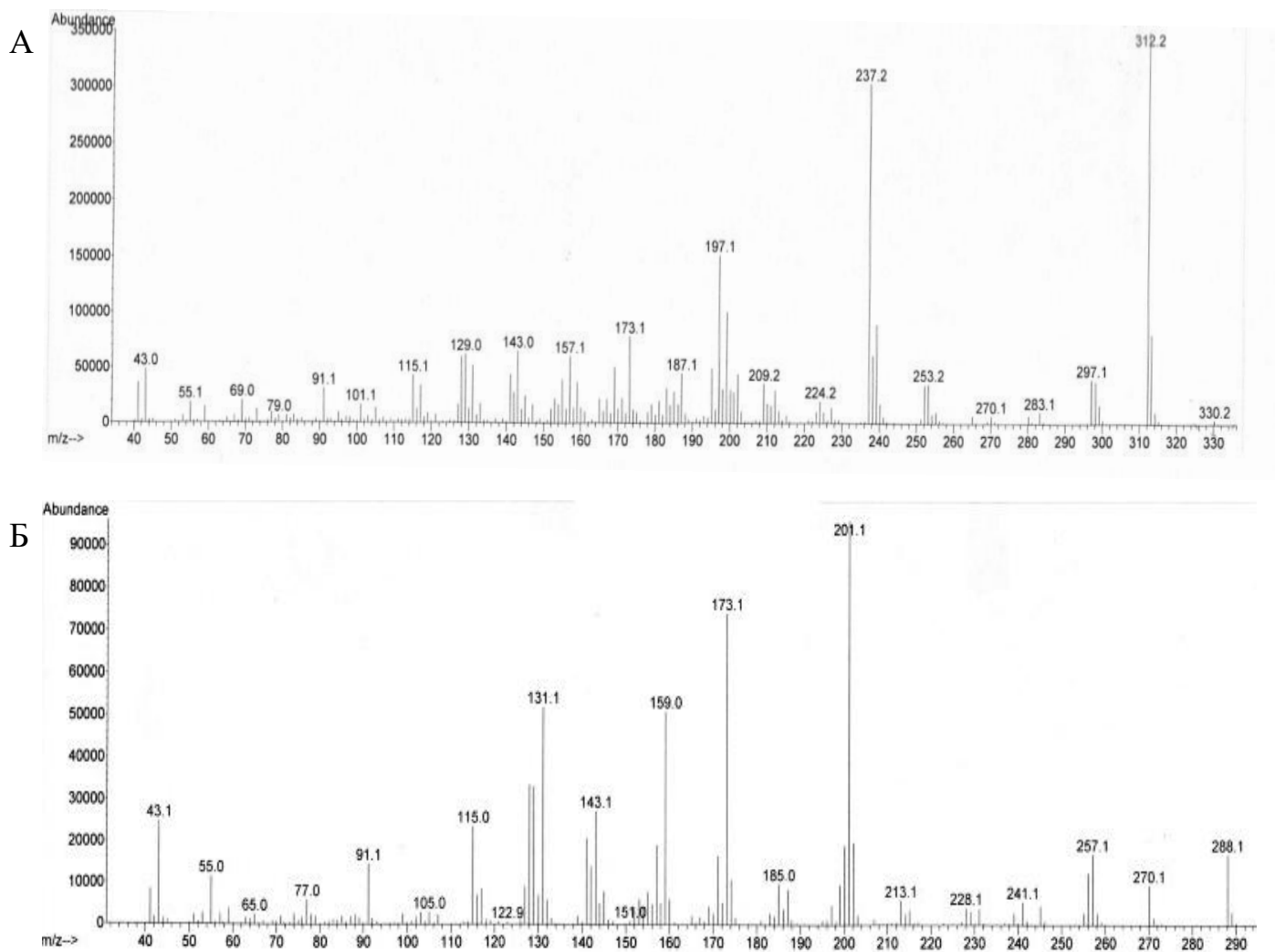
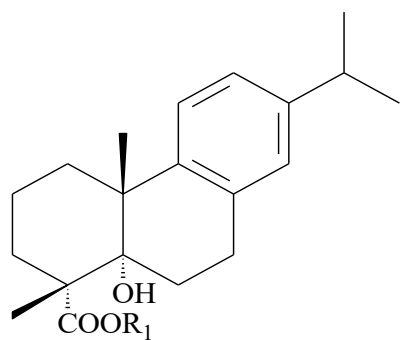
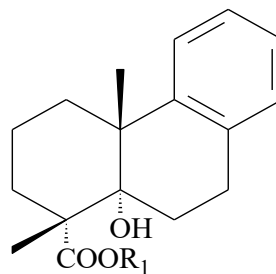


Рисунок 34 – Масс-спектры продуктов биоконверсии ДАК прединкубированными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267. Метаболиты: А –  $m/z$  330,3; Б –  $m/z$  288,1.



**49:**  $R_1 = H$ ,

**50:**  $R_1 = CH_3$ ,



**51:**  $R_1 = H$ ,

**52:**  $R_1 = CH_3$ ,

Метаболиты  $m/z$  330,3 (соединение **50**) и  $m/z$  288 (соединение **52**) представляют собой метиловые эфиры новых соединений **49** и **51**, полученных в настоящем исследовании. Для идентификации структуры этих метаболитов этилацетатный экстракт продуктов биотрансформации концентрировали и затем метилировали метилиодидом. Соединение **50** в виде бесцветного игольчатого кристалла (в *n*-гексане) выделяли из метилированного экстракта флеш-хроматографией на силикагеле.

В ИК-спектрах соединения **50** присутствуют полосы поглощения при 3480  $\text{cm}^{-1}$  и 1721  $\text{cm}^{-1}$ , что говорит о присутствии в структуре производного ДАК гидроксильных и карбонильных групп (рисунок 35).

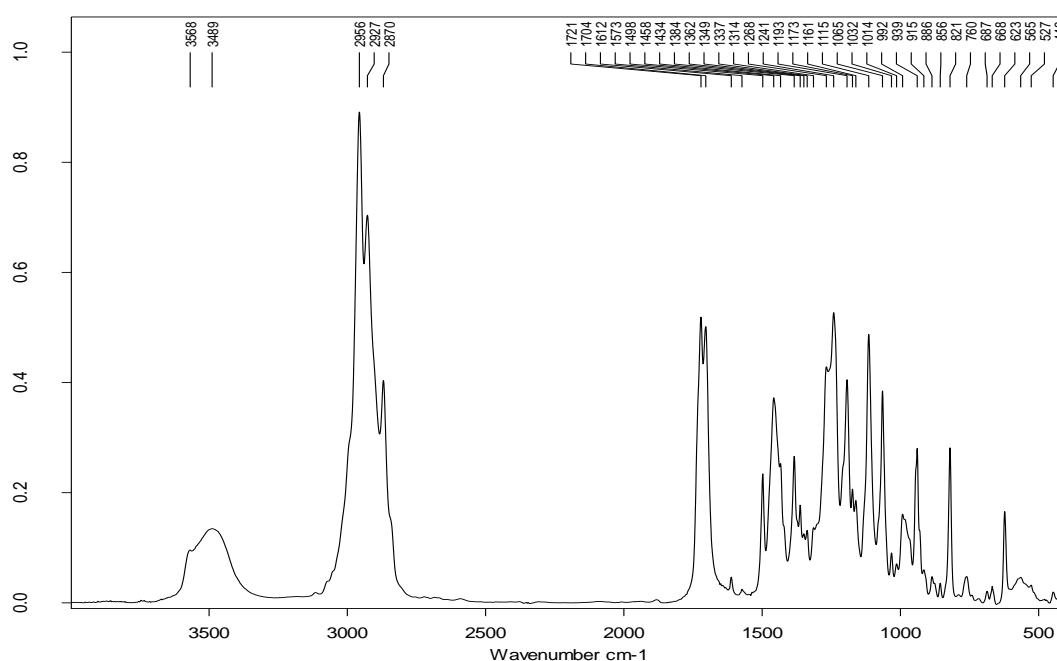


Рисунок 35 – ИК-спектр соединения **50**.

На  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектре (DEPT и APT) соединения **50** и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектре метилового эфира ДАК (de Carvalho *et al.*, 2008) обнаруживалось наличие 21 сигнала углерода, включая две третичные и две вторичные метильные группы, бензольное кольцо и сигналы с низким содержанием кислорода (таблица 19). Среди спектральных сигналов  $sp^3$  соединения **50**, измерения DEPT показали только один третичный (CH) углерод при  $\delta\text{C}$  32,95 ppm, относящийся к C-15, и новый синглет четвертичного углерода при  $\delta\text{C}$  75,04 ppm, относящийся к C-5,

Таблица 19 –  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР данные соединения 50

Позиция	$\delta_{\text{C}}^{13}\text{C}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^1\text{H}$	HMBC
1	31,02	$\text{CH}_2$	2,03 m 2,11 m	H-1/C-2; H-1/C-3; H-1/C-5; H-1/C-9; H-1/C-20
2	17,49	$\text{CH}_2$	1,84 m	H-2/C-3; H-2/C-4; H-2/C-10
3	31,53	$\text{CH}_2$	2,41 m 1,58 m	H-3/C-1; H-3/C-2; H-3/C-4; H-3/C-5; H-3/C-18; H-3/C-19
4	50,62	C	–	
5	75,04	C	–	
6	25,31	$\text{CH}_2$	2,09 m 2,32 m	H-6/C-4; H-6/C-5; H-6/C-7; H-6/C-8; H-6/C-10
7	25,13	$\text{CH}_2$	2,92 m 3,06 m	H-7/C-5; H-7/C-8; H-7/C-9
8	133,72	C	–	
9	144,34	C	–	
10	42,22	C	–	
11	123,43	CH	7,14 d (8,2)	H-11/C-7; H-11/C-8; H-11/C-10; H-11/C-13
12	123,70	CH	7,01 brdd (8,2, 1,7)	H-12/C-9; H-12/C-14; H-12/C-15
13	145,01	C	–	
14	125,00	CH	6,94 brd (1,7)	H-14/C-9; H-14/C-12; H-14/C-15
15	32,95	CH	2,85 sept (6,9)	H-15/C-16,17; H-15/C-13; H-15/C-14; H-15/C-12
16/17	23,42	$2\text{CH}_3$	1,25 d (6,9)	H-16,17/C-13; H-16,17/C-15; H-16/C-16,17; H-17/C-16,17
18	178,34	C	–	
19	19,22	$\text{CH}_3$	1,46	H-19/C-3; H-19/C-4; H-19/C-5; H-19/C-18
20	28,08	$\text{CH}_3$	1,33	H-20/C-3; H-20/C-5; H-20/C-9; H-20/C-10
21	51,45	$\text{CH}_3\text{OO}$ OH	3,73 3,36	H-21/C-18 OH/C-4; OH/C-5; OH/C-10

Примечание. Анализ проводили в  $\text{CDCl}_3$  при 400 ( $^1\text{H}$ -ЯМР) и 100 ( $^{13}\text{C}$ -ЯМР) МГц;  $\delta$  в ppm, s – синглет, d – дублет, dd – дублет дублета, sept – септет, m – мультиплет, значения J (Гц) указаны в скобках.

связанный с гидроксильной группой.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр исходной ДАК включал два третичных  $\text{sp}^3$ -углерода С-5 и С-15. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР соединения  $m/z$  330.3 **50** показал новый сигнал для гидроксильной группы при С-5 при  $\delta\text{H}$  3,36 ppm и неповрежденный сигнал сеплета Н-15 при  $\delta\text{H}$  2,85 ppm вместе с характерным набором сигналов метилового эфира ДАК (Landucci, Zinkel, 1991). На основе спектров 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  ЯМР (COSY, NOESY, HMQC, и HMBC) предлагается соединение **50** как производное метилабиета-8,11,13-триен-18-оата с третичной гидроксильной группой при атоме С-5.

Таким образом, наиболее информативными кросс-пиками в спектрах HMBC были Н-1 / С-2; Н-1 / С-3; Н-1 / С-20; Н-3 / С-5; Н-3 / С-18; Н-3 / С-19; Н-6 / С-5; Н-6 / С-7; Н-7 / С-8; Н-7 / С-9; Н-19 / С-4; Н-19 / С-5; Н-19 / С-18; Н-20 / С-10; ОН / С-4; ОН / С-5; ОН / С-10. Спектр NOESY соединения **50** подтвердил значительное взаимодействие NOE между осевой ОН-группой и осевым Н-3 и слабые пространственные взаимодействия ОН-группы с экваториальным Н-7 и обоими атомами Н-6, выявив относительную  $\alpha$ -ориентацию ОН при С-5.

*Метил эфир 5 $\alpha$ -гидрокси-абиета-8,11,13-триен-18-овой кислоты (50)*. Выход: 17 %,  $R_f$  0,62 (*n*-гексан/этилацетат 7:3),  $T_{\text{пл}}$ : 59,6°C (*n*-гексан),  $[\alpha]_{589}^{22}$  +24,0 (*c* 0,55,  $\text{CHCl}_3$ ). ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3480 br (ОН), 2956, 2927, 2870, 1721 (C=O, эфир), 1458, 1241 (C–O), 1193 (C–O), 1115, 939, 821  $\text{cm}^{-1}$ . ГХ-МС ( $m/z$ ): 330,3 ( $\text{M}^+$ ).

Метаболит  $m/z$  288,1 **52** выделить в чистом виде не удалось. Однако при сравнении известных масс-спектров соединений дитерпеновой структуры, наиболее вероятно, что метаболит **52** представляет собой соединение 15,16,17-тринор-абиетанового типа с ОН-группой в положение С-5.

В таблице 20 приведены результаты проведенной оценки биоактивности метаболитов ДАК на основе их структурных формул с помощью компьютерной программы PASS online (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). Наибольшая вероятность обнаружения активности в программе принималась за 1.

Таблица 20 – Расчет прогнозируемой биологической активности производных ДАК

Предполагаемая активность	Соединение 49		Соединение 51	
	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>
Антигиперхолестеролемическая	0,671	0,009	–*	–*
Антисеборейная	–*	–*	0,776	0,024
Антиэкземная	0,795	0,020	0,710	0,042
Антиэкземная (атопический дерматит)	0,606	0,003	0,720	0,003
Антагонист холестерина	0,587	0,021	–*	–*
Дерматологическая	0,716	0,007	0,739	0,005
Мукоембранный протектор	<b>0,952</b>	0,003	<b>0,897</b>	0,005
Противоастматическая	–*	–*	0,591	0,016
Противовирусное (Грипп)	0,686	0,006	0,684	0,006
Противовоспалительная (Заболевания кишечника)	0,743	0,005	–*	–*
Противозудная	0,686	0,009	0,62	0,014
Регулятор метаболизма липидов	0,661	0,014	0,666	0,014
Спазмолитическая	0,605	0,024	0,616	0,022
Ингибитор альдегилглицерофосфохолингидролазы	0,749	0,025	–*	–*
Ингибитор проницаемости мембран	0,696	0,040	0,644	0,064
Ингибитор Тестостерон 17β-дегидрогеназы (NADP+)	<b>0,845</b>	0,015	<b>0,891</b>	0,008
Фибринолитическая	0,672	0,034	0,607	0,069
Холеретическая	0,603	0,005	0,613	0,005
<i>Возможно использование при</i>				
Лечении образования аденоматозных полипов	0,612	0,019	0,615	0,018
Лечении алопеции	–*	–*	0,64	0,013
Лечении аутоиммунных заболеваний	0,536	0,021	0,604	0,012
Лечении острых неврологических расстройств	0,550	0,056	0,606	0,037
Лечении ревматоидного артрита	0,621	0,005	0,689	0,004

Примечание. \* – активность не обнаружена. Расчеты проведены с использованием компьютерной программы PASS online (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>) на основе структурных формул производных ДАК. *Pa* – вероятность обнаружения; *Pi* – вероятность не обнаружения.

Оценка биопотенциала выявленных новых метаболитов ДАК показала, что с достаточно высоким (более 0,7) коэффициентом вероятности соединения **49** может проявлять антиэкземную, дерматологическую и противовоспалительную активность; соединение **51** – антисеборейную и антиэкземную активность. Оба метаболита с высокой (0,897–0,952) долей вероятности могут обладать мукомембранным протекторным свойством. При этом возможно (коэффициент вероятности более 0,5) использование полученных соединений **49** и **51** в лечении таких заболеваний как ревматоидный артрит, алопеция, острые неврологические расстройства. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего более углубленного исследования биоактивности новых метаболитов ДАК.

## 6.2. Анализ путей актинобактериальной биодеструкции ДАК

В литературе описаны пути биодеструкции ДАК для грамтрицательных протеобактерий. Нами в процессе использования клеточных фракций *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 были зарегистрированы метаболиты ДАК, масс-спектры которых соответствуют известным производным – 7-оксо-ДАК (соединение **2**) и 7-оксо-11,12-дигидрокси-8,13-абиетадиеновая кислота (соединение **3**) (рисунок 36). Образование метаболитов **2** и **3** в качестве промежуточных соединений характерно для биодеструкции ДАК клетками *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 (Martin, Mohn, 1999). Процесс актинобактериальной биодеструкции ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, по-видимому, протекает аналогично *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 посредством окисления по атому С-7 углеродного кольца (соединение **2**) с последующим дигидроксилированием ароматического цикла (соединение **3**) и его дальнейшим *мета*-расщеплением (путь **I**).

Обнаружение новых метаболитов – 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК (соединение **49**) и соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа (соединение **51**), полученных в результате использования адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267, дает основание предполагать существование нового пути биодеструкции ДАК. Факт гидроксилирования по С-5 положению смоляных кислот абиетанового типа



описан лишь в двух работах с образованием 5-гидрокси-7-оксо-ДАК из ДАК (Witzig *et al.*, 2007) и 5-гидроксипроизводного из абиетиновой кислоты (Cross, Myers, 1968). Наиболее вероятно, что биотрансформация клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267 протекает путем окисления молекулы исходного соединения по атому С-5 углеродного кольца с последующим деизопропилированием ароматического кольца (путь II).

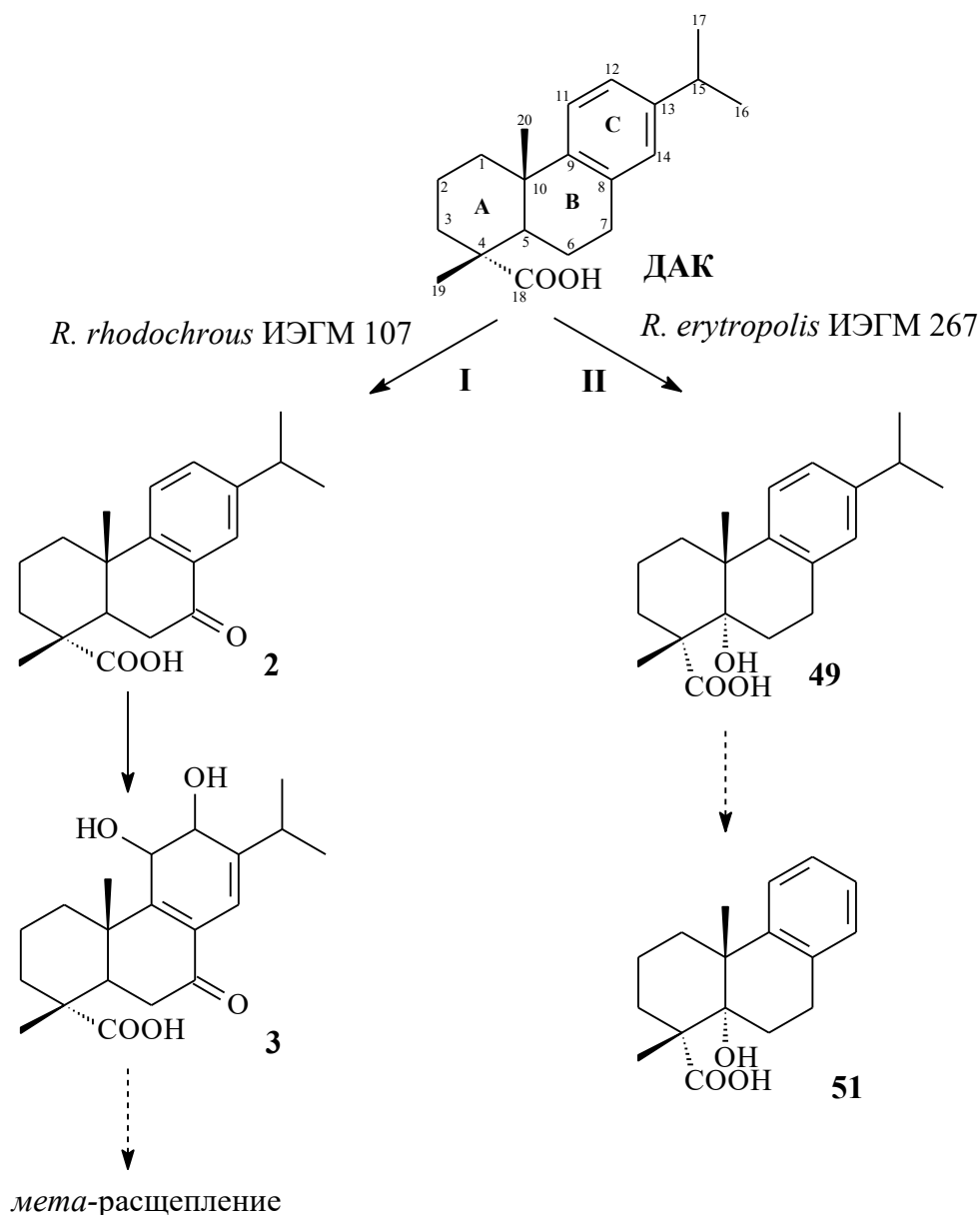


Рисунок 36 – Пути актинобактериальной биодеструкции ДАК.

**2** – 7-оксо-ДАК, **3** – 7-оксо-11,12-дигидрокси-8,13-абиеадиеновая кислота, **49** – 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК, **51** – соединение 15,16,17-тринор-абиеанового типа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Смоляные кислоты – токсичные трициклические дитерпеноиды, продуцируемые хвойными растениями семейства *Pinaceae* (Liss *et al.*, 1997) и составляющие до 21,4 % липофильной фракции экстрактов или 0,2–0,8 % от сухой биомассы древесины (Fengel, Wegener, 1984). При этом в составе смеси смоляных кислот доминирующим (до 60 %) компонентом является ДАК (Chow, Shepard, 1996). В процессе получения целлюлозы ДАК высвобождается, концентрируется в составе сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности (до 500 мг/л) и попадает в окружающую среду, оказывая токсическое воздействие на живые организмы (Liss *et al.*, 1997; Peng, Roberts, 2000; Kamaya, *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2008).

В результате естественной биоаккумуляции продуцируемая хвойными растениями ДАК обнаруживается в морской и речной воде (Volkman *et al.*, 1993); донных отложениях и почве (Pérez-de-Mora *et al.*, 2008); живых организмах (Hernández *et al.*, 2008). Ключевую роль в естественной детоксикации поллютантов играют микробные биодеструкторы. Благодаря широкому распространению ДАК в природе, обнаружены микроорганизмы различных филогенетических групп (грибы, бактерии), способные к частичной или полной деструкции ДАК (Liss *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999). В природных условиях ДАК обнаруживается в небольших количествах (Martin *et al.*, 1999). В связи с этим многие из описанных микроорганизмов, как правило, проявляют деструктирующую активность при концентрации ДАК в среде культивирования не более 250 мг/л (Bicho *et al.*, 1995; Gouiric *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; van Beek *et al.*, 2007; Choudhary *et al.*, 2014). Большинство описанных к настоящему моменту изолятов относится к грамтрицательным протеобактериям  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -подкласса, биотехнологическое использование которых потенциально опасно ввиду их возможной патогенности. Грамположительные биодеструкторы представлены лишь несколькими штаммами, принадлежащими к родам *Mycobacterium* и *Bacillus* (Côté, Otis, 1989; Martin, Mohn, 1999; Yu, Mohn, 1999). В связи с вышесказанным необходим поиск эффективных и безопасных

биокатализаторов, сохраняющих способность к эффективной деструкции в условиях сравнительно высоких концентраций ДАК.

Одной из интенсивно разрабатываемых в биотехнологическом плане групп микроорганизмов являются актинобактерии экологически значимых видов, способные трансформировать и/или деградировать сложные труднодоступные для других микроорганизмов органические соединения в высокой концентрации (Larkin *et al.*, 2006; Ivshina *et al.*, 2012; Grishko *et al.*, 2013; Kylosova *et al.*, 2016). Однако в настоящее время практически отсутствуют научные публикации, касающиеся использования актинобактерий в процессе биоконверсии смоляных кислот, за исключением единичной работы (Vorob'ev *et al.*, 2001).

На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://iegmc01.ru/>) нами впервые показана способность актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* к полной биодеструкции 500 мг/л ДАК в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана в течение 7 сут. Наибольшей биодеструктирующей активностью отличался штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, который проявлял наибольшую устойчивость (МПК 780 мг/л) к токсическому воздействию ДАК. Среди всего массива обследованных культур обнаружены штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 132 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267, трансформирующие ДАК с образованием ранее неизвестного метаболита, идентифицированного нами как 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК. Наибольший выход этого производного отмечен при использовании штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267, характеризующегося значительно меньшей (МПК 24 мг/л) устойчивостью к воздействию экотоксиканта.

С использованием различных методов микроскопии (фазово-контрастная, атомно-силовая, конфокальная лазерная сканирующая) и с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS показано формирование макроагрегатов, изменение морфометрических параметров (увеличение размеров клеток) и свойств клеточной поверхности (повышение степени среднеквадратичной шероховатости, уменьшение величины электрокинетического потенциала) актинобактерий под

воздействием ДАК. Более выраженные изменения отмечены при анализе параметров менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267. Ранее в работах (Мухутдинова, 2014; Серебренникова, 2014) отмечено изменение данных свойств актинобактерий в присутствии других токсичных экополлютантов (дротаверина гидрохлорида, нефтяных углеводородов, в частности). Выявленные изменения можно рассматривать как один из механизмов адаптации актинобактерий к воздействию токсичного соединения. При сканировании клеток устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 после инкубации в присутствии ДАК на многих образцах было зарегистрировано образование внеклеточной жидкости, которая, наиболее вероятно, является биосурфактантом или внеклеточным полисахаридным матриксом, образующимся при формировании биопленок. Экспериментально обосновано, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в биодеструкции ДАК, локализованы в цитоплазме, тогда как ферменты, участвующие в образовании 5 $\alpha$ -гидрокси-производного, прочно связаны с плазматической мембраной.

Для повышения эффективности процесса биоконверсии ДАК были апробированы следующие приемы: (1) внесение в среду ферментации дополнительного энергетического субстрата (*n*-гексадекана) в различных концентрациях, (2) предварительная адаптация бактериальной культуры к ДАК, (3) использование “нерастущих” клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания, (4) иммобилизация бактериальных клеток на поверхности твердых носителей и закрепление клеток в криогель на основе ПВС.

В результате полученных данных показана возможность существенного сокращения (с 7 до 3 сут) процесса биодеструкции ДАК с применением “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. При этом установлено, что оптимальными условиями биодеструкции ДАК является предварительное выращивание актинобактерий в МПБ, поддержание слабощелочной реакции среды (рН 8,0) и использование суспензии клеток с ОП<sub>600</sub> 2,5.

Использование приема предварительной адаптации клеток к ДАК менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 позволило достигнуть

максимального (87 %) уровня биоконверсии ДАК с образованием 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК (**49**) и нового соединения 15,16,17-тринорабиетанового (**51**) типа. Новые метаболиты ДАК перспективны для дальнейшего углубленного исследования их биопотенциала, поскольку известно, что многие производные ДАК обладают широким спектром биологического действия: противоязвенного (Wada *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 2014), противомикробного (Savluchinske-Feio *et al.*, 2006), фунгицидного (Savluchinske-Feio *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010), анксиолитического (Tolmacheva *et al.*, 2006), противовирусного (Tagat *et al.*, 1994; González *et al.*, 2010), противоопухолевого (Huang *et al.*, 2013), а также могут использоваться в качестве интермедиатов синтеза биоактивных соединений (González, 2015).

Оценка биопотенциала обнаруженных нами метаболитов ДАК с помощью компьютерной программы PASS online (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>) показала, что с достаточно высоким (более 0,7) коэффициентом вероятности соединение **49** может проявлять антиэкземную, дерматологическую и противовоспалительную активность, соединение **51** – антисеборейную и антиэкземную активность. Оба метаболита с высокой (0,897–0,952) долей вероятности могут обладать мукоембранным протекторным свойством. Использование соединений **49** и **51** возможно (коэффициент вероятности более 0,5) в лечении таких заболеваний как ревматоидный артрит, алопеция, острые неврологические расстройства и т.д.

С использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 происходит полное разрушение ДАК через окисление молекулы исходного соединения по атому С-7 углеродного кольца с последующим дигидроксилированием ароматического цикла и его *meta*-расщеплением. Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 267 способен трансформировать ДАК через окисление молекулы исходного соединения по атому С-5 углеродного кольца с последующим деизопропилированием ароматического кольца с образованием метаболитов с прогнозируемой биоактивностью.

## ВЫВОДЫ

1. На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов впервые показана способность актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* к биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты (ДАК) в высокой (500 мг/л) концентрации в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %). Отобраны штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 132 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267, трансформирующие ДАК с образованием ранее не описанных метаболитов – 5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК и соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа, а также штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, полностью деструктирующий ДАК.

2. Показано, что использование клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (ОП<sub>600</sub> 2,5) в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания, вдвое сокращает продолжительность (с 7 до 3 сут) процесса биодеструкции ДАК в слабощелочных (рН 8,0) условиях среды. Использование приема предварительной адаптации клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 к ДАК обеспечивает максимальный (87 %) выход продукции метаболитов (5 $\alpha$ -гидрокси-ДАК и соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа) с выраженной прогнозируемой биоактивностью.

3. Под воздействием ДАК выявлены характерные изменения морфометрических параметров (увеличение размеров клеток) и свойств клеточной поверхности (повышение степени среднеквадратичной шероховатости, смещение значения электрокинетического потенциала в более отрицательную область). Экспериментально обосновано, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в биодеструкции ДАК, локализованы в цитоплазме бактериальных клеток, окисление ДАК до 5 $\alpha$ -гидрокси-производного катализируют ферменты, прочно связанные с цитоплазматической мембраной.

4. Установлено, что с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 происходит полное разрушение ДАК через окисление молекулы исходного соединения по атому С-7 углеродного кольца с последующим дигидроксилированием ароматического цикла и его *meta*-расщеплением. Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 267 способен трансформировать ДАК через окисление

молекулы исходного соединения по атому С-5 углеродного кольца с последующим деизопропилированием ароматического кольца с образованием метаболитов с прогнозируемой биоактивностью.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АК	–	абиетиновая кислота
АСМ	–	атомно-силовая микроскопия
АТФ	–	аденозинтрифосфат
ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ-МС	–	газовая хромато-масс-спектрометрия
ДАК	–	дегидроабиетиновая кислота
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК-спектр	–	инфрокрасный спектр
ИПК	–	изопимаровая кислота
КЛСМ	–	конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
ЛД	–	летальная доза
ЛПК	–	левопимаровая кислота
МПА	–	мясопептонный агар
МПБ	–	мясопептонный бульон
МПК	–	минимальная подавляющая концентрация
НАК	–	неоабиетиновая кислота
ОП	–	оптическая плотность
ПаК	–	палюстровая кислота
ПАУ	–	полициклические ароматические углеводороды
ПВС	–	поливиниловый спирт
ПК	–	пимаровая кислота
рРНК	–	рибосомная рибонуклеиновая кислота
СПК	–	сандаракопимаровая кислота
ТСХ	–	тонкослойная хроматография
ЦБК	–	целлюлозно-бумажный комбинат
ЯМР	–	ядерный магнитный резонанс
<i>D.</i>	–	<i>Dietzia</i>
<i>G.</i>	–	<i>Gordonia</i>
<i>R.</i>	–	<i>Rhodococcus</i>



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атаманчуков, Г.Д. Живица и применение продуктов ее переработки / Г.Д. Атаманчуков – М.: Лесная промышленность, 1968. – 31 с.
2. Бажутин, Г.А. Биотрансформирующая активность родококков в отношении насыщенных стероидов / Г.А. Бажутин, Е.М. Ноговицина, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2015. – № 3. – С. 228–232.
3. Ившина, И.Б. Адаптационные механизмы выживания алканотрофных родококков, реализованные в неблагоприятных условиях среды / И.Б. Ившина, Т.Н. Каменских, Б.А. Анохин // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2007. – Т. 5, № 10. – С. 107–112.
4. Ившина, И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): дис. ... д-ра. биол. наук: 03.00.07 / Ившина Ирина Борисовна. – Пермь, 1997. – 197 с.
5. Ившина, И.Б. Большой практикум. Микробиология / И.Б. Ившина. – СПб.: Проспект науки, 2014. – 112 с.
6. Ившина, И.Б. Состояние и проблемы развития специализированных центров микробиологических ресурсов России / И.Б. Ившина // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 551–560.
7. Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов // Под ред. И.Б. Ившиной. – М.: Наука, 1994. – 163 с.
8. Коршунова, И.О. Влияние органических растворителей на жизнеспособность и морфофункциональные свойства родококков / И.О. Коршунова, О.Н. Писцова, М.С. Куюкина, И.Б. Ившина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, № 1. – С. 53–61.
9. Михайлов, Г.М. Пути улучшения использования вторичного древесного сырья / Г.М. Михайлов, Н.А. Серов // М.: Лесная промышленность, 1988. – 224 с.

10. Мухутдинова, А.Н. Биодеструкция дротаверина гидрохлорида актинобактериями рода *Rhodococcus*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Мухутдинова Анна Наилевна. – Пермь, 2014. – 126 с.

11. Ноговицина, Е.М. Получение стигмаст-4-ен-3-она из  $\beta$ -ситостерола с использованием актинобактерий рода *Rhodococcus* / Е.М. Ноговицина, Е.В. Тарасова, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2010. – Вып. 1, № 1. – С. 64–68.

12. Пентегова, В.А. Терпеноиды хвойных растений / В.А. Пентегова, Ж.В. Дубовенко, В.А. Ралдугин, Э.Н. Шмитд // Новосибирск: Наука, 1987. – 97 с.

13. Племенков, В.В. К вопросу о нативном содержании смоляных кислот в живицах хвойных / В.В. Племенков, С.А. Апполонова, Д.А. Кирлица // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – 2004. – Вып. 5, № 1. – С. 30–32.

14. Романенко, В.И. Экология микроорганизмов пресных вод. Лабораторное руководство / В.И. Романенко, С.И. Кузнецов. – М.: Наука, 1974. – 194 с.

15. Серебренникова, М.К. Биодegradация нефтяных углеводов иммобилизованными родококками в колоночном биореакторе: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Серебренникова Марина Константиновна. – Пермь, 2014. – 159 с.

16. Тарабанько, В.Е. Исследование динамики содержания терпеновых соединений в компостах на основе сосновой коры и их ростостимулирующей активности / В.Е. Тарабанько, Щ.А. Ульянова, Г.С. Калачева // Химия растительного сырья. – 2010 – № 1. – С. 121–126.

17. Тарасова, Е.В. Биотрансформация бетулина актинобактериями рода *Rhodococcus*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Тарасова Екатерина Владимировна. – Пермь, 2014. – 136 с.

18. Фуксман, И.Л. Влияние природных и антропогенных факторов на метаболизм веществ вторичного происхождения у древесных растений: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16 / Фуксман Ирма Людвиговна. – Санкт-Петербург, 1999. –

323 с.

19. Чеботарь, И.В. Матрикс микробных биопленок / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Н.А. Маянский // *Болезни и возбудители*. – 2016. – Т. 18, № 1. – С. 9–19.
20. Alakurtti, S Anti-leishmanial activity of betulin derivatives / S. Alakurtti, P. Bergström, N. Sacerdoti-Sierra, C.L. Jaffe, J. Yli-Kauhaluoma // *Journal of Antibiotics*. – 2010. – N. 63. – P. 123–126.
21. Andalibi, F. *Gordonia*: isolation and identification in clinical samples and role in biotechnology / F. Andalibi, M. Fatahi-Bafghi // *Folia Microbiologica*. – 2017. – V. 62, N. 3. – P. 245–52.
22. Angelova, B. Hydroxylation of androstenedione by resting *Rhodococcus* sp. cells in organic media / B. Angelova [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2005. – V. 37, N. 7. – P. 718–22.
23. Atrat, P. Interactions of *Mycobacterium fortuitum* with solid sterol substrate particles // P. Atrat [et al.] // *Journal of Basic Microbiology*. – 1991. – V. 31. – P. 413–422.
24. Ayars, G.H. The toxicity of constituents of cedar and pine woods pulmonary epithelium / G.H. Ayars, L.C. Altman, E. Frazier, E.Y. Chi // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1989. – V. 83, N. 3. – P. 610–618.
25. Behki, R. Metabolism of the herbicide atrazine by rhodococcus strains / R. Behki, E. Topp, W. Dick, P. Germon // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1993. – V. 59, N. 6. – P. 1955–1959.
26. Bell, K.S. The genus *Rhodococcus* / K.S. Bell, J.C. Philp, D.W.J. Aw, N. Christof // *Journal of Applied Microbiology*. – 1998. – V. 85, N. 2. – P. 195–210.
27. Belmonte, M. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ecf bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation / M. Belmonte [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2005. – V. 135. N. 1–3. – P. 256–63.
28. Bicho, P.A. Growth, induction, and substrate-specificity of dehydroabietic acid-degrading bacteria isolated from a kraft mill effluent enrichment / P.A. Bicho, V.

Martin, J.N. Saddler // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – V. 61, N. 9. – P. 3245–3250.

29. Biellmann, J.F. Dégradation bactérienne de l'acide déhydroabiétique par un *Pseudomonas* et une *Alcaligenes* / J.F. Biellmann, G. Branlant, M. Gero-Robert, M. Poiret // *Tetrahedron*. – 1973. – V. 29, N. 9. – P. 1237–41.

30. Biellmann, J.F. Dégradation bactérienne de l'acide déhydroabiétique par *Flavobacterium resinovorum* / J.F. Biellmann, G. Branlant // *Tetrahedron*. – 1973. – V. 29. – P. 1227–1236.

31. Biellmann, J.F. Microbial degradation of diterpenic acids / J.F. Biellmann, R. Wenning, P. Daste, M.L. Raynaud // *Chemical Communications*. – 1968. – V. 1. – P. 168–169.

32. Bleif, S. Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase / S. Bleif [et al.] // *ChemBioChem*. – 2011. – V. 12, N. 4. – P. 576–582.

33. Brandão, P.F. *Gordonia namibiensis* sp. nov., a novel nitrile metabolising actinomycete recovered from an african sand / P.F. Brandão [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2001. – V. 24, N. 4. – P. 510–515.

34. Briglia, M. *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-trichlorophenol / M. Briglia [et al.] // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1996. – V. 46, N. 1. – P. 23–30.

35. Bunch, A.W. Biotransformation of nitriles by *Rhodococci* / A.W. Bunch // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1998. – V. 74. – P. 89–97.

36. Burnes, T.A. Bacterial biodegradation of extractives and patterns of bordered pit membrane attack in pine wood / T.A. Burnes, R.A. Blanchette, R.L. Farrell // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66, N. 12. – P. 5201–5205.

37. Bushnell, P.G. Metabolic effects of dehydroabietic acid on rainbow trout erythrocytes / P.G. Bushnell, M. Nikinmaa, A. Oikari // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1985. – V. 81, N. 2. – P. 391–394.

38. Cámara, B. *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov.

and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid / B. Cámara [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – V. 57, N. 5. – P. 923–931.

39. Carr, E.L. Substrate uptake by *Gordonia amarae* in activated sludge foams by fish-mar / E.L. Carr, K.L. Eales, R.J. Seviour // Water Science and Technology. – 2006. – V. 54, N. 1. – P. 39–45.

40. Čejková, A. Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism / A. Čejková [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2005. – V. 21, N. 3. – P. 317–321.

41. Chen, J. Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides / J. Chen, R. Zheng, Y. Zheng, Y. Shen // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – 2009. – V. 113. – P.33–77.

42. Chen, W. High Efficiency Degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3 / W. Chen [et al.] // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2017. – V. 118. – P. 110–118.

43. Choudhary, M.I. Biotransformation of dehydroabietic acid with microbial cell cultures and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of resulting metabolites / M.I. Choudhary [et al.] // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2014. – V. 6, N. 7. – P. 375–78.

44. Chow, S.Z. High performance liquid chromatographic determination of resin acids in pulp mill effluent / S.Z. Chow, D. Shepard // Tappi Journal. – 1996. – V. 79, N. 10. – P. 173–179.

45. Classification of domains and phyla - Hierarchical classification of prokaryotes (bacteria) [Электронный ресурс] / List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN // Режим доступа: <http://www.bacterio.net/classifphyla.html> [10.09.2018].

46. Costa, F. Biofilms bioprocess / F. Costa, B. Silva, T. Tavares // Current developments in biotechnology and bioengineering bioprocess, bioreactors and controls / Ed. by Ch. Larroche, M.A. Sanroma'n, G. Du, A. Pandey. – Elsevier, 2017. – P. 143–

175.

47. Côté, R. Étude de la biodégradation de l'acide dehydroabietique par *Bacillus psychrophilus* / R. Côté, C. Otis // Revue Des Sciences de L'eau. – 1989. – V. 2. – P. 313–324.

48. Cross, B.E. The bacterial transformation of abietic acid / B.E. Cross, P.L. Myers // The Biochemical Journal. – 1968. – V. 108, N. 2. – P. 303–310.

49. de Carvalho, C.C.C.R. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* dcl14 / C.C.C.R. de Carvalho, M.M.R. da Fonseca // FEMS Microbiology Ecology. – 2005. – V. 51, N. 3. – P. 389–399.

50. 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.

51. de Carvalho, C.C.C.R. Sitosterol bioconversion with resting cells in liquid polymer based systems / C.C.C.R. de Carvalho [et al.] // Bioresource Technology. – 2009. – V. 100, N. 17. – P. 4050–4053.

52. de Carvalho, M.S. <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR signal assignments of some new synthetic dehydroabietic acid derivatives / M.S. de Carvalho, L.H.B. Baptistella, P.M. Imamura // Magnetic Resonance in Chemistry. – 2008. – V. 46. – P. 381–386.

53. Dean-Ross, D. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment / D. Dean-Ross, J. Moody, C.E. Cerniglia // FEMS Microbiology Ecology. – 2002. – V. 41, N. 1. – P. 1–7.

54. Dong, C. Distribution of pahs and the pah-degrading bacteria in the deep-sea sediments of the high-latitude arctic ocean / C. Dong [et al.] // Biogeosciences. – 2015. – V. 12, N. 7. – P. 2163–2177.

55. Drzyzga, O. The strenghts and weaknesses of *Gordonia*: a review of an emerging genus with increasing biotechnological potential / O. Drzyzga // Critical Reviews in Microbiology. – 2012. – V. 38, N. 4. – P. 300–316.

56. Duckworth, A.W. *Dietzia natronolimnaios* sp. nov., a new member of the

genus *Dietzia* isolated from an east african soda lake / A.W. Duckworth [et al.] // *Extremophiles*. – 1998. – V. 2, N. 3. – P. 359–366.

57. Duetz, W.A. Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells / W.A. Duetz [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67, N. 6. – P. 2829–2832.

58. Eaton, R.W. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions / R.W. Eaton, P.J. Chapman // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – V. 174, N. 23. – P. 7542–7554.

59. Eaton, R.W. Biotransformations of 2-methylisoborneol by camphor-degrading bacteria / R.W. Eaton, P. Sandusky // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – V. 75, N. 3. – P. 583–588.

60. Elkin, A.A. Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides by *Gordonia terrae* IEGM 136 and *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 / A.A. Elkin, T.I. Kylosova, V.V. Grishko, I.B. Ivshina // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2013. – V. 89. – P. 82–85.

61. Fengel, D. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions / D. Fengel, G. Wegener. – Berlin: W. de Gruyter, 1984. – 613 p.

62. Gachet, M.S. Antiparasitic compounds from *Cupania cinerea* with activities against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* / M.S. Gachet [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2011. – V. 74. – P. 559–566.

63. Genus *Dietzia* [Электронный ресурс] / List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN // Режим доступа: <http://www.bacterio.net/dietzia.html> [10.09.2018].

64. Genus *Gordonia* [Электронный ресурс] / List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN // Режим доступа: <http://www.bacterio.net/gordonia.html> [10.09.2018].

65. Genus *Rhodococcus* [Электронный ресурс] / List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN // Режим доступа:

<http://www.bacterio.net/rhodococcus.html> [10.09.2018].

66. González, M.A. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis / M.A. González // *Natural Product Reports*. – 2015. – V. 32, N. 5. – P. 684–704.

67. González, M.A. Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives / M.A. González [*et al.*] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – V. 45, N. 2. – P. 811–816.

68. Goodfellow, M. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the ‘rhodochrous’ complex / M. Goodfellow, G. Alderson // *Journal of General Microbiology*. – 1977. – V. 100. – P. 99–122.

69. Gouiric, S.C. 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydehydroabietic acid, a new biotransformation product of dehydroabietic acid by *Aspergillus niger* / S.C. Gouiric [*et al.*] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – V. 20, N. 3. – P. 281–84.

70. Grishko, V.V. Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the actinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 / V.V. Grishko, E.V. Tarasova, I.B. Ivshina // *Process Biochemistry*. – 2013. – V. 48, N. 11. – P. 1640–1644.

71. Grogan, G. Microbial conversion of beta-myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus* / G. Grogan, M. Thompson // *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformation*. – 2012. – V. 2. – P. 159–162.

72. Grogan, G. P450(camr), a cytochrome P450 catalysing the stereospecific 6-endo-hydroxylation of (1R)-(+)-camphor / G. Grogan [*et al.*] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – V. 59, N. 4–5. – P. 449–454.

73. Gürtler, V. Systematics of members of the genus *Rhodococcus* / V. Gürtler, R.J. Seviour // *Biology of Rhodococcus* Ed. H.M. Alvares. – Springer, 2010. – P. 1–28.

74. Hemingway, R.W. Biodegradation of resin acid sodium salts / R.W. Hemingway, H. Greaves // *Tappi Journal*. – 1973. – V. 56, N. 12. – P. 189–192.

75. Hernández, V. Resin acids in bile samples from fish inhabiting marine



waters affected by pulp mill effluents / V. Hernández [*et al.*] // Journal of the Chilean Chemical Society. – 2008. – V. 53, N. 4. – P. 1718–1721.

76. Huang, F.X. Microbial transformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schroter AS 3.264 / F.X. Huang [*et al.*] // Phytochemistry. – 2012. – V. 82. – P. 56–60.

77. Huang, X.C. Synthesis and antitumor activities of novel thiourea  $\alpha$ -aminophosphonates from dehydroabietic acid / X.C. Huang [*et al.*] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – V. 69. – P. 508–520.

78. Ivshina, I.B. Bioconversion of  $\beta$ -sitosterol and its esters by actinobacteria of the genus *Rhodococcus* / I.B. Ivshina [*et al.*] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2005. – V. 41, N. 6. – P. 551–557.

79. Ivshina, I.B. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 / I.B. Ivshina [*et al.*] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – V. 28, N. 10. – P. 2997–3006.

80. Ivshina, I.B. Draft genome sequence of propane- and butane-oxidizing actinobacterium *Rhodococcus ruber* IEGM 231 / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, A.V. Krivoruchko, V. Barbe, C. Fischer // Genome Announcements. – 2014. – V. 2, N. 6.

81. Ivshina, I.B. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, J.C. Philp, N. Christofi // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1998. – V. 14, N. 5. – P. 711–717.

82. Janocha, S. Resin acid conversion with CYP105A1: an enzyme with potential for the production of pharmaceutically relevant diterpenoids / S. Janocha [*et al.*] // ChemBioChem. – 2013. – V. 14, N. 4. – P. 467–73.

83. Janocha, S. Umsatz von Harzsäuren durch die Bakteriellen Cytochrome CYP105A1 und CYP106A2 – strukturelle Grundlagen und potentielle Anwendungen / S. Janocha. – Saarbrücken, 2013. – 176 c.

84. Kallioinen, A. Effects of bacterial treatments on wood extractives / A.

Kallioinen [*et al.*] // Journal of Biotechnology. – 2003. – V. 103, N. 1. – P. 67–76.

85. Kamaya, Y. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna* / Y. Kamaya, N. Tokita, K. Suzuki // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2005. – V. 61, N. 1. – P. 83–88.

86. Kang, M.S. Dehydroabietic acid, a diterpene, improves diabetes and hyperlipidemia in obese diabetic KK-Ay Mice / M.S. Kang [*et al.*] // BioFactors. – 2009. – V. 35, N. 5. – P. 442–448.

87. Kang, M.S. Dehydroabietic acid, a phytochemical, acts as ligand for ppar $\alpha$  in macrophages and adipocytes to regulate inflammation / M.S. Kang [*et al.*] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2008. – V. 369, N. 2. – P. 333–338.

88. Koerner, R.J. The genus *Dietzia*: a new home for some known and emerging opportunist pathogens / R.J. Koerner, M. Goodfellow, A.L. Jones // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2009. – V. 55, N. 3. – P. 296–305.

89. Kumar, V. Transformation of *p*-hydroxybenzotrile to *p*-hydroxybenzoic acid using nitrilase activity of *Gordonia terrae* / V. Kumar, T.C. Bhalla // Biocatalysis and Biotransformation. – 2013. – V. 31, N. 1. – P. 42–48.

90. Kutney, J.P. Biotransformation of dehydroabietic acid with resting cell suspensions and calcium alginate-immobilized cells of *Mortierella isabellina* / J.P. Kutney [*et al.*] // Applied and Environmental Microbiology. – 1985. – V. 49, N. 1. – P. 96–100.

91. Kutney, J.P. Biotransformation of dehydroabietic, abietic, and isopimaric acids by *Mortierella isabellina* immobilized in polyurethane foam / J.P. Kutney, J.D. Berset, G.M. Hewitt, M. Singh // Applied and Environmental Microbiology. – 1988. – V. 54, N. 4. – P. 1015–1022.

92. Kutney, J.P. Studies related to biological detoxification of kraft pulp mill effluent. III. The Biodegradation of abietic acid with *Mortierella isabellina* / J.P. Kutney [*et al.*] // Helvetica Chimica Acta. – 1982. – V. 65, N. 3. – P. 661–670.

93. 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, I.B. Ivshina, I.O. Korshunova, E.V. Rubtsova // *Journal of Microbiological Methods*. – 2014. – V. 107. – P. 23–29.
94. Kuyukina, M.S. Diverse effects of a biosurfactant from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on the adhesion of resting and growing bacteria to polystyrene / M.S. Kuyukina [et al.] // *AMB Express*. – 2016. – V. 6. – P. 1–14.
95. 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.
96. Kuyukina, M.S. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction / M.S. Kuyukina [et al.] // *Journal of Microbiological Methods*. – 2001. – V. 46. – P. 149–156.
97. Kylosova, T.I. Biotransformation of prochiral sulfides into (r)-sulfoxides using immobilized *Gordonia terrae* IEGM 136 cells / T.I. Kylosova, A.A. Elkin, V.V. Grishko, I.B. Ivshina // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2016. – V. 123. – P. 8–13.
98. Landucci, L.L. Prediction of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectra of the abietadienoic acid / L.L. Landucci, D.F. Zinkel // *Holzforschung*. – 1991. – V. 45. – P. 341–346.
99. 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.
100. Lashkarian, H. Extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp.: isolation and molecular characterization / H. Lashkarian [et al.] // *Iranian Biomedical Journal*. – 2010. – V. 14, N. 2. – P. 49–57.
101. Leach, J.M. Toxic constituents in mechanical pulping effluents / J.M. Leach, A.N. Thakore // *Tappi Journal*. – 1976. – V. 59. – P. 129–132.
102. Leppanen, H. The use of fish bile metabolite analyses as exposure

biomarkers to pulp and paper mill effluents / H. Leppanen, S. Marttinen, A. Oikari // *Chemosphere*. – 1998. – V. 36, N. 12. – P. 2621–2634.

103. Lin, X.H. Biotransformation of 20(R)-panaxadiol by the fungus *Rhizopus chinensis* / X.H. Lin [*et al.*] // *Phytochemistry*. – 2014. – V. 105. – P. 129–134.

104. Lindberg, L.E. Degradation of paper mill water components in laboratory tests with pure cultures of bacteria / L.E. Lindberg [*et al.*] // *Biodegradation*. – 2001. – V. 12, N. 3. – P. 141–148.

105. Lindesjö, E. Biomarker responses and resin acids in fish chronically exposed to effluents from a total chlorine-free pulp mill during regular production / E. Lindesjö, M. Adolfsson-Erici, G. Ericson, L. Förlin // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2002. – V. 53. – P. 238–247.

106. Liss, S.N. Microbiological study of a bleached kraft pulp mill aerated lagoon / S.N. Liss, D.G. Allen // *Journal of Pulp and Paper Science*. – 1992. – V. 18, N. 6. – P. 216–221.

107. Liss, S.N. Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview / S.N. Liss, P.A. Bicho, J.N. Saddler // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1997. – V. 43, N. 7. – P. 599–611.

108. Liu, M. Chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC roots and their antitumor activities / M. Liu [*et al.*] // *Molecules*. – 2012. – V. 17. – P. 6156–6169.

109. Liu, Y. Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis* / Y. Liu [*et al.*] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – V. 27, N. 4. – P. 759–765.

110. Loughlin, W.A. Biotransformations in organic synthesis / W.A. Loughlin // *Bioresource Technology*. – 2000. – V. 74, N. 1. – P. 49–62.

111. Maniyam, M.N. Bioremediation of cyanide by optimized resting cells of *rhodococcus* strains isolated from peninsular Malaysia / M.N. Maniyam, F. Sjahrir, A.L. Ibrahim // *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. – 2011. – V. 1, N. 2. – P. 98–101.

112. Martin, V.J.J. A novel aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase from the diterpenoid-degrading bacterium a novel aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase from the diterpenoid-degrading bacterium *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 / V.J.J. Martin, W.W. Mohn // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – V. 181, N. 9. – P. 2675–2682.
113. Martin, V.J.J. Genetic investigation of the catabolic pathway for degradation of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 // V.J.J. Martin, W.W. Mohn // *Journal of Bacteriology*. – 2000. – V. 182, N. 13. – P. 3784–3782.
114. Martin, V.J.J. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism / V.J.J. Martin, Z. Yu, W.W. Mohn // *Archives of Microbiology*. – 1999. – V. 172, N. 3. – P. 131–138.
115. Martínková, L. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / L. Martínková [et al.] // *Environment International*. – 2009. – V. 35, N. 1. – P. 162–177.
116. McFarlane, P. Metabolism of resin acids in anaerobic systems / P. McFarlane, T. Clark // *Water Science Technology*. – 1988. – V. 20. – P. 273–276.
117. Meyer, T. Impact of resin and fatty acids on full-scale anaerobic treatment of pulp and paper mill effluents / T. Meyer [et al.] // *Environmental Engineering Science*. – 2016. – V. 33, N. 6. – P. 394–403.
118. Mohn, W.W. Bacteria obtained from a sequencing batch reactor that are capable of growth on dehydroabietic acid / W.W. Mohn // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – V. 61, N. 6. – P. 2145–2150.
119. Mohn, W.W. Lessons learned from *Sphingomonas* species that degrade abietane triterpenoids / W.W. Mohn, Z. Yu, E.R.B. Moore, F. Muttray // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. – 1999a. – V. 23. – P. 374–379.
120. Mohn, W.W. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids / W.W. Mohn, A.E. Wilson, P. Bicho, E.R. Moore // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1999b. – V. 22, N. 1. – P. 68–78.
121. Mohn, W.W. Resin acid-degrading inocula for bioaugmentation of pulp and paper mill effluent biotreatment systems / W.W. Mohn. – Vancouver, 2001. – 20 p.

122. Morgan, C.A. Characterization of tdt genes for the degradation of tricyclic diterpenes by *Pseudomonas diterpeniphila* A19-6a / C.A. Morgan, R.C. Wyndham // Canadian Journal of Microbiology. – 2002. – V. 48, N. 1. – P. 49–59.

123. Morgan, C.A. Isolation and characterization of resin acid degrading bacteria found in effluent from a bleached kraft pulp mill / C.A. Morgan, R.C. Wyndham // Canadian Journal of Microbiology. – 1996. – V. 42. – P. 423–430.

124. Mutton, D. Wood Resins / D. Mutton // In wood extractives and their effects and significance to the pulp and paper industry / Ed. by W.E. Hillis. – 1962. – P. 331–363.

125. Muttray, A. Dynamics and metabolic activity of *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 within pulp mill wastewater microbial communities assayed by competitive PCR and RT-PCR population / A.F. Muttray, Z. Yu, W.W. Mohn // FEMS Microbiology Ecology. – 2001. – V. 38, N. 1. – P. 21–31.

126. Na, K.S. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains / K.S. Na [et al.] // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2005. – V. 99, N. 4. – P. 378–382.

127. Nawawi, N.M. Biotransformation of phenol by the resting cells of *Rhodococcus* sp. NAM 81 / N.M. Nawawi, S.A. Ahmad, M.N. Maniyam, A.L. Ibrahim // Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. – 2016. – V. 6, N. 1. – P. 101–107.

128. 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.

129. Nyren, V. Ionization constant, solubility product and solubility of abietic and dehydroabietic acid / V. Nyren, E. Back // Förlagsföreningen Acta Chemica Scandinavica. – 1958. – V. 12. – P. 1516–1520.

130. Oikari, A. Uptake of resin acids into tissues of trout (*Salmo gairdneri* Richardson) / A. Oikari, B. Holmbom, H. Bister // Annales Zoologici Fennici. – 1982. – V. 19. – P. 61–64.

131. Ozaki, A. Migration of dehydroabietic and abietic acids from paper and paperboard food packaging into food-simulating solvents and tenax ta / A. Ozaki, T. Ooshima, Y. Mori // *Food Additives and Contaminants*. – 2006. – V. 23, N. 8. – P. 854–860.

132. Ozsen, O. Biotransformation of abietic acid by fungi and biological evaluation of its metabolites / O. Ozsen [*et al.*] // *Process Biochemistry*. – 2017. – V. 52. – P. 130–140.

133. PASS online [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php> [10.09.2018].

134. Peng, G. Solubility and toxicity of resin acids / G. Peng, J.C. Roberts // *Water Research*. – 2000. – V. 34, N. 10. – P. 2779–2785.

135. Pérez-de-Mora, E.M. Long-term impact of acid resin waste deposits on soil quality of forest areas I. Contaminants and abiotic properties / E.M. Pérez-de-Mora [*et al.*] // *Science of the Total Environment*. – 2008. – V. 406. – P. 88–98.

136. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 // Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). – Wayne, PA. – 2017. – 250 p.

137. Rainey, F.A. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris* / F.A. Rainey, S. Klatte, R.M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1995. – V. 45, N. 1. – P. 32–36.

138. Reyes, C.P. Activity of lupine triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2 / C.P. Reyes [*et al.*] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2006. – V. 14. – P. 1573–1579.

139. Rissanen, E. Dehydroabietic acid, a major component of wood industry effluents, interferes with cellular energetics in rainbow trout hepatocytes / E. Rissanen, G. Krumschnabel, M. Nikinmaa // *Aquatic Toxicology*. – 2003. – V. 62, N. 1. – P. 45–53.

140. Rodríguez, P. Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of

eucalyptus oils / P. Rodríguez [et al.] // Electronic Journal of Biotechnology. – 2006. – V. 9, N. 3. – P. 232–236.

141. Savluchinske-Feio, S. Activity of dehydroabietic acid derivatives against wood contaminant fungi / S. Savluchinske-Feio [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2007. – V. 70, N. 3. – P. 465–470.

142. Savluchinske-Feio, S. Antimicrobial activity of resin acid derivatives / S. Savluchinske-Feio, M.J.M. Curto, B.Gigante, J.C. Roseiro // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 72, N. 3. – P. 430–436.

143. Simoneit, B.R.T. Molecular characterization of smoke from campfire burning of pine wood (*Pinus elliottii*) / B.R.T. Simoneit, W.F. Rogge, Q. Lang, R. Ja // Chemosphere. – 2000. – V. 2, N. 1. – P. 107–122.

144. Smith, D.J. A cytochrome P450 involved in the Metabolism of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 / D.J. Smith, V.J.J. Martin, W.W. Mohn // Journal of Bacteriology. – 2004. – V. 186, N. 11. – P. 3631–3639.

145. Smith, D.J. A large gene cluster in *Burkholderia xenovorans* encoding abietane diterpenoid catabolism / D.J. Smith, J. Park, J.M. Tiedje, W.W. Mohn // Journal of Bacteriology. – 2007. – V. 189, N. 17. – P. 6195–6204.

146. Smith, D.J. Distinct roles for two CYP226 family cytochromes P450 in abietane diterpenoid catabolism by *Burkholderia xenovorans* LB400 / D.J. Smith [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2008. – V. 190, N. 5. – P. 1575–1583.

147. Söderberg, T. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells / T.A. Söderberg, A. Johansson, R. Gref // Toxicology . – 1996. – V. 107, N. 2. – P. 99–109.

148. Soler, A. Diversity of culturable nocardioform Actinomycetes from wastewater treatment plants in Spain and their role in the biodegradability of aromatic compounds / A. Soler, J. García-Hernández, A. Zornoza // Environmental. – 2018. – V. 39, N. 2. – P. 172–181.

149. Stackebrandt, E. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: revival of the genus *Gordona* (Tsukamura) / E. Stackebrandt, J. Smida,



M.D. Collons // *Journal of General and Applied Microbiology*. – 1988. – V. 34. – P. 341–348.

150. Stoltes, E. Chemistry of rosin / E. Stoltes, D. Zinkel // In *Naval stores: production, chemistry, utilization* / Ed. by D. Zinkel, J. Russel – New York: Pulp Chemistry Association, 1989. – P. 261–345.

151. Stuthridge, T.R. Treatability of bleached kraft pulp and paper mill wastewaters in a New Zealand aerated lagoon treatment system / T.R. Stuthridge [*et al.*] // *Water Science Technology*. – 1991. – V. 24, N. 314. – P. 309–317.

152. Suckling, I.D. Factors affecting resin removal from radiate pine mechanical pulps / I.D. Suckling, H.L. Hua, J.M. Uprichard // *Appita Journal*. – 1990. – V. 43, N. 3. – P. 217–221.

153. Suh, S. Pimaric acid from *Aralia cordata* has an inhibitory effect on tnf-induced mmp-9 production and hasmc migration via down-regulated NF- $\kappa$ B and AP-1 / S. Suh [*et al.*] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2012. – V. 199, N. 2. – P. 112–119.

154. Sunzel, B. The protective effect of zinc on rosin and resin acid toxicity in human polymorphonuclear leukocytes and human gingival fibroblasts in vitro / B. Sunzel [*et al.*] // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1997. – V. 37, N. 1. – P. 20–28.

155. Tabatabaei, Y.M. Production of cholesterol oxidase by a newly isolated *Rhodococcus* sp. / Y.M. Tabatabaei [*et al.*] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – V. 17, N. 7. – P. 731–737.

156. Tagat, J.R. Synthesis and anti-herpes activity of some a-ring functionalized dehydroabietane derivatives / J.R. Tagat [*et al.*] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 1994. – V. 4, N. 9. – P. 1101–1104.

157. Tapia, A.A. Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Fusarium* species / A.A. Tapia [*et al.*] // *Phytochemistry*. – 1997. – V. 46, N. 1. – P. 131–133.

158. Tarasova, E.V. 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.

159. Tavendale, M.H. The fate of resin acids - 1. The biotransformation and degradation of deuterium labelled dehydroabietic acid in anaerobic sediments / M.H. Tavendale [et al.] // *Chemosphere*. – 1997a. – V. 35, N. 10. – P. 2137–2151.

160. Tavendale, M.H. The fate of resin acids - 2. The fate of resin acids and resin acid derived neutral compounds in anaerobic sediments / M.H. Tavendale [et al.] // *Chemosphere*. – 1997b. – V. 35, N. 10. – P. 2153–2166.

161. Taylor, B.R. Scientific criteria document for development of provincial water quality objectives and guidelines. Resin acids / B.R. Taylor, K.L. Yeager, S.G. Abernathy, G.F. Westlake. – Ontario Ministry of the Environment, Water Resources Branch, Toronto, Ont, 1988. – 56 p.

162. Teschke, K. Determinants of exposure to inhalable particulate, wood dust, resin acids, and monoterpenes in a lumber mill environment / K. Teschke [et al.] // *The Annals of Occupational Hygiene*. – 1999. – V. 43, N. 4. – P. 247–255.

163. Thompson, K.T. Mineralization of the cyclic nitramine explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by *Gordonia* and *Williamsis* spp. / K.T. Thompson, F.H. Crocker, H.L. Fredrickson // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71, N. 12. – P. 8265–8272.

164. Thompson, M.L. Biotransformation of  $\beta$ -myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants / M.L. Thompson [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 85, N. 3. – P. 721–730.

165. Tolmacheva, I.A. Synthesis and biological activity of nitrogen-containing derivatives of methyl dehydroabietate / I.A. Tolmacheva [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2006. – V. 40. – P. 489–493.

166. van Beek, T.A. Fungal biotransformation products of dehydroabietic acid / T.A. van Beek [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2007. – V. 70, N. 2. – P. 154–159.

167. Vogt, C. Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an *in situ* reactor mediated by hydrogen peroxide / C. Vogt [et al.] // *Journal of*

Contaminant Hydrology. – 2004. – V. 68. – P. 121–141.

168. Volkman, J.K. Determination of resin acids by gas chromatography and high-performance liquid chromatography in paper mill effluent, river waters and sediments from the upper derwent estuary, Tasmania / J.K. Volkman, D.G. Holdsworth, D.E. Richardson // *Journal of Chromatography A*. – 1993. – V. 643. – P. 209–219.

169. von der Weid, I. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil / I. von der Weid [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2007. – V. 30, N. 4. – P. 331–339.

170. Vorob'ev, A.V. Microbial transformations of diterpene acids / A.V. Vorob'ev [et al.] // *Mendeleev Communications*. – 2001. – V. 11, N. 2. – P. 72–73.

171. Wada, H. Antiulcer activity of dehydroabietic acid derivatives / H. Wada [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1985. – V. 33. – P. 1472–1487.

172. Wajs-Bonikowska, A. Chemical composition and content of lipophilic seed extractives of some *Abies* and *Picea* species / A. Wajs-Bonikowska, A. Smeds, S. Willför // *Chemistry and Biodiversity*. – 2016. – V. 13, N. 9. – P. 1194–1201.

173. Wakeham, S.G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments-II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis / S.G. Wakeham, C. Schaffner, W. Giger // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1980. – V. 44, N. 3. – P. 415–429.

174. Walter, U. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1 / U. Walter, M. Beyer, J. Klein, H. Rehm // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1991. – V. 34, N. 5. – P. 671–676.

175. Wang, W. Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3 / W. Wang, B. Cai, Z. Shao // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – V. 5. – P. 1–11.

176. Warnecke, F. Diversität und Ökologie von limnischen Actinobakterien / F. Warnecke – Bremen, 2004. – 139 p.

177. Williams, D.R. Metabolism of 1,8-cineole by a *Rhodococcus* species: ring

cleavage reactions / D.R. Williams, P.W. Trudgill, D.G. Taylor // *Microbiology*. – 1989. – V. 135, N. 7. – P. 1957–1967.

178. Wilson, A.E.J. Isolation and characterization of isopimaric acid-degrading bacteria from a sequencing batch reactor / A.E.J. Wilson, E.R.B. Moore, W.W. Mohn // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – V. 62, N. 9. – P. 3146–3151.

179. Witzig, R. Molecular detection and diversity of novel diterpenoid dioxygenase Dita1 Genes from proteobacterial strains and soil samples / R. Witzig [*et al.*] // *Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 9, N. 5. – P. 1202–1218.

180. Yang, N.Y. Diterpenoids from *Pinus massoniana* resin and their cytotoxicity against A431 and A549 cells / N.Y. Yang [*et al.*] // *Phytochemistry*. – 2010. – V. 71, N. 13. – P. 1528–1533.

181. Yoshimoto, T. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants / T. Yoshimoto [*et al.*] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – V. 70, N. 9. – P. 5283–5289.

182. Yu, Z. Apparent Contradiction: psychrotolerant bacteria from hydrocarbon-contaminated arctic tundra soils that degrade diterpenoids synthesized by trees / Z. Yu, G.R. Stewart, W.W. Mohn // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66, N. 12. – P. 5148–5154.

183. Yu, Z. Bioaugmentation with resin-acid-degrading bacteria enhances resin acid removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents / Z. Yu, W.W. Mohn // *Water Research*. – 2001. – V. 35, N. 4. – P. 883–890.

184. Yu, Z. Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent / Z. Yu, W.W. Mohn // *Water Research*. – 2002. – V. 36, N. 11. – P. 2793–2801.

185. Yu, Z. Isolation and characterization of thermophilic bacteria capable of degrading dehydroabietic acid / Z. Yu, W.W. Mohn // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1999. – V. 45, N. 6. – P. 513–519.

186. Zanella, E. Effect of pH on acute toxicity of dehydroabietic acid and chlorinated dehydroabietic acid to fish and daphnia / E. Zanella // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1983. – V. 30. – P. 133–140.

187. Zheng, J. Action of resin acids in nerve ending fractions isolated from fish central nervous system / J. Zheng, R. Nicholson // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 1998. – V. 17, N. 9. – P. 1852–1859.

188. Zhu, Y. Analysis of abietic acid and dehydroabietic acid residues in raw ducks and cooked ducks / Y. Zhu [*et al.*] // *Poultry Science*. – 2014a. – V. 93. – P. 1–5.

189. Zhu, Y. Simultaneous determination of abietic acid and dehydroabietic acid residues in duck meat by HPLC-PAD-FLD / Y. Zhu [*et al.*] // *Food Analytical Methods*. – 2014b. – V. 7, N. 8. – P. 1627–1633.