

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

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

На правах рукописи

Бажутин Григорий Андреевич

**БИОДЕСТРУКЦИЯ ИБУПРОФЕНА АКТИНОМИЦЕТАМИ
РОДА *RHODOCOCCUS***

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Пермь – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ИБУПРОФЕН КАК ТОТАЛЬНО РАСПРОСТРАНЕННЫЙ ФАРМПОЛЛЮТАНТ	12
1.1. Проблема лекарственного загрязнения природных экосистем.....	12
1.2. Нестероидные противовоспалительные средства	22
1.3. Ибупрофен как один из наиболее обнаруживаемых в объектах окружающей среды НПВС.....	31
1.4. Традиционные методы утилизации фармпollютантов	37
1.5. Биодеструкция ибупрофена	43
1.5.1. Биодеструкция ибупрофена с использованием монокультуры микроорганизмов.....	45
1.5.2. Биодеструкция ибупрофена активным илом.....	49
1.6. Родоккокки как перспективные биодеструкторы фармпollютантов	50
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Рабочая коллекция	55
2.2. Химические реагенты	57
2.3. Определение минимальной подавляющей концентрации ибупрофена	57
2.4. Условия культивирования бактерий	58
2.5. Получение клеточных фракций	59
2.6. Микроскопические исследования	60
2.7. Респирометрический анализ	61
2.8. Электрокинетический потенциал	61
2.9. Каталазная активность.....	61
2.10. Аналитические методы.....	62
2.11. Полногеномное секвенирование.....	63
2.13. Фитотоксичность ибупрофена и продуктов его биоокисления	64
2.14. <i>In silico</i> исследования продуктов биодеструкции ибупрофена.....	65
2.15. Статистическая обработка.....	66
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ К БИОДЕСТРУКЦИИ ИБУПРОФЕНА	67

3.1. Определение устойчивости актиномицетов к ибупрофену	67
3.2. Биодеструкция ибупрофена клетками <i>R. cerastii</i> ИЭГМ 1243	70
3.3. Респираторная активность клеток <i>R. cerastii</i> ИЭГМ 1243 в присутствии ибупрофена	72
3.4. Оценка воздействия различных факторов культивирования на процесс биодеструкции ибупрофена	77
3.5. Кинетическое моделирование процесса биодеструкции ибупрофена	82
3.6. Пути биодеструкции ибупрофена	83
ГЛАВА 4. ТОКСИЧНОСТЬ И СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ ИБУПРОФЕНА.....	91
4.1. Фитотоксичность ибупрофена и продуктов его биодеструкции	91
4.2. <i>In silico</i> прогнозирование экотоксических свойств ибупрофена и его метаболитов.....	92
ГЛАВА 5. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ АКТИНОМИЦЕТОВ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ИБУПРОФЕНА	95
5.1. Изменение морфометрических характеристик бактериальных клеток.....	95
5.2. Изменения в ультраструктуре бактериальных клеток	102
5.3. Изменение электрокинетического потенциала клеток	103
5.4. Изменение каталазной активности.....	104
5.5. Формирование липидных включений в бктериальных клетках	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Интенсивное развитие фармакологической индустрии, нарастающее бесконтрольное потребление лекарственных препаратов населением и в ветеринарии сформировали новую разновидность особо опасных эмерджентных контаминантов–загрязнителей природной среды. К ним относится большая группа веществ, объединяемых одним общим термином “фармполлютанты”. Фармполлютанты, представляющие собой высокостабильные соединения с разнообразной химической природой и выраженной биоактивностью, с начала 2000-х годов признаны новым классом ксенобиотиков (Rivera-Utrilla *et al.*, 2013; aus der Beek T. *et al.*, 2016). По масштабам и экологической значимости проблема медикаментозного загрязнения окружающей среды приобретает сегодня поистине планетарный характер (Patel *et al.*, 2019; Kaushik, Thomas, 2019; Tyumina *et al.*, 2020). Фармполлютанты оказывают вредное влияние на окружающую среду, имея, даже в незначительных концентрациях, высокую токсичность (Quinn *et al.*, 2008; Domaradzka *et al.*, 2015; Sánchez-Aceves *et al.*, 2021). Понимание механизмов биологической трансформации этих соединений важно для определения их экологической “судьбы” и эффективной нейтрализации. Невозможно оценить риск, который представляют эти микрозагрязнители, не изучив природу и стойкость метаболитов, образующихся при их трансформации. Нужны глубокие фундаментальные знания о возможности их биодеструкции микроорганизмами загрязненных сред, играющих роль первичной системы реагирования на потенциально опасные изменения среды их обитания и запускающих механизмы реакции детоксикации и разложения ксенобиотиков на самых ранних стадиях.

Одними из наиболее перспективных микроорганизмов, осуществляющих процессы естественного самоочищения от антропогенных ксенобиотиков, являются актиномицеты – типичные обитатели водных и почвенных экосистем, обладающие наибольшим разнообразием деградируемых поллютантов и широким спектром адаптационных возможностей (Ivshina *et al.*, 2017, Anteneh, Franko,

2019; Girardot *et al.*, 2020). Уже убедительно документирована эффективная актиномицетальная деструкция антибиотиков, гормонов, антиэпилептиков, анальгетиков и отдельных представителей группы нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) (Yoshimoto *et al.*, 2004; Gauthier *et al.*, 2010; Plotnikov *et al.*, 2017; Thelusmond *et al.*, 2018, Žur *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Ранее была подтверждена способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к полной биодеструкции фармпрепаратов группы обезболивающих и спазмолитических средств, в том числе парацетамола (Ivshina *et al.*, 2006), дротаверина гидрохлорида (Ivshina *et al.*, 2012; Ivshina *et al.*, 2015), диклофенака натрия (Ivshina *et al.*, 2019; Tyumina *et al.*, 2019). В настоящей работе интерес представлял анализ возможного участия *Rhodococcus* в качестве биоокислителей ибупрофена – моноциклического НПВС, производного пропионовой кислоты, наиболее часто детектируемого в окружающей среде.

Ибупрофен – широко применяемый в медицине и ветеринарии лекарственный препарат, включенный ВОЗ в “Essential Drug List”, он обладает противовоспалительным, жаропонижающим, анальгезирующим эффектом, используется в лечении остеоартрита, подагры, перикардита, рака (Garrard, 2014; Chopra, Kumar, 2020). Объемы производства ибупрофена исчисляются тысячами тонн в год (Ma *et al.*, 2018). Тотальное применение ибупрофена, высокая устойчивость молекулы и его неполное разложение в организме человека, ненадлежащая утилизация просроченного (unused and expired) препарата приводят к значительным объемам его эмиссии в окружающую среду и в большей степени через сточные воды (Bashaar *et al.*, 2017; Sadutto *et al.*, 2021; Singh, Sutar, 2021). Ибупрофен повсеместно встречается в поверхностных, грунтовых и очищенных сточных водах в концентрациях от нескольких нг/л до 6000 мкг/л, а также регулярно обнаруживается в образцах питьевой воды (aus der Beek T. *et al.*, 2016; Koumaki, Mamais, 2017; Biel-Maeso *et al.*, 2018; Česen *et al.*, 2018; Guruge *et al.*, 2019; Moreau *et al.*, 2019; Chopra, Kumar, 2020; Singh, Sutar, 2021).

Высокая ($\log K_{ow}$ 3,49) липофильность молекулы ибупрофена, обусловленная наличием 2-метилпропильного радикала, а также отсутствием

дополнительных атомов кислорода, определяет способность ибупрофена проходить через биологические мембраны и высокую (0,18 л/кг) степень распределения в живых организмах (Czyrski, 2019). В связи с этим ибупрофен склонен к биоаккумуляции в живых организмах, в частности в морских (Mezzelani *et al.*, 2018; Ericson *et al.*, 2010) и пресноводных (Xie *et al.*, 2015; Ikkere *et al.*, 2018; Parolini, 2020) моллюсках, рыбах (UNESCO HELCOM 2017; Xie *et al.*, 2019), млекопитающих (Richards *et al.*, 2011), растениях (Pi, Ng, Kelly, 2017), а также к биомагнификации в пищевых цепях (Richmond *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2015).

Накапливаясь в организме позвоночных и беспозвоночных животных, ибупрофен вызывает негативные эффекты – окислительный стресс, повреждение структуры ДНК, подавление активности отдельных ферментов, нитрование белков, нарушение работы митохондрий и пероксидирование липидов (Gonzales-Gonzales *et al.*, 2014; Gonzales-Naranjo, Boltes, 2014; Ortiz de Garcia *et al.*, 2014; Ogueji *et al.*, 2017; Parolini, 2020). В единичных работах отражена токсичность ибупрофена в отношении низших и высших растений (Gonzales-Naranjo, Boltes, 2014; Bácsi *et al.*, 2016; Wijaya *et al.*, 2020). При этом абсолютное большинство исследований токсичности данного экотоксиканта посвящена только непосредственно ибупрофену, тогда как сведения об обнаружении и токсичности продуктов его частичного окисления чрезвычайно фрагментарны (Quero-Pastor *et al.*, 2014; Ellepola *et al.*, 2020; Grabarczyk *et al.*, 2020). Имеются лишь единичные сведения, указывающие на негативное влияние ибупрофена, а также других НПВС на процесс фиксации азота, индукцию окислительного стресса у микроорганизмов и дестабилизацию клеточных оболочек (Guzik, Wojcieszynska, 2019; Ivshina *et al.*, 2019; Palyzová *et al.*, 2020). Недавно показано, что ибупрофен способствует распространению устойчивости к антибиотикам за счет облегчения поглощения бактериями экзогенных генов устойчивости к антибиотикам (Wang *et al.*, 2020). В связи с этим актиномицеты, поддерживаемые в Региональной прпрофилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации колллекций культур, реестровый номер УНУ/ЦКП 73559/480868, <http://www.iegmc.ru>), были

выбраны нами в качестве объекта исследования, а предметом исследований являлась их способность к биодеструкции ибупрофена.

Цель настоящей работы – исследовать способность актиномицетов к биодеструкции ибупрофена и оценить адаптивные реакции бактериальных клеток на присутствие фармполлютанта.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать каталитическую активность коллекционных культур актиномицетов в отношении ибупрофена. Отобрать штаммы – активные биодеструкторы ибупрофена. Сравнить потенциал биодеструкции ибупрофена актиномицетами в присутствии различных источников углерода и энергии.

2. Изучить динамику процесса биодеструкции ибупрофена с использованием математических моделей.

3. Определить основные метаболиты, пути разложения и оценить степень токсичности продуктов бактериальной деструкции ибупрофена.

4. Выявить механизмы адаптации бактериальных клеток к воздействию ибупрофена на уровне их морфофизиологических аномалий.

Научная новизна. С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, реестровый номер УНУ/ЦКП 73559/480868, <http://www.iegmc.ru>) впервые показана способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к направленной биодеструкции высоких (100 мг/л) концентраций ибупрофена в присутствии глюкозы и *n*-гексадекана. Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми к ибупрофену оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам актиномицетов рода *Rhodococcus*: *R. cerastii*, *R. cercidiphyllii* и *R. erythropolis*, выделенные ранее из почвы, ризосферы растений и природного водоёма соответственно. На примере *R. cerastii* ИЭГМ 1243 изучены специфические особенности проявления токсического эффекта ибупрофена на бактериальные клетки. Установлено, что наиболее типичными реакциями актиномицетов на воздействие ибупрофена являются изменение дзета-

потенциала (электрокинетического потенциала) клеток; формирование многоклеточных конгломератов в жидкой среде; изменение относительной площади клеточной поверхности. Полученные данные рассматриваются в качестве механизмов адаптации актиномицетов и, как следствие, повышения их устойчивости к токсическому воздействию фармполлютанта. Установлено, что процесс биодеструкции ибупрофена катализируется ферментными комплексами, локализованными в цитоплазме клеток. Описаны пути бактериальной метаболизации ибупрофена. Подобраны условия, значительно ускоряющие метаболизм ибупрофена и сокращающие продолжительность *lag*-фазы. Проведена оценка и прогнозирование экотоксичности отдельных продуктов метаболизации ибупрофена.

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

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена с применением классических методов микробиологии, таких как получение чистых культур микроорганизмов и их культивирование. Анализ физиологии и

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

Основные положения, выносимые на защиту

1. Актиномицеты рода *Rhodococcus* способны к биодеструкции ибупрофена в условиях косубстратного культивирования. Наиболее выраженной устойчивостью ($\text{МПК} \geq 1000 \text{ мг/л}$) к ибупрофену характеризуются представители трех экологически значимых видов *R. erythropolis*, *R. cercidiphyllii* и *R. cerastii*. Полное разложение ибупрофена (100 мг/л) с использованием клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 достигается в течение 6 сут эксперимента в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %). Кинетическое моделирование, параллельное во времени проводимым экспериментам, позволяет определить продолжительность процесса биодеструкции ибупрофена.

2. Начальный этап процесса биодеструкции ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 сопровождается реакцией гидроксирования бензольного кольца в структуре фармполлютанта с последующим образованием

декарбоксилированных производных. Процесс биодеструкции ибупрофена катализируется цитоплазматическими ферментами семейства СYP450-зависимых оксигеназ.

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

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на II Международной научно-практической конференции “Высокие технологии, определяющие качество жизни”, Пермь, 2018; XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием “Симбиоз–Россия 2019”, Пермь, 2019; XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием “Симбиоз–Россия 2020”, Пермь, 2020; Международной конференции “Пермский международный форум Наука и глобальные вызовы XXI века”, Пермь, 2021; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Химия, Экология, Урбанистика”, Пермь, 2022; Всероссийской научной молодежной конференции “Геномика и биотехнология микроорганизмов”, Владивосток, 2022; 10th Congress of European Microbiologists “FEMS 2023”, Hamburg, Germany, 2023.

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

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 20 таблиц и 22 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 258 наименований работ, в том числе 43 отечественных и 215 зарубежных.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.

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

Обзор литературы

**Глава 1. ИБУПРОФЕН КАК ТОТАЛЬНО
РАСПРОСТРАНЕННЫЙ ФАРМПОЛЛЮТАНТ****1.1. Проблема лекарственного загрязнения природных экосистем**

Впервые проблема присутствия лекарственных средств и их остатков в окружающей среде упоминается в ряде научных публикаций 1966–1976 гг. в контексте анализа загрязнения сточных вод. Однако масштабные исследования в данном направлении начались только в середине 90-х гг. прошлого века, когда лекарственные вещества в природной среде признали новым фактором экологического риска. Повышенный интерес к настоящей проблеме объясняется интенсивным развитием производства и ростом потребления лекарств, а также активным внедрением новых аналитических методов (высокочувствительная и высокоселективная хроматография и масс-спектрометрия), позволяющих выявлять следовые количества лекарственных веществ. На сегодняшний день тема фармполлютантов охвачена широким спектром исследований – от разработки новых точных и чувствительных методов мониторинга окружающей среды с целью обнаружения фармацевтических субстанций до совершенствования и изобретения новых методов выведения данных веществ из природных объектов (Баренбойм, Чиганова, 2012; Козырев, 2012; Прожерина, 2017).

Метаболиты лекарственных препаратов – это полярные водорастворимые вещества, образующиеся вследствие физико- и биохимических процессов. Как правило, метаболиты лекарств не являются токсичными по сравнению с их первоначальными соединениями. Однако, известны случаи, когда метаболиты оказываются более активными, чем исходные лекарства, введенные в организм (Баренбойм, Чиганова, 2015; Blowey, 2008; Celiz *et al.*, 2009; Macherey, Dansette, 2015; Ashrap *et al.*, 2017).

Высокая устойчивость химической структуры и выраженная биологическая активность за счет присутствия реакционно-активных функциональных групп

обуславливают лекарственным средствам и их метаболитам статус наиболее опасных среди загрязнителей, поступающих в открытые экосистемы. Появление фармполлютантов связано с интенсивным развитием фармацевтической промышленности, отсутствием должного контроля за обращением с медицинскими отходами, растущим ежегодным потреблением лекарств населением и в различных отраслях хозяйственной деятельности человека. Установлено, что после применения более половины лекарств выводятся из организма в биологически активной форме, практически не теряя своих свойств (Новикова с соавт., 2018; Halm-Lemeille, Gomez, 2016; Gworek *et al.*, 2020).

В качестве возможных наиболее крупных источников загрязнения можно выделить: население; животноводческие предприятия, птицефабрики; фармацевтические предприятия и научно-исследовательские центры; лечебно-профилактические и аптечные организации.

Для оценки масштаба поступления контаминантов в открытые экосистемы можно использовать несколько параметров. Один из них – оборот мирового фармацевтического рынка, который составляет 850–900 млрд. долларов США в год, и, согласно прогнозам, в 2016–2025 гг. будет расти в среднем на 4,6% в год, что позволяет предположить увеличение объемов поступления лекарственных средств в окружающую среду. Что касается российских реалий, то объем рынка России в ценах дистрибуторов в 2019 г. вырос на 9,5% по сравнению с 2018 г. и составил 1843 млрд. рублей (Баренбойм, Чиганова, 2015; Новикова, Фридман, 2018; Desbiolles *et al.*, 2018; https://dsm.ru/docs/analytics/2019_Report_rus_2019.pdf). При этом применение лекарственных препаратов в России и других странах не всегда продиктовано реальной необходимостью. Результаты мировых исследований показывают, что около 50% всех лекарственных препаратов назначается, распределяется и реализуется ненадлежащим образом, а половина пациентов не принимают препараты в соответствии с предписаниями врача. Иногда медикаменты, вопреки инструкции, используются не только в лечебных, но и профилактических целях. В ряде случаев потребители самостоятельно приобретают для себя лекарства из так называемой категории “lifestyle”,

предназначенные для поднятия настроения, улучшения внешнего вида и так далее. Кроме того, по данным Европейской федерации фармацевтической промышленности и ассоциаций (EFPIA), от 3 до 8% проданных медикаментов остаются неиспользованными, а по некоторым данным, этот показатель существенно выше и может достигать 50%, как, например, во Франции и Великобритании. Ситуация с избыточным потреблением лекарств усугубляется тем, что нередко назначение тех или иных препаратов стимулируется материальной заинтересованностью в этом врачей. Реклама и широкий доступ к Интернету также обеспечивают более активное проникновение фармацевтических препаратов в нашу повседневную жизнь, а иногда способствуют переходу лекарств в разряд товаров широкого потребления. Кроме того, отдельные лекарственные средства применяются не только в медицинской практике, но и в других отраслях деятельности человека, таких как ветеринария, птицеводство, рыбоводческое хозяйство. Все это приводит к неизбежному попаданию лекарств в окружающую среду и чрезмерному распространению лекарственных средств в открытых экосистемах и может оказывать влияние на состояние биотопов (Мухутдинова с соавт., 2015; Прожерина, 2017; Felicity, 2017).

Повсеместное часто неконтролируемое потребление лекарственных препаратов населением закономерно приводит к росту количества фармацевтических отходов, которые, согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, относятся к классу медицинских отходов. В российское правовое поле понятие “медицинские отходы” введено с принятием Федерального закона от 21.11.2011 г. № 323–ФЗ (ред. от 14.12.2015) «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации». Особое внимание уделено вопросу регулирования обращения с медицинскими отходами в лечебно-профилактических учреждениях. Основные положения, связанные со сбором, временным хранением и транспортировкой отходов, прописаны в СанПиН 2.1.7.2790–10 “Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами”. При этом лекарственные отходы отнесены к группе «Г» как токсикологически опасные (1–4-й класс опасности). Кроме того,

обращение с отходами в нашей стране регулируется такими документами, как Закон РФ № 7–ФЗ от 10.01.2002 “Об охране окружающей среды”, Закон РФ № 52–ФЗ от 30.03.1999 “О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения”, Закон РФ № 89ФЗ от 24.06.1998 “Об отходах производства и потребления” и Федеральный закон № 458–ФЗ от 29.12.2014 “О внесении изменений в Федеральный закон “Об отходах производства и потребления” с изменениями и дополнениями от 29.07.2017. Отдельные документы касаются нормирования содержания лекарственных средств в воздухе и распространяются на рабочие зоны при производстве лекарств (Крюков, Коновалов, 2013; Минашкина, Кондратенко, 2017; <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste>).

При оценке объёмов образования медицинских отходов в РФ обычно используют нормативы образования и число койко-мест в медицинском учреждении. Считается, что их образуется примерно 1,3–2,7 кг/сутки на 1 койко-место (для отходов всех классов), что дает, исходя из числа койко-мест в 130000–140000 в стране, общий объём образования медицинских отходов для РФ в целом около 100 000 т в год. По данным экспертов “Общероссийского народного фронта”, в год производится до 1 млн т медицинского мусора. Для Пермского края средняя годовая оценка количества образуемых медицинских отходов составляет 1683 т. При этом на площадках, предназначенных для утилизации опасных медицинских отходов, реализуется только 250 т, в то время как число случаев обнаружения несанкционированных свалок медицинских отходов растёт. Данный факт может быть связан с тем, что с 2013 г. на федеральном уровне отменили лицензирование подрядных организаций, занимающихся вывозом и утилизацией медицинских отходов (Акимкин с соавт., 2014; Хохлова, 2020; Николаева, 2017; <https://onf.ru/2020/02/12/permskie-eksperty-onf-predlozhili-vlastyam-razrabotat-territorialnuyu-shemu-obrazovaniya/>).

Таким образом, можно разделить источники попадания лекарственных средств в окружающую среду на два основных приблизительно равнозначных сектора: лекарства неиспользованные и использованные по назначению. По

литературным данным, около 35–50% лекарственных средств оказываются ненужными из-за избыточного объема продаваемых упаковок, не востребоваемости, истечения сроков хранения, нарушений норм производства, складирования и перевозки или иных причин. Неиспользованные лекарственные средства нередко выбрасываются или утилизируются ненадлежащим образом и становятся главными факторами загрязнения, попадая в систему канализации, стоки или испарения свалок. Также следует рассматривать бытовые стоки населенных пунктов и клиник, содержащие лекарственные субстанции, применяемые населением и пациентами, загрязненные воды и ирригацию сельских хозяйств, использующих ветеринарные препараты (Козырев, 2012; Padmanabhan, Debabrata, 2019; Wojsławski *et al.*, 2019; Woolridge, Hoboy, 2019).

Однако даже при использовании по назначению активная субстанция лекарственного средства оказывается во внешней среде. Попадая в человеческий организм, одна часть лекарственного вещества подвергается химическим превращениям, а метаболиты часто теряют активность. С точки зрения фармакологии устойчивость к превращениям оказывается предпочтительной, так как обеспечивает нужные сроки хранения препарата, а главное, увеличивает долю молекул, попадающих в ткани-мишени. Оставшаяся часть препарата (обычно от 50 до 90%) выделяется в неизменном виде. Например, в случае антибиотиков исходная субстанция сохраняется на 90%, а для кофеина только 10% выделяется почками в неизменном виде (Харкевич, 2010; Русаков с соавт., 2018; Коноплева, 2019; Brown, 2019).

В монографии Т. Ternes и А. Joss (2006) впервые была предложена эмпирическая формула (1) для расчета предполагаемых концентраций лекарственных средств в первичных неочищенных сточных водах, очищенных сточных водах и поверхностных сточных водах:

$$\text{ПКЛС}_{\text{CB1}} = \frac{(\text{Потр.}_{\text{(субст.)}} \times \text{Экскр.} \times 10^9)}{365 \times \text{Нас.} \times \text{ОСВ}} [\text{мкг/л}^{-1}], \quad (1)$$

где ПКЛС_{CB1} – предполагаемая концентрация вещества (ЛС) в первичных неочищенных сточных водах (CB_1), $\text{мкг} \times \text{л}^{-1}$, $\text{Потр.}_{\text{(субст.)}}$ – потребление вещества

(фармацевтической субстанции) на определенной территории, кг/г, Экскр. – уровень экскреции неизменного вещества и его биологических конъюгатов с мочой и фекалиями, %, 365 – число дней в году, Нас. – численность населения территории, обслуживаемой соответствующими канализационными сетями, ОСВ – объем сточных вод, л на 1 человека в день.

Приведенная формула предполагает равномерность распределения таких значений, как количественное потребление соответствующего лекарственного средства, численность населения территории и сезонная динамика объема сточных вод. Также допускается, что в течение времени, пока первичные стоки достигнут очистных сооружений, в их составе не происходит биологическая, химическая или физико-химическая деградация вещества.

Предполагаемое содержание остатков лекарственных средств в очищенных сточных водах находится в прямой зависимости от показателя удаления лекарственных средств в ходе очистки сточных вод. Этот параметр является переменным и зависит от применяемых технологий очистки, их комбинирования, от индивидуальных свойств лекарственных средств (в первую очередь от полярности соединения), а также от количества и химической доступности ненасыщенных ковалентных связей в молекуле. Зависимость может быть представлена следующей формулой (2):

$$\text{ПКЛС}_{\text{СВ}_2} = \text{ПКЛС}_{\text{СВ}_1} \times (1 - \text{Удал}) [\text{мкг/л}^{-1}] \quad (2)$$

где $\text{ПКЛС}_{\text{СВ}_2}$ – предполагаемая концентрация лекарственного вещества (ЛС) в очищенных сточных водах (СВ_2), $\text{мкг} \times \text{л}^{-1}$, Удал. – показатель удаления лекарственных средств в ходе очистки сточных вод, %.

И наконец, содержание остатков лекарственных средств в поверхностных водах, в которые производится слив очищенных сточных вод, зависит от уже имеющейся в поверхностных водах фактической концентрации соответствующего вещества (можно принять равной 0), входящей концентрации в сточных водах и от уровня разбавления сточных вод. Последний показатель, в соответствии с рекомендациями Европейского медицинского агентства, принимается равным 1:10. Указанная зависимость может быть представлена следующей формулой (3):

$$\text{ПКЛС}_{\text{ПовВ}} = \text{ПКЛС}_{\text{СВ2}} \times 0,1 + \text{КЛС}_0 [\text{мкг/л}^{-1}] \quad (3)$$

где $\text{ПКЛС}_{\text{ПовВ}}$ — предполагаемая концентрация вещества (ЛС) в поверхностных водах (ПовВ), $\text{мкг} \times \text{л}^{-1}$, 0,1 — уровень разбавления сточных вод, КЛС_0 — имеющаяся фактическая концентрация вещества в поверхностных водах, мкг хл^{-1} .

Немецкие исследователи провели сравнение расчетных предполагаемых концентраций лекарственных средств с фактическими обнаруженными значениями, и в большинстве случаев расчетные значения оказались близки к средним обнаруженным концентрациям лекарственных средств (приложение А). В то же время следует помнить, что представленные формулы существенно упрощают модель поведения веществ, что ведёт к значительным отклонениям. Результаты расчетов представляют интерес главным образом для проведения комплекса калибровочных расчетов в ходе подготовки к анализам проб воды на новой изучаемой территории (Гетьман, Наркевич, 2013; Sadezky *et al.*, 2008).

Несмотря на растущее число исследований, оценить реальную картину воздействия фармполлютантов на окружающую среду весьма затруднительно. Отчасти это связано с тем, что проблема загрязнения экосистем фармацевтическими субстанциями была признана на международном уровне недавно — только в начале XXI века. Причина кроется в том, что фармполлютанты относятся к категории эмерджентных загрязнителей — веществ, поступление которых в окружающую среду не регулируется и не контролируется, а обнаружение стало возможным в связи с развитием высокочувствительных аналитических методов (Тюмина с соавт., 2020; ЕЕА, 2010; Barroso *et al.*, 2019).

Дороговизна и сложность аналитических методов, необходимых для детектирования фармполлютантов в сточных водах, значительно ограничивает масштаб их применимости. Агентство по охране окружающей среды США разработало и утвердило подробную методику обнаружения и количественного определения лекарственных средств в воде, почве, осадках и биологических материалах на основе ВЭЖХ-МС/МС. При этом для обнаружения стероидов и гормонов предлагается использование HRGC/HRMS — газовой хроматографии

высокого разрешения/масс-спектрометрии высокого разрешения. При проведении общенациональных геологических исследований в США рекомендуется использовать метод обнаружения лекарственных средств в фильтрованной воде с использованием ВЭЖХ-МС и твердофазной экстракции на основе синтетических химически модифицированных стирол-дивинилбензольных смол. Метод, основанный на применении хроматографии ультравысокого разрешения с тройной квадрупольной масс-спектрометрической детекцией, описан в работе U.S. Baghel (2017). В качестве метода детекции может также использоваться диодная матрица с флуоресцентным детектором. Иллюстрация применимости различных хроматографических методов анализа целевых веществ, подготовленная на основе обобщения сведений из литературных источников, представлена на рисунке 2 (Гетьман, Наркевич, 2013; Fatta *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007; Furlong *et al.*, 2008; Kostich, Lasorchak, 2008).

Следует отметить, что в России отсутствуют утверждённые методики определения содержания лекарственных средств и их метаболитов водных объектах, питьевой воде, поэтому исследования могут проводиться не в целях государственного контроля, а только в научных целях. Например, научно-исследовательским центром экологической безопасности РАН (Санкт-Петербург) была проведена оценка уровня загрязнения водоёмов Северо-Западного федерального округа лекарственными веществами. Практически во всех пробах воды из исследованных водоёмов Северо-Запада присутствовал кофеин в концентрациях 3,8–446 нг/дм³, в ряде проб обнаружены кетопрофен, диклофенак и ципрофлоксацин в концентрации от десятков до сотен нг/дм³ (Русских с соавт., 2014).

Сотрудниками Института водных проблем РАН (Москва) были исследованы водоёмы, являющиеся источниками питьевого водоснабжения Москвы, – Ивановское, Истринское, Можайское и Учинское водохранилища, реки Москва, Истра и Руза, а также 4 станции водоподготовки – Северная, Западная, Восточная и Рублёвская. В воде и донных отложениях исследованных объектов были обнаружены 23 действующих вещества лекарственных

препаратов, 9 вспомогательных веществ лекарственных форм, 5 веществ, входящих в витаминные комплексы, а также биологически активные добавки. Наличие лекарственного загрязнения в воде поверхностных водоёмов, питьевой воде и возникающие в связи с этим риски для здоровья человека вызывают необходимость разработки гигиенических нормативов. В ст. 16 Рамочной директивы ЕС по воде (2000/60/ЕС) определена стратегия борьбы с химическим загрязнением вод, которая положила начало формированию систематических мер по борьбе с загрязнением лекарственными средствами. В РФ разработаны и утверждены гигиенические нормативы содержания в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе, питьевой воде и воде водоёмов хозяйственно-питьевого, культурно-бытового и рыбохозяйственного назначения определённого перечня лекарственных средств. Однако в связи с развитием фармацевтической промышленности, увеличением производства и потребления лекарственных средств актуальной становится разработка гигиенических нормативов для уже применяемых и вновь разработанных препаратов. Сложность разработки методического сопровождения контроля лекарственных средств, в первую очередь, связана с отсутствием утверждённых величин ПДК лекарственных средств. Так, Санкт-Петербургским научно-исследовательским центром экологической безопасности РАН разработан метод определения лекарственных препаратов – комплексный метод жидкостной хроматографии – tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения с применением хромато-масс-спектрометра LTQ OrbiTrap (Thermo Finnigan) в режиме электрораспылительной ионизации, который был апробирован при определении 16 лекарственных соединений, принадлежащих к различным фармацевтическим группам, в природной воде и донных отложениях. Однако такая методика не может быть утверждена из-за отсутствия гигиенических нормативов на перечисленные лекарственные соединения (Баренбойм, Чиганова, 2012; Некрасова с соавт., 2012; Новикова с соавт., 2018).

Необходимо отметить, что проблема детектирования загрязнения окружающей среды фармацевтическими веществами имеет мировой масштаб.

Для составления глобальной статистики группа учёных под руководством T. aus der Beek в 2016 г. составила литературный обзор 1016 публикаций и 150 обзорных статей. Это позволило авторам собрать данные об измеренных концентрациях фармацевтических средств по всему миру в поверхностных, подземных, водопроводных и питьевых водах, навозе, почве и других матрицах окружающей среды в отношении 713 лекарственных средств. По результатам проведенного исследования, концентрация 631 лекарственного вещества была выше предельно допустимых норм в окружающей среде 71 страны, охватывающих все континенты (aus der Beek *et al.*, 2016).

Также немаловажным фактором в оценке риска неблагоприятного воздействия фармацевтических веществ на окружающую среду является отсутствие данных о комбинированном действии химических веществ. Как правило, в фармакологических и токсикологических исследованиях изучают зависимость “доза-эффект” одного конкретного соединения. Когда число действующих веществ увеличивается, могут возникать эффекты как взаимного потенцирования веществ, так и их конкуренции, при этом зависимость “доза-эффект” меняет характер. Известны случаи, когда одновременное применение только двух лекарств усиливало их активности до сотни раз. Такой эффект способен существенно снижать имеющийся резерв безопасности в случае сочетанных действий лекарственных примесей, обнаруживаемых в окружающей среде. Предсказательные методы оценки комбинированного воздействия лекарств отсутствуют, а получение экспериментальных данных невозможно из-за бесконечной вариабельности концентраций и наименований лекарственных субстанций, меняющихся от времени и места пробоотбора (Миронов, 2012; Backhaus, 2014; Peake *et al.*, 2015; Lindim *et al.*, 2019).

Помимо явления совокупной токсичности, к особенностям фармацевтических субстанций в качестве загрязнителей относятся следующие: (1) лекарственные субстанции исходно малотоксичны, но всегда оказывают эффекты, изменяющие деятельность функционально важных биомолекул; (2) способность лекарственных субстанций к перераспределению и аккумуляции в ткани живого,

окружающей среде и пищевых цепочках биосферы. Это означает возможность направленной концентрации этих веществ до уровней, близких к терапевтическим. Аккумуляция фармполлютантов в экосистемах и их продолжительное воздействие на живые организмы может сопровождаться развитием раковых клеток и нарушением функций работы почек у млекопитающих, снижением репродуктивной функции у рыб и другими патологическими изменениями (Козырев, 2012; Новикова и др., 2018; Keerthanan *et al.*, 2020).

1.2. Нестероидные противовоспалительные средства

Интенсивное развитие фармацевтической промышленности сопряжено как с постоянной разработкой новых химических соединений, так и совершенствованием существующих формул в сторону увеличения биологической активности лекарственных средств. На сегодняшний день во всем мире зарегистрировано около 4000 активных лекарственных средств (<https://www.drugbank.ca/stats>). Разнообразие в химической структуре данных веществ требует системного подхода к проблеме. В качестве основы для расстановки приоритетов может послужить оценка частоты встречаемости лекарственных загрязнителей различных терапевтических классов в окружающей среде. Группа португальских ученых изучила и систематизировала данные 134 статей за период с 1997 по 2009 гг. (Santos *et al.*, 2007, 2010). Результатом проведенного анализа явились данные об относительной встречаемости контаминантов различных терапевтических классов в окружающей среде. Изучение обзорных статей за период с 2009 по 2019 гг. показало, что описанная тенденция сохраняется, и наиболее обширно распространенная группа контаминантов, имеющая глобальный характер встречаемости, это нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) (Мухутдинова с соавт., 2015; Li *et al.*, 2014; Sui *et al.*, 2015; aus der Beek *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017; Vergili, 2019).

За период с 2009 по 2019 гг. в водных промышленных и природных системах по всему миру обнаружено 26 фармполлютантов группы НПВС

медицинского и ветеринарного назначения. Данные вещества детектированы в поверхностных (речные, озерные, морские, океанические), грунтовых, сточных водах (муниципальные, промышленные, больничные), в почвах, донных осадках, питьевой воде, снеге и ледниках Антарктиды. Экологические концентрации НПВС варьируют от единиц нанограмм до сотен микрограмм. При этом обнаружено, что содержание фармполлютантов в муниципальных сточных водах достигает 100–200 мкг/л. Наиболее высокие уровни НПВС – 1,407 мг/л ацетилсалициловой кислоты, зарегистрированы в неочищенных муниципальных сточных водах. На настоящий момент наиболее часто обнаруживаемыми соединениями являются диклофенак (35 стран), ибупрофен (28 стран), напроксен (21 страна) и кетопрофен (19 стран). Наиболее значимыми источниками НПВС в водной среде являются бытовые и больничные сточные воды. Отсутствие строгого контроля в сфере оборота лекарственных средств приводит к тому, что непригодные для медицинского использования лекарственные препараты (бракованные, с истекшим сроком годности), в том числе НПВС, поступают в канализационные системы без предварительной обработки. После потребления фармацевтических препаратов 30–90% активного соединения сбрасывается в канализационную систему в форме исходного соединения или в комплексах с глюкуроновой кислотой. Исследование M.J. Gomez *et al.* (2006) показало, что небольшие больницы Испании с 75 койками сбрасывают сточные воды с содержанием ибупрофена 20 мкг/л и парацетамола 16 мкг/л. При этом, как правило, больничные сточные воды сбрасываются в канализационную сеть общего пользования без предварительной очистки. Вклад больниц в фармацевтическую нагрузку на городские сточные воды может составлять до 15%. При этом станции очистки сточных вод не рассчитаны на удаление таких сложных соединений, как НПВС. По причине того, что значения константы диссоциации для НПВС находятся в диапазоне от 4,20 до 9,40, за исключением ацетилсалициловой кислоты, удаление этих соединений сорбционными процессами неэффективно (не превышает 30%) и, в большей степени, зависит от химических и биологических процессов. Более того, встречаются данные о том,

что в процессе очистки сточных вод концентрация ПВС может повышаться в результате высвобождения их из конъюгатов (Jones *et al.*, 2002; Ort *et al.*, 2010; Vieno, Sillanpää, 2014; Kot-Wasik *et al.*, 2016; González-Alonso *et al.*, 2017; Botero-Coy *et al.*, 2018; Aydin *et al.*, 2019).

В последнее время в научной литературе затрагивается вопрос сезонной динамики фармполлютантной нагрузки на водные экосистемы: зимой концентрация НПВС выше, чем в весенне-летний период, что, в свою очередь, связано с низкой турбуляцией водных масс, низкими температурами и, следовательно, слабой биodeградирующей активностью микроорганизмов. При этом наиболее высокие (до 70 мкг/л) концентрации в очищенных сточных и поверхностных водах характерны для ибупрофена, что связано с чрезвычайной востребованностью данного лекарства среди населения. Значительные концентрации напроксена (29 мкг/л) детектированы в очищенных сточных водах Канады, кетопрофена (9–10 мкг/л) – в странах Латинской Америки и Африки, диклофенака (до 20 мкг/л) – в очищенных сточных водах в странах Африки и Европы (Русских с соавт., 2014).

Несмотря на небольшой охват проводимых в нашей стране исследований, обнаруживаемые в водных экосистемах России концентрации НПВС сопоставимы с мировыми уровнями фармацевтического загрязнения. Такие концентрации НПВС в окружающей среде несут потенциальные экологические риски, рассчитанные по коэффициентам экологической опасности, и представляют собой источник неблагоприятных эффектов для окружающей среды.

Причина столь широкой распространенности загрязнения окружающей среды НПВС кроется в высоком уровне потребления населением препаратов данной группы. Ежедневно их потребляют более 30–50 млн. человек в мире. Только в США каждый год выписывается более 111 млн. рецептов на препараты этой группы, дополнительно около 30 млрд. доз НПВС продается на безрецептурной основе, что составляет около 60% безрецептурного рынка. Регулярно (не менее 1 раза в месяц) НПВС принимают 14–68% жителей разных

стран. В связи со старением населения и, как следствие, повышением распространенности дегенеративных и воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата и других патологических состояний, требующих применения НПВС, масштабы потребления препаратов этой группы прогрессивно увеличиваются во всем мире. Например, в США в период с 2005 по 2010 гг. оно увеличилось на 41% (Ушкалова, 2019).

В России в настоящее время в общей структуре производства и реализации лекарственных препаратов одну из лидирующих позиций среди групп анатомо-терапевтическо-химической классификации занимает группа М «костно-мышечная система», доля которой в объеме розничных продаж в 2017 г. составила 8,4%. Значительная часть данной группы приходится на нестероидные противовоспалительные препараты, пользующиеся спросом у 20% населения всего мира. Распространенность и частота применения обусловлена разнообразием терапевтических эффектов данных лекарственных препаратов (ЛП): они обладают обезболивающим, жаропонижающим, противовоспалительным действием. Анализ ассортимента НПВС по Международным непатентованным наименованиям (МНН) показал, что лидирующие позиции по показателю удельного веса в общей структуре рынка на 2017 г. занимают диклофенак (25,6%), мелоксикам (10,9%), ибупрофен (10,7%), кетопрофен (11,1%) и кеторолак (7,2%). Лекарственные препараты данных 5 МНН формируют более 50% фармацевтического рынка НПВС. Сравнительный анализ данных Государственного реестра лекарственных средств России за 2014 и 2017 гг. показал стабильный рост фармацевтического рынка НПВС по всем направлениям: расширение ассортимента по числу номенклатурных позиций, рост отечественного производства лекарственных препаратов, положительная динамика регистрации новых лекарственных препаратов под уже действующими Международными непатентованными наименованиями. При этом наибольшее число новых ЛП за рассматриваемый период было зарегистрировано под МНН ибупрофен (14 ЛП, 8 ТН), мелоксикам (11 ЛП, 3 ТН), кетопрофен (13 ЛП, 1 ТН), кеторолак (9 ЛП, 3 ТН), нимесулид (8 ЛП) и диклофенак (8 ЛП, 2 ТН).

Современный фармацевтический рынок НПВС формируют как рецептурные – 64,5% (330 ЛП), так и безрецептурные – 35,5% (182 ЛП) препараты. В структуре безрецептурных наибольший удельный вес имеют ЛП следующих МНН: ибупрофен (10,0%), диклофенак (7,0%), кетопрофен (4,7%). При этом условия отпуска определяются не только действующим веществом, но и лекарственной формой препарата (Зиновьева, 2017; Олейникова, Пожидаева, 2018).

В литературе НПВС относят к классу терапевтических средств, одобренных для применения в качестве жаропонижающих, противовоспалительных и обезболивающих средств. НПВС используются для лечения мышечной боли, дисменореи, артрита, гипертермии, подагры, мигрени, зубной боли, а также в качестве опиоид-сберегающих агентов в некоторых случаях острой травмы. Это чрезвычайно разнообразная группа препаратов, классифицируемая по химической структуре и селективности: ацетилированные салицилаты (аспирин), неацетилированные салицилаты (дифлунизал, сальсалат), пропионовые кислоты (напроксен, ибупрофен, флурбипрофен, кетопрофен), уксусные кислоты (диклофенак, индометацин, сулиндак, этодолак), оксикамы (мелоксикам, пироксикам), антраниловые кислоты (меклофенамат, мефенамовая кислота), алканоны (набуметон) и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (целекоксиб, эторикоксиб). При наличии реактивных групп (в частности, гидроксильной, амидной) молекулы НПВС обладают как высокой реакционной способностью, так и стабильностью. При этом, несмотря на многообразие в химической структуре, в основе действия НПВС лежит единый механизм блокирования группы ферментов – циклооксигеназ (ЦОГ). Это ферменты, участвующие в синтезе простагландинов, простациклинов и тромбоксанов – веществ, инициирующих воспаление (Лазаренко, 2016; Ghlichloo, 2020; <https://www.drugs.com>).

НПВС могут вызывать многочисленные нежелательные реакции (НР) со стороны различных органов и систем и занимают одно из ведущих мест среди всех фармакологических групп по частоте регистрации НР. Наиболее частые НР НПВС, среди которых поражения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (10–50%),

почек (1–15%), нарушение агрегации тромбоцитов и отрицательное влияние на систему кровообращения (1–5%), являются класс-специфичными и связаны с их основным механизмом действия – ингибированием изоферментов циклооксигеназы (ЦОГ). Наиболее серьезные НР НПВС (кровотечение из верхних и нижних отделов ЖКТ, перфорация и прободение язвенных поражений ЖКТ, сердечно-сосудистые тромботические осложнения, артериальная гипертензия, застойная сердечная недостаточность, тяжелые поражения печени и почек, анафилактикоидные и тяжелые кожные реакции, усиление и/или удлинение продолжительности кровотечения после травмы или хирургического вмешательства) развиваются у 5–7% пациентов и вносят существенный вклад в неблагоприятные исходы лечения. Спектр клинической токсичности НПВС в целом сходен для разных препаратов этой группы, однако частота развития НР со стороны определенных органов и систем может существенно различаться и зависит как от их фармакодинамических свойств, особенно степени ингибирования ЦОГ-1 и ЦОГ-2, так и фармакокинетических характеристик (биодоступность, период полувыведения, экскреция) (Чичасова, 2016; Ушкалова, 2019; Остроумова, 2020).

По результатам проведенного S. Trelle с соавт. (2011) метаанализа, включающего 31 плацебо-контролируемое или сравнительное исследование с другими НПВС (116429 пациентов, 115000 пациенто-лет), выявлен повышенный риск кардиотоксичности для широко применяемых в медицинской практике препаратов – ибупрофена и диклофенака. Сопоставимый риск сердечно-сосудистых осложнений при применении высоких доз диклофенака и коксибов был подтвержден и в самом большом метаанализе, включавшем 280 плацебо-контролируемых рандомизированных контролируемых испытаний (124513 участников, 68342 пациенто-лет) и 474 сравнительных рандомизированных контролируемых испытаний НПВС между собой (229296 участников, 165456 пациенто-лет). По данным этого метаанализа, риск развития больших коронарных событий по сравнению с плацебо повышали как коксибы, диклофенак, так и ибупрофен, однако риск сосудистой смерти достоверно увеличивался только при

применении коксибов и диклофенака, а при использовании ибупрофена наблюдалась тенденция к ее повышению. На каждые 1000 пациентов, получающих коксиб или диклофенак в течение 1 года, приходилось 3 дополнительных по сравнению с плацебо сосудистых осложнения, одно из которых было фатальным. Все эти препараты примерно в 2 раза повышали риск развития сердечной недостаточности. Напроксен не оказывал существенного влияния на большие сосудистые события и сосудистую смертность, однако так же, как и во всех других исследованиях, ассоциировался с более высоким риском желудочно-кишечных осложнений, чем препараты сравнения (Trelle *et al.*, 2011; Bhala *et al.*, 2013).

Проблемы безопасности НПВС вызывают особое беспокойство на фоне растущего числа данных об обнаружении данной группы фармполлютантов в сточных, поверхностных, грунтовых и подземных водах, откуда они через систему водоснабжения попадают в питьевую воду, поставляемую населению. Таким образом, лекарственные средства поступают в организм человека незапланированно, в связи с этим, влияние данных ЛП невозможно спрогнозировать, контролировать и регулировать (Новикова с соавт., 2018; Kümmerer, 2016).

Разнообразие химических структур, устойчивость к биоразложению, способность к персистированию обуславливают высокий показатель экотоксичности для лекарственных препаратов группы НПВС. При этом в границах очерченной группы наиболее высокой острой токсичностью обладает диклофенак, представляющий потенциальный риск для нецелевых организмов при концентрациях менее 1 мкг/л. В литературе представлены данные о случаях влияния диклофенака на уменьшение популяции рыб и птиц. Наиболее известный случай негативного экотоксического воздействия НПВС связан с массовым сокращением популяций трех видов грифов на территории Индийского субконтинента, вызванным интоксикацией и почечной недостаточностью птиц вследствие их кормления тушами крупного рогатого скота, обработанного диклофенаком. Исследования совокупной токсичности НПВС, в том числе

диклофенака, ибупрофена, напроксена и ацетилсалициловой кислоты в воде продемонстрировали синергетический эффект на повышение токсичности в тестах на дафнии и водорослях. Два продукта разложения ацетаминофена при хлорировании в сточных очистных сооружениях были идентифицированы как высокотоксичные соединения. В настоящее время ведутся исследования по изучению токсичности ибупрофена в отношении эндокринной системы у человека и диких животных. Показано, что продукты фоторазложения напроксена более токсичны, чем исходное соединение (Lolić *et al.*, 2015; Pomati *et al.*, 2004).

Беспокойство вызывает способность НПВС к миграции в пищевой цепочке, описанная в нескольких работах. Так, обнаружение диклофенака и ибупрофена в шерсти выдры (*Lutra lutra*) на территории Великобритании свидетельствует о загрязнении этими экотоксикантами водных объектов и рыбной фауны – среды обитания и кормовой базы выдр. Ряд исследователей обнаружили биоаккумуляцию НПВС в морских и пресноводных моллюсках, растениях. Несмотря на отдельные локальные исследования, глобальная картина воздействия НПВС на окружающую среду практически не известна. Наибольшее внимание привлекают вопросы воздействия данных веществ на человека и животных, в меньшей мере представлены исследования влияния НПВС на растения, в то время как исследования в отношении микроорганизмов в микробных сообществах, которым при контакте с фармацевтическим ксенобиотиками приходится решать проблему их детоксикации, только начинают разворачиваться (Kookana *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018;).

Установлено, что НПВС вызывают нарушения во всех системах органов живых организмов. Наиболее общей ответной реакцией у беспозвоночных и позвоночных животных на воздействие НПВС различной химической природы является индукция окислительного стресса, что выражается в изменении активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы и др.), суммарного количества белков, а также в перекисном окислении липидов. НПВС индуцируют нарушения в системе самоочищения организма: цитологические изменения почек и печени в организме

рыб (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*) под воздействием (0,1–100 мкг/л) диклофенака. В присутствии диклофенака и кетопрофена выявлены нарушения кровоснабжения и сердечные аномалии у пресноводных рыб *Clarias gariepinus* и *Danio rerio*. Кроме того, у беспозвоночных и позвоночных животных НПВС индуцируют расстройства метаболизма: от изменения активности ферментов детоксикации до митохондриальной дисфункции и снижении функциональной активности мембран. Известно, что НПВС способствуют изменениям на молекулярно-генетическом уровне, вызывая нарушения в экспрессии генов и разрыв цепи ДНК. Помимо перечисленных токсических эффектов, НПВС могут вызывать эндокринные нарушения, что продемонстрировано на модели культуры клеток (индукция выработки половых гормонов под действием напроксена), двустворчатых моллюсках и рыбах (в присутствии мефенамовой кислоты и диклофенака). Единичные исследования воздействия экотоксикантов группы НПВС на высшие растения и водоросли показали индукцию окислительного стресса и изменение содержания хлорофилла, антоцианов и каротиноидов.

Анализ литературных данных свидетельствует о явно недостаточном характере исследований влияния НПВС на микроорганизмы, учитывая их ключевую роль в окружающей среде и биогеохимических циклах. Микроорганизмы являются природной системой “первичного реагирования” на ксенобиотическую нагрузку в открытых экосистемах, при этом существует явный недостаток информации о механизмах и эффективности защитных реакций микроорганизмов, индуцируемых присутствием фармацевтических поллютантов. Известны данные о том, что НПВС ингибируют рост речных биопленок, активного ила очистных сооружений и почвенных бактерий. Ингибирование физиологической активности микроорганизмов под воздействием фармполлютантов может приводить к нарушению важнейших экологических процессов в биосфере, таких как круговорот углерода и азота. Информация об изменении таксономического состава природных микробных сообществ в ответ на появление и присутствие фармполлютантов дает представление об устойчивости определенных групп микроорганизмов, а также их возможном

участии в процессах деструкции и элиминации этих ксенобиотиков. Обнаружено, что под воздействием диклофенака в сообществе активного ила возрастало количество представителей родов *Nitratireductor*, *Asticcacaulis* и *Pseudoxanthomonas*. Напроксен в концентрации 100 мг/л оказывал токсическое действие на представителей *Archaea*, *Betaproteobacteria* и *Planctomycetes* в естественном сообществе речной экосистемы, а количество *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, напротив, увеличивалось. Влияние смеси НПВС на сообщество активного ила сопровождалось увеличением представителей *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Эти сведения свидетельствуют о том, что микроорганизмы данных таксонов могут быть вовлечены в процессы биологической деструкции фармполлютантов (Jiang *et al.*, 2017; Mezzelani *et al.*, 2018; Ivshina *et al.*, 2019; Keerthanan *et al.*, 2020).

1.3. Ибупрофен как один из наиболее обнаруживаемых в объектах окружающей среды НПВС

Ибупрофен (RS-2-[4-(2-метилпропил)фенил]пропановая кислота) является третьим по популярности, наиболее назначаемым и самым продаваемым лекарственным препаратом в мире (Marchlewicz *et al.*, 2015). Химическая структура представлена на Рисунке 1.

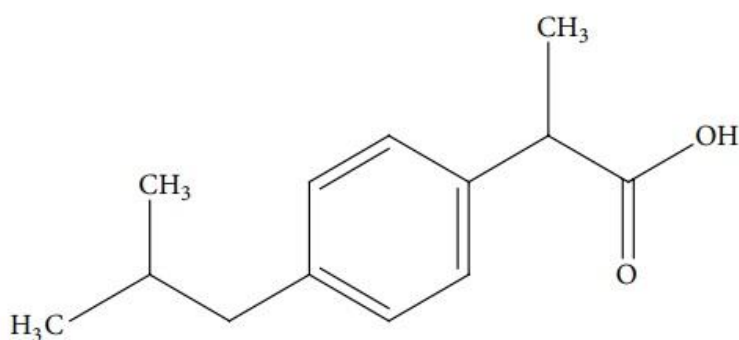


Рисунок 1 – Структурная формула ибупрофена

Ибупрофен впервые синтезирован Стюартом Адамсом и Джоном Николсоном в 1962 г. и был введен в употребление в Англии в 1967 г., в США – в 1974 г. в качестве противовоспалительного препарата. Сегодня ибупрофен представлен в более чем 120 странах мира и эффективно применяется при

лечении различного рода болей и лихорадки миллионами людей, поскольку обладает противовоспалительной, анальгетической и умеренной жаропонижающей активностью. Это один из препаратов, включенных в Список основных лекарственных средств 2010 г., составленный Всемирной организацией здравоохранения. В механизме действия существенную роль играет его ингибирующее влияние на биосинтез простагландинов. Ибупрофен ослабляет боль посредством подавления циклооксигеназы-1 и 2, что препятствует превращению арахидоновой кислоты в простагландины в очаге воспаления. Это уменьшает воспалительную реакцию и возникающее при этом поражение тканей, а также снижает действие простагландинов на болевые рецепторы. Ибупрофен также применяется при состояниях, связанных с воспалением, которые сопровождаются усилением синтеза простагландинов. По литературным данным (Овсепян, 2018; Navrozidou *et al.*, 2019), применение ибупрофена для терапии лихорадочной реакции продолжает расти, поскольку считается, что он снижает температуру тела на более длительный интервал времени.

Количество обнаруживаемого ибупрофена в сточных водах очистных сооружений и естественных водоемах растет день ото дня из-за возросшего уровня потребления лекарственного препарата населением. Это может оказывать опасное воздействие на окружающую среду из-за его биологически активной природы. Загрязнение ибупрофеном становится повсеместным для водоемов, потому что он не может быть эффективно удалён обычными методами очистки воды. В последние годы потребление ибупрофена увеличивается во многих странах Европейского союза. Терапевтические дозы ибупрофена составляют от 600 до 1200 мг/день. Пероральная доза ибупрофена в полном объёме (~99%) быстро образует связь с альбумином плазмы крови, и почти 15% его выводится из организма человека в виде неизменной молекулы (конъюгированной с глюкуронидом и тиолом), а также его метаболитов, таких как карбоксиибупрофен, гидроксиибупрофен и карбоксигидратроповая кислота. Конъюгаты далее гидролизуются в окружающей среде. В то время как в сточных водах содержатся такие метаболиты, как 4-изобутирикбензальдегид, 1-(4-

изобутилфенил)-1-этанол, 2-[4-(1-гидроксиизобутил)фенил]пропионовая кислота, 4-этилфенол, 4-этилбензальдегид и 1-этил-4-(1-гидрокси)изобутилбензол. В настоящее время в разных частях мира проводятся исследования по разработке методов детекции загрязнения окружающей среды ибупрофеном, с применением технологий, основанных на биосенсорах, включая ферментативные биосенсоры, микробные биосенсоры и иммуносенсоры (Marchlewicz *et al.*, 2015; Murdoch, Hay, 2015; Chopra, Kumar, 2020).

Глобальный годовой объем производства ибупрофена достигает 20000 тонн. Согласно недавнему исследованию рынка лекарственных препаратов РФ, «Нурофен», действующее вещество которого – ибупрофен, является самым продаваемым торговым наименованием с долей продаж 0,8%. Далее следуют препараты «Кагоцел» и «Детралекс» (по 0,7%), «Конкор», «Кардиомагнил», «Эссенциале», «Ингавирин», «Актовегин», «Мирамистин» и «Мексидол» (по 0,6%) (Улумбекова, Калашникова, 2019; Ogunwole, Saliu, 2020).

Благодаря широкому распространению применения ибупрофена в тандеме с фармакокинетикой препарата (период полувыведения, метаболизм, экскреция) его содержание в экосистеме вырастает до измеримых уровней. В обзоре A.G. Ogunwole и J.K. Saliu (2020) приведены масштабные данные о случаях детектирования ибупрофена в окружающей среде по всему миру: в сточных водах от 37,99 мкг/л в Нигерии, до 45 мкг/л в Канаде, 703–1673 мкг/л в Пакистане, 221 мкг/л в Южной Африке и 5,78 мкг/л в Бельгии. В поверхностных водах вблизи выбросов стоков из сточных вод со средней концентрацией 0,02–79,45 мкг/л (Нигерия), и в диапазоне 0,0002–5,04 мкг/л в Бразилии, Канаде, Китае, Германии, Италии, Швеции, Великобритании и США. В поверхностных водах содержание ибупрофена зарегистрировано в диапазоне средней концентрации 0,98–67 мкг/л в Канаде и Греции, 0,98 мкг/л (Канада), 1,0–67 мкг/л (Греция), <15–414 мкг/л (Корея), 5,0–280 мкг/л (Тайвань), ND–8,0 мкг/л (Франция) и ND–1417 мкг/л (Китай). Показатели средней концентрации ибупрофена, обнаруженного в подземных водах Европы, составляют 3,0 нг/л, с максимальной концентрацией до 395,0 нг/л. В почве Пакистана обнаруженные концентрации ибупрофена

колебались в пределах 321,0–61,0 мкг/кг или 0,213 мкг/л в почвах Испании, орошаемых сточными водами и содержащих фармацевтические ингредиенты (Chopra, Kumar, 2020) (Таблица 1).

Таблица 1 – Обнаружение ибупрофена в различных типах образцов

Источник	Место обнаружения и концентрация	Литературный источник
Сточные воды	Канада (45 мкг/л)	Guerra <i>et al.</i> , 2014
	Пакистан (703–1 673 мкг/л)	Vergeynst <i>et al.</i> , 2015
	Южная Африка (1,38 мкг/л)	Ashfaq <i>et al.</i> , 2017
	Бельгия (5,78 мкг/л)	Matongo <i>et al.</i> , 2015
Ил	Южная Африка (0,009 мкг/кг)	Matongo <i>et al.</i> , 2015
	Пакистан (2 053–6 064 мкг/кг)	Ashfaq <i>et al.</i> , 2017
Водные очистные сооружения	Греция, Швеция, Швейцария, Великобритания, Босния и Герцеговина, Хорватия, Сербия, Китай и Корея (0,004–603 мкг/л)	Luo <i>et al.</i> , 2014
Почва и воды ирригационной системы	Пакистан (321–610 мкг/кг)	Ashfaq <i>et al.</i> , 2017
Воды ирригационной системы	Испания (0,213 мкг/л)	Vazquez-Roig <i>et al.</i> , 2012
Поверхностные воды	Канада (0,98 мкг/л)	Almeida <i>et al.</i> , 2013
	Греция (1,0–67 мкг/л)	Luo <i>et al.</i> , 2014
	Корея (<15–414 мкг/л)	
	Тайвань (5,0–280 мкг/л)	
	Франция (8,0 мкг/л)	
	Китай (1 417 мкг/л)	
Подземные воды	Европа (3–395 нг/л)	Luo <i>et al.</i> , 2014

Фармацевтические продукты, как правило, разрабатываются таким образом, чтобы они проходили через биологические мембраны, и поэтому скорость поглощения и внутренние концентрации являются важнейшими показателями. Для того чтобы полностью понять потенциал фармацевтических препаратов в контексте причинения вреда водной экосистеме, важно оценить более широкое распространение биодоступной фракции в биоте (беспозвоночные, рыбы, растения, водоросли). Зачастую в качестве модельного объекта исследований экотоксичности используют рыбу в связи с ее высоким рангом в водной пищевой сети. Это позволяет обеспечить более широкое понимание общего состояния

окружающей среды, поскольку эта обширная группа водных позвоночных животных способна аккумулировать загрязняющие вещества с низких трофических уровней. Показано, что среди НПВС ибупрофен, диклофенак и напроксен обладают наибольшей способностью накапливаться в органах и тканях рыб разных видов (Ogunwole, Saliu, 2020; Weisbrod *et al.*, 2007).

Фармацевтические микрозагрязнители и ибупрофен в частности оказывают негативное влияние на гидробионты на всех этапах их жизненного цикла. Кроме того, наличие ибупрофена в сточных водах может вызвать эффект генотоксичности в условиях острого и субхронического воздействия, а также образование свободных радикалов и окислительный стресс в различных водных организмах. Исследование влияния ибупрофена на микроводоросли *Scenedesmus rubescens* выявило негативные ультраструктурные и морфологические изменения клеток. Среди других отрицательных последствий воздействия ибупрофена документированы также снижение хлорофилла и повышение суммарного содержания каротиноидов в клетках (Navrozidou *et al.*, 2019).

Исследование сезонных колебаний концентрации ибупрофена в донных отложениях, биоте и воде рек Оуэна (Owena) и Огбесе (Ogbese) в Нигерии показало, что средняя концентрация ибупрофена в образцах составляла от 1,75 до 2,75 мкг/г в донных отложениях, 0,01–15,00 мкг/г у рыб и 0,00002–0,005 мкг/мл в воде. Содержание ибупрофена в осадке и воде было значительно повышено в сухой сезон по сравнению с сезоном дождей, в то время как для показателей содержания ибупрофена в биоте тенденция оказалась противоположной. По расчетам авторов публикации, коэффициенты риска для пресноводных организмов в целом, за исключением рыб (10,00–1,67), были ниже 1 (0,08–0,83), что подразумевает отсутствие рисков для бактерий, водорослей и дафний *Daphnia magna*. Высокие значения коэффициента риска загрязнения ибупрофеном для рыбы, обитающей в обеих реках, объясняются наличием значительного количества целевых ортологов лекарственного препарата у рыб. В исследовании L. Gunnarsson с соавт. (2019) установлено, что 90% всех мишеней лекарственных препаратов человека имели ортологи у рыбок Данио (*Danio rerio*), у 64% мишеней

были ортологи у водяных блох (*Daphnia pulex*) и 34% у зеленых водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Gunnarsson *et al.*, 2019; Ogunwole, 2020).

В обзорной статье S. Chopra и D. Kumar (2020) упоминается токсическое воздействие ибупрофена на следующие модельные организмы: *Asterias rubens*, *Psammechinus miliaris*, *Arenicola marina*, *Allivibrio fischeri*, *Navicula* sp., *Chlorella vulgaris*, *Acutodesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis limnetica*, *Daphnia magna*, *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Neocaridina denticulata*, *Scenedesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Danio rerio*, *Rutilus rutilus*, *Pimephales notatus*, *Daphnia longispina*, *Menidia beryllina*, *Oreochromis niloticus* и *Mytilus galloprovincialis*. Ибупрофен уменьшает нерест рыбы и одновременно увеличивает количество икры у *Oryzias latipes* (Японская медака). Ибупрофен в низкой (250 нг/л) концентрации вызывает эндокринные нарушения у *Mytilus galloprovincialis* (Черноморская мидия). Более того, его присутствие приводит к индукции окислительного стресса. Ибупрофен также увеличивает активность каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы II фазы и глутатионредуктазы после воздействия (в течение 7 сут). Также у моллюсков наблюдалось повреждение мембран в пищеварительной железе и повышение уровня липидного эпексидирования.

У менидии (*Menidia beryllina*) в концентрации 11,5 мкг/л ибупрофен способствовал снижению экспрессии многих генов, участвующих в развитии скелета, аэробном дыхании и иммунной функции. В высокой концентрации (1,15 мг/л) была обнаружена повышенная экспрессия регуляторных генов в пути метаболизма арахидоновой кислоты и нескольких иммунных генов, участвующих в воспалительной реакции. Кроме того, наблюдалась дифференциальная экспрессия генов, участвующих в реакциях на окислительный стресс, и снижение экспрессии генов, участвующих в осморегуляции (Ghonzalez-Rey, Bebianno 2012; Jeffries *et al.*, 2015).

Острая токсичность фармацевтических загрязнителей рассчитывается по вышеупомянутому показателю EC_{50} (10 и 100 мг/л); цито- и генотоксические эффекты анализируются при длительном воздействии анальгетиков, которое в

основном связано с дисбалансом окислительного статуса клеток. Кроме того, наблюдаются дополнительные последствия, такие как изменение в скорости роста, поведении, размножении и прочие искажения на биохимическом уровне. Известно, что конъюгация ибупрофена и диацилглицерина (ибупрофен-DG) ответственна за ингибирование клеточного деления и не дизъюнкции хромосом к нескольким парам. В результате проведенного исследования хронической токсичности ибупрофена по гормональному балансу в условиях *in vitro* с использованием клеточной линии H295R на пресноводных рыбах *Oryzias latipes*, планктонных ракообразных *Moina macroscopa* и дафниях *Daphnia magna* установлено, что в присутствии ибупрофена увеличивалась выработка 17- β -эстрадиола, снижался синтез тестостерона, а также активность ароматазы (Lange et al., 2006; Kayani et al., 2009; Han, 2010; Parolini, Benelli, 2012).

После рассмотрения вышеприведенных фактов становятся понятными необходимость и целесообразность разработки эффективных методов и технологий детоксикации и удаления ибупрофена из окружающей среды.

1.4. Традиционные методы утилизации фармполлютантов

Методы очистки сточных вод делятся на механические, химические, физико-химические, биологические и комбинированные. Применение того или иного метода в каждом конкретном случае определяется характером загрязнения, степенью вредности примесей, эффективностью очистки и другими показателями. Механическая очистка – грубая очистка, которая заключается главным образом в очистке вод от взвешенных веществ, не растворяющихся в воде. Многие лекарства – это растворимые в воде химические препараты, и для них применимы химические, физико-химические, некоторые биологические и комбинированные методы. Химическую очистку применяют в тех случаях, когда выделение загрязнений, в том числе лекарств, возможно только в результате химической реакции между примесью (лекарством) и реагентом с образованием новых веществ, которые легко удалить из воды. Для такой очистки используют реакции окисления или восстановления, нейтрализации, перевод вредных примесей в

безвредные, обезвреживание методом озонирования, хлорирования и др. Этот метод, наряду с физико-химическими и комбинированными, находит наиболее широкое применение в практике очистки вод от лекарственных препаратов (Долина, Савина, 2018).

Следует отметить, что, несмотря на разнообразие методов очистки, большинство лекарственных средств не удаляются из сточных и бытовых вод вследствие низкой эффективности очистных сооружений. Это обуславливает актуальность поиска и разработки новых материалов и технологий очистки природных и сточных вод (Иванец с соавт., 2019).

Эффективное удаление низких концентраций ибупрофена и диклофенака из сточных вод должно происходить в масштабе времени от нескольких минут до нескольких дней из-за короткого времени удержания на очистных сооружениях. В настоящее время для удаления микрозагрязнителей разрабатываются высокоселективные и быстрые реакции, такие как процессы усовершенствованного окисления (Advanced Oxidation Process, AOP), в которых используются сочетания реакционноспособных окислителей, включая озонирование, фотокатализ и ультразвуковое окисление, или адсорбенты, такие как активированный углерод. AOP характеризуются производством чрезвычайно реактивных и неселективных частиц, таких как гидроксильные радикалы, которые способны разлагать устойчивые молекулы до возможных биоразлагаемых промежуточных соединений или полностью минерализовать до CO_2 , H_2O и неорганических ионов. Однако это также может привести к образованию потенциально вредных побочных продуктов, и такие технологии окисления характеризуются значительным экологическим воздействием из-за высокого потребления энергии. Кроме того, многие из этих систем находятся в стадии исследования и не применяются в широком масштабе, поскольку не хватает данных о задействованных механизмах, влиянии рабочих переменных, о кинетике реакции и проблемах конструкции реактора (Langenhoff *et al.*, 2013).

Большое внимание методам утилизации ибупрофена уделяется в обзорной статье S. Chopra и D. Kumar (2020). Авторы сравнивают эффективность

различных передовых технологий удаления фармацевтических субстанций из сточных вод, таких как адсорбция (порошкообразный активированный уголь, гранулированный активированный уголь и т.д.), коагуляция-флокуляция, усовершенствованные процессы окисления, биофильтрация (капельный фильтр, песочные фильтры, биологический фильтр с активированным углем и т.д.), обратный осмос, мембранные биореакторы, нанофильтрация, углеродные нанокomпозиты и магнитные наночастицы ((AC)/CoFe₂O₄).

Передовые химические процессы в основном направлены на очистку сточных вод. К ним относят озонирование, гамма-радиолиз, усовершенствованные процессы окисления (AOP), УФ/H₂O₂, реакцию Фентона и фентоноподобное окисление, O₃/УФ, окислительно-восстановительные реакции и ультразвук, систему с использованием электро-фентоновского процесса (Bai *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2009; Mendez-Arriaga *et al.*, 2010; Wang, Xu 2012;).

При озонировании озон используется для удаления ибупрофена посредством процесса окисления. Озон в основном зависит от сильной неселективной окислительной активности гидроксильных радикалов. В обзоре приводится исследование, в котором была получена вода сверхвысокой степени очистки со снижением концентрации ибупрофена от 160 до 1 мг/л через 20 мин при pH 9 и температуре 25°C путем озонирования. Окислительно-восстановительный потенциал озона выше, чем у кислорода и хлора, вследствие чего он обладает более высоким окислительным и бактерицидным действием. Следует отметить, что сегодня во многих странах Западной Европы использование обработки воды озоном или ультрафиолетовыми лучами практически полностью вытеснило способ очистки воды хлорированием. К озонированию относятся как процессы прямого окисления органических соединений или обеззараживания растворенным в воде озоном, так и окислительные процессы, протекающие при участии гидроксильных радикалов, образующихся в результате химических трансформаций солей. Именно последние процессы рассматривают в числе новых окислительных технологий. При этом, если стандартный восстановительный потенциал озона равен 2,07 В, то у

гидроксильных радикалов этот показатель достигает 2,80 В. Образование гидроксильных радикалов в результате трансформации озона в водной среде увеличивается в присутствии пероксида водорода, катализаторов, активированного угля, при совмещении озонирования с ультрафиолетовым облучением и ультразвуковой обработкой. В процессе озонирования при ультрафиолетовом облучении деградация загрязняющих веществ происходит в результате прямого фотолиза, прямого озонирования и взаимодействия с гидроксильными радикалами. Последние образуются при трансформации озона под воздействием УФ-облучения через промежуточное образование пероксида водорода. Преимущества процесса по отношению к традиционному озонированию выявлены в многочисленных исследованиях по деградации веществ с гормональной активностью, метилметакрилата, фталатов, фенантрена, нитробензола, фенольных соединений (фенолы, хлорофенолы, нитрофенолы, крезолы, ксиленолы, катехины). Во всех случаях достигается максимальная минерализация загрязняющих веществ, в том числе и лекарств (Долина, Савина, 2018; Desbiolles *et al.*, 2018; Chopra, Kumar, 2020).

Одним из популярных методов портативной дезинфекции воды является обработка при помощи ультрафиолетового излучения. Поскольку ультрафиолетовый свет разрушает связи химического вещества, присутствующего в водоемах, этот метод используется для удаления фармацевтических активных субстанций. Гамма-облучение является одним из АОР, который становится все более эффективной технологией для удаления фармполлютантов из сточных вод. Эффективность удаления ибупрофена снижалась с увеличением pH с 1,45 до 11,0, что указывает на включение гидрид-иона в радикальную реакцию. Применение технологии Фентона при pH 3 и температуре 30° С в течение 2 ч с использованием 1,2 мМ Fe²⁺, 0,32 мМ H₂O₂ для удаления 0,87 мМ ибупрофена проходило с эффективностью удаления >50%. При использовании процесса фото-Фентона при тех же условиях эффективность деградации достигала почти 100%, так как реакция Фентона ускоряется при

воздействии света, что повышает степень минерализации органических веществ и снижает эксплуатационные расходы (Chopra, Kumar, 2020).

Исследование российских ученых, направленное на изучение каталитических свойств наночастиц MgFe_2 в процессе окислительной деструкции ибупрофена, выявило влияние условий проведения каталитического процесса на эффективность разложения ибупрофена. Показано, что при содержании катализатора 0,5 г/л, концентрации H_2O_2 20,0 ммоль/л и pH 6,0 в течение 40 мин достигалось снижение концентрации ибупрофена с 10,0 мг/л до концентрации ниже предела обнаружения. При этом степень минерализации ибупрофена достигала 100% (Иванец с соавт., 2019).

Очистка воды кислородом – эффективный метод удаления вредных для здоровья человека химических соединений. Кислород – самый доступный экологический окислитель. Он подается в напорную водопроводную магистраль при помощи аэрационного эжектора или компрессора для аэрации воды. Очистка воды кислородом может быть двух видов: безнапорная аэрация и напорная аэрация.

Каталитическая деструкция органических соединений, устойчивых к химическому и биологическому разложению, в том числе и фармацевтических ингредиентов, является одним из наиболее перспективных методов их удаления. В связи с этим в течение последних двух десятилетий ведутся активные исследования по разработке и применению усовершенствованных процессов окисления (AOP), которые предполагают использование химически стабильных, нетоксичных и высокоактивных к широкому спектру органических загрязнителей каталитических систем на основе наноразмерных оксидов металлов. При этом значительным преимуществом AOP является возможность полной «минерализации» органических загрязнителей за счет генерирования сильных окислителей на основе кислородсодержащих реакционноспособных частиц, преимущественно гидроксил-радикала (OH) (Желовицкая и др., 2015).

При использовании AOP окисление ибупрофена инициируется высоко реакционноспособными гидроксильными радикалами. При этом образуются

следующие метаболиты: 4-изобутилфенол, гидратроповая кислота, 4-(1-карбоксиэтил)бензойная кислота, 4-этилбензальдегид, 2-[4-(1-гидрокси-2-метилпропил)фенил]пропановая кислота, 1-(4-изобутилфенил-1-этанол, 4-ацетилбензойная кислота кислотный 1-изобутил-4-винилбензол и 4-изобутилацетофенон. Однако эти метаболиты обладают большей токсичностью, чем ибупрофен (Корж с соавт., 2016; Долина, Савина, 2018; Иванец с соавт., 2019; Lucas *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2017; Chopra, Kumar, 2020).

Среди физических методов удаления ибупрофена одним из наиболее эффективных является адсорбция. Преимуществом метода является возможность поглощения веществ многокомпонентных смесей, а также высокая степень очистки, особенно слабо концентрированных сточных вод. В качестве сорбентов применяют различные искусственные и природные пористые материалы (активированный уголь, цеолиты, зола, торф и др.). Эффективность адсорбционной очистки достигает 80–95% (Корж с соавт., 2016; Долина, Савина, 2018).

Активированный уголь – традиционный адсорбент, широко используемый для очистки воды, он может также удалять парциальную концентрацию ибупрофена из сточных вод. Активированный уголь подразделяют на порошкообразный активированный уголь (РАС) и гранулированный активированный уголь (GAC). Концентрация РАС 5 г/л и 10 мг/л использовалась для удаления ибупрофена в концентрации 100 нг/л и 40 мг/л из проб поверхностной и модельной (экспериментальной) воды соответственно. Использование графена исследовано в работе L. Rizzo с соавт. (2015) для удаления 10 мг/л ибупрофена из синтетической воды с эффективностью около 95%. Y. Wang с соавт. (2016) сообщили об удалении ибупрофена с помощью метода нескольких нанотрубок из смеси или различных лекарств из речной воды. Перспективным адсорбентом является гидрокар (углеобразный продукт), также известный как гидротермически карбонизированный материал, получаемый путем преобразования биомассы с помощью термохимического процесса. Существуют данные об удалении фармацевтических активных субстанций с использованием

углеводородов, полученных из сахарозы или углеродных продуктов, таких как апельсиновая корка и гранулы пробки. Нанопотокаталитический реактор для деструкции является одной из перспективных технологий разложения загрязняющих веществ в реальном времени (Chopra, Kumar, 2020).

1.5. Биодеструкция ибупрофена

Во многих токсикологических исследованиях показано, что промежуточные продукты, образующиеся в ходе предварительной химической обработки сточных вод, обладают наибольшей токсичностью по сравнению с исходным соединением. В качестве альтернативы эффективного удаления ибупрофена из водоемов рассматривается биологическая деградация ибупрофена. Преимущество использования биодеструкции загрязнителей перед традиционными методами – это экономичность и естественность процесса, а также широта диапазона оптимальных условий. Микроорганизмы используют ибупрофен в качестве источника питания. Для биоремедиации фармацевтических загрязнителей предложены различные методы (Таблица 2).

Таблица 2 – Селективные биологические методы деструкции ибупрофена

Метод	Техники	Характерные черты
Деградация <i>in situ</i>	Биобарботирование Биовентиляция Биоаугментация	Биодеградирующие способности местной микрофлоры в присутствии ибупрофена в параметрах окружающей среды Биоразлагаемость загрязняющих веществ и растворимость ибупрофена с геологическими факторами
Деградация <i>ex situ</i>	Землеотвалы (твердофазная система очистки) Компостирование (анаэробное превращение твердых органических отходов в гумусоподобный материал) Биопили	Поверхностное нанесение, аэробный процесс, нанесение на естественные почвы с последующим поливом и обработкой почвы Альтернатива захоронению/сжиганию Поверхностное применение, сельскохозяйственные отходы

Окончание таблицы 2

Биореакторы	Шламовые реакторы Водные реакторы	Биоаугментация с изменением токсичных концентраций загрязняющих веществ
Микрофльтрация	Микрофльтрационные мембраны, используемые при постоянном давлении	Очистка сточных вод Восстановление и повторное использование более 90% сточных вод

Примечание. По данным Chopra, Kumar, 2020.

Несмотря на то, что сегодня биологическая очистка считается наиболее эффективным методом нейтрализации микрозагрязнителей, следует отметить его существенные недостатки, среди которых: (1) возможное влияние технологии биоремедиации на естественную микросреду, (2) некоторые экотоксиканты имеют более низкую степень восприимчивости во время биоразложения, (3) невозможность удаления генетически модифицированных микроорганизмов после биоразложения поллютантов, (4) промежуточные продукты, образующиеся во время биодеструкции, имеют большее токсическое воздействие на систему, чем исходные соединения (Chopra, Kumar, 2020).

По данным литературы, на сегодня известны микроорганизмы, способные использовать ибупрофен в качестве единственного источника углерода и энергии. Однако метаболический путь деградации и ферменты, участвующие в деградации ибупрофена, пока еще мало изучены. В обзоре J. Zur с соавт. (2018) описаны исследования, касающиеся методов определения токсичности и биodeградации парацетамола и ибупрофена, а также результаты применения подходов, основанных на биоинформатике, для понимания генетических основ микроорганизмов, участвующих в биodeградации ксенобиотиков. Авторами обосновано, что вопросы обнаружения ибупрофена в окружающей среде и оценки его возможных токсических эффектов, а также изучения генетического механизма процесса микробной деградации требуют дальнейшего детального изучения (Quero-Pastor *et al.*, 2014; Zur *et al.*, 2018).

Анализируя возможности повышения эффективности деструкции ибупрофена посредством биodeградации, В. Sharma с соавт. (2019) выделили

моменты, требующие особого внимания от исследователя: (1) влияние концентрации ибупрофена на эффективность биодеструкции; (2) роль микробного сообщества в биodeградации ибупрофена, ибо до сих пор неясно, какое микробное сообщество разлагает ибупрофен в системах активного ила; (3) продукты метаболизма, образующиеся при разложении ибупрофена, могут оказаться более токсичными, чем исходное соединение, и должны быть детектированы.

Исследования по биодеструкции ибупрофена условно можно разделить на 2 подхода: с использованием монокультуры единичного изолята и с применением консорциума микроорганизмов.

1.5.1. Биодеструкция ибупрофена с использованием монокультуры микроорганизмов

Биodeградация ибупрофена зависит от способности микроорганизмов продуцировать специфический фермент, разлагающий ибупрофен (Chopra, Kumar, 2020). Впервые возможность полного бактериального разложения ибупрофена (1000 мг/л) в течение 120 ч в условиях периодического культивирования с использованием штамма актиномицетов *Nocardia* sp. NRRL 5646 упоминается в публикации (Chen, Rosazza, 1994). В качестве метаболитов идентифицированы ибупрофенол и ибупрофенол-ацетат. Сегодня известны микроорганизмы, обладающие способностью разлагать ибупрофен с образованием гидроксиибупрофена и карбоксиибупрофена (Hanlon *et al.*, 1994; Zwiener *et al.*, 2002; Quintana *et al.*, 2005; Marco-Urea *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2018).

Использование альфапротеобактериального штамма *Sphingomonas* sp. Ibu-2 приводило к полному разложению ибупрофена (500 мг/л) в течение 80 ч (Murdoch, Hay, 2005). Биодеструкция протекала посредством 2,3-диоксигенирования экстрадиольного кольца и дегидрирования до катехина и сопровождалась образованием изобутилкатехола, 5-формил-2-гидрокси-7-метилокта-2,4-диеновой кислоты, 2-гидрокси-5-изобутилгекса-2,4-диеновой кислоты. В последующих экспериментах на предмет биодеструктирующей

активности ибупрофена (500 мг/л) авторами была изучена бетапротееобактерии *Variovorax* sp. Ibu-1 (Murdoch, Hay, 2015). Данный штамм практически полностью (90%) метаболизировал ибупрофен в качестве единственного источника углерода в течение 150 ч с образованием 3-гидроксиибупрофена. Также в данной работе исследователи представили кластер из 5 генов (*ipf* ABCDEF), участвующих в минерализации ибупрофена. Гены *ipfA* и *ipfB* кодируют две субъединицы оксигеназ, в то время как ген *ipfD* кодирует фермент для удаления/добавления ацильных групп ацил-КоА-синтетазы. Ген *ipfF* кодирует фермент коэнзим-А-лигазы, функция гена *ipfE* не была детально описана. Фермент удаляет цепь пропионовой кислоты, и дальнейшая реакция диоксигенирования приводит к образованию изобутилокатехола, который, в свою очередь, подвергается оксигенолитическому расщеплению (Chopra, Kumar, 2020).

У изолированных из активного ила штаммов протеобактерий *Sphingobium* sp. IbD51 и *Sphingopyxis* sp. TrD1 была выявлена способность полностью минерализовать ибупрофен (4,3 мг/л) в среде R2A за 6 ч (Zhou *et al.*, 2013). Способность к полному разложению ибупрофена (5 мг/л, 20 мг/л) в условиях метаболизма и кометаболизма (в присутствии 1 мг/л глюкозы) обнаружена у бактериального штамма *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) (Marchlewicz *et al.*, 201). В дальнейшем авторы изучали биodeградирующий потенциал данного штамма в отношении ибупрофена (5 мг/л, 10 мг/л) в присутствии разных косубстратов (глюкоза, фенол, бензоат), хлорфенолов (2-хлорфенол, 4-хлорфенол) и тяжелых металлов (медь, кадмий, хром, кобальт). Полная биодеструкция ибупрофена (10 мг/л) наблюдалась на 36–85 ч, однако в присутствии 4-хлорфенола убыль вещества составляла только 20%. Токсикологические исследования показали высокий уровень устойчивости штамма *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) к ибупрофену: ЕС₅₀ составлял 809,3 мг/л (Marchlewicz *et al.*, 2017). Анализ продуктов разложения ибупрофена выявил наличие гидроксипроизводных и хинонов, так как в процессе разложения происходит гидроксилирование как ароматического кольца, так и алифатической цепи (Chopra, Kumar, 2020).

[illegible]

Рисунок 2 – Предполагаемые пути биodeградации ибупрофена (цит. по Chorgha, Kumar, 2020)

Основные промежуточные метаболиты, образующиеся в процессе биотрансформации ибупрофена, гидроксированы из изопропильной цепи ибупрофена в 1- и 2-гидроксиибупрофен с образованием 1,2-дигидроксиибупрофена в качестве финального метаболита (Zwiener *et al.*, 2002; Quintana *et al.*, 2005). Инициирование процесса биодеструкции начинается с образования 1,4-гидрохинона и 2-гидроксихинона. 1,4-гидрохинон является продуктом активности ацил-КоА-синтазы и превращается в 2-гидрокси-1,4-хинол под воздействием гидрохинона монооксигеназы. Более того, активность гидроксихинол-1,2-диоксигеназы после индукции ибупрофеном наблюдалась только из-за присутствия глюкозы, фермент не проявлял активности. Гидроксихинол 1,2-диоксигеназы связывает 2-гидрокси-1,4-хинол и отвечает за *орто*-расщепление этого соединения до 3-гидрокси-*цис,цис*-муконовой кислоты. В. Sharma с соавт. (2019) в экспериментах по бактериальной деструкции ибупрофена с использованием *Micrococcus yunnanensis* идентифицировали производные реакций гидроксирования, деметилирования и дегидрирования и определили фермент монооксигеназу, ответственную за биodeградацию ибупрофена.

Исследование группы немецких ученых Е.М. Balciunas соавт. (2020) по изучению биodeградации ибупрофена в сконструированном в лабораторных условиях модельном водно-болотном угодье с использованием растительных систем (*Juncus effusus*, *Phalaris arundinacea*) выявило наибольшую скорость удаления ибупрофена при инокуляции гравия недавно выделенной альфапротеобактерией-биодеструктором ибупрофена *Sphingobium yanoikuyae*, формирующей биопленку. Результатом биоаугментации стало немедленное удаление 70% от начальной концентрации ибупрофена (50 мг/л), а также зарегистрированная скорость биodeградации на 5% выше аналогичного параметра для образца без предварительной бактериальной инокуляции в период наибольшей активности.

В работе Е. Marco-Urrea с соавт. (2010) показано, что грибы, принадлежащие к *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma Lucidum* и

Phanerochaete chrysosporium, также могут использовать ибупрофен в качестве единственного источника питания. A.I. Rodarte-Morales с соавт. (2012) выявили способность гриба белой гнили *Phanerochaete chrysosporium* к полной биодеструкции ибупрофена и диклофенака в условиях биореактора периодического действия.

1.5.2. Биодеструкция ибупрофена активным илом

Многие исследования по биоконверсии ибупрофена проведены с использованием микробных консорциумов. Применение активного ила описано в работах (Tran *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2013; Girardi *et al.*, 2013; Langenhoff *et al.*, 2013). Эффективность биодеструкции ибупрофена варьировала в широком диапазоне – от 100% в течение 2–8 ч до 68% на 28 сут экспериментов (Almeida *et al.*, 2013; Girardi *et al.*, 2013). Воздействие ибупрофена на микробный консорциум активного ила сопровождался доминированием представителей филума *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* и *Enterobacteriales*) (Davids *et al.*, 2017). При использовании ибупрофена в концентрации 50 мг/л наблюдалось ингибирование активности бактерий. В работе С. Jiang с соавт. (2017) сообщается об увеличении доли бактерий *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* в составе микробиоты активного ила при применении смеси ибупрофена с диклофенаком или напроксеном в сравнительно низкой концентрации (5 мкг/л). Добавление пяти фармацевтических препаратов (50 мкг/л каждый), в том числе ибупрофена, привело к уменьшению доли представителей *Bacteroidetes* в консорциуме активного ила системы очистки сточных вод (Wang *et al.*, 2016).

Бактериальное сообщество речной воды (*Comamonas aquatic* и *Bacillus* sp.) полностью разрушало ибупрофен (100 мг/л) в течение 33 ч (Fortunato *et al.*, 2016). В исследовании Е. Koumaki с соавт. (2017) показано, что оптимальным условием для декомпозиции ибупрофена речным биоконсорциумом являются аэробные бактерии, в то время как в отсутствии кислорода биодеструкция экотоксиканта не наблюдалась. При использовании бактерий морской воды убыль ибупрофена (1 мкг/л) на 28 сут составляла лишь 28% (Baena-Nogueras *et al.*, 2017).

Ибупрофен эффективно разлагается в биореакторах разного операционного действия. В последовательном биореакторе ибупрофен (20 мкг/л) полностью разлагался в течение 24 ч (Kruglova *et al.*, 2014), в условиях мембранного биореактора – 6 ч. Наиболее эффективно процесс биоконверсии протекал при нейтральных значениях pH, в то время как в кислых условиях происходила сорбция вещества на активный ил (Bo *et al.*, 2009).

1.6. Родококки как перспективные биодеструкторы фармполлютантов

Экстремотолерантные бактерии рода *Rhodococcus* Zopf 1891 (домен «Бактерии», тип *Actinomycetota*, класс *Actinomycetia*, порядок *Mycobacteriales*, семейство *Nocardiaceae*; <https://lpsn.dsmz.de/genus/rhodococcus>) признаны одной из наиболее биотехнологически перспективных групп микроорганизмов. Актиномицеты благодаря характерному комплексу стратегий выживания отличаются высокой экологической пластичностью и устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды, широкой катаболической гибкостью и наличием специфических ферментов. Актиномицеты являются активными биодеструкторами сложных труднодеградируемых органических соединений различной структуры (алифатических и ароматических углеводов, галогенированных и азотсодержащих соединений, гетероциклических веществ и др.). При этом присутствие легко деградируемых источников углерода не способствует снижению скорости в процессе детоксикации трудноразлагаемых соединений ввиду отсутствия у актиномицетов катаболитной репрессии (Ившина с соавт., 2021; de Carvalho *et al.*, 2005; Ivshina *et al.*, 2012, 2015).

В настоящее время насчитывается 56 валидных видов родококков. Стремительное совершенствование инструментальной базы, возможность проведения полногеномного секвенирования, сопровождаемого биоинформатическим анализом, широкого использования MALDI-TOF масс-спектрометрических методов обусловило интенсивное развитие исследований по идентификации и реклассификации актиномицетов: только за последние девять

лет описано 22 новых вида *Rhodococcus*. Совсем недавно описаны еще два новых вида: *R. daqingensis*, представители которого выделены из нефтезагрязненной почвы в Китае, и *R. subtropicus* – из природной пещеры в Южной Корее (Lee *et al.*, 2019; Sangal *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

Краткая характеристика актиномицетов рода *Rhodococcus*: аэробные, Грам-положительные, неподвижные, не образующие спор бактерии с трехстадийным морфогенетическим циклом развития (кокки/короткие палочки – палочки/ветвящиеся нитевидные клетки/гифы – кокки/короткие палочки). Колонии могут быть бугорчатыми, шероховатыми (rough, R-формы), гладкими (smooth, S-формы) или слизистыми (mucoid, M-формы). Среди родококков распространены пигментированные формы, которые дают палевые, кремовые, желтые, оранжевые, коралловые, розовые и красные колонии, хотя встречаются и бесцветные варианты. Характеризуются хемоорганотрофным и окислительным типом обмена веществ. Большинство выделенных штаммов хорошо растут на стандартных средах при температуре 15–40°C и используют широкий спектр органических соединений в качестве единственного источника углерода для энергии и роста (Ившина и др., 1987, 2021).

Родококки встречаются повсеместно в водных и наземных экосистемах, в том числе в Арктике и Антарктике. Они выделены из чистых и техногенно загрязненных почв и поверхностных вод, бытовых и промышленных сточных вод, грунтовых вод, морских донных осадков, ризосферы растений, навоза травоядных животных, из кровососущих членистоногих и даже с космической станции “МИР”. Основная экологическая роль родококков заключается в деконтаминации экосистем от стабильных органических веществ и ксенобиотиков. Причина глобального характера распространения родококков лежит в исключительной метаболической гибкости данной группы организмов, отражающейся в характерных особенностях их генома: большом размере геномов, содержащих информацию о многочисленных катаболических путях различных химических соединений; значительная степень избыточности генома, обеспечивающая функциональную устойчивость; наличие кольцевых и линейных

плазмид, представляющих собой дополнительный пул ДНК. Генетическая избыточность рассматривается в качестве основы универсальности катаболической активности родококков, их функциональной устойчивости и способности к адаптации в экстремальных условиях окружающей среды (Di Canito *et al.*, 2018; Cappelletti *et al.*, 2019).

Высокая катаболическая активность родококков в отношении ксенобиотиков широкого спектра обеспечивается функционированием оксигеназных ферментных систем. Большая часть генов оксигеназ локализована на хромосоме, что свидетельствует об их фундаментальной роли в физиологии родококков.

У *Rhodococcus* spp. катаболизм ароматических соединений организован по модульному принципу, который включает периферический, центральный и основной пути. В периферических путях сложные ароматические соединения (например, бифенил и фталат) превращаются в отдельные промежуточные соединения (например, катехол и фенилацетат), которые, в свою очередь, используются в центральных ароматических путях для получения ряда общих промежуточных соединений (например, метаболитов цикла трикарбоновых кислот), которые являются субстратами для основных путей. На настоящий момент у родококков насчитывается как минимум 26 периферических путей и 8 центральных метаболических путей. Отсутствие катаболитной репрессии у родококков обуславливает их перманентную вовлеченность в процессы окисления сложных органических соединений и постоянное функционирование их периферической катаболитной системы (Larkin *et al.*, 2010).

С использованием родококков изучались процессы биодеструкции антибиотиков сульфаметоксазола (3,6 мг/л), сульфаметизола (9,5 мг/л), антиэпилептика карбамазепина и β -блокатора метопролола (107,8 мг/л) (Gauthier *et al.*, 2010; Larcher, Yargeau, 2011; Carvalho *et al.*, 2016), оксифлоксацина (40–250 мкг/л) (Maia *et al.*, 2018), гипополипидемического препарата клофибриновой кислоты (Evangelista *et al.*, 2008), противозэпилептика карбамазепина (Gauthier *et al.*, 2010), стероидных гормонов тестостерона, 17β -эстрадиола, 17α -

этинилэстрадиола (Yoshimoto *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2019). Штамм *R. wratislaviensis* 9 полностью конвертировал фенантрен, а также частично разрушал пирен и бензпирен (Subashchandrabose *et al.*, 2019), штамм *R. opacus* DSM 43205 деградировал нафталин, фенантрен, флуорантен на 80–90% (Goswami *et al.*, 2018).

На базе Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCC 285, <http://www.iegmccl.ru>) проведены исследования по биodeградации широко используемых в медицинской практике в России и за рубежом фармпрепаратов и наиболее часто детектируемых в экосистемах, а именно спазмолитиков (дротаверин, производное изохинолина) (Ivshina *et al.*, 2012, 2015), анальгетиков (парацетамол, производное *p*-аминофена, и кодеина, производное изохинолина) (Ivshina *et al.*, 2006; Plotnikov *et al.*, 2017). Штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 77, ИЭГМ 767 трансформировали парацетамол с образованием пирокатехина, гидрохинона и бензохинона. Максимальная убыль парацетамола в виде субстанции составляла 86% на 20 сут, а полная биodeградация парацетамола в таблетированной форме достигалась через 5 сут (Ivshina *et al.*, 2006). Использование иммобилизованных родококков в криогеле на основе поливинилового спирта позволило сократить продолжительность данного процесса до 3 сут. С использованием свободных, иммобилизованных и dormantных клеток родококков наблюдалась полная биodeструкция дротаверина (20 мг/л) с образованием простых ароматических соединений – производных протокатеховой кислоты, не обладающих выраженной токсичностью по сравнению с исходным соединением (Ivshina *et al.*, 2012, 2015). Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 трансформировал кодеин до кодеинона, гидрокодона, 14-гидроксикодинона (Плотников с соавт., 2015; Plotnikov *et al.*, 2017).

Подводя итог вышесказанному, представители рода *Rhodococcus* являются одними из наиболее активных природных агентов, характеризующиеся высокой деструктирующей и трансформирующей активностью в отношении фармацевтических соединений. Это послужило причиной значительного роста числа исследований по биоконверсии фармпрепаратов с использованием родококков разных видов. При этом следует отметить, что большая часть

исследований направлена на изучение процесса биodeградации экотоксиканта в контексте очистки сточных вод, тогда как вопросу о влиянии фармпollютантов на микроорганизмы в открытых экосистемах уделяется недостаточно внимания. Кроме того, малочисленны сведения о метаболитах, возникающих в процессе биотрансформации фармацевтических веществ, и степени токсичности и опасности их для открытых экосистем. Изучение данных вопросов расширит современное научное представление о влиянии, оказываемом фармпollютантами на окружающую среду, и создаст платформу для разработки новых технологий доочистки сточных вод, а также обезвреживания и утилизации фармацевтических отходов.

Экспериментальная часть

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Рабочая коллекция

В работе использовали 190 бактериальных штаммов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, УНУ/ЦКП 480868/73559, <http://www.iegmcoll.ru>), принадлежащих к родам *Agromyces* (1 штамм), *Brachybacterium* (2 штамма), *Clavibacter* (1 штамм), *Corynebacterium* (1 штамм), *Curtobacterium* (1 штамм), *Dietzia* (15 штаммов), *Gordonia* (7 штаммов), *Micrococcus* (2 штамма), *Microbacterium* (1 штамм), *Nocardioideis* (2 штамма), *Rhodococcus* (156 штаммов) и *Williamsia* (1 штамм) (Таблица 3). Выбор конкретных штаммов обоснован географией и источником их выделения, а также известной каталитической активностью коллекционных культур в отношении гидрофобных органических соединений.

Таблица 3 – Коллекционные штаммы актиномицетов, использованные в работе

Вид (кол-во штаммов)	Характеристика штаммов	Источник выделения, география
<i>Agromyces mediolanus</i> (1)	Растет на богатых питательных средах	Прессованные дрожжи
<i>Brachybacterium faecium</i> (1)	Использует мочевины в качестве источника энергии	Глубокая подстилка птичника, Россия
<i>B. paraconglomeratum</i> (1)	Использует мочевую кислоту в качестве источника энергии	Глубокая подстилка птичника, Россия
<i>Clavibacter michiganensis</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Почва, Венгрия
<i>Corynebacterium variabile</i> (1)	Растет на богатых питательных средах	Сыр, Россия
<i>Curtobacterium citreum</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Почва, Китай

Продолжение таблицы 3

<i>Dietzia maris</i> (15)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Вода, почва; Пермский край, Тюменская область, Россия; Украина.
<i>Gordonia rubripertincta</i> (3)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Вода, Украина
<i>G. terrae</i> (4)	Используют <i>n</i> -алканы, спирты, арены в качестве источника углерода	Почва, Украина
<i>Microbacterium imperiale</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве единственного источника углерода	Кишечник моли
<i>Micrococcus luteus</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве единственного источника углерода	Почва, ЯмАО, Россия
<i>M. lylae</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве единственного источника углерода	Кожа человека
<i>Nocardioides albus</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве единственного источника углерода	Почва, Венгрия
<i>N. jensenii</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве единственного источника углерода	Почва, Россия
<i>R. cerastii</i> (3)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Почва, Тюменская область, Россия
<i>R. cercidiphylli</i> (2)	Использует <i>n</i> -алканы в качестве источника углерода	Почва, Пермский край, Россия
<i>R. corynebacterioides</i> (2)	Используют <i>n</i> -алканы, спирты, арены в качестве источника углерода	Почва, Пермский край, Ямало-Ненецкий автономный округ, Россия
<i>R. erythropolis</i> (61)	Используют <i>n</i> -алканы, спирты, арены, органические кислоты в качестве источника углерода, деградируют ароматические кислоты	Вода, снег, донные осадки, Пермский край, Земля Франца-Иосифа, Якутия, Иркутская область, Россия; Китай, Шотландия, Италия
<i>R. fascians</i> (13)	Используют <i>n</i> -алканы, спирты, арены в качестве источника углерода	Почва, Пермский край, Россия
<i>R. koreensis</i> (1)	Деградирует 2,4-динитрофенол	Вода, Южная Корея

Окончание таблицы 3

<i>R. pyridinivorans</i> (2)	Деградируют пиридин, ксилен и сырую нефть	Вода, Пермский край, Россия; Северная Корея
<i>R. qingshengii</i> (4)	Используют <i>n</i> -алканы, сырую нефть в качестве источника углерода, деградируют эфиры фталевой кислоты	Почва, донные осадки, нефтяной шлам, Удмуртия, Земля Франца-Иосифа, Россия; Беларусь
<i>R. rhodochrous</i> (26)	Гидролизуют нитроолефины; трансформируют тиаанисол, дротаверин	Почва, торф, снег, вода, Пермский край, Россия; Шотландия
<i>R. ruber</i> (41)	Используют <i>n</i> -алканы, арены, спирты; аккумулируют цезий, трансформируют β -ситостерол, деградируют парацетамол	Вода, донные отложения, снег, почва, Пермский край, Республика Коми, Красноярский край, Иркутская область, Россия; Беларусь, Китай
<i>R. wratislaviensis</i> (1)	Использует <i>n</i> -алканы, арены в качестве единственного источника углерода	Почва, Пермский край, Россия
<i>Williamsia marianensis</i> (1)	Используют <i>n</i> -алканы, спирты в качестве источника углерода	Вода, Пермский край, Россия

2.2. Химические реагенты

Ибупрофен ($C_{13}H_{17}O_2Na$, CAS: 31121-93-4, (RS)-2-(4-(2-метилпропил)фенил)пропионовая кислота в виде натриевой соли) использовали в виде фармацевтической субстанции (бесцветный кристаллический порошок с характерным запахом, чистота – 98,0% в пересчете на сухое вещество, умеренно растворимый в воде) производства Sigma-Aldrich, USA. Химические реагенты, в том числе ацетонитрил, этилацетат, этанол имели квалификацию х.ч., ч.д.а. или о.с.ч. (Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США). Для получения ультрачистой воды для высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (Millipore, USA).

2.3. Определение минимальной подавляющей концентрации ибупрофена

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ибупрофена в отношении исследованных культур определяли методом двукратных разведений в иммунологическом 96-луночном планшете, с последующим окрашиванием клеток

0,2%-ным р-ром йоднитротетразолия хлорида (Sigma-Aldrich, США) (Веслополова, 1995; Kuzyukina, 2006). Оценку жизнеспособности клеток проводили измерением оптической плотности среды на микропланшетном спектрофотометре Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, США) с использованием светофильтра с длиной волны 630 нм.

2.4. Условия культивирования бактерий

В экспериментах по биодеструкции ибупрофена применяли минерально-солевую среду RS (г/л): K_2HPO_4 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; KNO_3 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; $NaCl$ – 1,0; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,2; $CaCl_2 \times 2 H_2O$ – 0,02; $FeCl_3 \times 7 H_2O$ – 0,001 (рН 6,9); минеральную среду К: (г/л): K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; KNO_3 – 1,0; $NaCl$ – 1,0; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,2; $CaCl_2 \times 2 H_2O$ – 0,02; $FeCl_3 \times 7 H_2O$ – 0,01 или минеральную среду К модифицированную (г/л): K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; NH_4NO_3 – 1,0; $NaCl$ – 1,0; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,2; $CaCl_2 \times 2 H_2O$ – 0,02; $FeCl_3 \times 7 H_2O$ – 0,01 с добавлением раствора микроэлементов (Романенко, Кузнецов, 1974) во все использованные минеральные среды. Ибупрофен вносили в виде стерильного концентрированного водного раствора (1000 мг/л) до конечной концентрации 100 мг/л или 100 мкг/л. В качестве дополнительного источника углерода и энергии испытывали 10 различных косубстратов: ацетат натрия, глюкозу, олеаноловую, фенилуксусную и гуминовые кислоты (0,1%), мясopептонный бульон (МПБ, 1,3%), глицерин, пентанол-1, гексанол-1, *n*-гексадекан (0,01–0,1 об. %). В качестве инокулята использовали суспендированные в физиологическом растворе актиномицеты (ОП₆₀₀ 1,0), предварительно выращенные в течение 1, 2, 3 или 4 сут в МПБ (Oxoid, Великобритания) и отмытые дважды фосфатным буфером (рН 7,0). Эксперименты по биодеструкции ибупрофена проводили в условиях периодического культивирования (160 об/мин, 28°C) в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с объемом среды 100 мл.

В экспериментах по оценке влияния факторов культивирования на процесс биодеструкции применяли среду К с добавлением *n*-гексадекана (0,1; 1,0; 10, 50 мл/л), глюкозы (0,1; 0,5; 1,0; 2,5 г/л), фиксированном значении рН (4,0; 5,0; 5,5;

6,0; 6,5; 7,0; 8,0) и бактериального инокулята (10, 50, 100, 200% от концентрации клеток, эквивалентной по степени мутности БАК5 международным единицам мутности). Доведение pH осуществляли 5М р-рами HCL и NaOH в деионизированной воде.

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

В качестве контролей использовали (а) стерильный р-р ибупрофена в минеральной среде (для оценки абиотической деструкции фармвещества); (б) стерильный р-р ибупрофена в минеральной среде с инаktivированными бактериальными клетками (для оценки степени адсорбции ибупрофена на бактериальных клетках); (в) минеральную среду, содержащую *n*-гексадекан с бактериальными клетками, без ибупрофена (контроль для разграничения метаболитов, появляющихся в результате разложения ибупрофена).

2.5. Получение клеточных фракций

Бактерии, предварительно выращенные в течение 2 сут в МПБ и в присутствии ибупрофена (10 мг/л), трижды отмывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,0). Клеточную суспензию обрабатывали с помощью ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 (MSE, Великобритания) в течение 90 мин при амплитуде 15 мкм в условиях охлаждения. Полученный гомогенат центрифугировали (6 000 об/мин, 20 мин, 4°C) для получения фракции цитоплазматических ферментов. Для выделения мембраносвязанных ферментов осадок ресуспендировали в 1% р-ре Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере (pH 7,0), перемешивали на орбитальном шейкере в течение 30 мин и затем центрифугировали (6000 об/мин, 20 мин, 4°C). Соникат мембраносвязанных ферментов, неэкстрагированных детергентом, ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,0). В качестве контроля

использовали цельноклеточный комплекс в фосфатном буферном растворе (pH 7,0).

2.6. Микроскопические исследования

Визуализацию клеток проводили с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста и флуоресценции. Фотодокументирование изображений осуществляли с помощью фотокамеры Axiocam 506 Color (Zeiss, Germany) и компьютерной программы Zen Blue 3.1 (Zeiss, Germany).

Влияние ибупрофена на морфологию и рельеф поверхности бактериальных клеток исследовали с помощью системы совмещенного сканирования, включающей атомно-силовой микроскоп (АСМ) MFP-3D-BIO™ (Asylum Research Inc., USA) и конфокальный лазерный микроскоп (КЛСМ) Olympus Fluo View 1000 (Olympus Corporation, Japan). Для дифференциации живых и мертвых клеток бактериальную суспензию окрашивали флуоресцентным красителем LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США). Подготовку и сканирование образцов проводили согласно работе (Коршунова, 2016). Измеряли среднеквадратичную шероховатость клеточной поверхности, длину, ширину клеток и рассчитывали объем и площадь поверхности клеток согласно работе (Neumann *et al.*, 2005). Обработку полученных изображений проводили с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, USA).

Исследования с использованием методов сканирующей (СЭМ) и просвечивающей (ПЭМ) электронной микроскопии проводили на базе центра коллективного пользования «Коллекция UNIQEM» Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.).

Культуры, выращенные в течение 72 ч на плотных средах, фиксировали в 2,5% глутаральдегиде (w/v) в 0,1 М буфере какодилата натрия (pH 7,2) в течение 2,5 ч и затем постфиксировали в 1% (w/v) четырехокси осмия в том же буфере. Зафиксированный материал обезвоживали серией растворов этанола, в том числе абсолютным этанолом, насыщенным ацетатом уранила, и заливали в аралдит.

Тонкие срезы готовили на ультратоме (LKB, Швеция) и окрашивали цитратом свинца. Ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония). Целые клетки просматривали на сканирующем электронном микроскопе JSM-IT200 (Jeol, Япония).

2.7. Респиromетрический анализ

Дыхательную деятельность бактериальных клеток оценивали с помощью 10-канального респиromетра Micro-Oxymax[®] (Columbus Instruments, США). Эксперименты проводили в стеклянных флаконах Micro-Oxymax вместимостью 300 мл, с объемом минеральной среды 100 мл при постоянном перемешивании (160 об/мин, 28±2°C). Оценивали количество (мкл) и скорость (мкл/мин) потребляемого O₂ и выделяемого CO₂. Автоматическая регистрация респиromетрической активности проводилась каждые 30 мин в течение 7 сут.

2.8. Электрокинетический потенциал

Измерение электрокинетического потенциала (дзета (ζ)-потенциала) бактериальных клеток проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZetaSizer, v. 2.2. Клетки, выращенные в минеральной среде в присутствии ибупрофена и *n*-гексадекана, дважды отмывали и ресуспендировали в 0,1 М KNO₃ (pH 7,0) до достижения ОП₆₀₀ 0,2. Измерения проводили в U-образной кювете с позолоченными электродами при температуре 25°C и pH 7,0.

2.9. Каталазная активность

Каталазную активность актиномицетов в процессе биодеструкции ибупрофена определяли по методике, описанной в работе (Gogoleva et al., 2012). Бактериальные клетки, выращенные в присутствии глюкозы и ибупрофена, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, отмывали фосфатным буфером (pH 7,0) и ресуспендировали в том же буфере до ОП₄₉₂ 0,2. К 200 мкл клеточной суспензии добавляли 1 мл 0,00125 М раствора H₂O₂ и инкубировали в

течение 10 мин при комнатной температуре. Затем вносили 100 мкл 2н раствора HCl для остановки процесса каталазного расщепления пероксида водорода. К полученной смеси добавляли 1 мл 0,025 М раствора KI, аккуратно перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. В контрольных образцах вместо клеточной суспензии использовали дистиллированную воду. Оптическую плотность супернатанта измеряли с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 492 нм. Каталазную активность рассчитывали по формуле 4:

$$A_{\text{кат}} = \frac{12,5(1-ОП_0/ОП_к)}{T \times ОП_б}, \quad (4)$$

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

2.10. Аналитические методы

Убыль ибупрофена в процессе биодеструкции контролировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония), оборудованного хроматографической колонкой с обращенно-фазным сорбентом Phenomenex Jupiter® 5u C18 300 A, 250×4.60 mm 5 micron (Phenomenex, США) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Оптимальные условия для определения ибупрофена: подвижная фаза фосфатный буферный раствор (pH 5,0) – ацетонитрил (40:60), поток элюента – 0.5 мл/мин, температура колонки 40°C, объем вводимой пробы – 20 мкл, длина волны детектирования – 254 нм. В данных условиях время удерживания субстрата составило $9,28 \pm 0,20$ мин. Регистрацию и обработку хроматографической информации осуществляли с помощью программы LCSolution (v/1.25 rus). Нормализация хроматографических пиков осуществлялась по методу внешнего стандарта.

Продукты бактериальной метаболизации ибупрофена анализировали с использованием жидкостного тройного квадрупольного хроматографа LCMS-8050 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором с двойным источником ионизации (электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении). Разделение метаболитов осуществляли на хроматографической колонке (Luna 3u C18(2) 100A, LC Column 100x0.5 mm) с обращенно-фазным сорбентом (Phenomenex, USA). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил и 0,1% муравьиную кислоту в соотношении 60:40 в изократическом режиме элюирования, скорость потока элюента – 1 мл/мин; температура колонки – 40°C; объем вводимой пробы – 10 мкл; опорная длина волны детектирования целевого соединения – 220 нм.

Для хроматографического анализа аликвотную часть (1 мл) культуральной жидкости актиномицетов центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр (Filter-Bio, China) с диаметром пор 0,20 мкм.

2.11. Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование штаммов-биодеструкторов проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием секвенатора Illumina NovaSeq (Illumina, США) и метода сборки генома SPAdes v.3.14.1. Полный геном штамма *R. cerastii* ИЭГМ 1243 внесен в базу данных NCBI под номером JAJNDD010000001 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&cmd=Search&term=JAJNDD010000000>).

Поиск функциональных генов, предположительно участвующих в процессе биодеструкции ибупрофена, проводили в международной базе данных NCBI на основе автоматически аннотированного полного генома штамма. Анализ свойств последовательностей целевых генов проводили с использованием сервиса BLASTN, доступного на сайте NCBI.

2.12. Математическое моделирование процесса биодеструкции ибупрофена

Для математического моделирования использовали кинетическое уравнение минус первого порядка $dx/dt = -k x^{-1}$ с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$. Значения параметра скорости биодеструкции k в реализациях определяли по полученным методом ВЭЖХ экспериментальным данным, отражающим динамику изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции с применением метода наименьших квадратов. Период полураспада ибупрофена определяли, согласно выражению:

$$t_{1/2} = \frac{0,75x_0^2}{(2k)}$$

Время окончания процесса при 100-кратном уменьшении начальной концентрации исследуемого вещества устанавливали по выражению

$$t_{1/100} = \frac{0.9999x_0^2}{(2k)}$$

Кинетическое моделирование проводили на базе кафедры вычислительной математики, механики и биомеханики Пермского национального политехнического университета (зав. кафедрой – д.т.н., проф. Столбов В.Ю).

2.13. Фитотоксичность ибупрофена и продуктов его биоокисления

Фитотоксичность продуктов биодеструкции ибупрофена в отношении овса обыкновенного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). В экспериментах использовали семена (Permagrobus iness, Россия), всхожесть которых составляла 98%. Семена проращивали в течение 3 сут в стерильных чашках Петри с фильтровальной бумагой, обработанной дистиллированной водой (5 мл). Затем проросшие семена обрабатывали водным раствором ибупрофена либо продуктов его биодеструкции. Чашки Петри помещали в ростовую камеру при постоянной температуре 25°C на 7 сут. Токсичность определяли по величине эффекта торможения роста корневой системы растения по формуле 5:

$$E_{in} = \frac{L_c - L_e}{L_e} \cdot 100\%, \quad (5)$$

где E_{in} – эффект торможения, %; L_e – средняя длина корней в опыте, см; L_c – средняя длина корней в контроле, см. Фитотоксическое действие считалось доказанным, если фитотоксический эффект (E_{in}) составлял 20% и более.

В качестве контролей использовали проросшие семена овса, обработанные стерильной минеральной средой RS.

2.14. *In silico* исследования продуктов биодеструкции ибупрофена

Экотоксичность ибупрофена и продуктов его биодеструкции оценивали с помощью компьютеризированной системы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationships), доступной в программном пакете EPI Suite TM (The Estimation Programs Interface, EPA, США). Программа ECOSAR дает возможность оценки потенциальной острой и хронической токсичности химических веществ в отношении водных и наземных организмов с использованием компьютеризированного анализа структурно-функциональной взаимосвязи в молекулах. Результаты экотоксичности прогнозируются на основании доступных данных по токсическим эффектам органических соединений различных химических классов.

Биодеградируемость продуктов метаболизации ибупрофена оценивали с использованием программы BIOWIN (EPIsuite, EPA, США). BIOWIN оценивает возможность быстрой аэробной и анаэробной биодеградации органических соединений в присутствии смешанной популяции природных микроорганизмов. Прогноз проводили в программных пакетах Biowin 5 (линейная модель), 6 (нелинейная модель) и Biowin 7 (анаэробная модель). Модели предсказывают результаты биодеградации для каждого соединения, когда значения больше или равны 0,5 – они соответствуют высокой биоразлагаемости соединения, а менее 0,5 – соответствуют низкой биоразлагаемости соединения. Способность к оседанию в почвах, биоконцентрированию и биоаккумуляции ибупрофена и продуктов его биодеструкции оценивали с помощью программ KOCWIN и BCFBAF (EPIsuite, EPA, США), моделирующих соответствующие значения на основании коэффициента распределения октанол/вода ($\log K_{ow}$).

2.15. Статистическая обработка

Эксперименты проводили в трех-, восьми- или десятикратной повторности. Математическую обработку результатов проводили с использованием программ R (RStudio), Statistica 13 (StatSoft, 2018), MS Excel. При оценке степени достоверности различий средних значений использовали t-критерий Стьюдента.

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ К БИОДЕСТРУКЦИИ ИБУПРОФЕНА

3.1. Определение устойчивости актиномицетов к ибупрофену

По нашим данным, все использованные в работе штаммы актиномицетов сохраняли жизнеспособность в присутствии ибупрофена в диапазоне концентраций от 125 до 1000 мг/л (Таблица 4).

Таблица 4 – МПК ибупрофена в отношении использованных в работе актиномицетов

Вид	МПК ибупрофена, мг/л
<i>Agromyces mediolanus</i> , <i>Brachybacterium faecium</i> , <i>B. paraconglomeratum</i> , <i>Corynebacterium variabile</i> , <i>Curtobacterium citreum</i> , <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> , <i>Gordonia terrae</i> , <i>R. cerastii</i> , <i>R. cercidiphylli</i> , <i>R. corynebacterioides</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>M. lylae</i> , <i>Nocardioideis albus</i> , <i>N. jensenii</i>	≥ 1000
<i>R. opacus</i>	500– ≥ 1000
<i>G. rubripertincta</i> , <i>R. globerulus</i>	500
<i>R. fascians</i>	250 – ≥ 1000
<i>Microbacterium imperial</i> , <i>R. rhodochrous</i> , <i>Williamsia mariensis</i>	250
<i>Dietzia maris</i> , <i>R. erythropolis</i> , <i>R. ruber</i>	125 – ≥ 1000
<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>R. jostii</i>	125

Наименее устойчивыми (МПК=125 мг/л) оказались штаммы, принадлежащие к видам *Clavibacter michiganensis*, *R. jostii*, а также отдельные представители видов *Dietzia maris*, *R. erythropolis* и *R. ruber*. Наиболее высокую (МПК ≥ 1000 мг/л) резистентность к ибупрофену проявили штаммы, принадлежащие к *Agromyces mediolanus*, *Brachybacterium faecium*, *B. paraconglomeratum*, *Corynebacterium variabile*, *Curtobacterium citreum*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *D. maris*, *G. terrae*, *R. cerastii*, *R. cercidiphylli*, *R.*

corynebacterioides, *M. luteus*, *M. lylae*, *N. albus*, *N. jensenii*, *R. opacus*, *R. erythropolis*, *R. ruber*. Следует отметить, что прямой корреляции между таксономической принадлежностью актиномицетов и устойчивостью к ибупрофену не выявлено. Для проведения дальнейших экспериментов были отобраны 15 штаммов, наиболее устойчивые к воздействию ибупрофена.

По нашим данным, все использованные в работе штаммы актиномицетов оказались неспособными к метаболизму ибупрофена в качестве единственного источника углерода и энергии. Биодеструкцию ибупрофена фиксировали исключительно в условиях косубстратного культивирования. Это объясняется тем, что молекула ибупрофена не является достаточным источником углерода и энергии. Для оценки способности выбранных штаммов к кометаболизму ибупрофена была проведена инкубация бактериальных клеток с ибупрофеном в минеральной среде в присутствии глицерина (Таблица 5). Наиболее перспективными биодеструкторами в условиях совместного метаболизма ибупрофена оказались штаммы *R. cerastii* ИЭГМ 1378, ИЭГМ 1243, *R. cercidiphylli* ИЭГМ 1184 и *R. erythropolis* ИЭГМ 501: на 7 сут эксперимента биодеструкция ибупрофена составляла 14,1, 21,6 и 18,6% соответственно.

Следует отметить, что на стадии предварительных исследований в качестве среды культивирования актиномицетов в процессе биодеструкции проверяли богатую питательную среду (МПБ), однако в этих условиях убыль ибупрофена была значительна меньше, чем в условиях использования минеральной среды с добавлением дополнительного ростового субстрата. Интересно отметить, что не все отобранные по признаку устойчивости к ибупрофену штаммы проявили способность к его метаболизму.

Таблица 5 – Биодеструкция 100 мг/л ибупрофена в присутствии 0,1% глицерина

Штамм	Остаточное содержание ибупрофена, %
<i>Agromyces mediolanus</i> ИЭГМ 860	96,3±0,78

Окончание таблицы 5

<i>Corynebacterium variabile</i> ИЭГМ 824	97,2±1,12
<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> ИЭГМ 393	100,0±0,00
<i>Dietzia maris</i> ИЭГМ 297	93,3±2,14
<i>D. maris</i> ИЭГМ 302	92,1±3,44
<i>D. maris</i> ИЭГМ 459	89,3±5,63
<i>Gordonia terrae</i> ИЭГМ 153	93,2±2,71
<i>Nocardioides albus</i> ИЭГМ 820	90,3±2,10
<i>Nocardioides jensenii</i> ИЭГМ 821	88,9±1,38
<i>Rhodococcus cerastii</i> ИЭГМ 1278	85,9±2,17
<i>R. cercidiphylli</i> ИЭГМ 1184	78,4±1,72
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 501	81,4±0,97
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 711	95,3±0,15
<i>R. fascians</i> ИЭГМ 1158	97,9±1,30
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 596	89,5±2,67
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 477	95,6±2,82

Примечание. Представлены данные на 7 сут эксперимента.

В сравнительных экспериментах по исследованию биодеструктирующей способности отобранных штаммов в присутствии различных ростовых субстратов установлено, что наиболее высокая убыль фармполлютанта наблюдалась в присутствии 0,1% *n*-гексадекана при использовании клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 (Таблица 6). При использовании глицерина, мясопептонного бульона и пентанола-1 в качестве дополнительных субстратов биодеструкция ибупрофена была значительно ниже – от 14,1 до 27,4%. В присутствии остальных косубстратов биотрансформация ибупрофена не происходила.

Таблица 6 – Биодеструкция 100 мг/л ибупрофена в присутствии дополнительных источников углерода

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

Примечание. Представлены результаты после 7 сут эксперимента.

Активность штамма ИЭГМ 1243, относящегося к ассоциированному с растениями виду *R. cerastii* (Kampfer *et al.*, 2013), в отношении ибупрофена можно объяснить, по-видимому, химической природой фармполлютанта. Ибупрофен – производное пропионовой кислоты, которая, в свою очередь, относится к спектру феноксиалкановых кислот, имеющих широкое распространение в растительных тканях в качестве ростовых регуляторов (Rainsford, 1991). Известно, что ассоциированные с растениями актиномицеты (представители *Microbacterium*, в частности) характеризуются высокой устойчивостью и деструктирующей активностью по отношению к полициклическому НПВС диклофенаку (Wegrzyn, Felis, 2018; Sauvetre *et al.*, 2020).

3.2. Биодеструкция ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243

По нашим данным, наиболее эффективно процесс биодеструкции ибупрофена протекал в минеральной среде RS в присутствии 0,1% *n*-гексадекана с использованием клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, предварительно выращенных в МПБ в течение 3 сут и отобранных в экспоненциальную фазу роста (Рисунок 3). В данных условиях полная биодеструкция ибупрофена наблюдалась на 6 сут

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

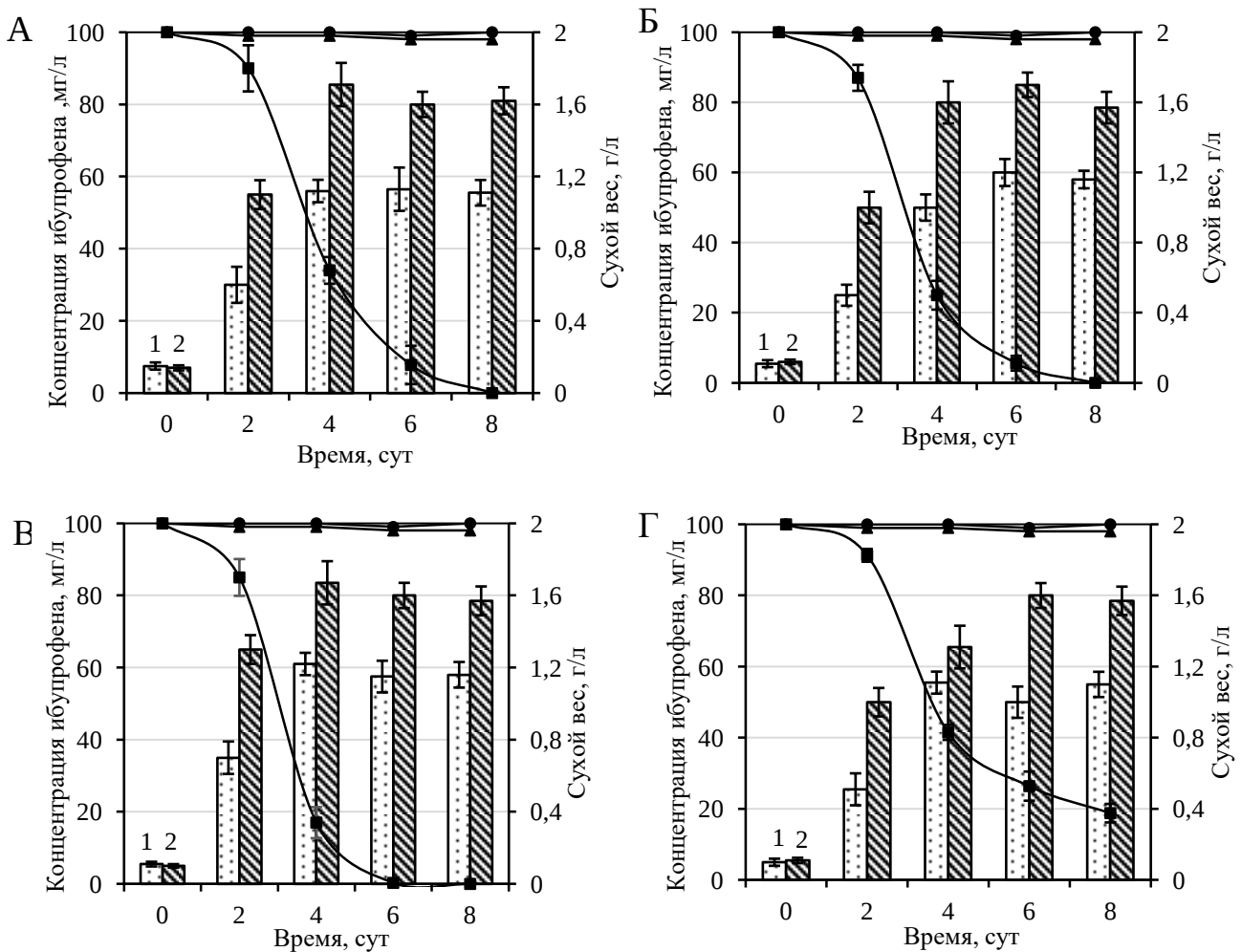


Рисунок 3 – Динамика биодеструкции 100 мг/л ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 (■) в присутствии *n*-гексадекана. Клетки предварительно выращивали в МПБ в течение 1 (А), 2 (Б), 3 (В) и 4 (Г) сут. (●) контроль абиотической деструкции; (▲) контроль биосорбции; 1 – сухой вес биомассы актиномицетов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

В случае предварительного инкубирования актиномицетов в МПБ в течение 2 сут, процесс полной биоконверсии ибупрофена завершался на 8 сут эксперимента. При использовании 4-х суточной культуры на 8 сут эксперимента остаточное содержание ибупрофена в среде составляло примерно 20% (Рисунок 3 Г).

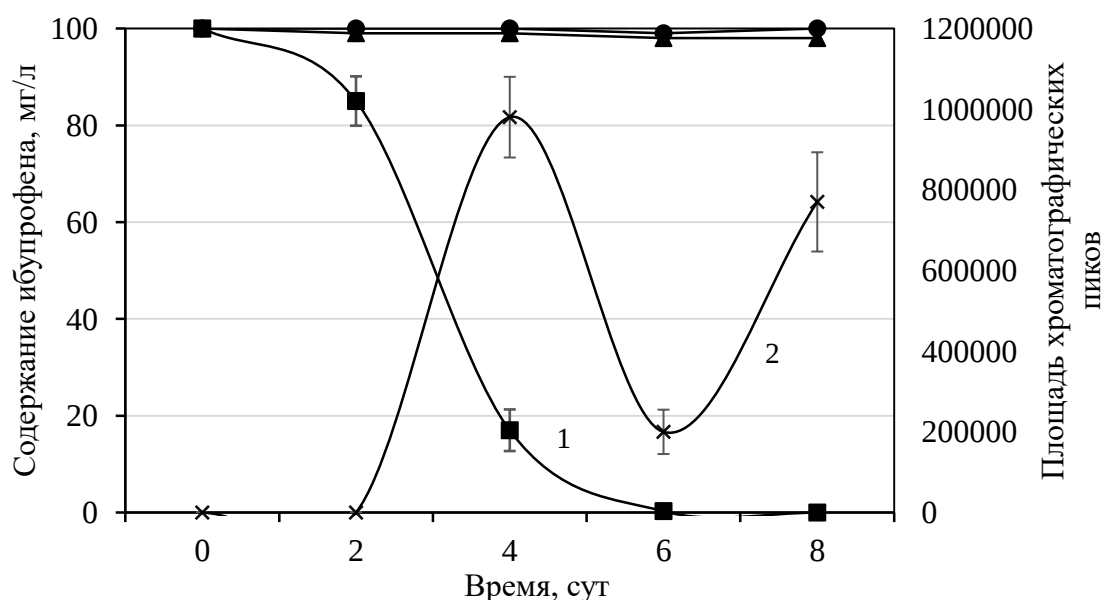


Рисунок 4 – Динамика изменения содержания ибупрофена (1) и его метаболитов (2) в процессе биодеструкции клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243.

● – контроль абиотической деструкции, ▲ – контроль биосорбции

3.3. Респираторная активность клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии ибупрофена

Для оценки каталитической активности бактерий в процессе биоконверсии сложных органических субстратов целесообразно использовать метод респирометрического анализа (Kuyukina *et al.*, 2009). Это может обеспечить надежную, повторяемую и технически обоснованную оценку микробной активности. Каталитическая активность штамма *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в отношении ибупрофена была подтверждена данными потребления кислорода и выделения углекислого газа. Как видно из Рисунка 5 А,В, максимум активности актиномицетов в присутствии только *n*-гексадекана приходился на 30–32 ч эксперимента и затем резко снижался вследствие истощения субстрата в среде. В

это время максимальные значения скорости потребления O_2 и выделения CO_2 достигали -66673 и 250,6 мкл/мин соответственно. В присутствии ибупрофена регистрировали замедление роста и активности бактериальных клеток в первые сут эксперимента: продолжительность lag-фазы составляла порядка 70 ч. Максимум метаболической активности (поглощение O_2 -2581,2 мкл/мин и выделение CO_2 197,2 мкл/мин) клеток ИЭГМ 1243 в присутствии фармвещества наблюдали на 82–86 ч эксперимента, что соответствовало максимальной скорости биодеструкции ибупрофена (см. Рисунок 3 В). Дальнейший спад газообмена в клетках можно объяснить не только исчерпанием ибупрофена в среде, но и накоплением продуктов его метаболизма (см. Рисунок 5). Рассчитанные средние показатели скорости поглощения кислорода клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии ибупрофена и без него составляли 1015,0 и 1230,0 мкл/мин соответственно. Общее количество потребленного кислорода в присутствии ибупрофена составляло 824801 мкл, а в контроле –690152 мкл.

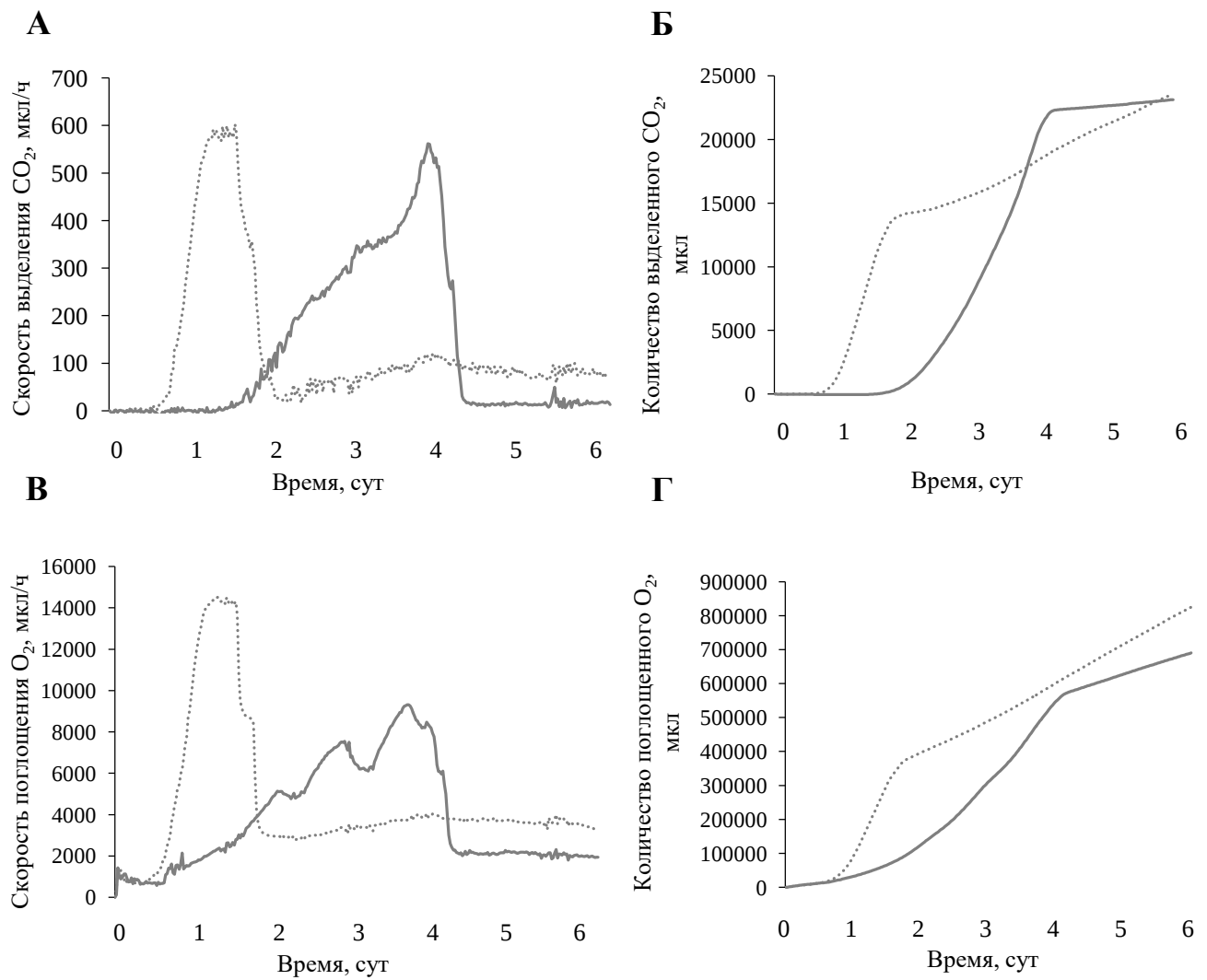


Рисунок 5 – Респиromетрические показатели метаболической активности клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в процессе биодеструкции ибупрофена. Выделение (А) и аккумуляция (Б) CO_2 ; поглощение (В) и аккумуляция (Г) O_2 . Клетки выращивали в присутствии *n*-гексадекана (пунктирная линия) или *n*-гексадекана с добавлением 100 мг/л ибупрофена (сплошная линия).

Средняя скорость выделения углекислого газа в присутствии ибупрофена была значительно (в 1,5 раза) выше, чем в контроле – 36,3 и 23,8 мкл/мин соответственно. Общее количество выделенного CO_2 актиномицетов составило 4396,0 и 3857,4 мкл в присутствии ибупрофена и без него соответственно. Таким образом, по показателям выделения углекислого газа можно заметить, что метаболическая активность актиномицетов значительно выше в присутствии ибупрофена.

При проведении процесса биодеструкции ибупрофена в условиях лабораторного биореактора наблюдалось замедление убыли фармполлютанта: остаточное содержание ибупрофена на 20 сут эксперимента составляло еще более 30%. Следует отметить, что уровень биоконверсии субстрата коррелировал (-0,92) с уменьшением концентрации растворенного в культуральной среде кислорода. Обнаружено, что поглощение кислорода снижалось с накоплением продуктов биодеструкции ибупрофена (Рисунок 6), что свидетельствовало о подавляющем влиянии их высокой концентрации на респирацию активно растущей бактериальной биомассы.

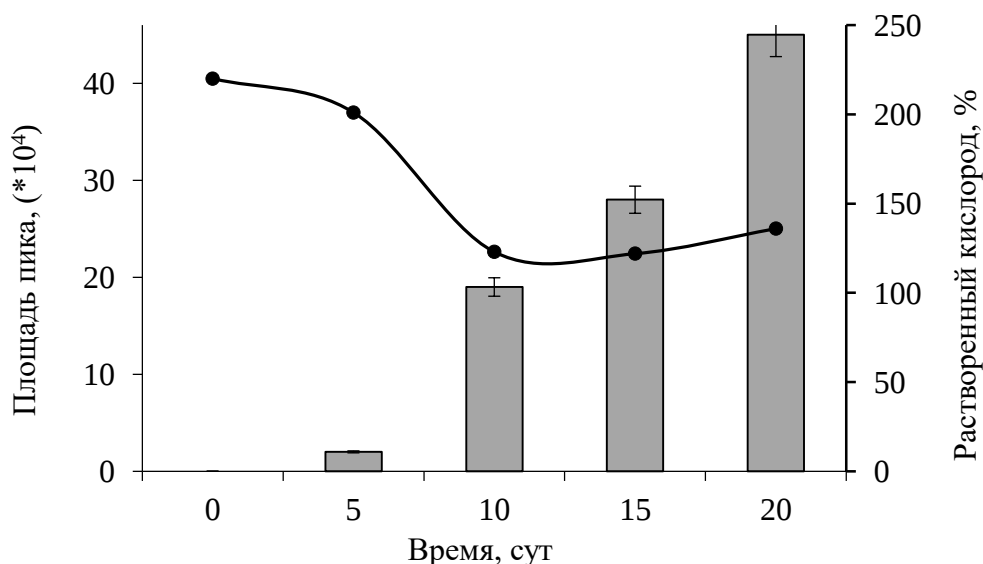


Рисунок 6 – Совокупная площадь ВЭЖХ-пиков продуктов биодеструкции ибупрофена в условиях лабораторного биореактора. • – содержание растворенного кислорода в среде.

В связи с тем, что ибупрофен в окружающей среде чаще всего обнаруживается в концентрациях порядка десятков и сотен мкг/л, важным показателем биотехнологического потенциала бактериальной культуры–биодеструктора ибупрофен явилась ее способность к окислению фармполлютанта в экологически релевантных концентрациях. По нашим данным, при добавлении ибупрофена одновременно с инокулятом (нативные клетки) 100%-ная биодеструкция ибупрофена протекала в течение 48 ч эксперимента (Рисунок 7). В условиях предварительной инкубации актиномицетов в течение 2 сут в присутствии *n*-гексадекана полную биоконверсию фармполлютанта регистрировали на 30 ч. В течение эксперимента отмечали прирост биомассы, в контрольных вариантах (без ибупрофена) количество биомассы достоверно не отличалось от таковой в присутствии экотоксиканта.

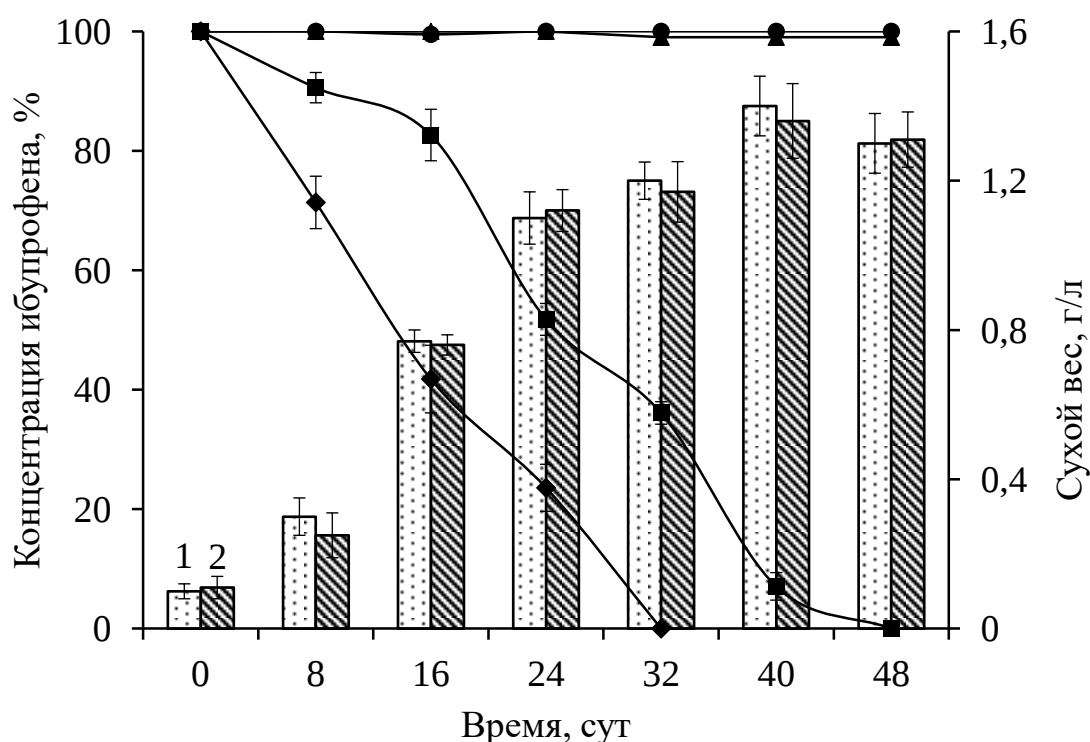


Рисунок 7 – Динамика биодеструкции 100 мг/л ибупрофена нативными (■) и прединкубированными (◆) клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии *n*-гексадекана. ● – контроль абиотической деструкции, ▲ – контроль

биосорбции. 1 – сухой вес (СВ) биомассы в присутствии ибупрофена и *n*-гексадекана; 2 – сухой вес биомассы в присутствии *n*-гексадекана.

3.4. Оценка воздействия различных факторов культивирования на процесс биодеструкции ибупрофена

Для оценки воздействия различных факторов инкубации на процесс биодеструкции ибупрофена использовали среду К модифицированную, с добавлением 0,01% *n*-гексадекана и 0,1 г/л глюкозы с рН 6,7, инокулированную клетками, выращенными в течение 3 сут на МПБ, и внесенными до концентрации, соответствующей стандарту мутности БАК5. Каждый отдельный из факторов (концентрации косубстратов, рН, концентрация инокулята) варьировался в широких пределах в отдельном эксперименте. По результатам проведенных экспериментов, варьирование концентраций глюкозы и *n*-гексадекана уменьшало продолжительность процесса с 5 до 3 сут при использовании данных косубстратов в количестве 1,0 г/л и 10,0 мл/л соответственно (Таблицы 7, 8). При увеличении концентрации глюкозы с 0,1 до 1,0 г/л и *n*-гексадекана с 0,1 до 10,0 мл/л наблюдалось существенное сокращение продолжительности процесса. Однако дальнейшее увеличение как концентрации глюкозы (более 1,0 г/л), так и *n*-гексадекана (более 10,0 мл/л) не способствовало ускорению процесса биодеструкции ибупрофена.

Таблица 7 – Динамика содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях глюкозы

Концентрация глюкозы, г/л	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	4	5
	Содержание ибупрофена*, %					
0,1	100,0	94,1	76,8	75,8	73,9	67,0
	100,0	88,6	70,8	59,0	55,1	53,9
	100,0	89,4	74,3	66,3	60,6	58,7
0,5	100,0	84,5	37,8	27,9	0,0	0,0
	100,0	76,0	27,8	24,4	17,7	0,0
	100,0	75,5	28,4	26,9	11,3	0,0
1,0	100,0	87,3	9,3	0,0	0,0	0,0
	100,0	86,5	8,5	0,0	0,0	0,0

Окончание таблицы 7

	100,0	85,7	7,1	0,0	0,0	0,0
2,5	100,0	84,3	4,1	2,1	0,0	0,0
	100,0	86,5	2,9	3,1	0,0	0,0
	100,0	83,6	3,4	1,2	0,0	0,0

Примечание. *Начальная концентрация ибупрофена принята за 100%.

Таблица 8 – Динамика содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях *n*-гексадекана

Концентрация <i>n</i> -гексадекана, мл/л	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	4	5
	Содержание ибупрофена*, %					
0,1	100,0	94,1	76,8	75,8	73,9	67,0
	100,0	88,6	70,8	59,0	55,1	53,9
	100,0	88,4	72,5	61,3	57,6	54,2
1,0	100,0	87,2	18,0	0,0	0,0	0,0
	100,0	88,4	32,2	8,6	0,0	0,0
	100,0	87,1	28,5	6,6	0,0	0,0
10,0	100,0	87,3	9,3	0,0	0,0	0,0
	100,0	86,5	8,5	0,0	0,0	0,0
	100,0	85,7	7,1	0,0	0,0	0,0
50,0	100,0	86,3	2,5	0,0	0,0	0,0
	100,0	81,2	2,1	0,0	0,0	0,0
	100,0	83,3	3,6	0,0	0,0	0,0

Примечание. *Начальная концентрация ибупрофена принята за 100%.

При варьировании объема инокулята (в единицах стандарта мутности БАК5), свидетельствующего о концентрации использованных бактериальных клеток, принимали во внимание тот факт, что недостаточное количество инокулята приводило к неспособности актиномицетов преодолеть ингибирующее действие ибупрофена и к отсутствию их роста, а отсюда, как следствие, к значительному увеличению продолжительности lag-фазы. Экспериментально установлено, что со снижением концентрации клеток ниже 50% БАК5 снижается эффективность биодеструкции ибупрофена (Таблица 9). Увеличение объема инокулята выше концентрации по БАК5 не влияет на продолжительность процесса. Отсюда, наиболее рациональным значением данного фактора следует считать БАК5.

Таблица 9 – Динамика содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях инокулята

Концентрация инокулята, БАК5	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	4	5
	Содержание ибупрофена*, %					
0,1	100,0	99,9	99,3	97,9	81,4	63,3
	100,0	99,7	99,8	98,2	90,1	89,3
	100,0	99,7	97,2	97,1	85,5	80,2
0,5	100,0	96,3	73,3	71,4	57,6	55,5
	100,0	96,3	84,0	75,3	72,6	58,6
	100,0	96,2	80,2	72,5	60,6	57,5
1	100,0	94,1	76,8	75,8	73,9	67,0
	100,0	88,6	70,8	59,0	55,1	53,9
	100,0	89,7	73,5	62,6	60,2	58,9
2	100,0	90,9	77,7	75,5	73,9	73,0
	100,0	91,4	67,3	64,4	63,3	62,8
	100,0	91,4	69,6	67,5	65,6	61,8

Примечание. *Начальная концентрация ибупрофена принята за 100%.

По нашим данным, наиболее значимым из 4-х исследованных факторов оказалось значение pH. При изменении pH в щелочную сторону (с 6,0 до 8,0) продолжительность процесса составляла более 5 сут (Таблица 10).

Таблица 10 – Динамика содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных значениях pH 4,0–8,0

Значение pH	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	4	5
	Содержание ибупрофена*, %					
4,0	100,0	100,0	100,0	99,0	99,0	97,0
	100,0	99,0	98,0	98,0	98,0	98,0
	100,0	100,0	100,0	99,0	98,0	98,0
5,0	100,0	97,0	92,0	89,0	87,0	86,8
	100,0	99,0	89,0	83,0	79,0	77,0
	100,0	99,0	97,0	91,0	86,0	79,0
6,0	100,0	93,3	61,6	30,3	22,9	18,8
	100,0	93,9	69,9	50,5	36,4	33,4
	100,0	93,6	62,5	37,6	29,8	23,5
7,0	100,0	98,4	92,8	90,9	88,6	87,5
	100,0	98,5	94,9	94,6	87,1	85,9

Окончание таблицы 10

	100,0	98,5	93,0	91,3	87,0	86,0
8,0	100,0	99,2	99,1	98,3	95,4	92,4
	100,0	99,8	98,0	97,5	97,4	96,3
	100,0	99,2	99,0	98,0	97,1	94,8

Примечание. *Начальная концентрация ибупрофена принята за 100%.

При pH 5,0 и менее биодеструкция ибупрофена практически не происходила, тогда как при варьировании значений pH от 5,5 до 7,0 с шагом в 0,5 время завершения процесса составляло 2 сут при pH 6,5 (Таблица 11).

Таблица 11 – Динамика содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при значениях pH 5,5–7,0

Значение pH	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	4	5
	Содержание ибупрофена*, %					
5,5	100,0	78,77	18,04	0	0	0
	100,0	71,22	29,78	0	0	0
	10,0	76,33	37,56	1,21	0	0
6,0	100,0	67,32	0	0	0	0
	100,0	66,32	4,91	0	0	0
	100,0	66,08	0,85	0	0	0
6,5	100,0	56,87	0	0	0	0
	100,0	55,78	0	0	0	0
	100,0	58,02	0	0	0	0
7,0	100,0	70,62	28,12	0	0	0
	100,0	68,36	32,99	3,72	0	0
	100,0	75,76	32,16	1,75	0	0

Примечание. *Начальная концентрация ибупрофена принята за 100%.

Необходимо отметить, что при разных величинах pH характер рост бактериальной культуры значительно различался. Так, при pH 5,0 на 2-е сут процесса биодеструкции ибупрофена наблюдался обильный рост биомассы с образованием скудного осадка на дне колбы с жидкой питательной средой в виде крупных рыхлых агрегатов. При pH 6,0 наблюдались обособленные конгломераты клеток кремового цвета. Наравне с мягкими белыми тяжами начали формироваться круглые плотные агрегаты яркой окраски, культуральная среда

при этом приобретала всё меньшую степень мутности. При pH 6,5 на 2-е сутки бактериальная культура была полностью организована в плотные клеточные агрегаты ярко оранжевого цвета. При отстаивании они всплывали на поверхность среды, подсадочная жидкость оставалась прозрачной.

Таким образом, в результате многофакторного анализа определили оптимальные значения факторов культивирования, сочетание которых позволило сократить процесс биодеструкции 100 мг/л ибупрофена с 4 сут до 36 часов. Наиболее оптимальными условиями оказались: минеральная среда К модифицированная, с добавлением глюкозы (1,0 г/л), и *n*-гексадекана (10,0 мл/л), при pH среды (6,5), и инокулированная 3х суточной культурой, предварительно выращенной на МПБ до оптической плотности, соответствующей стандарту мутности БАК5.

Для уточнения времени завершения процесса, которое находится в интервале (30–36 ч), он был воспроизведен в 9-ти реализациях в одинаковых условиях со стабилизацией показателя pH среды на уровне 6,5 (Таблица 12). На данном этапе работы применяли кинетическое моделирование для выбора и оптимизации условий проведения процессов биодеструкции ибупрофена.

Таблица 12 – Динамика процесса биодеструкции ибупрофена (0,01 %) клетками *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243*

№ п/п	Экспозиция, ч					Кинетическое моделирование		
	0	18	24	30	36			
	Концентрация ибупрофена, %					$k, \%^2/\text{ч}$	$t_{1/2}, \text{ч}$	$t_{1/100}, \text{ч}$
1	100,00	69,54	51,97	28,69	0,00	146,84	25,54	34,05
2	100,00	71,62	54,40	30,69	0,00	142,96	26,23	34,97
3	100,00	72,50	54,42	31,30	0,00	141,91	26,43	35,23
4	100,00	71,57	53,20	27,88	0,00	144,37	25,98	34,63
5	100,00	70,00	51,92	28,67	0,00	146,42	25,61	34,14
6	100,00	72,72	54,32	31,88	0,00	141,59	26,48	35,31
7	100,00	72,51	57,47	35,74	0,00	138,88	27,00	36,00

Окончание таблицы 12

8	100,00	71,72	58,54	34,49	0,00	139,39	26,90	35,87
9	100,00	72,71	56,96	33,75	0,00	139,56	26,87	35,82

Примечание. *Приведена концентрация ибупрофена по отношению к исходной; начальная концентрация ибупрофена (0,01%) принята за 100%.

3.5. Кинетическое моделирование процесса биодеструкции ибупрофена

При проведении целевого процесса со стабилизацией pH среды на уровне 6,5 скорость уменьшения концентрации ибупрофена оказалась обратно пропорциональной таковой в процессе биодеструкции (см. Таблица 11), поэтому для моделирования использовали кинетическое уравнение минус первого порядка $dx/dt = -k x^{-1}$ с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$. После интегрирования уравнение кинетической кривой принимало вид:

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

Значения параметра скорости биодеструкции k в реализациях определяли с применением метода наименьших квадратов по полученным экспериментальным данным (см. Таблица 11). Помимо этого, согласно выражению $t_{1/2} = \frac{0,75x_0^2}{(2k)}$ определяли период полураспада ибупрофена в процессе биодеструкции, а по выражению:

$$t_{1/100} = \frac{0,9999x_0^2}{(2k)}$$

устанавливали время окончания процесса при 100-кратном уменьшении начальной концентрации целевого вещества (см. Таблица 11).

Кинетические кривые, характеризующие изменение остаточной концентрации ибупрофена в культуральных средах актиномицетов в процессе его биодеструкции (Рисунок 8), хорошо соответствуют полученным экспериментальным данным (см. Таблица 12).

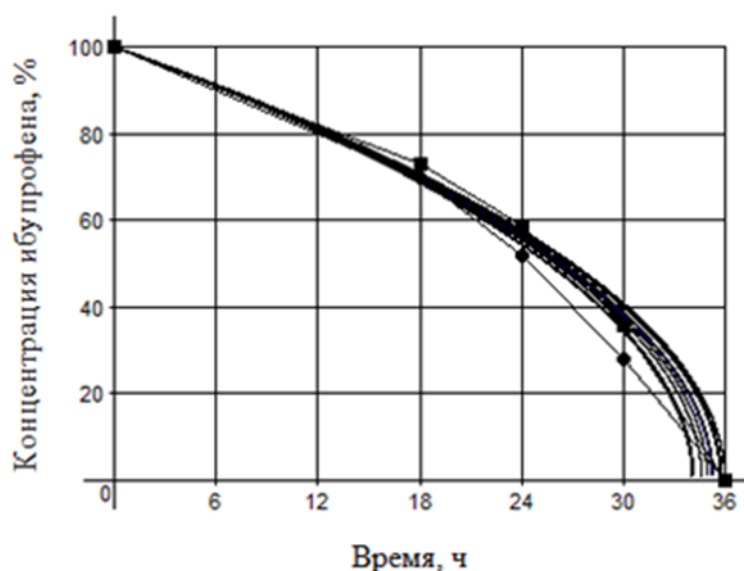


Рисунок 8 – Кинетические кривые изменения концентрации 0,1 г/л ибупрофена в процессе биодеструкции клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 со стабилизацией рН среды (точками показаны экспериментальные значения пределов концентрации)

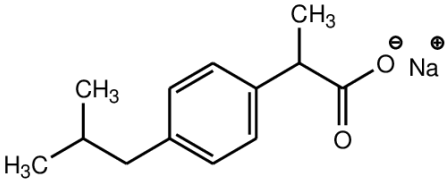
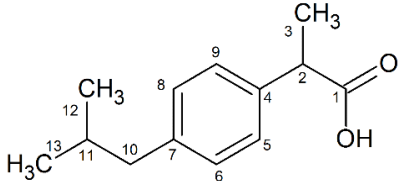
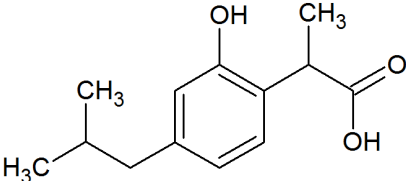
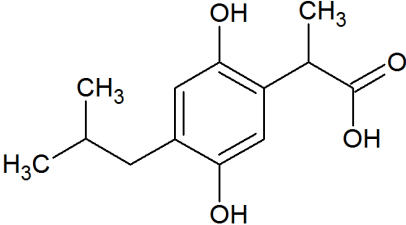
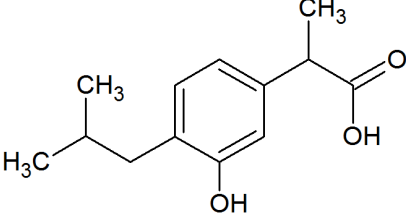
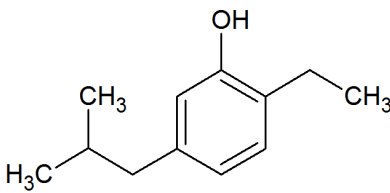
Как видно из Рисунок 8, значения параметра k скорости процесса биодеструкции ибупрофена находятся в пределах $138,88 \div 146,84 \text{ \%}^2/\text{ч}$, период полураспада $t_{1/2} - 25,54 \div 27,00 \text{ ч}$, время окончания процесса $t_{1/100} - 34,05 \div 36,00 \text{ ч}$. Доверительные интервалы для выборочных средних значений параметра скорости, периода полураспада и времени окончания процесса, установленные с применением критического значения коэффициента Стьюдента для доверительной вероятности $P = 95\%$ и числа степеней свободы $(n - 1) = 8$, составляют $(142,44 \pm 2,28) \text{ \%}^2/\text{ч}$, $(26,34 \pm 0,42) \text{ ч}$ и $(35,11 \pm 0,56) \text{ ч}$ соответственно. Полученное значение $(2,08\%)$ относительного стандартного отклонения для данных интервалов свидетельствует о приемлемой воспроизводимости варианта интенсифицированного процесса биодеструкции ибупрофена (Сергиенко, Бондарёва, 2000).

3.6. Пути биодеструкции ибупрофена

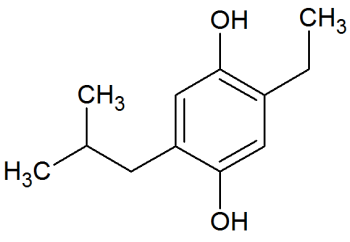
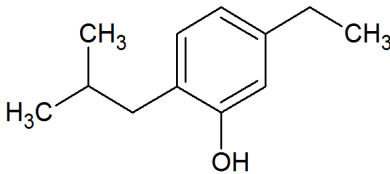
С использованием метода ВЭЖХ-МС идентифицировали метаболиты биодеструкции ибупрофена растущей культурой *R. cerastii* ИЭГМ 1243 (Рисунок 9). Детектирование веществ проводили в режиме мониторинга выбранных ионов

(SIM), используя характеристические ионы предполагаемых продуктов биодеструкции ибупрофена (Таблица 13).

Таблица 13 – Ибупрофен и предполагаемые продукты его метаболизма клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243

№ соединения	Формула	Название соединения
1		Натриевая соль ибупрофена $C_{13}H_{17}NaO_2$ М.м. 228,26
2		Ибупрофен $C_{13}H_{18}O_2$ М.м. 206,28
3		9-Гидроксиибупрофен $C_{13}H_{18}O_3$ М.м. 222,28
4		6,9-Дигидроксиибупрофен $C_{13}H_{18}O_4$ М.м. 238,28
5		6-Гидроксиибупрофен $C_{13}H_{18}O_3$ М.м. 222,28
6		Декарбоксилированное производное 9- гидроксиибупрофена $C_{12}H_{18}O$ М.м. 178,27

Окончание таблицы 13

7		Декарбоксилированное производное 6,9- дигидроксибупрофена $C_{12}H_{18}O_2$ М.м. 194,27
8		Декарбоксилированное производное 6- гидроксибупрофена $C_{12}H_{18}O$ М.м. 178,27

В первые 2 сут инкубации бактерий в присутствии высоких (100 мг/л) концентраций ибупрофена (соединение 2) регистрировали образование первичных гидроксиметаболитов (соединения 3–5). При детектировании ионов с массой 222 (соответствует массе протонированной молекулы моногидрокси-производного ибупрофена) на хроматограмме наблюдали 2 пика с временами удерживания 2,67 мин и 4,36 мин (Рисунок 9).

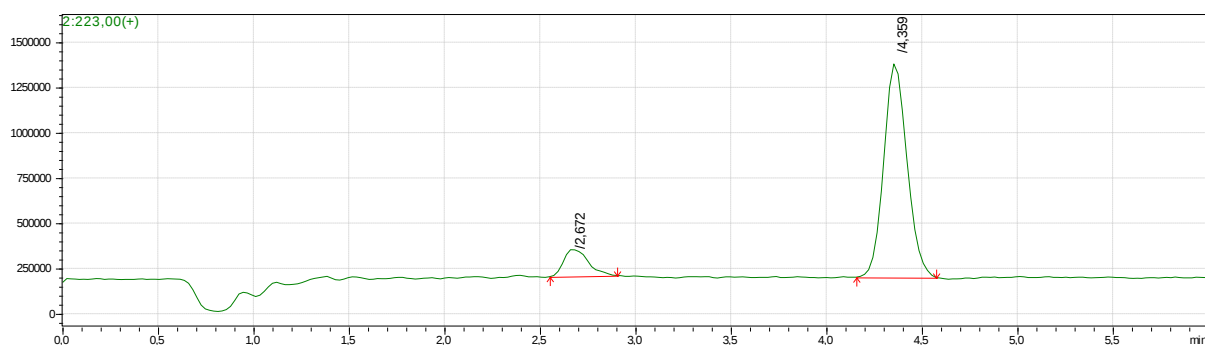


Рисунок 9 – Хроматограмма культуральной жидкости родококков (режим SIM, m/z 222)

Данные пики принадлежат 9-гидроксибупрофену (соединение 3) и 6-гидроксибупрофену (соединение 5). Сходство химической структуры данных соединений подтверждают масс-спектры “дочерних” ионов, полученные при

разных значениях энергии фрагментации в ячейке соударительной диссоциации (Рисунок 9, 10).

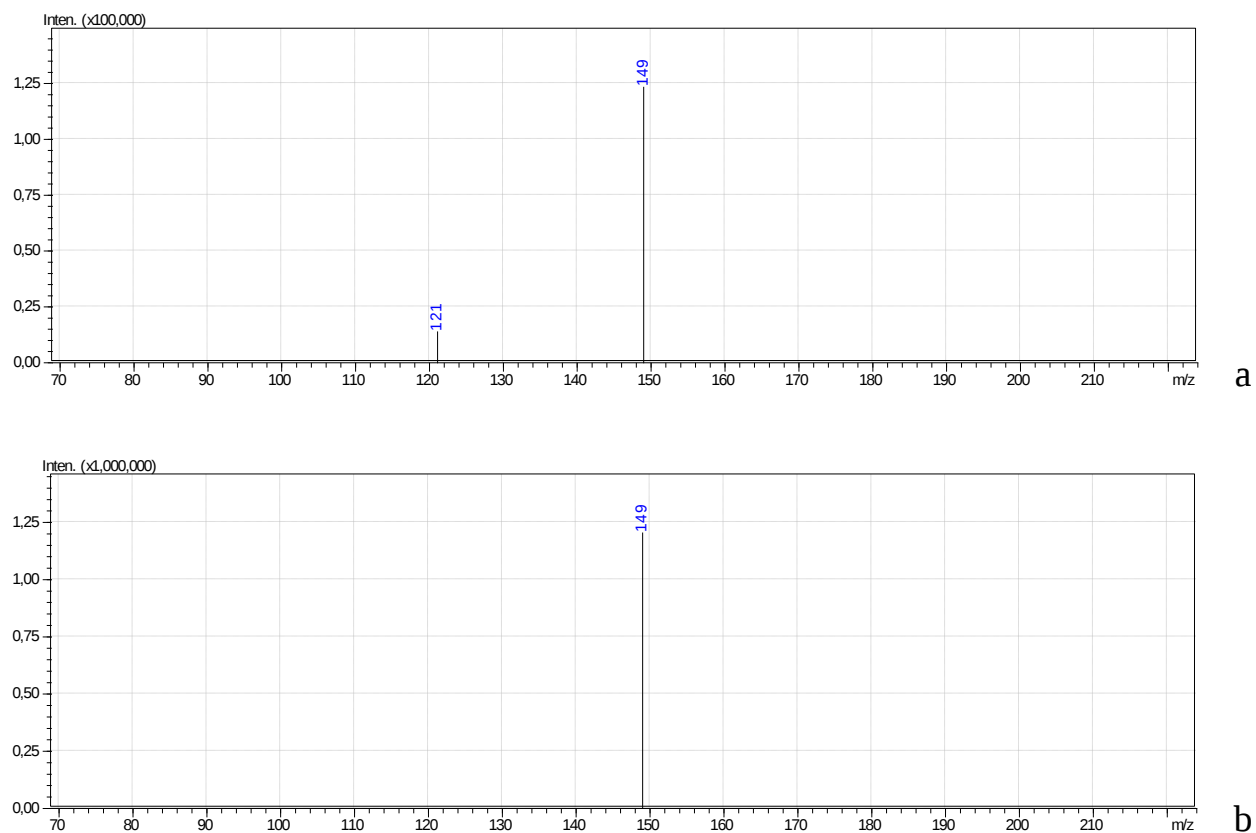


Рисунок 10 – Масс-спектры “дочерних” ионов протонированной молекулы (m/z 222), полученные при сканировании пиков со временами удерживания 2,67 мин (a) и 4,36 мин (b) (энергия соударительной ячейки 18 эВ)

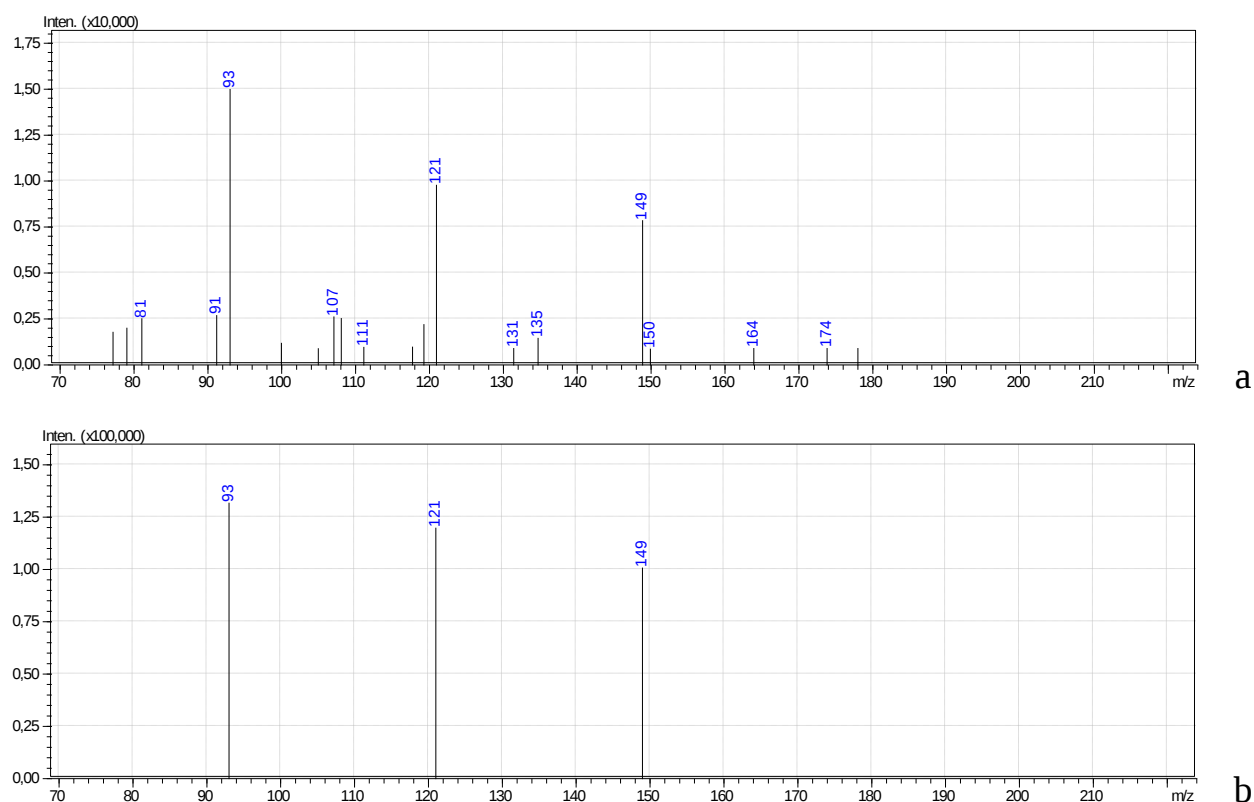


Рисунок 11 – Масс-спектры “дочерних” ионов протонированной молекулы (m/z 223), полученные при сканировании пиков со временами удерживания 2,67 мин (а) и 4,36 мин (b) (энергия соударительной ячейки 35 эВ).

При энергии соударительной ячейки, соответствующей 18 эВ, на обоих спектрах наблюдали интенсивный ион с массовым числом 149. При увеличении энергии до 35 эВ происходила более выраженная фрагментация “родительского” иона до “дочерних” ионов с массами 93, 121 и 149.

Позднее, на 4-е сут эксперимента, в среде инкубации обнаруживали карбоксилированные производные описанных выше гидроксиметаболитов (соединения **6–8**). При детектировании ионов с массовым числом 178, по массе соответствующих соединениям **6** и **8**, продуктам декарбоксилирования гидроксипроизводных ибупрофена, на хроматограмме наблюдали пик со временем удерживания 7,96 мин (Рисунок 12).

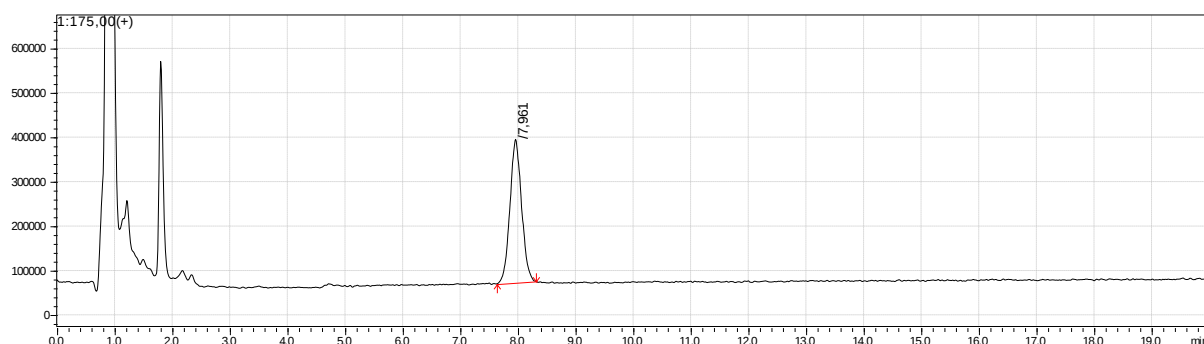


Рисунок 12 – Хроматограмма культуральной жидкости родококков (режим SIM, m/z 175)

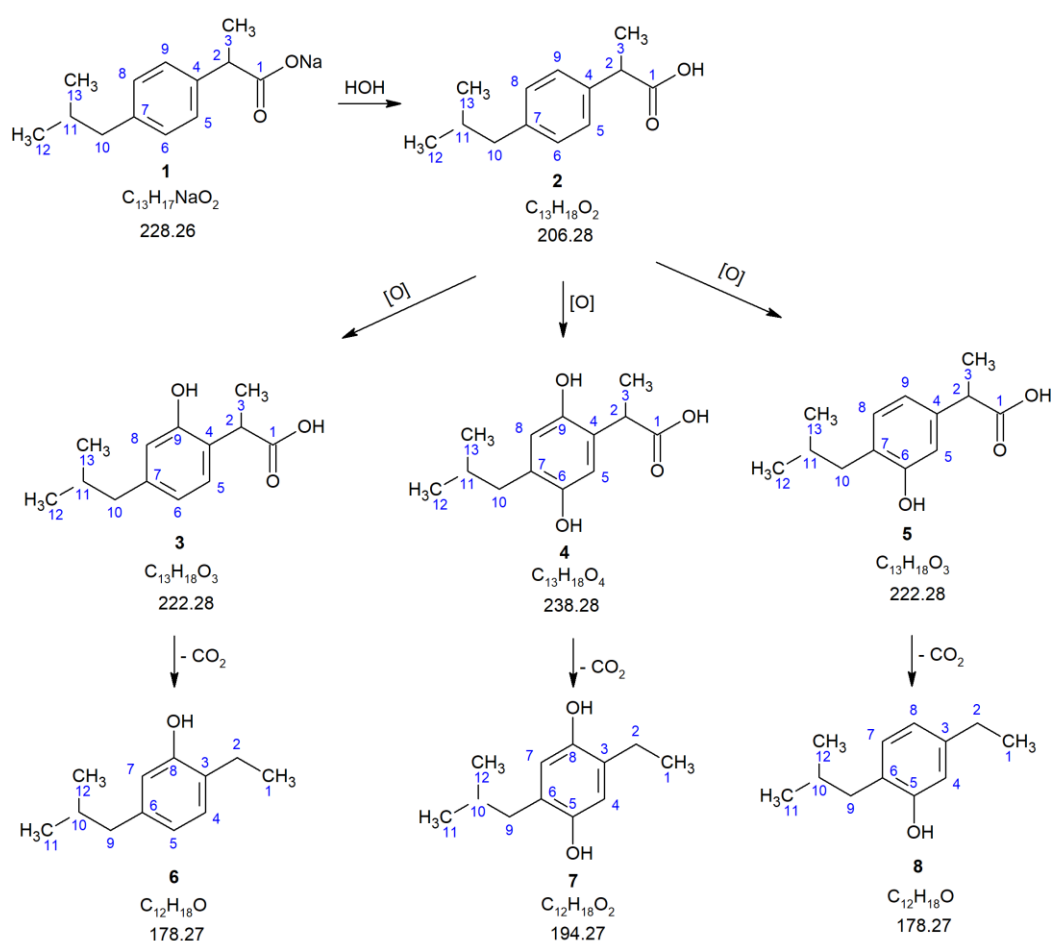


Рисунок 13 – Схема биодеструкции ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243. 1 – натриевая соль ибупрофена; 2 – ибупрофен; 3 – 9-гидроксиибупрофен; 4 – 6,9-дигидроксиибупрофен; 5 – 6-гидроксиибупрофен; 6 – декарбоксилированное производное 9-гидроксиибупрофена; 7 – декарбоксилированное производное 6,9-дигидроксиибупрофена; 8 – декарбоксилированное производное 6-гидроксиибупрофена.

8 – декарбоксилированное производное 6-гидроксиибупрофена. Использована нумерация атомов ибупрофена, предложенная в работе (Preskar *et al.*, 2019)

Как видно из Рисунка 13, метаболизация ибупрофена сопровождается гидроксилированием молекулы экотоксиканта (соединение **1**) с образованием 9-гидроксиибупрофена (соединение **3**), 2,6-дигидроксиибупрофена (соединение **4**) и 6-гидроксиибупрофена (соединение **5**) и их последующим декарбоксилированием (соединения **6–8**). Выявление последующих преобразований гидроксилированных и карбоксилированных метаболитов, образующихся в процессе биодеструкции ибупрофена, требует дальнейших исследований.

С целью установления пространственного расположения по отношению к бактериальной мембране ферментов, катализирующих биоокисление ибупрофена, была произведена его трансформация различными фракциями, полученными ультразвуковым лизированием клеточной культуры. Установлено, что фракция остатков клеточных мембран не демонстрирует активности в отношении ибупрофена, тогда как цитоплазматическая фракция показала низкую (около 3%) способность к окислению ибупрофена по сравнению с растущей культурой, тем не менее методом ВЭЖХ регистрировался пик, соответствующий 9-гидроксиибупрофену (Рисунок 13, продукт **3**), что свидетельствует о цитоплазматической локализации ферментов, вовлеченных в начальные стадии окисления ибупрофена.

Согласно литературным данным, одной из наиболее значимых групп ферментов, вовлеченных в процесс детоксикации лекарственных средств, в том числе НПВС, являются цитохром Р450 зависимые оксигеназы (CYP450) (Parke, 1985; Li *et al.*, 2023; Kariyawasam *et al.*, 2024.). По данным, полученным в результате анализа путей биодеструкции ибупрофена, также можно предположить, что основное участие в процессах окисления ибупрофена клетками актиномицетов принимают ферменты группы CYP450. Полногеномное секвенирование *R. cerastii* позволило провести анализ генетического потенциала штамма-биодеструктора (Таблица 14). С применением методов

биоинформатического анализа составлен перечень генов *R. cerastii* ИЭГМ 1243, кодирующих ферменты семейства CYP450, которые, предположительно, участвуют в процессе биодеструкции ибупрофена (Таблица 15). Полученные данные создают предпосылки для дальнейшего изучения транскриптома биодеструктора *R. cerastii* ИЭГМ 1243 с целью определения функциональных генов, участвующих в процессе биодеструкции ибупрофена.

Таблица 14 – Свойства генома *R. cerastii* ИЭГМ 1243

Свойство	Значение
Размер генома, bp	7007165
Содержание GC, %	62.5
N50	413 563
L50	5
Количество контигов	307
Количество кодирующих последовательностей	6336
Количество РНК	61

Примечание. *Согласно онлайн-сервису NCBI.

Таблица 15 – Ферменты группы CYP450, кодируемые генами *R. cerastii* ИЭГМ 1243

№ п/п	ID фермента	Положение	Размер, аминокислот
1	MCD2152598.1	536272..537501	409
2	MCD2152752.1	698937..700304	455
3	MCD2152815.1	769634..770857	407
4	MCD2153850.1	360265..361500	411
5	MCD2154060.1	612679..613929	416
6	MCD2154091.1	643147..644547	466
7	MCD2154138.1	695301..696506	401
8	MCD2157023.1	97165..98418	417
9	MCD2157028.1	102193..103587	464
10	MCD2157030.1	104390..105595	401
11	MCD2157653.1	25568..26836	422

Окончание таблицы 15

12	MCD2157885.1	26093..27364	423
----	--------------	--------------	-----

Примечание. *По результатам автоматического аннотирования в базе данных NCBI.

Сравнение генов, кодирующих CYP450, показало, что *R. cerastii* ИЭГМ 1243 имеет 11 генов, характерных для родококков, преимущественно для *R. erythropolis*, и один уникальный ген.

Глава 4. ТОКСИЧНОСТЬ И СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ ИБУПРОФЕНА

4.1. Фитотоксичность ибупрофена и продуктов его биодеструкции

Несмотря на то, что токсичность ибупрофена достаточно хорошо изучена на различных объектах, исследования в области острой, фито- и экотоксичности продуктов его бактериальной деструкции пока еще носят фрагментарный характер и преимущественно ограничиваются изысканиями *in silico*. Так, R. Salgado с соавт. (2020) при помощи программного обеспечения QSARs предположили, что отдельные продукты окисления ибупрофена обладают выраженной токсичностью в отношении водных организмов и классифицируются как токсичные в соответствии с рекомендациями агентства Environment Agency Substance Information System (EA-SIS).

По нашим данным определения фитотоксичности (phytotoxicity test), ибупрофен (100 мг/л) оказывал подавляющее (фитоэффект 37,2%) воздействие на рост корней растений (Таблица 16). Однако метаболиты, образующиеся в процессе биодеструкции ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1278, обладали более выраженной (фитоэффект 47,3%) фитотоксичностью по сравнению с исходным субстратом. Разбавление (10–1000 кратное) продуктов биодеструкции ибупрофена снижало оказываемый фитоэффект в отношении тест-растения до 5,6–18,8%.

Таблица 16 – Фитозффекты, оказываемые ибупрофеном (100 мг/л) и его метаболитами

Вариант	Длина корня	Фитозффект, %	Тест-реакция
Контроль (вода)	121,2±2,32	0	Норма
Ибупрофен	76,1±3,11	37,2	Торможение
Продукты биодеструкции ибупрофена	63,9±4,40	47,3	Торможение
Продукты биодеструкции, 10-кратное разведение	98,5±8,29	18,8	Норма
Продукты биодеструкции, 100-кратное разведение	114,4±4,73	5,6	Норма
Продукты биодеструкции, 1000-кратное разведение	111,5±1,87	8,0	Норма

4.2. *In silico* прогнозирование экотоксических свойств ибупрофена и его метаболитов

С использованием компьютерной программы ECOSAR спрогнозирована экотоксичность ибупрофена и продуктов его биодеструкции (Таблица 17). Согласно проведенному анализу, конечные метаболиты (соединения **6–8**, см. Рисунок 12) ибупрофена являются высокотоксичными соединениями для водных организмов (рыбы, беспозвоночные, водоросли), поскольку, согласно Глобальной гармонизированной системе классификации и маркировки химических веществ, показатели острой и хронической токсичности продуктов трансформации ибупрофена в отношении гидробионтов составляют менее 1 мг/л (United Nations GHS, 2011).

Таблица 17 – Расчет экотоксичности ибупрофена (соединения 1, 2) и продуктов его биодеструкции (соединения 3–7) с использованием программы ECOSAR

Соединение	Острая токсичность, мг/л			Категория опасности	Хроническая токсичность, мг/л			Категория опасности
	Рыбы ЛД ₅₀ (96 ч)	Дафнии ЛД ₅₀ (48 ч)	Зеленые водоросли ЭД ₅₀ (96 ч)		Рыбы (28 сут)	Дафнии (21 сут)	Зеленые водоросли (96 ч)	
1	41,561	27,848	41,133	3	4,939	4,305	15,574	2
2	38,795	20,960	84,857	3	4,747	3,979	39,207	2
3	40,725	229,211	26,107	3	19,748	81,515	3,949	3
4	38,795	20,960	84,857	3	4,747	3,979	39,207	2
5	0,391	0,358	1,291	1	0,057	0,068	0,588	1
6	0,653	2,295	0,846	1	0,264	0,760	0,152	1
7	0,391	0,358	1,291	1	0,057	0,068	0,588	1

Примечание. Расчет хронической токсичности представляет собой геометрическую среднюю концентрацию, не ведущую к видимым эффектам (NOEC), и наблюдаемой наименьшей эффективной концентрации (LOEC). ЛД₅₀ – средняя летальная доза, ЭД₅₀ – средняя эффективная доза. 1 – высокотоксичные, 2 – токсичные, 3 – опасные для водных организмов, 4 – нетоксичные (United Nations GHS, 2011).

Средствами программного продукта EPI Suite спрогнозированы характеристики метаболитов ибупрофена, позволяющие оценить их возможную экологическую “судьбу”. Основными параметрами выбраны способность веществ к биоконцентрации и биоаккумуляции в живых организмах. Под биоконцентрацией понимается процесс поступления химического соединения в водные организмы из окружающей среды путем адсорбции через дыхательные пути и кожные покровы. Биоаккумуляция – более широкое понятие, включающее поглощение веществ организмами любыми путями (перорально, дермально,

респираторно) из любых источников (вода, донные осадки, пища) (Weisbrod *et al.*, 2007).

По нашим данным, декарбоксированные продукты (соединение **6–8**) биодеструкции ибупрофена характеризуются высокими ($\log K_{ow} > 4$) показателями липофильности и, соответственно, значительными (4 999; 6 552 л/кг) показателями почвенной сорбции и биоконцентрации в живых организмах (431, 208 л/кг) (Таблица 18). Наиболее высокие показатели биоаккумуляции выявлены для ибупрофена (437 л/кг сырого веса) и карбоксилированных соединений **6** и **8** (133 л/кг сырого веса).

Таблица 18 – Показатели почвенной сорбции, биоконцентрации, биотрансформации и биоаккумуляции ибупрофена и продуктов метаболизма

Соединение*	$\log K_{ow}$	Почвенная сорбция, л/кг	Биоконцентрация		Биоаккумуляция	
			$\log BCF$	BCF, л/кг wet-wt	$\log BAF$	BAF, л/кг wet-wt
1	3,97	422,2	0.50	3.16	2.641	437
2	3,97	422,2	0.50	3.16	2.641	437
3	3,31	553,4	0.50	3.16	1.77	59.3
4	2,83	725,3	0.50	3.16	0.93	8.59
5	3,31	553,4	0.50	3.16	1.77	59.3
6	4,50	4 999	2.63	431	2.12	133
7	4,02	6 552	2.32	208	1.23	17
8	4,50	4 999	2.63	431	2.12	133

Примечание. Полученные показатели рассчитаны с использованием программного пакета EPI Suite. Соединения приведены согласно Рисунку 13.

Моделирование процесса биodeградебельности ибупрофена показало, что формирующиеся как в аэробных, так и анаэробных условиях метаболиты не являются легко биodeградебельными субстратами (Таблица 19).

Таблица 19 – Расчет биodeградабельности ибупрофена и продуктов его биодеструкции

Соединение	Aerobic		Anaerobic	Criteria
	BIOWIN 5	BIOWIN 6	BIOWIN 7	
1, 2	0,1976	0,1521	0,0334	Не является легко биodeградабельным
3	0,2060	0,1404	0,2096	
4	0,2144	0,1295	0,3857	
5	0,2060	0,1404	0,2096	
6	0,1098	0,1128	-0,0176	
7	0,1182	0,1037	0,1585	
8	0,1098	0,1128	-0,0176	

Примечание. Расчет показателей произведен с использованием программного пакета EPI Suite. Вероятность $\geq 0,5$ показывает, что соединение биodeградируется быстро; вероятность $< 0,5$ показывает, что соединение не является легко деградабельным.

Полученные сведения заставляют пересмотреть риски загрязнения природных экосистем ибупрофеном, поскольку продукты его неполного бактериального окисления, малоизученные на сегодняшний день, могут *in vivo* представлять существенно большую угрозу, нежели исходный экотоксикант.

Глава 5. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ АКТИНОМИЦЕТОВ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ИБУПРОФЕНА

5.1. Изменение морфометрических характеристик бактериальных клеток

Ответной реакцией актиномицетов на негативное воздействие ибупрофена в условиях совместного метаболизма с *n*-гексадеканом является переход клеток к сцепленному состоянию с формированием обособленных многоклеточных конгломератов неопределенной формы размером до 1,5 мм (Рисунок 15). Это, по-видимому, является адаптационным механизмом актиномицетов, позволяющим бактериальной популяции адаптироваться в условиях, при которых одиночные клетки не способны к разложению ибупрофена и его метаболитов. Такой

механизм защиты может быть предтечей запуска процесса образования биопленки. Аналогичный переход клеток *Rhodococcus* из одного состояния в другое за счет внешних условий среды (присутствия токсиканта и его метаболитов), подобное формирование сцепленных клеточных ансамблей отмечено ранее в процессе биодеструкции полициклического НПВС диклофенака (Tyumina *et al.*, 2019).

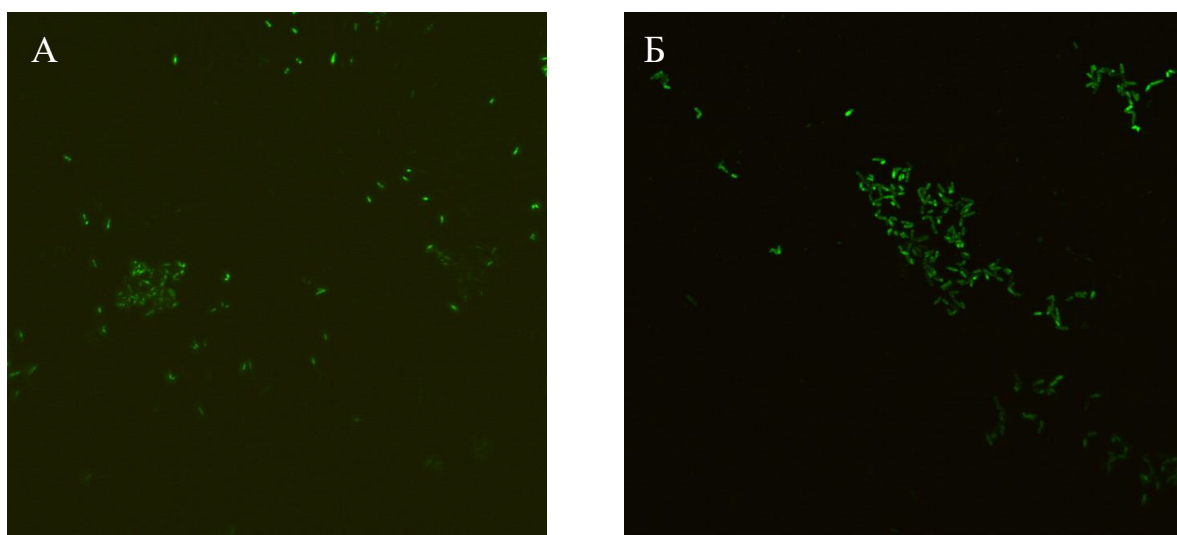


Рисунок 14 – КЛСМ-изображения *R. cerastii* ИЭГМ 1243. А – клетки выращивали в течение 3 сут в присутствии *n*-гексадекана, Б – 100 мг/л ибупрофена и *n*-гексадекана. Жизнеспособные клетки окрашены флуоресцентным красителем Syto9 (зеленое свечение)

Процесс агрегации клеток инициируется на 3 сут эксперимента и, по-видимому, связан с началом процесса активной биодеструкции ибупрофена. В первые двое суток наблюдается помутнение среды, увеличение оптической плотности за счет активного планктонного роста клеточной биомассы. Наиболее характерной особенностью роста клеток *R. cerastii* в присутствии ибупрофена является формирование рыхлых, игольчатых агрегатов палевого цвета на 3 сут эксперимента (Рисунок 15 А). Отсутствие яркой пигментации оранжевого цвета, присущей представителям вида *R. cerastii*, по-видимому, можно объяснить токсическим действием ибупрофена, которое выражается в ингибировании биосинтеза пигментов каротиноидов (Wijaya *et al.*, 2020). Агрегаты представляют собой плотные скопления клеток, окруженные полимерным собранным в тяжи

внеклеточным матриксом (Рисунок 14 Б). Аналогичные структуры наблюдали другие исследователи при росте грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* (Gilbertie *et al.*, 2019). Известно, что образование тяжей у актиномицетов способствует увеличению степени адгезии клеток (Depas, Bergkessel, Newman, 2019). В биотическом контроле в ответ на присутствие *n*-гексадекана наблюдали планктонный рост культуры. На 4–6 сут эксперимента по мере увеличения времени контактирования клеток с ибупрофеном и образования продуктов его окисления в процессе биодеструкции, истощения *n*-гексадекана в среде, а также выхода бактерий на стационарную фазу роста агрегация клеток усиливалась, сопровождаясь образованием ярко-оранжевых бактериальных “комков” размером до 15 мм. В биотическом контроле по мере потребления *n*-гексадекана на 5 сут эксперимента наблюдали образование яркоокрашенных мелких плотных агрегатов на фоне значительного количества одиночных клеток.

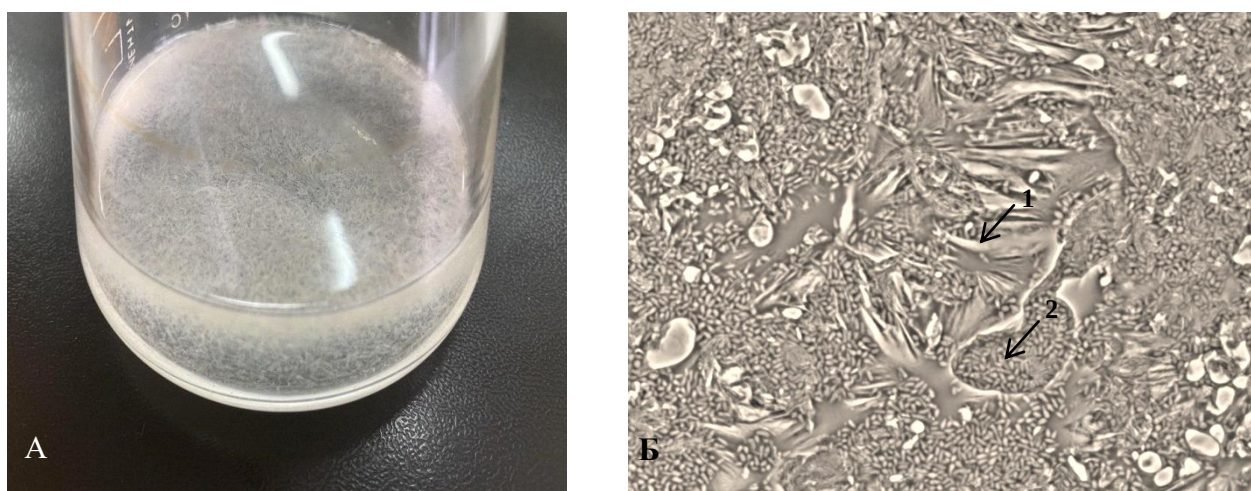


Рисунок 15 – Агрегаты клеток, формирующиеся в среде культивирования *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии *n*-гексадекана и 100 мг/л ибупрофена на 3 сут эксперимента. А – внешний вид культуральной среды; Б – увеличение $\times 1000$ (фазовый контраст). 1 – тяжи; 2 – бактериальные клетки

Использование системы совмещенного атомно-силового и лазерного сканирующего микрокопирования позволило получить точные дифференцированные данные о размерных параметрах и особенностях рельефа живых и мертвых клеток актиномицетов в присутствии ибупрофена. Наиболее

интересными оказались сведения о состоянии клеток на 4 сут эксперимента, что связано с активным процессом бактериальной деструкции ибупрофена и накоплением продуктов его деструкции в среде культивирования. Как видно из Таблицы 20, в первые сутки эксперимента значительной разницы в морфологии клеток в присутствии ибупрофена по сравнению с контрольными вариантами опыта не выявлено. Однако при этом отмечалось выраженное увеличение среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности (Таблица 20, Рисунок 16). На четвертые сут эксперимента клетки сильно изменяли свою форму за счет укорочения (в 1,5 раза) длины и увеличения (в 1,7 раз) ширины (см. Таблица 20, Рисунок 18, 17). При этом отмечалось значительное (в 1,7 раза) уменьшение соотношения площади поверхности клетки к ее объему (S/V), что, по-видимому, является механизмом защиты на присутствие в среде токсичных метаболитов ибупрофена. В это же время регистрировали снижение показателей степени шероховатости клеточной поверхности, открытой для прямого контакта с экстрессором (см. Рисунок 17).

Таблица 20 – Морфометрические параметры клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, выращенных в присутствии ибупрофена и *n*-гексадекана (контроль)

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

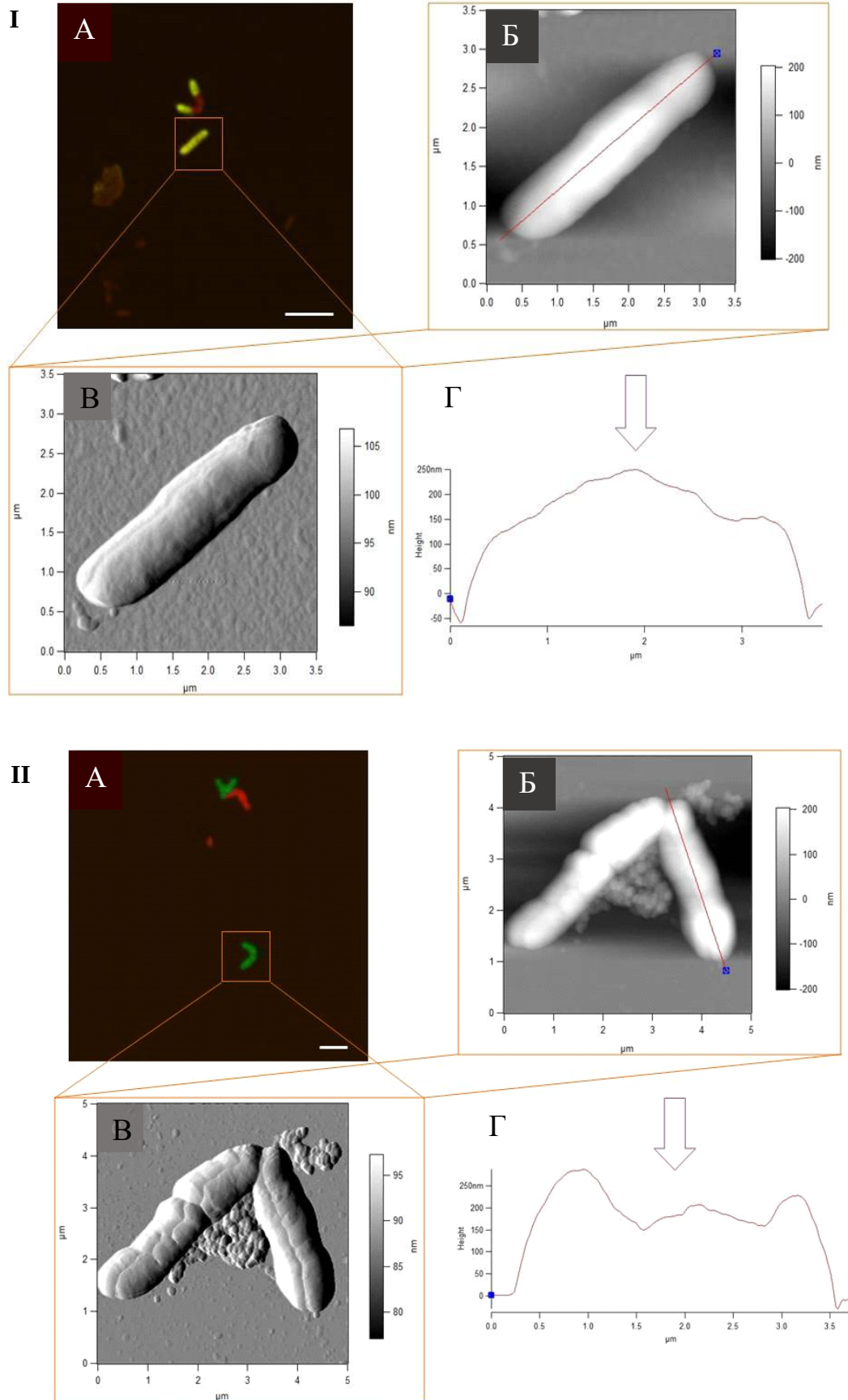


Рисунок 16 – КЛСМ (А), АСМ (Б, В) изображения и профили (Г) клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, выращенных в течение 24 ч в присутствии

***n*-гексадекана (I) и 100 мг/л ибупрофена и *n*-гексадекана (II). Шкала на КЛСМ-изображениях соответствует 5 мкм**

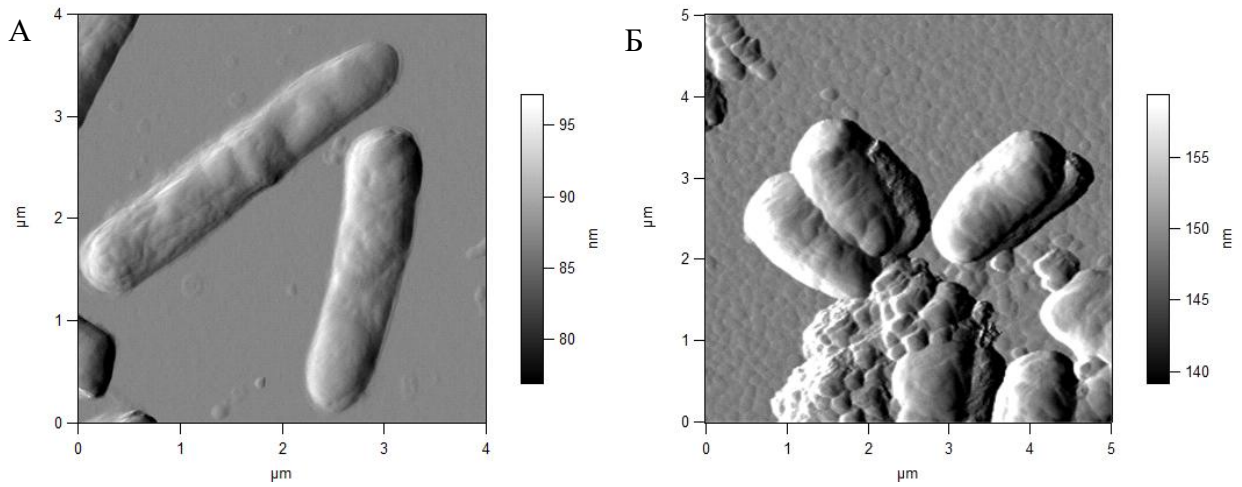


Рисунок 17 – АСМ-изображения *R. cerastii* ИЭГМ 1243. А – клетки выращивали в течение 4 сут в присутствии *n*-гексадекана, Б – *n*-гексадекана и 100 мг/л ибупрофена.

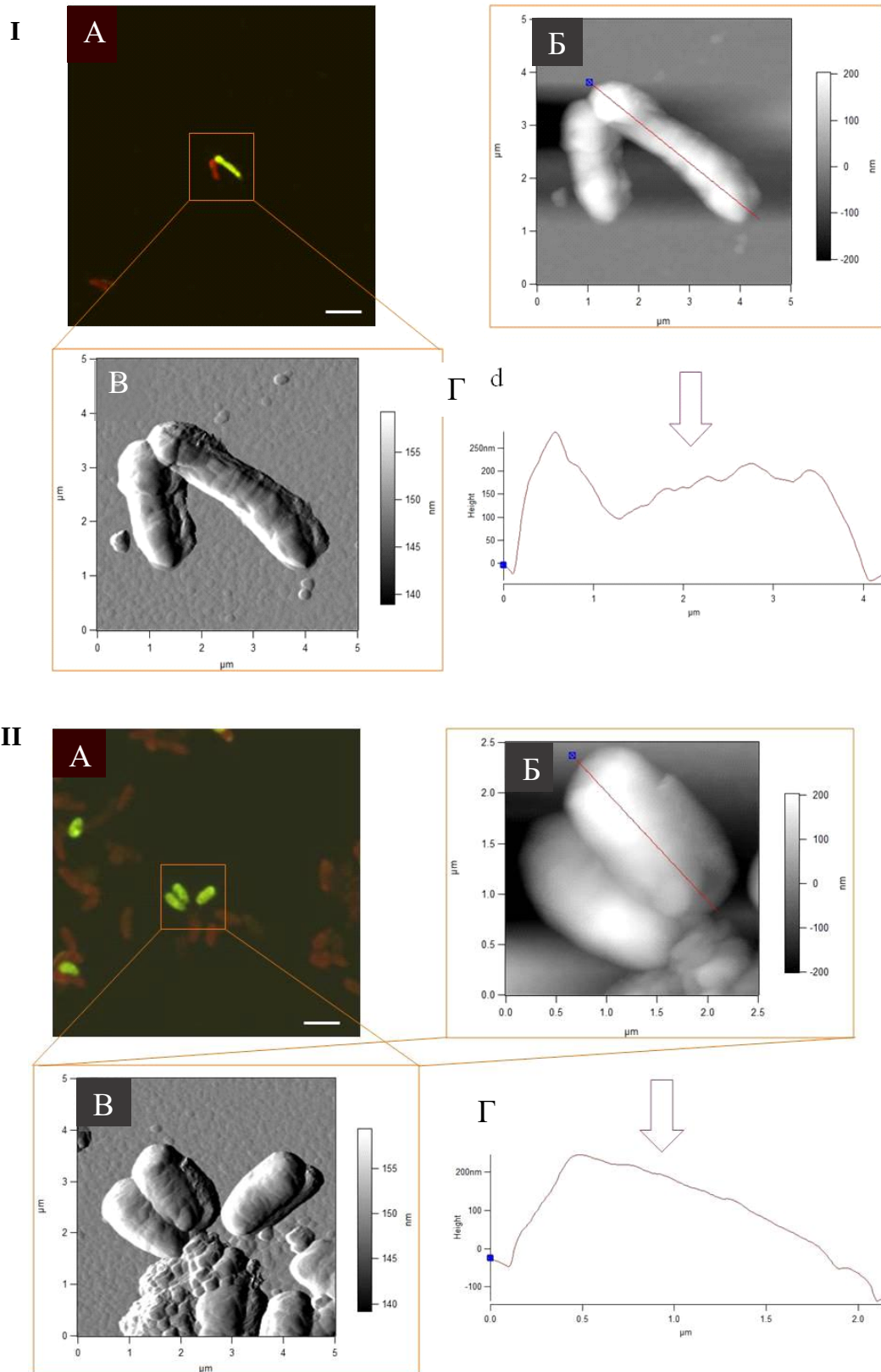


Рисунок 18 – КЛСМ (А), АСМ (Б, В) изображения и профили (Г) клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, выращенных в течение 4 сут в присутствии *n*-гексадекана (I) и 100 мг/л ибупрофена и *n*-гексадекана (II). Шкала на КЛСМ-изображениях соответствует 5 мкм

5.2. Изменения в ультраструктуре бактериальных клеток

С целью дальнейшего изучения влияния ибупрофена на клетки актиномицетов были получены данные сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Рисунок 19). Во всех случаях клетки были интактны, без выраженных внешних изменений из-за воздействия ибупрофена.

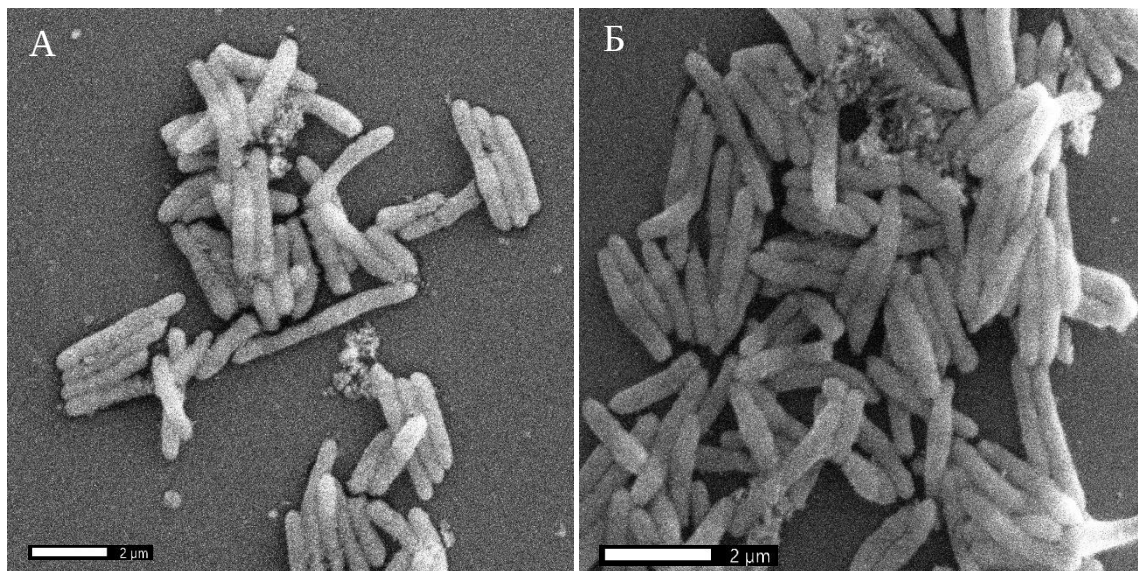


Рисунок 19 – СЭМ-изображения поверхности скоплений клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, выращенных в условиях МПБ в отсутствии (А) и в присутствии (Б) ибупрофена

Углубленный анализ ультраструктуры клеток актиномицетов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показал наличие электронно-прозрачных включений внутри клеток, предположительно липидных капель (Рисунок 20).

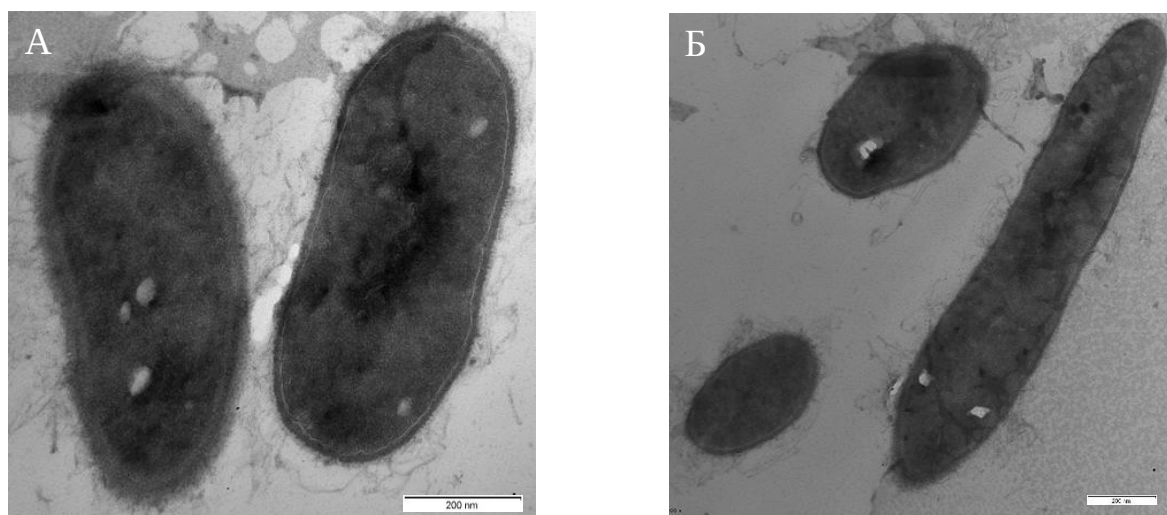


Рисунок 20 – ПЭМ изображения ультраструктуры клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, выращенных в условиях МПБ в отсутствии (А) и в присутствии (Б) ибупрофена

В целом, исследование ультраструктуры актинобмицетов независимо от условий культивирования (Рисунок 19) позволило выявить несколько типичных характеристик бактериальных клеток: внутрицитоплазматический мембранный аппарат состоит из мелких, слабо развитых, несложных мезосомоподобных структур, в цитоплазме клеток присутствуют единичные электронно-плотные и электронно-прозрачные включения округлой формы (полифосфаты и липиды соответственно). Растущие клетки делятся при помощи поперечных перегородок, формирующихся чаще всего посередине клетки. Перегородки состоят из двух электронно-плотных слоев, между которыми находится осмиофобное пространство. По предварительным оценкам, значимого влияния на ультраструктуру клеток штамма ибупрофен не оказывал.

5.3. Изменение электрокинетического потенциала клеток

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

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

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

5.4. Изменение каталазной активности актиномицетов

Каталаза, как жизненно важный антиоксидантный фермент, играет значимую роль в восстановлении перекиси водорода (H_2O_2) до молекулярного кислорода. Каталазная активность бактерий является индикатором их способности к биодеструкции ксенобиотиков и способствует выживанию бактерий в условиях окружающей среды (Гоголева, 2012). Этот фермент играет важную роль в реакции бактерий на окислительный стресс и деградации ксенобиотиков, в том числе фармполлютантов. Актиномицеты хорошо известны высокой каталазной активностью, что делает их устойчивыми и хорошо адаптирующимися к окислительному стрессу микроорганизмами.

По нашим данным, культивирование актиномицетов в присутствии ибупрофена приводило к изменению их каталазной активности (Рисунок 21).

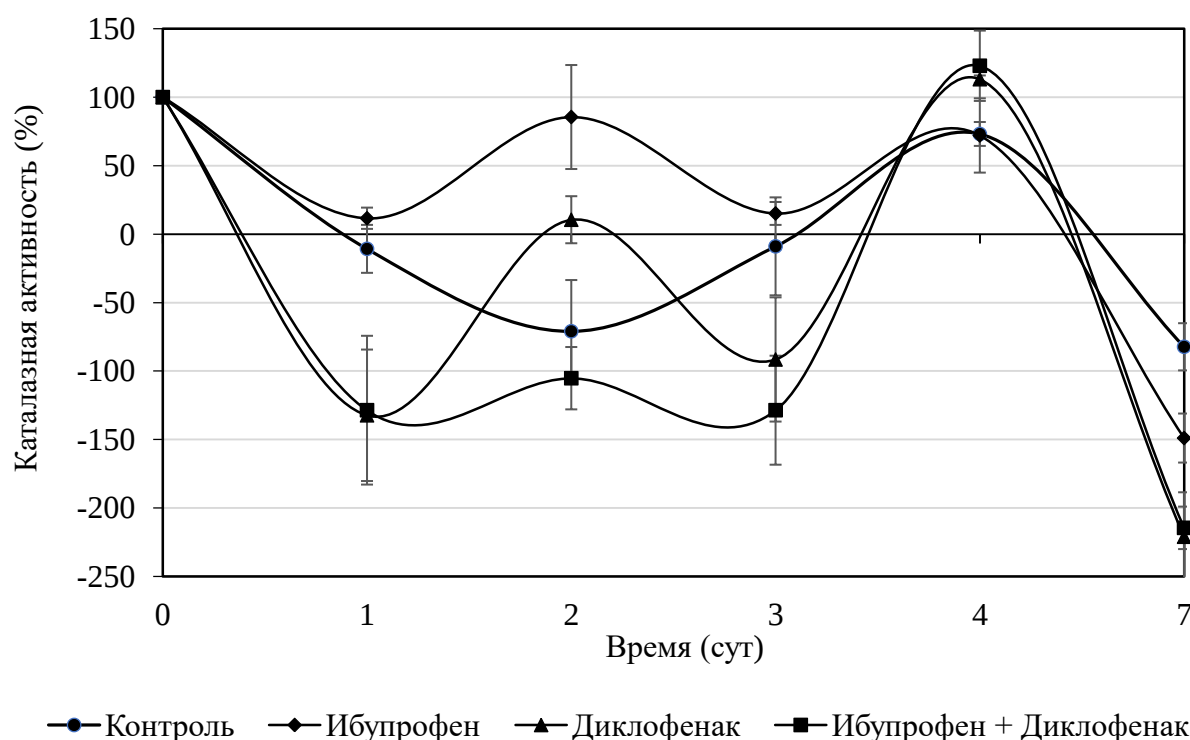


Рисунок 21 – Каталазная активность *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии НПВС

Исходная каталазная активность *R. cerastii* ИЭГМ 1243 составила 0,66 отн. ед., что было принято за 100%. В течение первых суток во всех тестируемых вариантах наблюдалось снижение активности каталазы. Наиболее значимые изменения каталазной активности клеток наблюдались в присутствии диклофенака и смеси НПВС. Снижение активности каталазы в данных условиях в течение первых 3 дней можно объяснить тем, что клетки дольше находятся в лаг-фазе роста. На вторые сутки отмечалось повышение активности каталазы в присутствии НПВС, тогда как в контрольной группе активность фермента продолжала снижаться. Обратная картина наблюдалась на третий день. Увеличение активности каталазы в образцах с НПВС на 4-е сутки можно объяснить вступлением бактерий в фазу экспоненциального роста, активной деградацией НПВС и возможным накоплением метаболитов. Снижение активности каталазы во всех образцах биомассы на 7-е сутки, по всей вероятности, связано с переходом к стационарной фазе роста.

5.5. Формирование липидных включений в бактериальных клетках

Окрашивание бактерий нильским красным выявило наличие небольшого количества липидных включений, в основном расположенных на периферии клеток (Рисунок 22). На 4-е сутки эксперимента наблюдалась тенденция к накоплению липидных включений во всех вариантах, особенно выраженная в контроле и в присутствии ибупрофена. Число включений достигало до 10 на клетку, преимущественно локализованных в центральной части клетки. В случае смеси НПВС количество и размер липидов были меньше, а включения чаще располагались на периферии клеток.

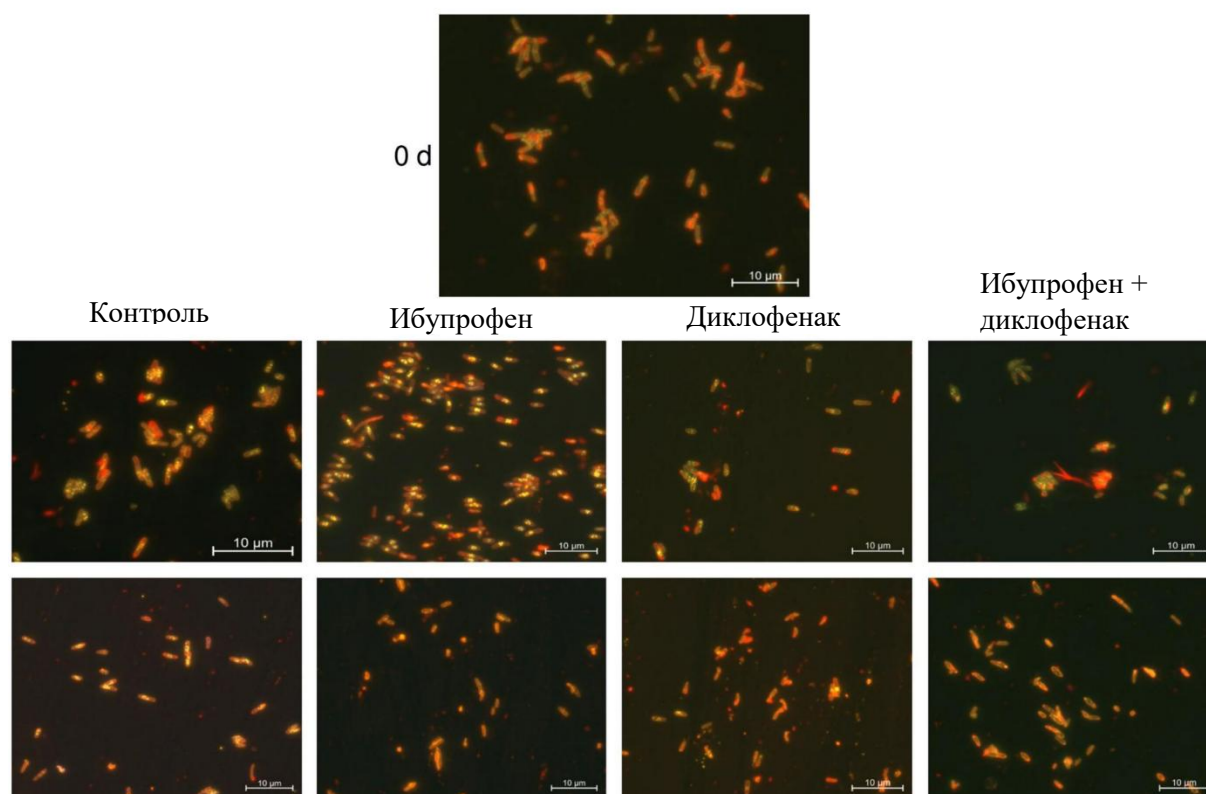


Рисунок 22 – Изображения клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243, окрашенных нильским красным, полученные посредством флуоресцентной микроскопии. Клетки культивировали в минеральной среде с добавлением глюкозы (контроль), ибупрофена (50 мг/л), диклофенака (50 мг/л), или их смеси. Желтые точки – липидные включения

Через 7 дней наблюдения в контрольных клетках сохранялось значительное количество липидных включений; однако наблюдались также отдельные клетки без внутриклеточных липидов. В присутствии НПВС клетки, вероятно, истощали

свои липидные запасы, при этом отдельные липидные гранулы располагались на периферии клеток (ибупрофен и смесь НПВС) или в центре клеток (диклофенак).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тотальное распространение фармполлютантов в открытых экосистемах по всему миру рассматривается как глобальная экологическая проблема. Попадание лекарственных соединений в окружающую среду, их накопление в донных отложениях и пищевых цепях несет серьезные потенциальные риски острого и хронического отравления для всех живых существ, приводит к экологическим катастрофам. Ибупрофен, широко применяемый в медицинской практике по всему миру, является одним из наиболее распространенных фармполлютантов в окружающей среде. Химическая стабильность молекулы, высокая биодоступность и способность проходить технические фильтры делают его опасным и непредсказуемым экополлютантом. Физико-химические методы детоксикации микроэкофармполлютантов малоэффективны, энерго- и ресурсозатратны. В связи с этим сегодня активно разрабатываются способы биодеструкции фармацевтических загрязнителей с использованием микроорганизмов, способных к эффективной детоксикации и удалению лекарственных соединений из водных и почвенных экосистем (Ivshina *et al.*, 2012, 2015; Bragança *et al.*, 2016; Aissaoui *et al.*, 2017; Facey *et al.*, 2018).

Нарастает интерес к изучению токсического воздействия фармполлютантов на природные микроорганизмы, играющие роль системы первичного реагирования на негативные воздействия загрязнителей и инициирующие адаптивные реакции. Углубленное изучение механизмов и возможных путей детоксикации и биodeградации фармполлютантов, поиск новых штаммов-активных биодеструкторов с детально изученными биохимическими характеристиками позволят создать предпосылки для реализации новых технологических решений процессов доочистки сточных вод предприятий фармацевтического профиля, а также разработки альтернативных биотехнологических способов обезвреживания опасных фармацевтических отходов (Corcoll *et al.*, 2014; Grenni *et al.*, 2014; Cysoń *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2019).

Среди микроорганизмов, участвующих в процессах самоочищения природных экосистем, важную экологическую роль играют бактерии рода *Rhodococcus*, занимающие одно из доминирующих положений в антропогенно нарушенных и загрязненных биотопах, способные метаболизировать в экстремальных экологических условиях, обладающие высокой активностью оксидоредуктаз, богатыми адаптивными возможностями в отношении различных стабильных токсических соединений, а также высоким потенциалом для биоремедиации загрязненных объектов (Larkin *et al.*, 2006; Cappelletti *et al.*, 2019; Krivoruchko *et al.*, 2019; Kuyukina, Ivshina, 2019a).

В результате масштабного (190 штаммов) скрининга актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, <http://www.iegmc.ru>) отобран штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243, характеризующийся наиболее высокой (МПК $\geq 1\ 000$ мг/л) резистентностью к ибупрофену. Данный штамм способен к полной биодеструкции ибупрофена в концентрации 100 мг/л в минеральной среде в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об.%) и глюкозы (1 г/л) в течение 36 ч., причем к биодеструкции более чем 50% от начальной концентрации 100 мг/л ибупрофена за первые сутки эксперимента. Установлено, что в процессе окисления ибупрофена задействованы цитоплазматические ферментные комплексы. В условиях лабораторного биореактора показано существенное снижение скорости биодеструкции ибупрофена, при этом уровень биодеструкции поллютанта находится в прямой зависимости от поглощения кислорода растущей биомассой. Под влиянием ибупрофена и его метаболитов наблюдается переход актиномицетов от одиночного состояния к агрегатному существованию, сопровождающийся выраженной морфологической аномалией клеток (изменение их формы и размеров, параметров шероховатости клеточной поверхности), смещением ζ -потенциала в область более отрицательных значений.

Описаны начальные этапы биоконверсии ибупрофена с использованием клеток *R. cerastii* ИЭГМ 1243 с образованием гидроксильированных и карбоксилированных производных.

Задokumentированная высокая токсичность ибупрофена и продуктов его неполного окисления свидетельствует о тотальной недооценке степени современного экологического риска, связанного с загрязнением окружающей среды этим микрофармзагрязнителем. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости более детального описания путей его метаболизации не только в естественных условиях для объективной оценки анализируемой опасности воздействия ибупрофена на природные экосистемы, но и в промышленных условиях с использованием стабильных биокатализаторов, пригодных для оптимизации процессов детоксикации сточных вод фармацевтических предприятий и обезвреживания фармотходов.

Поскольку в последние десятилетия фармпрепараты и их метаболиты все чаще детектируют в окружающей среде, одной из главных социальных проблем является разработка сценариев минимизации негативного влияния их на естественную биоту и устойчивость природных экосистем. Будущие исследования в этой области должны быть сосредоточены на преодолении этих проблем и принятии адекватных мер по предупреждению и снижению экологических рисков от медикаментозного загрязнения окружающей среды. Эти исследования в первую очередь должны быть направлены на углубленное изучение с использованием современных геномных и биоинформатических инструментов специфических особенностей взаимодействия “фармполлютант – микроорганизм”, что необходимо для понимания механизмов защиты нативной микробиоты от реального пагубного воздействия антропогенных агентов загрязнения и разработки эффективных способов их нейтрализации и выведения из водных и сухопутных экосистем.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИК – инфракрасный

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ИЭГМ – Институт экологии и генетики микроорганизмов

ЛД₅₀ – средняя летальная доза

МПБ – мясопептонный бульон

МПК – минимальная подавляющая концентрация

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

НР – нежелательные реакции

ОП – оптическая плотность

ЦОГ – циклооксигеназа

AOP – Advaned Oxidation Process

CYP450 – цитохром-P450 зависимые монооксигеназы

ECOSAR – Ecological Structure Activity Relationships

EPA – Environmental Protection Agency

EPI – Estimation Programs Interface

GST – Glutathione S-transferase

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances

WDCM – World Data Centre for Microorgannisms

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимкин, В. Г. Нормативы образования медицинских отходов, их практическое значение в учетной политике количества и объема отходов классов А, Б и В в медицинских организациях мегаполисов (на примере Москвы) / В. Г. Акимкин [и соавт.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 6(79). – С. 62–67.
2. Баренбойм, Г. М. Загрязнение поверхностных и сточных вод лекарственными препаратами / Г. М. Баренбойм, М. А. Чиганова // Вода: Химия и экология. – 2012. – № 10. – С. 40–46.
3. Баренбойм, Г. М. Загрязнение природных вод лекарствами / Г. М. Баренбойм, М. А. Чиганова. – М: Наука, 2015. – 283 с.
4. Веслополова, Е. М. Микрометод определения численности колонеобразующих единиц микроорганизмов / Е. М. Веслополова // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 2. – С. 279–284.
5. Всемирная Организация Здравоохранения: Медицинские отходы. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste> (дата обращения: 23.05.2020).
6. Гетьман, М. А. Прогнозирование и контроль поступления остатков ЛС в окружающую среду / М. А. Гетьман, И. А. Наркевич // Ремедиум. – 2013. – № 5. – С. 36–43.
7. Годовой отчет DSM Group – 2019. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://dsm.ru/docs/analytics/2019_Report_rus_2019.pdf (дата обращения: 12.03.2025).
8. Долина, Л. Ф. Очистка вод от остатков лекарственных препаратов / Л. Ф. Долина, О. П. Савина // Наука и прогресс транспорта. Вестник Днепропетровского национального университета железнодорожного транспорта. – 2018. – № 1. – С. 36–50.
9. Желовицкая, А. В. Применение перспективных окислительных процессов для очистки сточных вод, содержащих фармацевтические препараты

(обзор) / А. В. Желовицкая [и соавт.] // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 20. – С. 73–79.

10. Зиновьева, Ю. Э. Маркетинговое исследование рынка нестероидных противовоспалительных препаратов / Ю. Э. Зиновьева // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2017. – Т. 7. – С. 6–12.

11. Иванец, А. И. Окислительная деструкция ибупрофена в присутствии фентон-катализатора на основе наночастиц MgFe_2O_4 / А. И. Иванец [и соавт.] // Вестник Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. – 2019. – № 3. – С. 345–351.

12. Ившина, И. Б. Пропанокисляющие родококки / И. Б. Ившина, Р. А. Пшеничнов, А. А. Оборин. – Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. – 123 с.

13. Ившина, И. Б. Углеводородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография / И. Б. Ившина [и соавт.]. – УрО РАН, 2021. – 140 с.

14. Козырев, С. В. Новый фактор экологического риска: лекарственные вещества в окружающей среде и питьевой воде / С. В. Козырев, В. В. Кораблев, П. П. Якуцени // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Наука и образование. – 2012. – № 4. – С. 195–200.

15. Коноплева, Е. В. Фармакология. Учебник и практикум для среднего профессионального образования / Е. В. Коноплева. – М: Издательство Юрайт, 2019. – 433 с.

16. Корж, Е.А. Кинетика адсорбции фармацевтических веществ из водных растворов на активных углях / Е. А. Корж, С. К. Смолин, Н. А. Клименко // Химия и технология воды. – 2016. – Т. 38, № 4. – С. 342–353.

17. Коршунова, И. О. Влияние органических растворителей на морфофункциональные и наномеханические свойства родококков: дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Коршунова Ирина Олеговна. – 2016. – 128 с.

18. Крюков, А. Е. Профилактика внутрибольничных инфекций при контакте с медицинскими отходами / А. Е. Крюков, С. В. Коновалов // Медицинская сестра. – 2013. – № 5. – С. 17–21.

19. Лазаренко, Л. В. Лекарственные поражения печени и поджелудочной железы у животных при использовании нестероидных противовоспалительных препаратов: монография / Л. В. Лазаренко. – Пермь: ФКОУ ВО Пермский институт ФСИН России, 2016. – 94 с.
20. Минашкина, А. В. Источники образования медицинских отходов и их объёмы в Калининградской области / А. В. Минашкина, С. В. Кондратенко // Вестник молодёжной науки. – 2017. – № 4 (11). – С. 1–9.
21. Миронов, А. Н. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.
22. Мухутдинова, А. Н. Фармацевтические соединения на основе азотсодержащих гетероциклов – новый класс загрязнителей окружающей среды / А. Н. Мухутдинова [и соавт.] // Вестник Пермского Университета. – 2015. – № 1. – С. 65–76.
23. Некрасова, Л. И. Одновременное определение ряда лекарственных соединения методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии высокого разрешения/ Л. И. Некрасова [и соавт.] // Аналитика. – 2012. – № 2. – С. 38–44.
24. Николаева, Д. Отходы преткновения. // Коммерсантъ. 04.12.2017 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.kommersant.ru/doc/3486022> (дата обращения: 12.03.2025).
25. Новикова, Ю.А. Основные направления минимизации рисков здоровью населения, обусловленных загрязнением поверхностных источников питьевого водоснабжения лекарственными средствами / Ю. А. Новикова, О. Л. Маркова, К. Б. Фридман // Гигиена и санитария. – 2018. – № 97 (12). – С. 1166–1170.
26. Овсепян, В. Сравнительная характеристика парацетамола и ибупрофена и влияние условий их хранения на микробиологическую чистоту / В. Овсепян, С. Асатрян // Sciences of Europe. – 2018. – № 27. – С. 56–61.

27. Олейникова, Т. А. Анализ тенденций развития фармацевтического рынка нестероидных противовоспалительных препаратов в России / Т. А. Олейникова, Д. И. Пожидаева // Ремедиум. – 2018. – № 5. – С. 14–20.
28. Остроумова, О. Д. Лекарственно-индуцированная сердечная недостаточность (Часть 1: Актуальность, распространенность, причины) / О. Д. Остроумова, И. В. Голобородова // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 23–35.
29. Хохлова, А. Отхожий бизнес. // Бизнес Класс 02.02.2020 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.business-class.su/news/2020/02/06/othozhii-biznes> (дата обращения: 12.03.2025).
30. Пермские эксперты ОНФ предложили властям разработать территориальную схему образования медицинских отходов с пунктами обезвреживания // Народный Фронт. 12.02.2020. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://onf.ru/2020/02/12/permskie-eksperty-onf-predlozhili-vlastyam-razrabotat-territorialnuyu-shemu-obrazovaniya/> (дата обращения: 31.07.2023).
31. Прожерина, Ю. Фармацевтические отходы как новая экологическая проблема / Ю. Прожерина // Ремедиум. – 2017. – № 11. – С. 15–19.
32. Регистр Лекарственных Средств России [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/>. (дата обращения: 12.03.2025).
33. Романенко, В. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов / В. И. Романенко, С. И. Кузнецов. – Ленинград: Наука, 1974. – 194 с.
34. Русаков, Н. В. Обращение с медицинскими отходами: идеология, гигиена, экология / Н. В. Русаков, А. П. Щербо, О. В. Мироненко // Экология человека. – 2018. – № 7. – С. 4–10.
35. Русских, Я. В. Лекарственные соединения в водных объектах Северо-Запада России / Я. В. Русских [и соавт.] // Региональная экология. – 2014. – № 1–2 (35). – С. 77–83.
36. Самойленко, Н. Н. Использование электрохимической деструкции для обезвреживания сточных вод лечебных учреждений / Н. Н. Самойленко, И. М.

Ермакович // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2014. – № 4/10(70). – С.18–21.

37. Сергиенко, В. И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева. – М: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – 256 с.

38. Тюмина, Е. А. Поиск новых путей утилизации непригодных к медицинскому использованию лекарственных средств / Е. А. Тюмина, К. А. Мигачева, А. Н. Мухутдинова // Вестник РУДН. Серия Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2015. – № 4. – С. 68–73.

39. Улумбекова, Г. Э. Анализ рынка лекарственных препаратов в РФ / Г. Э. Улумбекова, А. В. Калашникова // Вестник ВШОУЗ. – 2019. – № 4 (14). – С. 53–76.

40. Ушкалова, Е.А. Безопасность и переносимость НПВС: фокус на ацеклофенак / Е. А. Ушкалова, С. К. Зырянов, К. Э. Затолочина // Медицинский совет. – 2019. – № 9. – С. 110–120.

41. Харкевич, Д. А. Фармакология. Учебник для вузов / Д. А. Харкевич. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 908 с.

42. Чичасова, Н. В. Проблема оценки эффективности и безопасности нестероидных противовоспалительных препаратов / Н. В. Чичасова // Современная ревматология. – 2016. – № 2. – С. 83–88.

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

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

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

46. Almeida, B. Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11 / B. Almeida [et al.] // Biodegradation. – 2013. – Vol. 24. – P. 615–630.
47. Alvarez, A. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals / A. Alvarez [et al.] // Chemosphere. – 2017. – Vol. 166. – P. 41–62.
48. Anteneh, Y. S. Whole cell actinobacteria as biocatalysts / Y. S. Anteneh, C. M. M. Franco // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – Article 77.
49. Araujo, L. Persistence of ibuprofen, ketoprofen, diclofenac and clofibrilic acid in natural waters / L. Araujo [et al.] // Journal of the Human Environment. – 2014. – Vol. 1. – P. 32–38.
50. Ashfaq, M. Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan / M. Ashfaq [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2017. – Vol. 136. – P. 31–39.
51. Ashrap, P. Discovery of a widespread metabolic pathway within and among phenolic xenobiotics / P. Ashrap [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – Vol. 114, No. 23. – P. 6062–6067.
52. aus der Beek, T. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives / T. aus der Beek [et al.] // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2016. – Vol. 35. – P. 828–835.
53. Aydin, S. Monitoring the release of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in the receiving environment / S. Aydin [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2019. – Vol. 26. – P. 36887–36902.
54. Backhaus, T. Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures / T. Backhaus // Philosophical Transactions of the Royal Society. Biological Sciences. – 2014. – Vol. 369. – P. 1–11.
55. Bácsi, I. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages / I. Bácsi [et al.] // Environmental Pollution. – 2016. – Vol. 212. – P. 508–518.

56. Baena-Nogueras, R. M. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation / R. M. Baena-Nogueras [*et al.*] // *The Science of The Total Environment*. – 2017. – Vol. 590–591. – P. 643–654.
57. Baghel, U. S. Application of mass spectroscopy in pharmaceutical and biomedical analysis / U.S. Baghel [*et al.*] // *Developments and Applications*. 2017. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.intechopen.com/books/spectroscopic-analyses-developments-and-applications/application-of-mass-spectroscopy-in-pharmaceutical-and-biomedical-analysis> (дата обращения: 12.03.2025).
58. Bai, Y. An efficient photocatalyst for degradation of various organic dyes: Ag@Ag₂MoO₄–AgBr composite / Y. Bai, Y. Lu, J-K. Liu // *Journal of Hazardous Materials*. – 2016. – Vol. 307. – P. 26–35.
59. Balciunas, E. M. Increasing ibuprofen degradation in constructed wetlands by bioaugmentation with gravel containing biofilms of an ibuprofen-degrading *Sphingobium yanoikuyae* / E. M. Balciunas [*et al.*] // *Engineering in Life Sciences*. – 2020. – Vol. 20(5–6). – P. 160–167.
60. Barroso, P. J. Emerging contaminants in the atmosphere: Analysis, occurrence and future challenges / P. J. Barroso [*et al.*] // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 2019. – Vol. 49. – P. 104–171.
61. Bashaar, M. Disposal practices of unused and expired pharmaceuticals among general public in Kabul / M. Bashaar [*et al.*] // *BMC Public Health*. – 2017. – Vol. 17. – Article 45.
62. Bhala, N. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: metaanalyses of individual participant data from randomised trials / N. Bhala [*et al.*] // *Lancet*. – 2013. – Vol. 382. – P. 769–779.
63. Biel-Maeso, M. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain) / M. Biel-Maeso [*et al.*] // *The Science of The Total Environment*. – 2018. – Vol. 612. – P. 649–659.

64. Blowey, L.D. Drug use and dosage in renal failure // *Comprehensive Pediatric Nephrology*. – 2008. – Vol. 64. – P. 991–1002.
65. Bo, L. Biodegradation of trace pharmaceutical substances in wastewater by a membrane bioreactor / L. Bo [*et al.*] // *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*. – 2009. – Vol. 3, No. 2. – P. 236–240.
66. Botero-Coy, A. M. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater / A.M. Botero-Coy [*et al.*] // *The Science of The Total Environment*. – 2018. – Vol. 642. – P. 842–853.
67. Bouissou-Schurtz, C. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey / C. Bouissou-Schurtz [*et al.*] // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2014. – Vol. 69. – P. 296–303.
68. Bragança, I. Cometabolic degradation of antiinflammatory and analgesic pharmaceuticals by a pentane enrichment culture / I. Bragança [*et al.*] // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2016. – Vol. 227. – Article 227.
69. Brown, A. Pharma industry confronts growing problem of pharmaceutical waste // *Nordic Lifescience*. 11.06.2020. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://nordiclifescience.org/pharma-industry-confronts-growing-problem-of-pharmaceutical-waste> (дата обращения: 12.03.2025).
70. Cai, Zh. Application of nanotechnologies for removing pharmaceutically active compounds in water: Development and future trends / Zh. Cai [*et al.*] // *Environmental Science: Nano*. – 2017. – Vol. 5. – P. 1–22.
71. Camacho-Muñoz, D. Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain) / D. Camacho-Muñoz [*et al.*] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2010. – Vol. 183. – P. 602–608.
72. Cappelletti, M. Genomics of *Rhodococcus* / M. Cappelletti [*et al.*] // *Biology of Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 23–60.
73. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.iegmc.ru/strains/index.html>. (Дата обращения: 12.02.2025)

74. Celiz, M. D. Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks / M. D. Celiz [et al.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2009. – Vol. 28. – P. 2473–2484.
75. Česen, M. The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river / M. Česen [et al.] // *The Science of The Total Environment*. – 2019. – Vol. 650. – P. 2446–2453.
76. Chen, Y. Microbial transformation of ibuprofen by a *Nocardia* species / Y. Chen, J. P. Rosazza // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – Vol. 60. – P. 1292–1296.
77. Chopra, S. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation / S. Chopra, D. Kumar // *Helyon*. – 2020. – Vol. 6. – P. 1–11.
78. Collard, H. J. Toxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) and two freshwater invertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) after chronic exposure to mefenamic acid / H. J. Collard [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2013. – Vol. 94. – P. 80–86.
79. Corcoll, N. Pollution-induced community tolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents / N. Corcoll [et al.] // *Chemosphere*. – 2014. – Vol. 112. – P. 185–193.
80. Cycoń, M. Variable effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on selected biochemical processes mediated by soil microorganisms / M. Cycoń [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – Article 1969.
81. Czyrski, A. Determination of the lipophilicity of ibuprofen, naproxen, ketoprofen, and flurbiprofen with thin-layer chromatography // *Journal of Chemistry*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–6.
82. Davids, M. The effects of ibuprofen on activated sludge: Shift in bacterial community structure and resistance to ciprofloxacin / M. Davids [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2017. – Vol. 340. – P. 291–299.

83. Dawas-Massalha, A. Co-metabolic oxidation of pharmaceutical compounds by a nitrifying bacterial enrichment / A. Dawas-Massalha [et al.] // Bioresource Technology. – 2014. – Vol. 167. – P. 336–342.
84. de Carvalho, C. C. C. R. Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents // Biology of *Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 103–135.
85. 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. – Vol. 51. – P. 389–399.
86. de Wilt, A. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams / A. de Wilt [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2016. – Vol. 304. – P. 84–92.
87. Depas, W. H. Aggregation of nontuberculous mycobacteria is regulated by carbon-nitrogen balance / W. H. Depas, M. Bergkessel, D. K. Newman // MBio. – 2019. – Vol. 10. – Article e01715-19.
88. Desbiolles, F. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? / F. Desbiolles [et al.] // Science of The Total Environment. – 2018. – Vol. 639. – P. 1334–1348.
89. Di Canito, A. Genome-based analysis for the identification of genes involved in o-xylene degradation in *Rhodococcus opacus* R7 / A. Di Canito [et al.] // BMC Genomics. – 2018. – Vol. 19. – P. 1–17.
90. Ding, T. Toxicity, degradation and metabolic fate of ibuprofen on freshwater diatom *Navicula* sp. / T. Ding [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2017. – Vol. 330. – P. 127–134.
91. Domaradzka, D. Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs / D. Domaradzka, U. Guzik, D. Wojcieszynska // Reviews of Environment Science Bio/Technology. – 2015. – Vol. 14. – P. 229–239.
92. Drugbank [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.drugbank.ca/stats> (дата обращения: 13.03.2025).

93. Drugs.com. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.drugs.com/> (дата обращения: 13.03.2025).
94. Elkin, A. A. Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides by *Gordonia terrae* IEGM 136 and *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 / A. A. Elkin [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – Vol. 89. – P. 82–85.
95. Ellepola, N. A toxicological study on photo-degradation products of environmental ibuprofen: Ecological and human health implications / N. Ellepola [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2020. – Vol. 188. – P. 109892.
96. Ericson, H. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels / H. Ericson, G. Thorsén, L. Kumblad // Aquatic Toxicology. – 2010. – Vol. 99. – P. 223–231.
97. European Environment Agency. Pharmaceuticals in the environment: results of an EEA Workshop. Copenhagen: EEA; 2010 EEA Technical Report. 2010.
98. Evangelista, S. The recalcitrance of clofibric acid to microbial degradation / S. Evangelista [et al.] // WIT Transactions on Ecology and the Environment. – 2008. – Vol. 111. – P. 273–278.
99. Fabbri, E. Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna // Annals of The New York Academy of Science. – 2014. – Vol. 3. – P. 1–9.
100. Facey, S. J. Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms / S. J. Facey [et al.] // Environmental Technology & Innovation. – 2018. – Vol. 10. – P. 55–61.
101. Fatta, D. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater / D. Fatta [et al.] // Trends in Analytical Chemistry. – 2007. – Vol. 26(6). – P. 515–533.
102. Felicity, T. Pharmaceutical waste in the environment // Public Health Panorama. – 2017. – Vol. 3. – P. 133–140.
103. Fortunato, M. S. Aerobic degradation of ibuprofen in batch and continuous reactors by an indigenous bacterial community / M. S. Fortunato [et al.] // Environmental Technology. – 2016. – Vol. 37(20). – P. 2617–2626.

104. Furlong, E. T. Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory — determination of humanhealth pharmaceuticals in filtered water by chemicallymodified styrene-divinylbenzene resin-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry / E. T. Furlong [*et al.*] // U.S. Geological Survey Techniques and Methods, 2008. – Book 5, Chap A9. – 56 p.
105. Gao, X. Comparative study of the toxicity between three non-steroidal anti-inflammatory drugs and their UV/Na₂S₂O₈ degradation products on *Cyprinus carpio* / X. Gao [*et al.*] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8(1). – P. 1–11.
106. García, N. Ibuprofen, a traditional drug that may impact the course of COVID-19 new effective formulation in nebulizable solution / N. García [*et al.*] // Med Hypotheses. – 2020. – Vol. 144. – Article 110079.
107. Garrard, A. Ibuprofen / A. Garrad. – Encyclopedia of Toxicology. – Elsevier; 2014. – P. 993–995.
108. Gauthier, H. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism / H. Gauthier, V. Yargeau, D. G. Cooper // The Science of The Total Environment. – 2010. – Vol. 408, No. 7. – P. 1701–1706.
109. Ghlichloo, I. NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) / I. Ghlichloo, V. Gerriets. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. – 10 p.
110. Gilbertie, J. Equine or porcine synovial fluid as a novel *ex vivo* model for the study of bacterial free-floating biofilms that form in human joint infections / J. Gilbertie [*et al.*] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14. – Article e0221012.
111. Girardi, C. Microbial degradation of the pharmaceutical ibuprofen and the herbicide 2,4-D in water and soil – Use and limits of data obtained from aqueous systems for predicting their fate in soil / C. Girardi [*et al.*] // The Science of The Total Environment. – 2013. – Vol. 444. – P. 32–42.
112. Girardot, F. Bacterial diversity on an abandoned, industrial wasteland contaminated by polychlorinated biphenyls, dioxins, furans and trace metals / F. Girardot [*et al.*] // The Science of The Total Environment. – 2020. – Vol. 748. – Article 141242.

113. Gomez, M. J. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters / M. J. Gomez [et al.] // *Journal of Chromatography*. – 2016. – Vol. 1114. – P. 224–233.

114. Gonda, S. Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L / S. Gonda [et al.] // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2016. – Vol. 108. – P. 115–121.

115. González-Alonso, S. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region / S. González-Alonso [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2017. – Vol. 229. – P. 241–254.

116. González-González, E. Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) / E. González-González [et al.] // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2014. – Vol. 67. – P. 281–295.

117. González-Naranjo, V. Toxicity of ibuprofen and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments / V. González-Naranjo, K. Boltes // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2014. – Vol. 11. – P. 1743–1750.

118. Goswami, L. Biological treatment of wastewater containing a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons using the oleaginous bacterium *Rhodococcus opacus* / L. Goswami // *Journal of Cleaner Production*. – 2018. – Vol. 196. – P. 1282–1291.

119. Grabarczyk, Ł. Ecotoxicity screening evaluation of selected pharmaceuticals and their transformation products towards various organisms / Ł. Grabarczyk [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2020. – Vol. 27. – P. 26103–26114.

120. Grenni, P. Capability of the natural microbial community in a river water ecosystem to degrade the drug naproxen / P. Grenni [*et al.*] // Environmental Science and Pollutions Research. – 2014. – Vol. 21. – P. 13470–13479.
121. Guerra, P. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes / P. Guerra [*et al.*] // The Science of The Total Environment. – 2014. – Vol. 473–474. – P. 235–243.
122. Gumbi, B. P. Detection and quantification of acidic drug residues in South African surface water using gas chromatography-mass spectrometry / B. P. Gumbi [*et al.*] // Chemosphere. – 2017. – Vol. 168. – P. 1042–1050.
123. Gunnarsson, L. Pharmacology beyond the patient – The environmental risks of human pharmacology beyond the patient / L. Gunnarsson [*et al.*] // Environment International. – 2019. – Vol. 129. – P. 320–332.
124. Guruge, K. First nationwide investigation and environmental risk assessment of 72 pharmaceuticals and personal care products from Sri Lankan surface waterways / K. Guruge [*et al.*] // The Science of The Total Environment. – 2019. – Vol. 690. – P. 683–695.
125. Guzik, U Biodegradation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and their influence on soil microorganisms. / U. Guzik, D. Wojcieszynska // eds. Kumar A, Sharma S. – Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation. – Springer, Singapore, 2019. – P. 379–401.
126. Gworek, B. Occurrence of pharmaceuticals in aquatic environment-a review / B. Gworek [*et al.*] // Destination and Water Treatment. – 2020. – Vol. 84. – P. 375–387.
127. Halm-Lemeille, M.-P. Pharmaceuticals in the environment / M.-P. Halm-Lemeille, E. Gomez // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – Vol. 23. – P. 4961–4963.
128. Han, S. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa* / S. Han [*et al.*] // Aquatic Toxicology. – 2010. – Vol. 98(3). – P 256–264.

129. Hanlon, G. W. Microbial metabolism of 2-arylpropionic acids: effect of environment on the metabolism of ibuprofen by *Verticillium lecanii* / G. W. Hanlon [et al.] // Journal of Applied Bacteriology. – 1994. – Vol. 76(5). – P. 442–447.
130. HELCOM. BASE project 2012–2014: Pilot activity to identify sources and flow patterns of pharmaceuticals in St. Petersburg to the Baltic Sea. 2014. – 54 p.
131. Ikkere, L. E. Occurrence of polybrominated diphenyl ethers, perfluorinated compounds, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in freshwater mussels from Latvia / L. E. Ikkere [et al.] // Chemosphere. – 2018. – Vol. 213. – P. 507–516.
132. 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. – Vol. 28, No. 10. – P. 2997–3006.
133. Ivshina, I. B. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic rhodococci / I. B. Ivshina [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2006. – Vol. 42, No. 4. – P. 392–395.
134. Ivshina, I. B. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* / I. B. Ivshina [et al.] // Current Microbiology. – 2015. – Vol. 70, No. 3. – P. 307–314.
135. Ivshina, I. B. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346/ I. B. Ivshina [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – Article 9159.
136. Ivshina, I. B. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation / I. B. Ivshina, M. S. Kuyukina, A. V. Krivoruchko // ed. Kurtböke I. B. – Microbial Resources. Elsevier, 2017. – P. 121–148.
137. Jewell, K. S. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm–activated sludge processes / K. S. Jewell [et al.] // Water Research. – 2016. – Vol. 105. – P. 559–567.
138. Jia, Y. Biotransformation of ibuprofen in biological sludge systems: Investigation of performance and mechanisms / Y. Jia [et al.] // Water Research. – 2020. – Vol. 170. – Article 115303.

139. Jiang, C. Impact of selected non-steroidal anti-inflammatory pharmaceuticals on microbial community assembly and activity in sequencing batch reactors / C. Jiang [et al.] // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12(6). – P. 1–16.
140. Jones, O. A. H. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals / O. A. H. Jones [et al.] // Water Research. – 2002. – Vol. 36, No. 20. – P. 5013–5022.
141. Kämpfer, P. *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces / P. Kämpfer [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – Vol. 63. – P. 1024–1029.
142. Kariyawasam, T. Pharmaceutical removal from wastewater by introducing cytochrome P450s into microalgae / T. Kariyawasam, C. Helvig, M. Petkovich, B. Vriens // Microbial Biotechnology. – 2024. – Vol. 6. – Article e14515.
143. Karpenko, Y. N. Chromatographic determination of drotaverine hydrochloride and kinetic modeling of the process of its biodestruction in a *Rhodococcus rhodochrous* culture liquid / Y. N. Karpenko [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2014. – Vol. 69, No. 7. – P. 681–685.
144. Kaushik, G. The potential association of psychoactive pharmaceuticals in the environment with human neurological disorders / G. Kaushik, M. A. Thomas // Sustainable Chemistry and Pharmacy. – 2019. – Vol. 13. – Article 100148.
145. Kayani, M. A. *In vitro* genotoxic assessment of xenobiotic diacylglycerols in an in vitro micronucleus assay / M. A. Kayani, J. M. Parry, S. Vickery, P. F. Dodds // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2009. – Vol. 50(4). – P. 277–284.
146. Keerthanan, S. Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in the environment: Plant uptake, translocation, bioaccumulation, and human health risks / S. Keerthanan [et al.] // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. – 2020. – Vol. 51(12). – P. 1–38.
147. Khrenkov, A. N. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids / A. N. Khrenkov [et al.] // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2020. – Vol. 61, No. 5. – P. 309–314.

148. Kookana, R. S. Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: an examination of risk factors in low-, middle- and high-income countries / R. S. Kookana [et al.] // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2014. – Vol. 369(1656). – P. 86–97.

149. Kostich, A. L. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid phase extraction and UPLC-MS/MS / A. L. Kostich, V. S. Lazorchak // *Analytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 80. – P. 5021–5042.

150. Kot-Wasik, A. Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants / A. Kot-Wasik [et al.] // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2016. – Vol. 188. – Article 661.

151. Koumaki, E. Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems / E. Koumaki, D. Mamais, C. Noutsopoulos // *Journal of Hazardous Materials*. – 2017. – Vol. 323. – P. 233–241.

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

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

154. Kruglova, A. Comparative study of emerging micropollutants removal by aerobic activated sludge of large laboratory-scale membrane bioreactors and sequencing batch reactors under low-temperature conditions / A. Kruglova [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 214. – P. 81–88.

155. Kümmerer, K. Presence, fate and risks of pharmaceuticals in the environment // *RSC Green Chemistry*. – 2016. – Vol. 46. – P. 63–72.

156. 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. – Vol. 65, No. 3. – P. 596–603.

157. Kuyukina, M. S. Petroleum-contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor with immobilized *Rhodococcus* cells / M. S. Kuyukina [et al.] // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2009. – Vol. 63. – P. 427–432.
158. Lange, H. J. Behavioural responsws of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuitcals / H. J. Lange [et al.] // Acuatic Toxicology. – Vol. 78. – P. 209–216.
159. Langenhoff, A. Microbial removal of the pharmaceutical compounds ibuprofen and diclofenac from wastewater / A. Langenhoff [et al.] // BioMed Research International. – 2013. – Vol 10. – 325806.
160. Larcher, S. Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria / S. Larcher, V. Yargeau // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 91, No. 1. – P. 211–218.
161. Larkin, M. J. Genomes and plasmids in *Rhodococcus* / M.J. Larkin [et al.] // Biology of *Rhodococcus* / ed. H.M. Alvarez. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. – P. 73–90.
162. Li, S. Cytochrome P450 enzyme-based biotransformation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) by microalgae in the aquatic environment / S. Li, Y. Chu, N. Ren, S-H Ho // Chemical Engineering Journal. – 2023. – Vol. 476. – Article146557.
163. Li, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil // Environmental Pollution. – 2014. – Vol. 187. – P. 193–201.
164. Li, Y. Prioritization of pharmaceuticals in water environment in China based on environmental criteria and risk analysis of top-priority pharmaceuticals / Y. Li [et al.] // Journal of Environmental Management. – 2019. – Vol. 253. – P. 1–10.
165. Lindim, C. Exposure and ecotoxilogical risk assesment of mixtures of top prescribed pharmaceuticals in Swedish freshwaters / C. Lindim [et al.] // Chemosphere. – 2019. – Vol. 220. – P. 344–352.
166. List of Common NSAIDs [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.drugs.com/drug-class/nonsteroidal-anti-inflammatory-agents.html> (дата обращения: 31.07.2023).

167. Lolić, A. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk / A. Lolić [et al.] // The Science of The Total Environment. – 2015. – Vol. 508. – P. 240–250.
168. Lucas, D. The role of sorption processes in the removal of pharmaceuticals by fungal treatment of wastewater / Lucas D. [et al.] // The Science of The Total Environment. – 2018. – Vol. 610–611. – P. 1147–1153.
169. Luo, Y. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment / Y. Luo [et al.] // The Science of The Total Environment. – 2014. – Vol. 473–474. – P. 619–641.
170. Ma, Y. Process intensification and waste minimization for ibuprofen synthesis process / Y. Ma [et al.] // Journal of Cleaner Production. – 2018. – Vol. 194. – P. 396–405.
171. Macherey, A.-C. Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspects / A.-C. Macherey, P. M. Dansette // The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition). – 2015. – Vol. 25. – P. 585–614.
172. Maia, A. S. Enantioselective degradation of ofloxacin and levofloxacin by the bacterial strains *Labrys portucalensis* F11 and *Rhodococcus* sp. FP1 / Maia A. S. [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2018. – Vol. 155. – P. 144–151.
173. Marchlewicz, A. *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen / A. Marchlewicz [et al.] // Water, Air, & Soil Pollution. – 2016. – Vol. 227. – Article 197.
174. Marchlewicz, A. Toxicity and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) / A. Marchlewicz [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – Vol. 24. – P. 7572–7584.
175. Marchlewicz, A. Exploring the degradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b): the new pathway and factors affecting degradation / A. Marchlewicz [et al.] // Molecules. – 2017. – Vol. 22. – P. 1659–1676.
176. Marco-Urea, E. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR / E.

Marco-Urea [*et al.*] // Bioresource Technology. – 2010. – Vol. 101, No. 7. – P. 2159–2166.

177. Marco-Urrea, E. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor* / E. Marco-Urrea, M. Pérez-Trujillo, T. Vicent, G. Caminal // Chemosphere. – 2009. – Vol. 74. – P. 765–772.

178. Matongo, S. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi river, KwaZulu-natal, South Africa / S. Matongo [*et al.*] // Chemosphere. – 2015. – Vol. 134. – P. 133–140.

179. Mendez-Arriaga, F. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton / F. Mendez-Arriaga, S. Esplugas, J. Gimenez // Water Resources. – 2010. – Vol. 44. – P. 589–595.

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

181. Moore, N. Ibuprofen: A journey from prescription to over-the-counter use // Journal of the Royal Society of Medicine. – 2014. – Vol. 100. – P. 2–6.

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

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

184. Murdoch, R. W. The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by *Variovorax* Ibu-1 / R. W. Murdoch, A. G. Hay // Biodegradation. – 2015. – Vol. 26, No. 2. – P. 105–113.

185. Murdoch, R. W. Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acids / R. W. Murdoch, A. G. Hay // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71. – P. 6121–6125.

186. Navrozidou, E. Biodegradation aspects of ibuprofen and identification of ibuprofen-degrading microbiota in an immobilized cell bioreactor / E. Navrozidou [*et al.*] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – Vol. 26, No. 4. – P. 1–12.
187. Neumann, G. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size / G. Neumann [*et al.*] // *Extremophiles*. – 2005. – Vol. 9, No. 2. – P. 163–168.
188. Nguyen, L. N. Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac on activated sludge microbial communities / L. N. Nguyen [*et al.*] // *The Science of The Total Environment*. – 2019. – Vol. 657. – P. 739–745.
189. Novoa-Luna, K. A. Oxidative stress induced in *Hyalella azteca* by an effluent from a NSAID-manufacturing plant in Mexico / K. A. Novoa-Luna [*et al.*] // *Ecotoxicology*. – 2016. – Vol. 25. – P. 1288–1304.
190. Ogueji, E. O. Acute toxicity effects of IBU on behavior and haematological parameters of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) / E. O. Ogueji [*et al.*] // *African Journal of Aquatic Science*. – 2017. – Vol. 43, No. 3. – P. 293–303.
191. Ogunwole, A. G. Seasonal occurrence of ibuprofen in sediment, water, and biota in river Owena and Ogbese, and its ecological risk assessment / A. G. Ogunwole, J. K. Saliu // *Annals of Sciences and Technology*. – 2020. – Vol. 5, No. 1. – P. 1–10.
192. Oliveira, T. Occurrence of common pollutants and pharmaceuticals in hospital effluents / T. Oliveira [*et al.*] // *The Handbook of Environmental Chemistry*. – 2017. – Vol. 60. – P. 17–32.
193. Ort, C. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital / C. Ort [*et al.*] // *Water Research*. – 2010. – Vol. 44. – P. 605–615.
194. Ortiz de García, S. A. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants/ S. A. Ortiz de García [*et al.*] // *Ecotoxicology*. – 2014. – Vol. 23, No. 8. – P. 1517–1533.

195. Padmanabhan, K. K. Health hazards of medical waste and its disposal / K. K. Padmanabhan, B. Debabrata // Woodhead Publishing Series in Energy. – 2019. – Vol. 8. – P. 99–118.
196. Palyzová, A. Effect of the anti-inflammatory drug diclofenac on lipid composition of bacterial strain *Raoultella* sp. KDF8 / A. Palyzová [et al.] // Folia Microbiologica. – 2020. – Vol. 65. – P. 763–773.
197. Parke, D. B. The role of cytochrome P-450 in the metabolism of pollutants // Marine Environmental Research. – 1985. – Vol. 18. – P. 97–100.
198. Parolini, M. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* / M. Parolini, A. Binelli, A. Provini // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2011. – Vol. 74. – P. 1586–1594.
199. Parolini, M. Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* / M. Parolini, A. Binelli // Ecotoxicology. – 2012. – Vol. 21. – P. 379–392.
200. Parolini, M. Toxicity of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review / M. Parolini // The Science of The Total Environment. – 2020. – Vol. 740. – Article 140043.
201. Patel, M. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods / M. Patel [et al.] // Chemical Reviews. – 2019. – Vol. 119. – P. 3510–3673.
202. Peake, B. M. The life-cycle of pharmaceuticals in the environment / B. M. Peake [et al.] // Woodhead Publishing in Biomedicine, 2015. – 268 p.
203. Pi, N. Bioaccumulation of pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in aquatic macrophytes: Results of hydroponic experiments with *Echinodorus horemanii* and *Eichhornia crassipes* / N. Pi, J. Z. Ng, B. C. Kelly // The Science of The Total Environment. – 2017. – Vol. 601–602. – P. 812–820.

204. Plotnikov, A. N. Determination of codeine phosphate in the culture fluid of *Rhodococcus* by high-performance liquid chromatography / A. N. Plotnikov [et al.] // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2017. – Vol. 72, No. 6. – P. 328–332.
205. Pomati, F. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor* / F. Pomati [et al.] // Aquatic Toxicology. – 2004. – Vol. 67. – P. 387–396.
206. Preskar, M. Solubilization of ibuprofen for freeze dried parenteral dosage forms / M. Preskar [et al.] // Acta Pharmaceutica. – 2019. – Vol. 69. – P. 17–32.
207. Quero-Pastor, M. J. Ozonation of ibuprofen: A degradation and toxicity study / M. J. Quero-Pastor [et al.] // The Science of The Total Environment. – 2014. – Vol. 466–467. – P. 957–964.
208. Quinn, B. The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuate* / B. Quinn, F. Gagné, C. Blaise // The Science of The Total Environment. – 2008. – Vol. 402, No. 1. – P. 62–69.
209. Rainsford, K. D. Ibuprofen: A Critical Bibliographic Review / K. D. Reinsford. – Taylor and Francis Ltd., 1991.
210. Richards, N. L. Qualitative detection of the NSAIDs diclofenac and ibuprofen in the hair of *Eurasian otters* (*Lutra lutra*) occupying UK waterways with GC-MS / N. L. Richards [et al.] // European Journal of Wildlife Research. – 2011. – Vol. 57, No. 5. – P. 1107–1114.
211. Richmond, E. K. A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs / E. K. Richmond [et al.] // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9, No. 1. – P. 1–9.
212. Rivera-Utrilla, J. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water / J. Rivera-Utrilla [et al.] // Chemosphere. – 2013. – Vol. 93. – P. 1268–1287.
213. Rizzo, L. Advanced treatment of urban wastewater by sand filtration and graphene adsorption for wastewater reuse: Effect on a mixture of pharmaceuticals and toxicity / L. Rizzo [et al.] // Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2015. – Vol. 3, No. 1. – P. 34–45.

214. Rodarte-Morales, A. I. Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply / A. I. Rodarte-Morales [et al.] // Biodegradation. – 2012. – Vol. 23. – P. 145–156.
215. Sadezky, A. Proposal of an environmental indicator and classification system of pharmaceutical product residues for environmental management, KNAPPE, Final report / A. Sadezky [et al.] // Federal Institute of Hydrology (BfG) Koblenz, Germany. – 2008. – P. 17–19.
216. Sadutto, D. Pharmaceuticals and personal care products in a Mediterranean coastal wetland: Impact of anthropogenic and spatial factors and environmental risk assessment / D. Sadutto [et al.] // Environmental Pollution. – 2021. – Vol. 271. – Article 116353.
217. Salgado, R. Metabolite identification of ibuprofen biodegradation by *Patulibacter medicamentivorans* under aerobic conditions / R. Salgado [et al.] // Environmental Technology. – 2018. – Vol. 8. – P. 450–465.
218. Salgado, R. Metabolite identification of ibuprofen biodegradation by *Patulibacter medicamentivorans* under aerobic conditions / R. Salgado [et al.] // Environmental Technology. – 2020. – Vol. 41. – P. 450–465.
219. Sánchez-Aceves, L. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of ibuprofen and aluminum alters oxidative stress status on *Danio rerio* / L. Sánchez-Aceves [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology. – 2021. – Vol. 248. – Article 109071.
220. Sangal, V. Refined systematics of the genus *Rhodococcus* based on whole genome analyses / V. Sangal, [et al.] // ed. H.M. Alvarez. – Cham: Springer, 2019. – P. 1–22.
221. Santos, J. L. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain) / J. L. Santos [et al.] // Environment International. – 2007. – Vol. 33. – P. 596–601.

222. Santos, L. H. M. L. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment / L. H. M. L. M. Santos [*et al.*] // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – Vol. 175(1–3). – P. 45–95.

223. Sauvêtre, A. Enrichment of endophytic actinobacteria in roots and rhizomes of *Miscanthus × giganteus* plants exposed to diclofenac and sulfamethoxazole / A. Sauvêtre [*et al.*] // Environmental Science and Pollution Research. – 2020. – Vol. 27. – P. 11892–11904.

224. Selderslaghs, I. W. T. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds / I. W. T. Selderslaghs, R. Blust, H. E. Witters // Reproductive Toxicology. – 2012. – Vol. 33. – P. 142–154.

225. Sharma, B. Recycling of organic wastes in agriculture: An environmental perspective / B. Sharma [*et al.*] // Sustainability. – 2019. – Vol. 13. – P. 409–429.

226. Sharma, K. Fate of ibuprofen under optimized batch biodegradation experiments using *Micrococcus yunnanensis* isolated from pharmaceutical sludge/ K. Sharma [*et al.*] // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2019. – Vol. 16. – P. 8315–8328.

227. Singh, V. Occurrence, seasonal variations, and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products in River Ganges at two holy cities of India / V. Singh, S. Suthar // Chemosphere. – 2021. – Vol. 268. – Article 129331.

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

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

230. Sui, Q. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review / Q. Sui [*et al.*] // Emerging Contaminants. – 2015. – Vol. 1, No. 1. – P. 14–24.

231. Ternes, T. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances – The challenge of micropollutants in urban water management / T. Ternes, A. Joss. – London: IWA Publishing, 2006. – P. 1–459.

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

233. Tran, N. H. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds / N. H. Tran [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Vol. 171, No. 1–3. – P. 1051–1057.

234. Trelle, S. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis / S. Trelle [et al.] // BMJ. – 2011. – Vol. 342. – P. 7086–7097.

235. Tong, A. Z. The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving waters in southwest Nova Scotia, Canada / A. Z. Tong, A. J. Ghoshdastidar, S. Fox // Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – Vol. 22. – P. 689–700.

236. Tyumina, E. A. Diclofenac as factor in the change of *Rhodococcus* metabolism / E. A. Tyumina [et al.] // IOP Conference Series: Materials, Sciences and Engineering. – 2019. – Vol. 487. – P. 1–7.

237. UNESCO, HELCOM. Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region – A status report. UNESCO Emerging Pollutants in Water Series – No. 1. – UNESCO Publishing; 2017.

238. United Nations. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). – 4th ed. New York and Geneva: United Nations, 2011.

239. Vazquez-Roig, P. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego–Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain) / P. Vazquez-Roig [et al.] // The Science of The Total Environment. – 2012. – Vol. 440. – P. 24–32.

240. Vergeynst, L. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–magnetic sector mass spectrometry: Method quality assessment

and application in a Belgian case study / L. Vergeynst [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2015. – Vol. 119. – P. 82–88.

241. Vergili, I. Occurrence and prioritization of pharmaceutical active compounds in domestic/municipal wastewater treatment plants / I. Vergili [*et al.*] // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2019. – Vol. 102. – P. 1–7.

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

243. Wang, F. The influence of nanoplastics on the toxic effects, bioaccumulation, biodegradation and enantioselectivity of ibuprofen in freshwater algae *Chlorella pyrenoidosa* / F. Wang [*et al.*] // *Environmental Pollution*. – 2020. – Vol. 263. – Article 114593.

244. Wang, J. L. Advanced oxidation processes for wastewater treatment: formation of hydroxyl radical and application / J. L. Wang, L. J. Xu // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 2012. – Vol. 42(3). – P. 251–325.

245. Wang, Y. Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation/ Y. Wang [*et al.*] // *ISME Journal*. – 2020. – Vol. 14. – P. 2179–2196.

246. Wang, Y. Degradation of 17 β -estradiol and products by a mixed culture of *Rhodococcus equi* DSSKP-R-001 and *Comamonas testosteroni* QYY20150409 / Y. Wang [*et al.*] // *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. – 2019. – Vol. 33, No. 1. – P. 268–277.

247. Wang, Y. Multi-walled carbon nanotubes with selected properties for dynamic filtration of pharmaceuticals and personal care products / Y. Wang [*et al.*] // *Water Research*. – 2016. – Vol. 92. – P. 104–112.

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

249. Weisbrod, A. V. Workgroup report: Review of fish bioaccumulation databases used to identify persistent, bioaccumulative, toxic substances / A. V. Weisbrod [et al.] // Environmental Health Perspectives. – 2007. – Vol. 115. – P. 255–261.
250. Wijaya, L. Ecotoxicological effects of ibuprofen on plant growth of *Vigna unguiculata* L. / L. Wijaya [et al.] // Plants. – 2020. – Vol. 9. – Article 1473.
251. Wojsławski, J. Leaching behavior of pharmaceuticals and their metabolites in the soil environment / J. Wojsławski [et al.] // Chemosphere. – 2019. – Vol. 231. – P. 269–275.
252. Woolridge, A. Waste: A Handbook for Management / A. Woolridge, S. Hoboy. – Academic Press. – 2019. – P. 517–530.
253. Xie, H. Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment / H. Xie [et al.] // The Science of The Total Environment. – 2019. – Vol. 659. – P. 230–239.
254. Xie, Z. Occurrence, bioaccumulation, and trophic magnification of pharmaceutically active compounds in Taihu Lake, China / Z. Xie [et al.] // Chemosphere. – 2015. – Vol. 138. – P. 140–147.
255. Yoshimoto, T. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates / T. Yoshimoto [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70. – P. 5283–5289.
256. Zhou, N. A. Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment / N.A. Zhou [et al.] // Biodegradation. – 2013. – Vol. 24, No. 6. – P. 813–827.
257. Żur, J. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria / J. Żur [et al.] // Environmental Science and Pollution Research International. – 2018. – Vol. 25. – P. 21498–21524.
258. Zwiener, C. Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments / C. Zwiener [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2002. – Vol. 372. – P. 569–575.