

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

На правах рукописи

Сыровацкая Галина Андреевна

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ СОДОВОГО
ШЛАМОХРАНИЛИЩА ГОРОДА БЕРЕЗНИКИ**

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Максимова Юлия Геннадьевна

Пермь – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Нитрилы в промышленности и окружающей среде	17
1.1.1 Нитрилгидролизующие бактерии	21
1.1.2 Ферменты гидролиза нитрилов	23
1.2 Экстремофильные бактерии	27
1.3 Нитрилгидролизующие галофилы и алкалофилы	31
1.4 Биопленкообразование как форма адаптации и коллективного существования бактерий	37
1.5 Деградация нитриловых полимеров под воздействием факторов окружающей среды и живых организмов	41
1.5.1 Влияние бутадиен-нитрильного каучука на окружающую среду и живые организмы	41
1.5.2 Деструкция бутадиен-нитрильного каучука под воздействием физических факторов	47
1.5.3 Биодеградация бутадиен-нитрильного каучука, её перспективы и ограничения	49
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	59
2.1 Микробиологические методы	59
2.1.1 Места отбора проб и их характеристика	59
2.1.2 Бактериальные изоляты и штаммы	60
2.1.3 Среда и условия культивирования бактерий	60
2.1.4 Оценка бактериостатической и бактерицидной активности алифатических нитрилов	61
2.1.5 Влияние растворителей на рост штаммов	62

2.1.6	Культивирование родококков с бутадиен-нитрильным каучуком	62
2.2	Физиолого-биохимические методы	64
2.2.1	Изучение влияния источника углерода на рост бактериальных изолятов содового шламохранилища	64
2.2.2	Подбор оптимальной концентрации источника углерода	64
2.2.3	Подбор оптимального источника азота	65
2.2.4	Подбор оптимальной концентрации источника азота	65
2.2.5	Исследование воздействия различных концентраций NaCl и pH реакционной среды на активность нитрилгидролизующих бактерий.....	65
2.2.6	Воздействие pH на рост и активность штаммов	66
2.2.7	Определение нитрилгидратазной и амидазной активности изолятов	66
2.3	Молекулярно-генетические методы.....	67
2.3.1	Идентификация бактерий по последовательности гена 16S рРНК	67
2.3.2	Детекция генов амидаз, нитрилгидратаз и нитрилаз.....	68
2.4	Оценка биопленкообразования.....	69
2.4.1	Определение способности изолятов содового шламохранилища к биопленкообразованию	70
2.4.2	Зависимость биопленкообразования от концентрации NaCl в среде.....	70
2.4.3	Зависимость биопленкообразования от температуры.....	70
2.4.4	Зависимость биопленкообразования от pH среды.....	71
2.5	Сканирующая электронная микроскопия.....	71
2.6	Фурье-спектрометрия	72
2.7	Статистическая обработка результатов	73
3.1	Таксономическое разнообразие нитрилутилизирующих бактерий содового шламохранилища	74

3.2 Нитрилгидратазная и амидазная активность выделенных изолятов	77
3.3 Детекция генов амидаз, нитрилгидратаз, нитрилаз у изолятов и штаммов..	78
3.4 Биопленкообразование изолятов	80
3.5 Зависимость роста изолятов от различных источников углерода	81
3.6 Формирование биопленок изолятами в зависимости от физико-химических воздействий	83
Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА РОСТ, НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ И БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ <i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417)	
4.1 Влияние источников углерода и азота на рост и нитрилгидролизующую активность штаммов <i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417).....	86
4.2 Исследование способности штаммов рода <i>Rhodococcus</i> к росту в присутствии органических растворителей	90
4.3 Влияние pH и NaCl среды на ферментативную активность и рост штаммов <i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417)	94
4.3.1 Изучение совместного действия NaCl и pH среды на рост и нитрилгидролизующую активность родококков	94
4.3.2 Влияние различных значений pH среды на рост и нитрилгидролизующую активность штаммов <i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417).....	96
4.4 Влияние pH и минерализации реакционной среды на нитрилгидролизующую активность <i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R.</i> <i>erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417).....	99
4.5 Воздействие pH, NaCl и температуры на биопленкообразование <i>R.</i> <i>qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417).....	100

Глава 5. ДЕГРАДАЦИЯ БУТАДИЕН-НИТРИЛЬНОГО КАУЧУКА НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИМИ ГАЛОАЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ <i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417)	104
5.1 Рост <i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416) и <i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417) на среде с бутадиен-нитрильным каучуком как единственным источником азота	104
5.2 Сканирующая электронная микроскопия биопленок родококков на поверхности бутадиен-нитрильного каучука.....	107
5.3 Оценка изменений структуры бутадиен-нитрильного каучука при культивировании родококков посредством Фурье-спектрометрии	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ВЫВОДЫ	130
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133
ПРИЛОЖЕНИЕ А	163

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Экстремофилами называют группу организмов, адаптированных к агрессивным условиям среды обитания и активно размножающихся в них. Экстремофилы встречаются среди представителей всех трех доменов живой природы, однако их значительно больше среди представителей доменов *Bacteria* и *Archaea*, поскольку стратегия развития прокариот направлена на освоение практически всех доступных экологических ниш. Эти организмы отличаются высокими скоростями роста и закрепления полезных мутаций, активным горизонтальным переносом генов, одноклеточностью, метаболической лабильностью, разнообразием адаптационных механизмов, что дает возможность существовать в самых разнообразных, в том числе и жестких условиях окружающей среды.

Адаптационные реакции экстремофилов и их уникальные ферменты позволяют рассматривать эти организмы в качестве кандидатов для биоремедиации загрязненных сред, для использования в биокатализе, как продуцентов биологически активных соединений. Исследования экстремофильных микроорганизмов дают возможность расширить понимание экологических взаимодействий в разнообразных средах обитания, имеют большое значение для изучения эволюционных взаимосвязей и происхождения жизни, служат референсом для поиска жизни на космических объектах, а также позволяют углубить знания о биогеохимическом круговороте элементов. Сочетание экстремофилии со способностью утилизировать нитрилы является малоизученным явлением.

Способность прокариот к биodeградации токсичных веществ в высоких концентрациях можно отнести к явлению экстремотолерантности. Нитрилы карбоновых кислот высокотоксичны, особенно для высших эукариотических организмов. Будучи разнообразным и значимым в индустриальной сфере

классом веществ (Yamada *et al.*, 2001), они неизбежно накапливаются в окружающей среде, в дополнение к нитрилам естественного происхождения.

Микроорганизмы, способные утилизировать нитрилы и адаптированные к высокой солености (галофильные и галотолерантные), представляют значительный интерес для биотехнологического применения. Они сохраняют функциональную активность в условиях низкой доступности воды и присутствия органических растворителей. Несмотря на то, что внутриклеточные ферменты алкалофильных организмов часто проявляют максимальную активность при нейтральных значениях pH, клетки в целом могут эффективно функционировать как биокатализаторы в сильнощелочных условиях, далеких от физиологической нормы.

Перспективным источником для выделения таких устойчивых штаммов являются техногенно-загрязненные экосистемы. Микроорганизмы, населяющие их, эволюционируют под давлением множества стрессовых факторов, что формирует у них неспецифические механизмы устойчивости и широкий адаптационный потенциал. Это позволяет им успешно выживать в условиях комбинированного воздействия высоких концентраций поллютантов и экстремальных параметров среды.

Первые галоалкалофильные бактерии, разлагающие нитрилы, выделены в 2007 году из содовых озер и солончаков (Sorokin *et al.*, 2007 b). Среди них – актинобактерия *Nitriliruptor alkaliphilus* в консорциуме с *Marinospirillum* sp., а также новые виды *Bacillus* и *Halomonas nitrilicus*, использующие нитрилазный путь трансформации органоцианидов (Sorokin *et al.*, 2007 a, b, 2008, 2009). Из озера Самбхар выделена умеренно галофильная *Halomonas* sp. с нитрилазной активностью, максимальной при pH 7 и 45°C (Singh *et al.*, 2018). Из морских отложений выделен солеустойчивый штамм дрожжей *Meyerozyma guilliermondii* с нитрилазой, работающей при pH 6–9 и в морской воде (Serra *et al.*, 2019). Из речных илов выделен алкалофильный штамм *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, разлагающий цианид при pH 9,5 (Luque-Almagro *et al.*, 2011). Из горячих

источников — *Rhodococcus pyridinivorans* с нитрилазой, активной при pH 10 (Seth *et al.*, 2017).

В 2017 году микробиологический скрининг проб грунта, отобранных на территории содового шламонакопителя в г. Березники Пермского края, показал наличие нитрилгидролизующих родококков, устойчивых к повышенным концентрациям NaCl и щелочной среде (Shilova *et al.*, 2022; Maksimova *et al.*, 2025). У них выявлены гены нитрилгидратаз и амидаз, но не нитрилаз (Сыровацкая и др., 2025). Высокая соленость и органические растворители снижают активность ферментов из-за дегидратации, поэтому галофильные ферменты рассматриваются как модели для биокатализа в маловодных средах (Kikani *et al.*, 2023).

Загрязнение окружающей среды полимерами, в том числе содержащими нитрильные звенья, достигает больших масштабов (Heydari *et al.*, 2026; Dzulkaflly *et al.*, 2025). Синтетические полимеры сложно поддаются биodeградации, что приводит к накоплению и долговременной персистенции этих материалов в окружающей среде. Их частичное разрушение под воздействием физико-химических факторов среды приводит к новой проблеме, связанной с образованием микропластика (МП) (Abidin *et al.*, 2024; Jiao *et al.*, 2024).

Бутадиен-нитрильный каучук (БНК) является материалом, из которого изготавливают одноразовые медицинские перчатки. Он стал значительной составляющей отходов после пандемии COVID-19. Потребление этого продукта в значительных объемах приводит к накоплению полимеров в окружающей среде. Есть крайне незначительное количество информации о воздействии микроорганизмов на БНК (Delgado-Nungaray *et al.*, 2024). В связи с этим возникает необходимость более детального изучения способности микроорганизмов к биodeградации синтетических полимеров, особенно воздействия на их устойчивую структуру посредством ферментативных процессов, приводящих к изменению физико-химических свойств материала и его последующему разрушению. Исследование этих процессов уточняет понимание роли микроорганизмов в трансформации синтетических полимеров и

создает основу для биотехнологического подхода к снижению их накопления в окружающей среде (Faszczevska *et al.*, 2026). Задача осложняется длительностью процесса, трудностью учета и анализа изменений, происходящих в пластике, требует поиска и селекции микроорганизмов – потенциальных деструкторов синтетических полимеров, а также изучения метаболических путей, которые могут привести к разложению полимера (Christiansson *et al.*, 2000). Необходимость решения вопросов переработки и безопасного управления отходами каучуковых изделий или пластмасс, достигшими конца своего срока службы, стимулировала исследования биологических методов разрушения этих устойчивых материалов. В частности, использование микроорганизмов стало многообещающим подходом для мягкой очистки почв и вод, загрязненных полимерными отходами (Shen *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016).

Таким образом, комплексное исследование филогенетического разнообразия нитрилгидролизующих бактерий в экстремальных биотопах, к которым относится содовое шламохранилище АО «Березниковский содовый завод» (Пермский край, Россия) является важной и актуальной задачей. Полученные данные позволяют не только расширить представления о границах жизни и адаптационных стратегиях микроорганизмов, но и выявить новые перспективные штаммы для биотехнологического применения. Помимо этого, в условиях активного накопления разнообразных полимеров в окружающей среде актуальна информация о взаимодействии этих материалов с их потенциальными деструкторами. Поиск нитрилгидролизующих экстремофилов позволяет уточнить распространение соединений нитрилов в антропогенных и естественных источниках, дополнить понимание вопроса, связанного с участием нитрильных соединений в азотном цикле, выделить штаммы, имеющие ценность для промышленного производства амидов и карбоновых кислот из соответствующих нитрилов, а также для биоремедиации биотопов, загрязненных нитрилами. Экстремофильные и экстремотолерантные микроорганизмы, в частности галоалкалофильные/толерантные, имеют большой потенциал для биodeградации различных ксенобиотиков и экополлютантов. Они обладают

способностью к росту в экстремальных условиях, которые могут присутствовать в щелочных сточных водах и засоленных почвах. Подобные агрессивные условия могут быть искусственно созданы для ускорения процессов деградации.

В регионах с умеренным климатом и чередованием сезонов отходы на полигонах подвергаются таким воздействиям, как УФ-излучение и замораживание-оттаивание. Однако информация, касающаяся сочетанного воздействия ферментативных систем бактерий и физических факторов, которым полимеры могут подвергаться в окружающей среде, недостаточно освещена в научной литературе. О деструкции или биотрансформации нитриловых полимеров, в частности, БНК, известно крайне мало. Так, *P. aeruginosa*, изученная Delgado-Nungaray *et al.* (2024) как возможный биодеструктор этого полимера, является условно-патогенной бактерией, вызывает нозокомиальные инфекции и заболевания у ослабленных пациентов. Ее потенциальная вирулентность и множественная лекарственная устойчивость осложняет ее использование в качестве биологического агента для биodeградации отходов (Dou *et al.*, 2026). Есть сведения о трансформации бутадиенового остова этого полимера мембранно-связанной нитрильной каучуковой оксигеназой (Nro1) из *Gordonia sp.* J1A, однако, нитрильные группы при этом не подвергались деструкции (Chiba *et al.*, 2025). Всё вышесказанное делает крайне актуальным поиск безопасных микроорганизмов, сочетающих способность к трансформации нитрилов с экстремофильностью (экстремотолерантностью), а также способных к деструкции / поверхностной модификации нитриловых полимеров.

Цель работы – охарактеризовать физиолого-биохимические свойства нитрилутилизующих бактерий, выделенных из высокоминерализованных щелочных биотопов антропогенного происхождения, и оценить их потенциал для биodeградации бутадиен-нитрильного каучука.

Основные задачи работы:

1. Выделить бактерии, использующие ацетонитрил или ацетамид в качестве единственного источника углерода, из грунтов и осадка содового

шламохранилища; идентифицировать изоляты методом секвенирования гена 16S рРНК.

2. Идентифицировать гены нитрилгидратаз, нитрилаз и амидаз у выделенных изолятов, определить нитрилгидролизующую активность изолятов и выявить штаммы, перспективные для биodeградации нитрильных соединений в условиях высокой минерализации и щелочной среды.

3. Изучить ростовые характеристики наиболее перспективных выделенных штаммов и способность к гидролизу нитрилов в условиях высокой минерализации и щелочной среды.

4. Охарактеризовать влияние различных физико-химических условий среды на формирование биопленок выделенными изолятами.

5. Исследовать воздействие галоалкалотолерантных нитрилутилизирующих бактерий на бутадиен-нитрильный каучук в процессе роста с полимером без дополнительного источника азота.

Научная новизна

Впервые осуществлено выделение и дана комплексная характеристика нитрил- и амидутилизирующих бактерий из экстремального биотопа антропогенного происхождения – содового шламохранилища, характеризующегося щелочной средой (до pH 11) и высокой минерализацией (до 98 г/л), расположенного на северо-западной окраине г. Березники Пермского края. У 16 выделенных изолятов показано наличие генов ферментов гидролиза нитрилов и оценена ферментативная активность изолятов.

Среди изолятов, относящихся к филумам *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*, непосредственно из содового шлама выделен изолят, обладающий нитрилгидратазной активностью, идентифицированный как *Rhodococcus qingshengii*. Штамм депонирован в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, www.iegmcoll.ru) под номером IEGM 1416. Из грунта старой карты шламохранилища (pH 8) выделен гидролизующий нитрилы изолят,

идентифицированный как *Rhodococcus erythropolis* и депонированный под номером IEGM 1417.

Подобраны оптимальные условия культивирования для двух перспективных штаммов родококков, демонстрирующих исключительную толерантность к высоким концентрациям нитрилов и органических растворителей. Показана связь адаптации перспективных штаммов родококков к агрессивным условиям среды с нитрилгидролизующей активностью в экстремальных условиях. Выявлены особенности формирования биопленок у экстремотолерантных нитрилутилизующих бактериальных изолятов. Установлено, что щелочная среда и повышенная минерализация стимулируют биопленкообразование родококков, как и понижение температуры до 8–15 °С, тогда как температура 37°С ингибирует этот процесс, одновременно с сохранением планктонного роста.

Впервые продемонстрирована способность галоалкалотолерантных родококков к росту на БНК как единственном источнике азота после предварительной обработки полимера УФ-излучением и замораживанием-оттаиванием, моделирующими природное старение. Получены данные о формировании массивных биопленок на поверхности фрагментов перчаток из БНК и выявлены структурные изменения полимера, выражающиеся в появлении амидных групп, что свидетельствует о трансформации нитрильных звеньев. Обнаружена разнонаправленность химических изменений на разных сторонах материала, обусловленная его структурной неоднородностью, что указывает на различную доступность полимерных цепей для ферментативного воздействия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа расширяет представления о физиолого-биохимической адаптации галоалкалотолерантных микроорганизмов и распространении нитрилутилизующих бактерий в окружающей среде. Охарактеризованы два новых штамма – *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э, выделенные из техногенной среды с экстремальными значениями pH и высоким содержанием

солей, и показано, что эти бактерии проявляют нитрилгидратазную активность в широком диапазоне pH и концентраций соли.

Выполненное исследование вносит существенный вклад в фундаментальные представления о процессе ферментативного гидролиза нитрилов и его роли в модификации синтетических акрилонитрильных полимеров. Впервые получены экспериментальные данные по модификации поверхности БНК экстремотолерантными родококками.

Практическая значимость работы определяется возможностью использования штаммов в различных биотехнологических процессах. Благодаря сохранению активности в широком диапазоне pH и минерализации, выделенные штаммы родококков могут быть использованы для биокаталитического гидролиза нитрилов в промышленных процессах (экстремобиокатализе), а также для очистки сточных вод и биоремедиации территорий, загрязненных нитрильными соединениями, в условиях высокого pH и засоления. Экспериментально обоснована возможность использования нитрилутилизующих родококков для биотрансформации БНК – материала нитриловых перчаток, одного из основных компонентов медицинских отходов периода пандемии COVID-19. Предварительная комбинированная обработка полимера ультрафиолетовым облучением и замораживанием-оттаиванием способствует усиленному нарастанию биопленки, что открывает перспективы разработки технологий ускоренной биоремедиации резиновых отходов. Результаты исследования используются в лекционных курсах для студентов магистратуры биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена с применением классических методов микробиологии, таких как получение чистых культур микроорганизмов и их культивирование, определение ростовых характеристик и количества жизнеспособных клеток. Для определения продуктов реакции и оценки ферментативной активности использован метод ВЭЖХ, наличие генов

подтверждено методом ПЦР, штаммы идентифицированы методом секвенирования гена 16S рРНК. Биопленки визуализированы методом сканирующей электронной микроскопии, изменение структуры полимера подтверждено методом спектроскопии полного внутреннего отражения с преобразованием Фурье в инфракрасном диапазоне (ATR-FTIR).

Положения, выносимые на защиту:

1. Нитрилутилизирующие бактерии, изолированные из осадка и грунтов содового шламохранилища, относятся к филумам *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*, содержат гены неэнантиселективных амидаз и Fe-содержащей нитрилгидратазы, при этом у них отсутствуют гены нитрилаз и Co-содержащих нитрилгидратаз. Амидазная активность изолятов значительно (до 10 раз) превышает нитрилгидратазную.

2. *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416), выделенный из содового шлама, и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), изолированный из грунта содового шламохранилища, проявляют исключительную устойчивость к высоким концентрациям нитрилов (до предела растворимости), гексана и толуола (до 80%), при этом устойчивы к высоким значениям pH и минерализации, что подтверждает их галоалкалотолерантность.

3. Повышение щелочности и степени минерализации среды, а также снижение температуры стимулирует формирование биопленок у изолятов нитрилутилизирующих бактерий, выделенных из осадка и грунта содового шламохранилища.

4. Нитрилутилизирующие *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) способны к росту с бутадиен-нитрильным каучуком как единственным источником азота; в процессе роста формируют биопленку на поверхности полимера и способствуют его окислительному старению и образованию амидных групп.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора

Исследования выполнены при финансовой поддержке Государственного задания на тему «Биоразнообразие микроорганизмов в антропогенно-

загрязненных экосистемах и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям внешней среды», регистрационный номер НИОКТР 124020500028-4. Исследования выполнены частично в рамках проекта международных исследовательских групп на базе государственных образовательных учреждений или научных организации Пермского края на тему «Получение препаратов для сельского хозяйства на основе клеток и ферментов микроорганизмов экстремальных экосистем», соглашение № С-26/507 (2020-2023 годы).

Основная часть экспериментов выполнена автором самостоятельно, проведена их математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Подготовка к печати научных работ, отражающих результаты диссертационного исследования, осуществлена автором самостоятельно или при участии соавторов. Сканирующая электронная микроскопия выполнена в «Горном институте УрО РАН» – филиале Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН. Спектроскопия с преобразованием Фурье выполнена в «Институте технической химии УрО РАН» – филиале Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН. Секвенирование генов 16S рРНК выполнено на базе ООО «Евроген», Москва.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием адекватных методов статистической обработки, выполнением анализов на современном оборудовании, применением комплекса классических и современных микробиологических, генетических, биохимических и аналитических методов, а также методов визуализации.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Международной молодежной научно-практической конференции-форуме «Современная наука и инновации», Пермь, 2023; Международной конференции ученых-биологов «Фундаментальные и прикладные аспекты биологии», Пермь, 2024; 26-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология - наука XXI века», Пущино, 2024; XX Всероссийской

научной конференции молодых ученых «Экологическая безопасность в условиях антропогенной трансформации природной среды», Пермь, 2025.

Результаты проведенных исследований опубликованы в 12 научных работах: 4 статьи в рецензируемых научных журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ / Единый государственный перечень научных изданий («Белый список», уровни 1–3), из которых 3 публикации – в журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus (Q1–Q3) и Web of Science; а также 5 статей в сборниках, входящих в базу данных РИНЦ, 1 статья в сборнике материалов международных конференций, индексируемом в Scopus и WoS CPCI, и тезисы 2 докладов.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка и 9 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, приложения. Список литературы включает 253 источника, из них 26 отечественных и 227 зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю, заведующей лабораторией молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН», д.б.н., доценту Юлии Геннадьевне Максимовой; к. г.-м. н. Оксане Викторовне Коротченковой, старшему научному сотруднику лаборатории геологии месторождений полезных ископаемых (зав. лаб. – д. г.-м. н. И. И. Чайковский) «Горного института УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН, за выполнение сканирующей электронной микроскопии образцов; а также Ирине Алексеевне Борисовой, ведущему инженеру лаборатории структурно-химической модификации полимеров (зав. лаб. – к. т. н. С. А. Астафьева) «Института технической химии УрО РАН» — филиала ПФИЦ УрО РАН, за выполнение спектроскопии с преобразованием Фурье.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нитрилы в промышленности и окружающей среде

Нитрилы – органические соединения с функциональной группой $C\equiv N$. Это универсальные предшественники для синтеза разнообразных соединений, высокореакционноспособные благодаря тройной ненасыщенной полярной связи. Они являются растворителями, экстрагентами, мономерами для синтеза полимерных соединений, применяются в качестве промежуточных соединений при производстве лекарственных препаратов и гербицидов (Veselá *et al.*, 2010; An *et al.*, 2020). Нитрилы – это универсальные реагенты и строительные блоки в органическом синтезе. Они способны участвовать в ряде реакций, таких как функционализация связи $C\equiv N$ (введение функциональных групп в молекулу или превращение одних функциональных групп в другие), внедрение алкина, циклоприсоединение и термическая или фотохимическая циклизация каскадного присоединения. Реакционная способность нитрилов определяется наличием у атома азота неподеленной пары электронов, π -электронов связи $C\equiv N$ и электрофильного углеродного центра (Debabov, Yanenko, 2011). Благодаря неподеленной паре электронов атом азота в функциональной группе имеет высокий координационный потенциал для активации орто-, мета- и пара- C–H связей, а также повышает реакционную способность электрофильного атома углерода, способствуя нуклеофильному присоединению. Модификация связи $C\equiv N$ применяется для получения разнообразных функциональных производных ароматических соединений, включая реакции арилирования, галогенирования, олефинирования, алкоксилирования, метилирования, гидроксирования и ацетилирования. Нитрилы подвергаются циклоприсоединениям с алкинами, азидами и диенами по тройной связи с образованием многозамещенных пиридинов и тетразолов. Значительный научный интерес представляют процессы циклизации нитрилов через каскадные присоединения, в результате которых образуются разнообразные N-гетероциклы (Rakshit *et al.*, 2022).

Поскольку нитрилы являются важными промежуточными продуктами в промышленном синтезе аминов, амидов, амидинов, карбоновых кислот, сложных эфиров, альдегидов, кетонов и гетероциклических соединений, на протяжении нескольких десятилетий они интенсивно поступали в окружающую среду при сбросе промышленных сточных вод (Feng *et al.*, 2008), а также в составе сельскохозяйственных химикатов и пестицидов (Sakkas *et al.*, 2002).

Токсический эффект нитрилов носит комплексный характер. Хроническая мутагенность и канцерогенность соединений определяются химической структурой молекулы. При их окислении ферментами семейства цитохрома P450 образуются реактивные электрофильные эпоксиды – циклические органические соединения с нестабильными химическими связями, которые напрямую атакуют нуклеофильные центры азотистых оснований и формируют устойчивые соединения с ДНК, провоцируя мутации и онкогенные процессы (Katic *et al.*, 2017). Кроме того, метаболизм нитрилов в организме животных истощает запасы восстановленного глутатиона. Возникающий вследствие дефицита глутатиона окислительный стресс приводит к накоплению активных форм кислорода, которые индуцируют вторичные повреждения генома (Pu *et al.*, 2006; Kobets *et al.*, 2022). В то же время острая цитотоксичность вызвана высвобождением свободного цианида при метаболическом распаде нитрилов. Выделяющийся цианид-ион выступает мощным ингибитором клеточного дыхания, прочно связываясь с трехвалентным железом цитохром-с-оксидазы в митохондриях, что блокирует синтез аденозинтрифосфата и вызывает быструю гибель клеток (Lachowicz *et al.*, 2024; Иони и др., 2025)

Нитрилы естественного происхождения обнаружены в бактериях, грибах, растениях и животных в морской и наземной средах обитания. Наиболее распространенными являются цианогенные гликозиды (Mukram *et al.*, 2015; Egelkamp *et al.*, 2019). Синтез нитрила в клетках микроорганизмов и растений происходит двумя различными путями: (1) альдоксимдегидратаза катализирует образование тройной связи между углеродом и азотом посредством дегидратации альдоксима ($R-CH=N-OH$) до соответствующего нитрила ($R-$

$C\equiv N$) и (2) гидроксинитриллиаза осуществляет превращение альдегида ($R-CH=O$) и цианистого водорода ($H-C\equiv N$) в циангидрины ($R-CH(OH)C\equiv N$). Первый путь может протекать при участии ферментов семейства цитохрома P450 (CYP), что характерно для животных и растений (Liu, Li, 2024). Циангидрины – предшественники цианогликозидов и цианолипидов в различных формах жизни, при этом реакция обратима. В случае повреждения тканей организмов они могут обратимо расщепляться с выделением токсичного циановодорода для химической защиты (Bhalla *et al.*, 2018). Бактериальные симбионты способны модулировать рост растений посредством трансформации альдоксимов и нитрилов, воздействуя таким образом на синтез фитогормонов (Rädisch *et al.*, 2022).

Недавние исследования продемонстрировали влияние нитрилов и продуктов их деградации на бактериальные сообщества, приводящее к дисбалансу видового разнообразия. Наблюдалась более высокая восприимчивость грамотрицательных микроорганизмов (*Agrobacterium tumefaciens* и *E. coli*) к действию нитрилов, подавляющему рост, по сравнению с грамположительными микроорганизмами (*Bacillus subtilis* и *Corynebacterium glutamicum*). Известно, что получение, поглощение и преобразование азота в природе полностью зависят от сложного и разнообразного азотного цикла микроорганизмов. Микробные процессы азотного цикла включают биологическую фиксацию азота, анаэробное окисление аммония нитритом в анаммокс-процессе, нитрификацию, денитрификацию, диссимиляционное или ассимиляционное восстановление нитрата до аммония и путь ассимиляции азота, в ходе которого микроорганизмы включают минеральный азот (аммоний) в состав органических молекул, превращая его в строительный материал для клетки (Ножевникова и др., 2011; Zhang *et al.*, 2025).

Биогенный синтез нитрилов и распространение нитрилгидролизующих ферментов у живых организмов, главным образом прокариот, позволяет рассматривать эти соединения как участников биогеохимического цикла, особенно цикла азота (Рисунок 1) (Карпоор *et al.*, 2016; Van Wyk *et al.*, 2022).

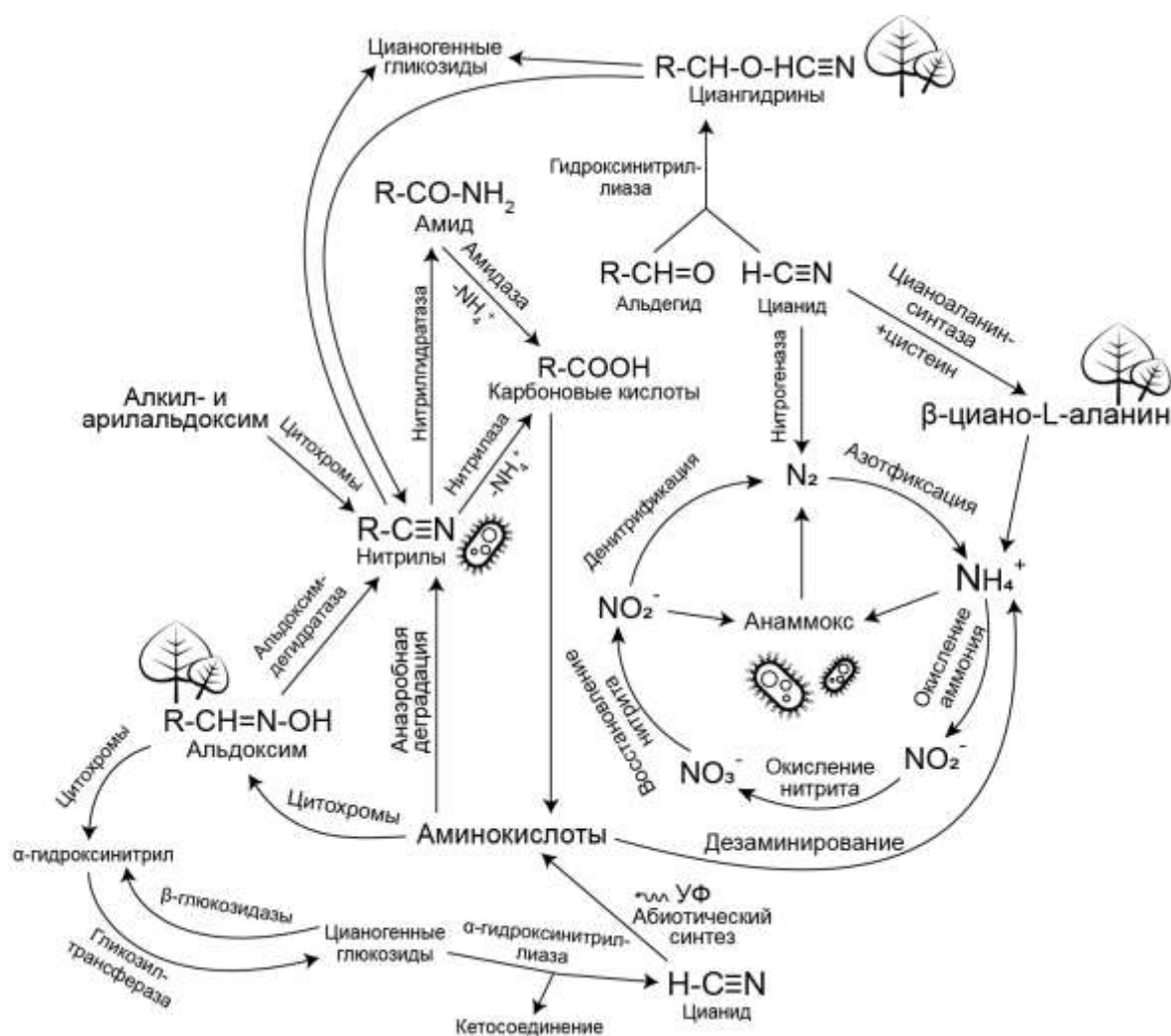


Рисунок 1 – Участие цианистого водорода и нитрилгидролизующих ферментов в биогеохимическом цикле азота. Схема составлена автором (Syrovatskaya *et al.*, 2026) на основе обобщения информации из источников (Harper, Gibbs, 1979; Miller, Conn, 1980; Wittstock, Halkier, 2002; Zagrobelny *et al.*, 2008; Ножевникова и др., 2011; Bhalla *et al.*, 2018; Rädisch *et al.*, 2022; Liu, Li, 2024)

Природные нитрилы выполняют разнообразные физиологические и экологические функции, участвуя в химической защите от хищников, размножении, регуляции биотических сообществ, а также служат источником азота в первичном метаболизме. Некоторые насекомые и растения используют нитрилы или циангидрины в анаболических путях в качестве предшественников цианогенных гликозидов (Bhalla *et al.*, 2018).

1.1.1 Нитрилгидролизующие бактерии

Способностью к гидролизу нитрилов и синтезу необходимых для данного процесса ферментов обладают преимущественно микроорганизмы. Они выделяются из различных биотопов и способны использовать нитрилы как единственный источник углерода и азота. Их выделение из сред, загрязненных синтетическими нитрилами (Nagasawa, Yamada, 1989; Демаков и др., 2007; Feng *et al.*, 2009), не обусловлено исключительно антропогенным воздействием. Согласно литературным данным, их распространение также может быть связано с накоплением природных соединений, содержащих цианогруппы, преимущественно цианогликозидов (Sahu *et al.*, 2019; Egelkamp *et al.*, 2019). Способность бактерий осуществлять детоксикацию альдоксимов и нитрилов важна для растительно-микробных взаимодействий, как при мутуалистическом, так и при паразитическом образе жизни бактерий (Rädisch *et al.*, 2022).

В экосистемах нитрилгидролизующая активность широко распространена среди микроорганизмов различных филогенетических групп, таких как, микроскопические грибы, дрожжи, но в особенности бактерии родов *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Acinetobacter* и *Alcaligenes* (Gong *et al.*, 2012). Наиболее изучены бактериальные системы метаболизма нитрилов, представленные двумя основными ферментативными путями. Одностадийный связан с ферментом нитрилазой, непосредственно гидролизующей нитрил до соответствующей карбоновой кислоты. Двухстадийный гидролиз последовательно задействует нитрилгидратазу и амидазу с тем же конечным продуктом и промежуточным в виде амида (нитрилгидролизующие ферменты подробнее рассмотрены в разделе 1.1.2). Оба ферментативных пути, широко представленных у бактерий, позволяют им ассимилировать нитрилы в качестве источников углерода и азота.

Наибольшую метаболическую и гидролитическую активность в отношении цианосоединений проявляют представители рода *Rhodococcus* (в частности, *R. erythropolis* и *R. rhodochrous*). У представителей родококков описано совместное присутствие нитрилгидратазной и нитрилазной активности,

а также наличие нескольких форм каждого типа нитрилгидролизующих ферментов, различающихся по своим свойствам. Это обеспечивает субстратную пластичность и способность трансформировать широкий спектр алифатических, ароматических и гетероциклических нитрилов (Nagasawa, Yamada, 1989; Bunch, 1998).

R. rhodochrous J1 способен продуцировать нитрилазу и нитрилгидратазу, отличающуюся высокой каталитической активностью в отношении ряда ароматических нитрилов. С использованием покоящихся клеток показана конверсия 3-цианопиридина в никотинамид без образования никотиновой кислоты. Аналогичный результат получен для 4- и 2-цианопиридина и цианопиразина, которые трансформируются в соответствующие амиды (Nagasawa *et al.*, 1988, 1990; Kobayashi *et al.*, 1989).

Штамм *Rhodococcus* sp. AJ270, выделенный из почвы, способен проявлять широкую субстратную специфичность: из 36 исследованных алифатических, ароматических и гетероароматических соединений рост был зарегистрирован на 32 субстратах. Нитрилгидратаза штамма характеризуется способностью катализировать региоспецифические и стереоспецифические превращения нитрилов (Blakey *et al.*, 1995).

Нитрилгидролизующая активность также широко представлена у грибов. В отличие от бактерий, у микроскопических грибов наиболее изучены нитрилазы. Анализ последовательностей показывает их широкое распространение среди представителей *Ascomycota*. Описанные нитрилазы преимущественно относятся к ферментам, действующим на ароматические нитрилы и арилуксусные нитрилы. Они способны осуществлять региоселективный и стереоселективный гидролиз субстратов (Egelkamp *et al.*, 2019).

Ферменты, задействованные в биodeградации нитрилов и амидов до карбоновых кислот, имеют внутриклеточную локализацию (Nagasawa, Yamada, 1989). Поскольку в свободных формах они нестабильны, для биоконверсии нитрила в промышленных процессах предпочтителен цельноклеточный катализ

(Demirjian *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, 2003; Sorokin *et al.*, 2009). Вопреки распространенности, недостатком данного типа катализа остается ограничение доступности потребляемых субстратов и их разнообразия. Различные технологии иммобилизации клеток могут обеспечить устойчивость биокатализатора к внешним факторам и дают перспективу разработки непрерывного процесса (Mylerova, Martinkova, 2003). Так нитрил-утилизирующие бактерии в биофильтрах очищают сточные воды от нитрилов (Li *et al.*, 2009; An *et al.*, 2018; Zorina *et al.*, 2022). При иммобилизации клеток на углеродных носителях ферментативная активность сохраняется, а стабильность повышается (Максимов и др., 2007; Максимова и др., 2008; Максимова и др., 2010; Максимова и др., 2013; Максимова и др., 2015; Velankar *et al.*, 2010).

Высокоактивные и универсальные штаммы, гидролизующие нитрил и имеющие промышленное значение, относятся к таким родам актинобактерий, как *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* и *Gordonia*. Среди прочих выделяются *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* и *Klebsiella* (Demirjian *et al.*, 2001; Sorokin *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2014; Ramezani-Pour *et al.*, 2015; Rapheeha *et al.*, 2017). Как деградация токсичных нитрилов в технологиях очистки окружающей среды, так и синтез амидов и карбоновых кислот из нитрилов может осуществляться микроорганизмами (Pace, Brenner, 2001; DeSantis *et al.*, 2002; Chhiba-Govindjee, 2013; Benedik, Sewell, 2017).

1.1.2 Ферменты гидролиза нитрилов

В природе известны два пути ферментативного гидролиза нитрилов. Одностадийный гидролиз катализируется нитрилазой (КФ 3.5.5.1) через присоединение двух молекул воды к молекуле нитрила. В двухстадийном процессе трансформация нитрила до карбоновой кислоты осуществляется нитрилгидратазой (КФ 4.2.1.84) и амидазой (КФ 3.5.1.4). Соответствующая карбоновая кислота является конечным продуктом в обоих вариантах, однако во втором пути катализа появляется промежуточный продукт в виде амида с его последующим гидролизом (Debabov, Yanenko, 2011; Menon, 2025). Эти три

фермента являются ключевыми катализаторами метаболизма нитрила (Ingvorsen *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2012; Ismailab *et al.*, 2017).

Нитрилазы классифицируют на 13 ветвей суперсемейства, из которых 12 дифференцированы по аминокислотным последовательностям. Они обладают сходной вторичной структурой ($\alpha\beta\alpha$, где α - спирали, а β - складчатости) и каталитической триадой Glu-Lys-Cys. Несмотря на общие субстраты с нитрилгидратазами и амидазами, их структура и механизм действия отличаются (Brenner, 2002; Martínková, Křen, 2010). Субстратная специфичность девяти из этих ветвей хорошо известна. Из этих девяти ветвей только одна ветвь обладает нитрилазной активностью, тогда как восемь ветвей обладают выраженной амидазной или амидоконденсационной активностью, поскольку нитрилазы и ряд амидаз являются дивергентными членами древнего суперсемейства CN-гидролаз. Однако не вся группа амидаз берет начало из него (Brenner, 2002; Makhongela *et al.*, 2007). По субстратной специфичности нитрилазы делят на ароматические, алифатические и арилалифатические, хотя некоторые проявляют широкую специфичность (Debabov, Yanenko, 2011).

Функции нитрилаз разнообразны: от модификации липопротеинов до катаболизма нуклеиновых кислот. Они обнаружены во всех организмах: у млекопитающих связаны с ростом клеток и подавлением опухолей, у растений – с биосинтезом гормонов и детоксикацией, у микроорганизмов – с метаболизмом нитрилов (Jenrich *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2023). Предполагается, что нитрилазы грибкового и бактериального происхождения выполняют сходные функции в процессах детоксикации нитрильных соединений, принимают участие в синтезе вторичных метаболитов, который индуцируется при наличии нитрилов в питательной среде (Schwartz *et al.*, 2023; Martínková, Křen, 2010).

У растений защитная роль нитрилаз заключается в детоксикации β -цианоаланина – опасного интермедиата, образующегося в ходе ассимиляции эндогенного цианида, который выделяется в качестве побочного продукта при синтезе фитогормона этилена. β -цианоаланин преобразуется в аспарагин, аспарагиновую кислоту и аммиак (Jenrich *et al.*, 2007). У микроорганизмов

детоксикационный потенциал нитрилаз обеспечивает прямой одностадийный гидролиз экзогенных нитрильных токсинов до карбоновых кислот и аммиака, предотвращая их окислительную активацию до мутагенных эпоксидов (Schwartz *et al.*, 2023).

Согласно исследованиям, нитрилазы вырабатываются как фитопатогенными, так и стимулирующими рост растений микроорганизмами. Их деятельность может оказывать существенное влияние на результат взаимодействий растений и микробов (Howden, Preston, 2009; Rädisch *et al.*, 2022). Имеются данные, указывающие на древность нитрилаз, возможно, связанных с метаболизмом цианида в условиях ранней биосферы (Schwartz *et al.*, 2023). Наиболее хорошо охарактеризованным ферментом является нитрилаза из *R. rhodochrous* J1, которая способна превращать акрилонитрил и 3-цианопиридин в акриловую кислоту и никотиновую кислоту соответственно (Thuku *et al.*, 2009).

Нитрилгидратазы состоят из α - и β -субъединиц и классифицируются на Fe- и Co-содержащие. Их активность зависит от металла в каталитическом центре, где ключевую роль играет мотив Cys-(Thr/Ser)-Lys-Cys-Ser-Cys-(Tyr/Thr). Нитрилгидратазы делят на высоко- (H) и низкомолекулярные (L), различающиеся субстратной специфичностью (Asano *et al.*, 1980; Kobayashi *et al.*, 1989; Nagasawa *et al.*, 1990, 1991; Payne, 1997; Endo *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1999; Debabov, Yanenko, 2011; Feng *et al.*, 2024).

Филогенетический анализ показал, что нитрилгидратазы, за редкими исключениями, преимущественно встречаются у бактерий. Среди эукариот эти ферменты обнаружены у вида морских одноклеточных воротничковых жгутиконосцев – *Monosiga brevicollis*. Экспрессия их нитрилгидратазы индуцируется субстратами, такими как мочевины и нитрилы (Prasad, Bhalla, 2010).

Амидазы делят на три группы:

1. Нитрилазного суперсемейства – гомотетрамеры/гексамеры с триадой Glu-Cys-Lys, гидролизующие короткоцепочечные амиды.

2. AS-семейства (amidase signature) – димеры/октамеры с триадой Ser-Ser-Lys, обладающие широкой субстратной специфичностью.
3. FmdA_AmdA семейства (formamidase A, amidase A) – небольшая группа, участвующая в метаболизме азота.

Генетическая связь нитрилгидратаз и амидаз подтверждает их роль в двухступенчатом гидролизе нитрилов, гены амидаз часто локализованы в одном опероне с генами нитрилгидратаз (Yamada, Kobayashi, 1996).

Амидазы широко распространены в природе. Механизм их действия заключается в нуклеофильной атаке на карбонильную группу амида с образованием промежуточного ацилферментного комплекса, который затем гидролизуется до карбоновой кислоты и свободного фермента с выделением аммония. Подобно нитрилазам, амидазы образуют ковалентную связь с субстратом через остатки Cys или Ser. Также они обладают ацилтрансферазной активностью, эффективно перенося ацильный остаток на гидроксилламин с образованием гидроксамовых кислот, что используется для определения активности фермента. Некоторые амидазы способны проявлять и нитрилазную активность. Например, рекомбинантная амидаза из *Rhodococcus rhodochrorus* J1 гидролизует бензонитрил до бензойной кислоты, хотя и в 6000 раз медленнее бензамида. Полная потеря обеих активностей при замене Ser195 на Ala195 доказывает, что обе реакции идут в одном активном центре. Как правило, амидазы стереоспецифичны к S-изомерам. Однако R-специфичные ферменты, перспективные для фармацевтического синтеза, также обнаружены у бактерий, например, у *Klebsiella oxytoca* (Дебабов, Яненко, 2011).

В последние 60 лет получено множество данных, подтверждающих роль HCN в происхождении или ранней эволюции жизни, но геномные исследования, ограничивающие или детализирующие эту модель, немногочисленны. Циановодород, предположительно, являлся одним из ключевых пребиотических соединений в Архее и служил субстратом для ранних микробных ферментов (Schwartz *et al.*, 2023). Широкое таксономическое распределение подсемейства нитрилаз 1 ветви и их нетребовательность к наличию молекулярного кислорода

для катализа указывают на относительную древность этих ферментов. Существует метод молекулярных часов для определения эволюционной дивергенции организмов, основанный на накоплении мутаций в наиболее стабильных фрагментах ДНК (мишенях). Основываясь на данных, полученных этим методом, бактериальные цианид-восстанавливающие нитрилазы присутствовали в палео- и мезопротерозое, а впоследствии были горизонтально перенесены в клетки эукариот. Гены, кодирующие нитрилазу в разных видах организмов, накапливают мутации с предсказуемой, но при этом неодинаковой скоростью. Создание генетических деревьев и изучение скорости их изменения по накоплению мутаций позволяют расширить понимание развития азотного цикла планеты, предполагающего центральную роль циановодорода в биологической трансформации веществ на ранних этапах эволюции. Вероятно, нитрилазы представляют собой не самую раннюю форму микробного метаболизма цианида. Им могли предшествовать другие нитрилгидролизующие ферменты, такие как нитрилгидратаза и тиоцианат гидролаза. Однако они ограничены по таксономическому распространению, а гены, кодирующие эти ферменты, подвергались горизонтальному переносу, что не позволяет точно датировать их возникновение. Метаболизировать HCN в условиях ранней Земли могли семейства ферментов, «вымершие» к сегодняшнему дню, либо сменившие специализацию у современных организмов. Так, современные нитрогеназы, появившиеся впервые у архей, беспорядочно метаболизируют HCN. Метаболизм циановодорода мог осуществляться предковыми версиями этих семейств ферментов. На основании полученных данных нитрилазы могут быть использованы для датирования молекулярных часов и создания генетических деревьев (Stairs *et al.*, 2023; Schwartz *et al.*, 2023).

1.2 Экстремофильные бактерии

Естественные места обитания прокариот разнообразны. Их способность сохраняться в биосфере отчасти обусловлена их метаболической универсальностью и фенотипической пластичностью. Микроорганизмы-

экстремофилы классифицируются по типам агрессивного влияния среды обитания. Для каждого вида устанавливаются минимальные, оптимальные и максимальные значения параметров роста. В зависимости от физико-химических факторов выделяют: термофилов и психрофилов, растущих при высокой ($> 50^{\circ}\text{C}$) и низкой ($< 15^{\circ}\text{C}$) температуре соответственно; алкало- и ацидофилов – в щелочной ($\text{pH} > 8$) и кислой ($\text{pH} < 4$) среде соответственно; галофилов – при повышенной концентрации солей ($2\text{--}5 \text{ M NaCl / KCl}$), пьезофилов – при повышенном давлении ($60\text{--}100 \text{ МПа}$). Кроме перечисленных выше, выделяют металлоторантные микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям тяжелых металлов (мышьяк, кадмий, медь, цинк и т.д.), устойчивые к ионизирующему излучению и т.д. (Demirjian *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2009; Cowan *et al.*, 2015; Dumorne *et al.*, 2017).

Физиологические изменения клеток экстремофилов препятствуют их существованию вне агрессивных условий. Адаптивные механизмы включают как "поведенческие" реакции, так и изменения на клеточном и молекулярном уровнях (Rothschild, Mancinelli, 2001; Rampelotto, 2013). Экстремофильные прокариоты также подразделяются по количеству экстремальных факторов среды, необходимых для их роста. Выделяют моноэкстремофилов, требующих наличия одного экстремального воздействия, и полиэкстремофилов, зависящих от нескольких факторов одновременно (Rampelotto, 2013). Когда организм способен выживать в экстремальных условиях, но эти условия не являются оптимальными для роста и размножения, вводят понятие «толерантности» или «устойчивости». К экстремоторантным относят организмы, устойчивые к одному или более физико-химическому параметру (Cavicchioli, 2002).

При изучении полиэкстремофилов особое внимание уделяется биотопам, характеризующимся сочетанным воздействием нескольких экстремальных факторов. Например, повышенная температура, минерализация и щелочность.

Анализ комбинаций экстремальных условий в природе выявляет отсутствие ацидофильных психрофилов и галофилов, пресноводных пьезофилов, а также галофильных гипертермофилов. Бактерии преобладают в

низкотемпературных и щелочных экосистемах, тогда как археи доминируют в высокотемпературных и кислых средах (Merino *et al.*, 2019).

Галоалкалофилы демонстрируют облигатную зависимость от ионов натрия, карбонатов и хлоридов. Некоторые из них, являясь тройными полиэкстремофилами, способны расти при повышенных температурах. Эти организмы обладают комплексными адаптационными механизмами, контролирующими энергетический и осмотический баланс, pH-гомеостаз, мембранную проницаемость и стабильность белков (Sorokin *et al.*, 2011).

Моноэкстремофилы без предварительной адаптации не способны противостоять множественным стрессам. Их выживание обеспечивается усиленным синтезом 40–70 специализированных белков, из которых 15–19% необходимы для преодоления теплового и солевого стресса и 22–39% - кислотного и окислительного стресса. Шесть основных белков теплового шока считаются ключевыми элементами общего стрессового ответа (Feder, Hofmann, 1999; Саралов, 2019).

Использование микроорганизмов-экстремофилов в биоремедиации является важным прикладным аспектом изучения экстремофилов. Промышленные сточные воды нередко имеют агрессивную среду, 5% из них являются солеными и гиперсолеными. Неэкстремофильные микроорганизмы не способны эффективно удалять загрязнители в подобных условиях. Эта проблема также возникает при загрязнении уникальных природных сред, таких как солончаки, кислотные и содовые озера (Le Borgne *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004). Биологические методы восстановления предпочтительнее физико-химических подходов, поскольку они экологически безопасны, экономически выгодны и не сопровождаются образованием вредных побочных продуктов. Микроорганизмы играют ключевую роль в трансформации загрязняющих веществ, способствуя их переносу, рассеиванию и минерализации. Они успешно применяются для очистки от широкого спектра загрязнителей, включая органические соединения (Santoshkumar *et al.*, 2011; Syed *et al.*, 2023), в частности, нитрилы. *Rhodococcus pyridinivorans* S85-2 продуцирующий нитрилгидратазу при участии

Brevundimonas diminuta AM10-C-1 продуцирующего амидазу, способны трансформировать до соответствующей карбоновой кислоты ацетонитрил (как побочный продукт в нейлоновой промышленности) при исходной концентрации субстрата до 6 М (Kohyama *et al.*, 2006).

Синтезу полимерных промежуточных продуктов, фармацевтических препаратов, специальных химикатов и агрохимикатов часто препятствуют высокая стоимость процессов, низкая селективность и образование нежелательных побочных продуктов (Brady *et al.*, 2006; Coady *et al.*, 2015). Выделение новых экстремофильных микроорганизмов и их ферментов (экстремозимов) оказало большое влияние на биокатализ (Straathof *et al.*, 2002; Cárdenas J. P. *et al.*, 2010; Lopez-Lopez *et al.*, 2014; Yildiz *et al.*, 2015). Установлено, что психрофильные ферменты могут способствовать оптимизации производства термочувствительных продуктов, а термофильные ферменты обладают высокой устойчивостью к протеазам, детергентам и хаотропным агентам, а также могут обеспечивать устойчивость в органических растворителях (Rozzell, 1999; Demirjian *et al.*, 2001). Степень гидратированности молекул фермента оказывает существенное влияние на его каталитическую активность, так, высокая соленость и органические растворители снижают содержание свободной воды, необходимой для ферментативной гидратации (Klibanov, 2001). В ряде исследований было продемонстрировано, что толерантность клеток и ферментов к органическому растворителю может коррелировать с толерантностью к высокой солености (Karan *et al.*, 2012). Поэтому галофильные ферменты, стабильные при высоких концентрациях солей, служат моделями биокатализа в маловодных средах (Stepankova *et al.*, 2013; Kikani *et al.*, 2023).

Мезофильные организмы плохо адаптированы к суровым условиям промышленных процессов, что сдерживает внедрение таких биокатализаторов в производственный процесс (Jaenicke *et al.*, 1996; Cowan *et al.*, 1998; Demirjian *et al.*, 2001; Irwin, Baird, 2004). Это обуславливает необходимость поиска экстремофильных и экстремотолерантных микроорганизмов как потенциальных

биокатализаторов трансформаций органических веществ и деструкторов токсичных загрязнителей окружающей среды (Singh, Gabani, 2011; Karan *et al.*, 2012; Nigam, 2013).

1.3 Нитрилгидролизующие галофилы и алкалофилы

На Земле повсеместно распространены экосистемы с высокими концентрациями соли и/или щелочи. Они могут быть представлены естественными водоемами, такими как соленые и щелочные озера, почвами с высоким содержанием соли (солонцы и солончаки), а также и объектами техногенного происхождения в виде искусственных прудов-испарителей и кристаллизаторов, построенных для производства солей натрия или калия и соды, шламохранилищ, производственных сточных вод, соляных шахт, солеотвалов и т.д. (Seckbach, Rampelotto, 2019).

Гиперсоленые среды разделяют на две обширные категории. Талассогаalinные воды возникли в результате испарения морской воды из-за изоляции водоемов. Они имеют ионный состав, аналогичный составу морской воды (с преобладанием хлорида натрия и сульфатов), встречаются в непосредственной близости от морей и океанов. Аталассогаalinные воды образуются при испарении пресной воды, а также возникают в результате выветривания и выщелачивания минералов из горных пород в дренажные бассейны (Oren, 2005). Таким образом, рассолы последней группы неоднородны по химическому составу. Рассолы могут сильно отличаться по концентрации щелочноземельных металлов, таких как магний и кальций (Ventosa *et al.*, 1998). К аталассогаalinным объектам относятся Мертвое море, озеро Магади в Кении, Вади-Натрун в Египте, соленые озера Антарктиды, озеро Чака на северо-западе Китая и озеро Моно в Калифорнии (Grant *et al.*, 1990; Oren, 2005). Гиперсоленые водные объекты обычно имеют в 9–10 раз более высокие концентрации соли, чем морская вода (Delgado-García *et al.*, 2012; Ибрахим, 2019). Большое Соленое Озеро в штате Юта, Мертвое море в Иордании, Красное море, пустыне Атакама (Чили) и де Ла Мата (Испания) являются типичными примерами гиперсоленой

среды. Все названные среды представляют собой экологические ниши галофильных микроорганизмов. В целом они различаются по солевому составу, однако преобладающим типом соли является NaCl (Delgado-García *et al.*, 2012).

Важно отметить существование и достаточно широкое распространение сред, сочетающих в себе высокую концентрацию соли с высоким pH. Содовые озера представляют собой особый тип соленых озер, в которых среди преобладающих солей содержится щелочная фракция карбоната/бикарбоната натрия. Часто они формируются по аталассогаалинному типу. В основном они приурочены к засушливым территориям с высокой скоростью испарения, способствующей накоплению солей в локальных понижениях ландшафта. Основным геохимическим условием их образования является выщелачивание богатого натрием горного материала водами, насыщенными углекислым газом, в районе с сухим и теплым климатом. К таким средам относятся содовые озера Тибета и уже упомянутые озера Магади и Вадии-Натрун. Гиперсоленые содовые озера богато заселены галоалкалофильными археями.

Природные щелочные среды характеризуются высокими значениями pH (8,0–11,0). Недавние исследования показывают, что алкалофильные бактерии были обнаружены в глубоководных отложениях, собранных на глубинах Марианской впадины (Singh *et al.*, 2018).

В каждом из трех основных доменов жизни встречаются микроорганизмы, устойчивые к засолению и высоким показателям pH. Галотолерантным микроорганизмам, в отличие от галофильных, для жизнедеятельности не требуется высокая концентрация соли, однако они могут адаптироваться к её содержанию в среде до 15%. В зависимости от их потребности к соли они классифицируются как галотолерантные (0–5% NaCl), слабые галофилы (2–5% NaCl), умеренные галофилы (5–20% NaCl) и экстремальные галофилы (20–30% NaCl) (Kanekar *et al.*, 2012). Среди бактерий данных экологических групп встречаются аэробы, факультативные и облигатные анаэробы, как грамположительные, так и грамотрицательные представители этих групп экстремофилов, обладающие значительным биотехнологическим потенциалом

(Delgado-García *et al.*, 2012; Ибрахим и др., 2018). Галофильные бактерии и археи обладают способностью адаптироваться к колебаниям внешнего осмотического давления и поддерживать осмотический баланс между своей цитоплазмой и гиперсоленой внеклеточной средой. Существуют два основных специфических механизма осмоадаптации: механизм «соль внутри», при котором внутриклеточная концентрация соли поддерживается на высоком уровне, и механизм накопления органических осмотических растворов, при котором внутриклеточная концентрация соли поддерживается на низком уровне (Ибрахим и др., 2018).

Микроорганизмы, адаптированные к щелочной среде, можно разделить на две основные группы: алкалофилы и устойчивые к щелочам алкалотолерантные виды. Первым необходимы щелочные условия, и оптимальная скорость роста этих микроорганизмов наблюдается при уровне pH, по крайней мере, на две единицы выше нейтрального. Организмы, способные расти при значениях pH более 9 или 10, но с оптимумом роста при нейтральных значениях или ниже, называются алкалотолерантными (Singh *et al.*, 2018). Особый интерес представляет влияние pH среды на уровни активности нитрилгидратазы и амидазы организмов, разлагающих нитрил. Как правило, целые клетки функционируют в более широком диапазоне pH, чем ферменты (Sorokin *et al.*, 2007 a, b, 2008, 2009; Gavagan *et al.*, 1999).

Первое сообщение о галоалкалофильных бактериях, разлагающих органические нитрилы, получено в 2007 году (Sorokin *et al.*, 2007 b). Из объединенных проб отложений содовых озер Кулундинской степи (Алтай, Россия) и Северо-Восточной Монголии, а также содовых солончаковых почв (Кулундинская степь) были выделены два консорциума микроорганизмов. В первом присутствовали актинобактерии *Nitriliruptor alkaliphilus* ANL-iso2 и сателлитный штамм ANL-isoa, который был отнесен к новому виду рода *Marinospirillum* (филум *Gamma*proteobacteria). Дальнейшее исследование изолятов подтвердило, что актинобактерия ответственна за первичный гидролиз, тогда как *Marinospirillum* sp. утилизирует продукты без возможности гидролиза

нитрилов. Консорциум был охарактеризован как комменсальный, потому что штамм ANL-iso2 мог сам утилизировать промежуточные продукты.

Штаммы ANL-iso4 и ANL-isoa2 второго консорциума содовых почв по данным анализа последовательности гена 16S рРНК представляют новые виды рода *Bacillus* (ANL-iso4 позднее утвержден как *Bacillus alkalinitrilicus* sp. nov.). Совместная культура рассматривалась как мутуалистическая, где оба члена были облигатно зависимы друг от друга. Эксперименты с отмытыми клетками подтвердили наличие системы нитрилгидратаза/амидаза в штаммах ANL-iso2 и ANL-iso4, разлагающих нитрил, а также продемонстрировали, что фактический диапазон преобразуемых субстратов намного шире, чем тот, который используется для роста. Штаммы способны метаболизировать несколько алифатических нитрилов и чрезвычайно активно гидролизировали их C4 и C5 молекулы, однако уровень их амидазной активности был на два-три порядка ниже. Все четыре изолята относились к умеренно солеустойчивым облигатным алкалофилам. Диапазон pH для роста при 0,6 М Na⁺ с изобутиронитрилом составлял от 8,4 до 10,4 (оптимум 9,0–9,5) для ANL-iso2 и от 7,0 до 10,25 (оптимум 9,0–9,35) для ANL-iso4; при использовании изобутирамида в качестве субстрата диапазон pH составлял от 8,0 до 10,5 (оптимум 9,5) для ANL-isoa и от 7,3–10,3 (оптимум 9,0) для ANL-isoa2. Все изоляты росли в диапазоне концентраций ионов Na⁺ от 0,1 до 2 М при pH 10 (оптимум 0,3–0,5 М) (Sorokin *et al.*, 2007 b, 2009).

Из выше указанных объединенных образцов отложений содовых озер и содовых солончаковых почв, помимо консорциумов, выделена монокультура гаммапротеобактерии ANL-αCH3 – новый вид *Halomonas nitrilicus* sp. nov. Галоалкалофильная бактерия способная утилизировать ариалифатические нитрилы. Клетки ANL-αCH3 гидролизировали фенилацетонитрил, фенилпропионитрил, манделонитрил, бензонитрил, акрилонитрил и фенилглициннитрил, предположительно по нитрилазному пути. Нитрилгидратазная и амидазная активность не были обнаружены, но способность расти с бензойной и салициловой кислотой предполагала

возможность катаболизма ароматических соединений. ANL- α CH₃ с диапазоном pH для роста от 7,5–10,5 и оптимумом при pH 9 был чрезвычайно солеустойчив, рос при 0,1–3,5 М Na⁺ с оптимум 0,3–0,5 М (Chmura *et al.*, 2008).

Сезонное высыхание озера Самбхар (26.9261° с.ш., 75.0962° в.д., Раджастхан, Индия) сопровождается повышением концентрации солей и формированием гиперсоленых местообитаний. Из грунта в период засухи выделена умеренно галофильная бактерия *Halomonas* sp. ПИМВ2797, продуцирующая нитрилазу, Максимальная продукция ферментов и биомассы наблюдалась в среде, содержащей 60 г/л NaCl, а в его отсутствии рост не наблюдался. Максимальная нитрилазная активность наблюдалась при использовании адипонитрила, затем манделонитрила, валеронитрила и фумаронитрила. Нитрилаза из выделенного штамма обладала широким субстратным сродством к алифатическим динитрилам, ароматическим, а также к алифатическим нитрилам. Влияние pH на активность нитрилазы определяли при различных значениях pH, но максимальная наблюдалась при pH 7,0. Значительная активность фермента наблюдалась в температурном диапазоне 35–50°C, а максимальная при 45°C (Singh *et al.*, 2018).

Проведен скрининг морских дрожжей на наличие нитрилгидролизующей активности. Коллекция из 20 изолятов подводных отложений и глубоководных гидротермальных источников отобрана на твердой среде, содержащей либо бензонитрил, либо циклогексанкарбонитрил в качестве единственного источника азота. Среди них выделен активный солеустойчивый штамм *Meyerozyma guilliermondii* LM2, способный конвертировать бензонитрил в среде, содержащей до 1,5 М NaCl, с той же эффективностью, что и в обычных буферах. Лиофилизированные клетки тестировали на активность по отношению к бензонитрилу при различных значениях pH. Активность нитрилазы низка (<10%) при pH < 6, но высокоактивна при pH от 6 до 9. Нитрилаза из *M. guilliermondii* LM2 (UBOCC-A-214008) проявляла высокую активность в отношении ароматических субстратов, но также катализировала реакции с арилалифатическими и алифатическими субстратами. Процесс

полупрепаративного получения (R)-миндальной кислоты из рацемического нитрила миндальной кислоты был эффективно осуществлен в морской воде с конверсией субстрата до 95% и высоким энантиомерным избытком продукта, превышающим 98%, как при росте дрожжей, так и покоящимися клетками (Serra *et al.*, 2019).

Из илов реки Гвадалквивир (Кордова, Испания) выделен штамм бактерий, способный разлагать цианид в щелочных условиях, используя его как источник азота. Он идентифицирован как *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 и рос при оптимальном pH 9,5. Помимо цианида он использовал в качестве азота циано-металлические комплексы, цианат, 3-цианоаланин, цианоацетамид, нитроферрицианид и смесь цианосоединений, содержащуюся в отходах ювелирной промышленности. Химическая обработка, необходимая для удаления цианида, является очень затратной и приводит к образованию токсичных продуктов, поэтому биоразложение цианида становится привлекательной альтернативой химическому процессу (Luque-Almagro *et al.*, 2011).

Штамм-продуцент алкалофильной нитрилазы, способный трансформировать как алифатические, так и ароматические нитрилы, был выделен из горячих источников Таттапани и Химачал-Прадеш. Он был идентифицирован как *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36. Штамм трансформировал бензонитрил и акрилонитрил, при этом максимальная конверсия в соответствующие кислоты наблюдалась в 0,1 М буфере с pH 10, содержащем бикарбонат натрия (Seth *et al.*, 2017).

Fusarium solani O1, депонированный в коллекции культур мицелиальных грибов (Карлов университет, Прага, Чешская Республика), содержит нитрилазу, которая индуцируется никотинонитрилом и сохраняет активность при целноклеточном гидролизе бензонитрила при pH среды от 5 до 10 с оптимумом pH, равным 7 (Kaplan *et al.*, 2006; Vejvoda *et al.*, 2006).

Экстремальные биотопы представляют собой значимый источник микроорганизмов, обладающих нитрилгидролизующей активностью.

Выделенные из содовых озер, солончаковых почв, морских и глубоководных отложений, а также горячих источников представители родов *Nitriliruptor*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Meyerozyma* и *Fusarium* способны трансформировать широкий спектр алифатических, ароматических и арилалифатических нитрилов. Выраженная устойчивость к солености и щелочности делает такие микроорганизмы и продуцируемые ими ферменты перспективной альтернативой химической трансформации нитрилов, особенно в условиях, ограничивающих применение ферментов мезофильных микроорганизмов.

1.4 Биопленкообразование как форма адаптации и коллективного существования бактерий

Биопленка – это бактериальное сообщество, заключенное в матрицу из полисахаридов, липидов и белков, которая обеспечивает прикрепление к поверхности. Образование биопленок характерно для большинства бактериальных видов (Costerton *et al.*, 1999). Микроорганизмы в биопленке образуют сложные экологические ниши, взаимовыгодно сосуществуя и защищаясь от неблагоприятных условий, таких как колебания концентраций питательных веществ, присутствие токсичных химикатов, изменение солености, pH и температуры (Syed *et al.*, 2023). В естественной среде обитания подавляющее большинство бактерий существует в виде биопленок – высокоорганизованных многоклеточных структур. При этом количественное соотношение компонентов биопленки демонстрирует преобладание внеклеточного матрикса (65–95% массы) над собственно бактериальными клетками (5–35%).

Сложные бактериальные сообщества ответственны за управление биогеохимическими циклами важнейших биогенных элементов (углерода, азота, фосфора), которые поддерживают биосферу. Биопленки обычно образуются естественным образом (*in vivo*), но их также можно искусственно вырастить (*in vitro*) на различных поверхностях. Формирование происходит на границе раздела

фаз (жидкость-твердое вещество, жидкость-жидкость, жидкость-газ и др.). Они могут развиваться как на твердых субстратах, погруженных в водные растворы, так и формировать плавающие агрегаты на поверхности жидкостей (Armitano *et al.*, 2014). Типичным примером природной биопленки служит слизистый налет на подводных поверхностях скал в условиях течения. При наличии достаточных ресурсов биопленочные сообщества способны достигать макроскопических размеров (Flemming *et al.*, 2016).

Популяции бактерий возникают из отдельных клеток, а метаболически схожие популяции (например, сульфат- и серовосстанавливающие бактерии) образуют группы внутри матрикса. Группы (например, ферментативные, сульфат- и серовосстанавливающие, а также метаногенные бактерии), проводящие взаимозависимые метаболические процессы, образуют микробные сообщества. Важно отметить, что в составе биопленок могут сосуществовать разнообразные микроорганизмы – бактерии, простейшие, грибы и водоросли, причем каждый компонент сообщества выполняет специализированные метаболические функции (Мальцев, Мансурова, 2011).

Экзополисахариды – ключевая часть внеклеточных полимерных веществ, синтезируемая бактериальными клетками наряду с нуклеиновыми кислотами, белками и липидами. Эти высокомолекулярные соединения (500–2000 кДа) с разветвленной или линейной структурой включают гомо- и гетерополисахариды, целлюлозу, глюканы и фруктаны. Различные биологические и физические характеристики, такие как поверхностный заряд (катионный/анионный), усвоение питательных веществ и структурная стабильность, в значительной степени зависят от органических и неорганических компонентов экзополисахаридов. Эта группа соединений задействована в защите клеток от воздействий окружающей среды и выполняет барьерную функцию при взаимодействии биопленки с токсичными веществами.

Биопленка содержит различные ферменты, которые в первую очередь участвуют в модификации и разрушении экзополимеров. Белки и полисахариды являются субстратами соответствующих ферментов, а мономеры используются

клетками как питательные вещества при необходимости. Ферменты участвуют в диспергировании матрикса биопленки и высвобождении микробных клеток.

Внеклеточные (или структурные) белки обнаруживаются внутри биопленки. Они имеют большую молекулярную массу, участвуют в формировании биопленки, выполняют структурные и адгезивные функции. Особый интерес представляют амилоидные белки, участвующие в стабилизации матрикса.

Биосурфактанты – это гидрофобные, поверхностно-активные соединения, такие как липиды и полисахариды с алкильными группами. Они относятся к хелатирующим, комплексообразующим агентам, которые способствуют связыванию водонерастворимых или других подлежащих удалению субстратов. Таким образом, биосурфактанты регулируют поверхностное натяжение на границе раздела вода-воздух и способствуют газообмену.

Внеклеточная ДНК – важный компонент матрикса биопленки, состоящий из высокомолекулярных фрагментов. Она связана с повышенной антибиотикорезистентностью, обменом генетической информацией, способностью клеток к самоорганизации и поддержанию механической стабильности биопленки (Syed *et al.*, 2023).

Джеймс Шапиро в своей статье, опубликованной в 1988 году, впервые выдвинул концепцию бактерий как социальных организмов, способных к скоординированному поведению. Последующие исследования подтвердили существование у микроорганизмов сложных форм коллективного поведения. Так, виды *Mucosoccus* демонстрируют удивительную способность к дифференцировке при голодании, формируя сложные плодовые тела. Аналогичным образом *Anabaena* в процессе развития образует специализированные гетероцисты. *Streptomyces coelicolor* изменяет свою морфологию в зависимости от питательных условий, в то время как *Serratia liquefaciens* проявляет координированную подвижность при миграции клеток.

Наиболее ярко социальное поведение бактерий проявляется в процессе формирования биопленок. Для развития биопленок необходимо многоклеточное

поведение. Их развитие требует координации взаимодействия между одним или разными видами бактерий, что подчеркивает их способность к истинно многовидовой кооперации (Davey, O'toole, 2000).

Quorum sensing (чувство кворума) – это механизм межклеточной коммуникации микроорганизмов, при котором некоторые сигнальные процессы активируются только при высокой плотности клеток. Децентрализованные процессы, такие как чувство кворума, используют сигнальные молекулы, называемые аутоиндукторами, которые регулируют экспрессию генов в ответ на изменения плотности популяции клеток (Waters, Bassler, 2005; West *et al.*, 2006).

Хотя видоспецифичное чувство кворума позволяет бактериям распознавать "своих" в смешанной популяции, им также необходим механизм для обнаружения других видов. Способность оценивать соотношение "свои/чужие" и адаптировать поведение в зависимости от изменений этого баланса может быть критически важной для выживания бактерий (Davey, O'toole 2000; Elias, Banin, 2012; Syed *et al.*, 2023).

Характеристики зрелой биопленки:

- Сложное взаимосвязанное сообщество микроорганизмов
 - Клетки организованы в микроколонию
 - Микроколонию заключены в защитный полимерный матрикс
 - Формирование микроградиентов (питательных веществ, кислорода, воды и т.д.) внутри структуры
 - Присутствие системы межклеточной коммуникации
 - Повышенная устойчивость к негативным внешним воздействиям
- (Мальцев, Мансурова 2011).

Известно, что зрелые биопленки через определенное время подвергаются процессу диспергирования, что сопровождается переходом клеток в планктонное состояние. При визуальном наблюдении в проточной камере регистрируется постепенное отделение как одиночных клеток, так и небольших клеточных агрегатов от основной матрицы (Stoodley *et al.*, 2001).

Данный процесс представляет собой закономерную стадию жизненного цикла биопленки, обеспечивающую распространение микроорганизмов в новые экологические ниши. Механизм дисперсии необходим для бактериальной диссеминации и колонизации новых субстратов (Rumbaugh, Sauer, 2020)

Интегрированные в зрелую биопленку бактерии подвергаются закономерным стрессовым воздействиям, преимущественно связанным с истощением питательных ресурсов и ограничением пространства. Эти условия аналогичны стационарной фазе развития периодических культур, однако в биопленке их воздействие усиливается. В результате в биопленках формируются гетерогенные сообщества, включающие не только активные метаболизирующие клетки, но и покоящиеся формы (Смирнова и др., 2010).

Биопленкообразование рассматривается как один из важных механизмов адаптации бактерий к изменяющимся и неблагоприятным условиям окружающей среды, в связи с чем изучение способности биотехнологически значимых микроорганизмов образовывать биопленки важно для понимания перспективности использования этих штаммов в промышленных и биоремедиационных процессах (Jallageas *et al.*, 2005).

1.5 Деградация нитриловых полимеров под воздействием факторов окружающей среды и живых организмов

1.5.1 Влияние бутадиен-нитрильного каучука на окружающую среду и живые организмы

Доля производства синтетических каучуков в мире составляет 65%. К самым популярным относятся различные типы: стирол-бутадиеновый, бутадиен-нитрильные сополимеры, этилен-винилхлоридные сополимеры, полибутадиен, полихлоропрен (неопрен) (Shah *et al.*, 2013). Синтетический каучук синтезируется из таких источников, как нефть, природный газ и ацетилен. Благодаря контролю химических процессов при производстве, синтетические каучуки обладают широким диапазоном свойств, адаптированных для конкретных применений (Guajardo, Andler, 2024).

БНК представляет собой синтетический сополимер на основе нефти, состоящий из акрилонитрила и 1,3-бутадиена, запатентован в 1934 году Эрихом Конрадом и Эдуардом Чункуром (Chiba *et al.*, 2025; Tang, Zhang, 2014; Lovato *et al.*, 2023). Благодаря маслостойкости, тепло- и холодостойкости, износостойкости и особенно превосходной стойкости к остаточной деформации сжатия, БНК широко применяется в различных отраслях промышленности, таких как авиационная, автомобильная, нефтяная и медицинская, в том числе как сополимер для улучшения желаемых характеристик получаемой каучуковой смеси (Tang, Zhang, 2014; Rempel, Wang, 2016; Lovato *et al.*, 2023; Kumar, Siddaramaiah, 2006; Mészáros *et al.*, 2025).

БНК – семейство ненасыщенных сополимеров, которые производятся методом эмульсионной полимеризации, как показано на рисунке 2.

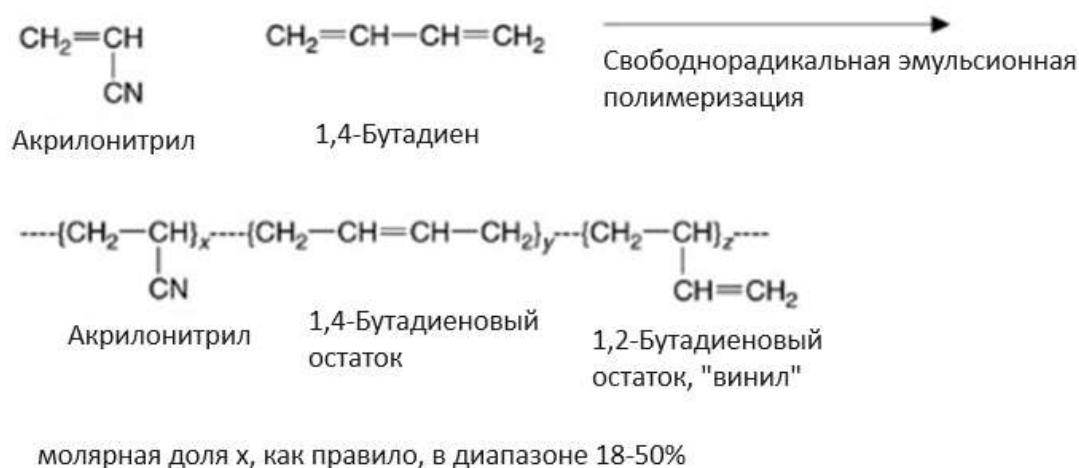


Рисунок 2 – Полимеризация и структура цепи БНК

По сравнению с другими часто используемыми каучуками, БНК имеет превосходную остаточную деформацию сжатия, выдающуюся устойчивость к разрыванию и истиранию. Высокое содержание акрилонитрила способствует повышению прочности, большей устойчивости к набуханию под действием углеводородных масел и более низкой проницаемости, что, однако, достигается ценой меньшей гибкости при низких температурах. Количество акрилонитрила в конечном сополимере часто варьируется от 18 до 50% для обеспечения определенных качеств каучука. В частности, повышение концентрации

акрилонитрила используется для получения высокопрочного каучука, в то время как более низкий процент акрилонитрила используется для получения гибкого каучука при низких температурах. Основным недостатком БНК является плохая озono- и атмосферостойкость, что делает его непригодным для применений, где требуются эти качества. БНК имеет рабочий температурный диапазон от -30 до +100°C (Rempel, Wang, 2016; Lovato *et al.*, 2023), обладает хорошей адгезией ко многим волокнам, особенно полярным по своей природе и используется как связующее при производстве нетканых материалов. Его добавление улучшает механические свойства нетканого джута, а скорость водопоглощения зависит от количества БНК в композите (Kumar *et al.*, 2010). Объем производства БНК в мире в 2020 году составил не менее 1,32 мегатонны в год и, как ожидается, будет расти (Chiba *et al.*, 2025).

Пандемия гриппа A/H1N1 (свиного гриппа) и новая коронавирусная инфекция (COVID-19) обусловили существенный рост мирового рынка медицинских хирургических и смотровых перчаток, для производства которых наряду с натуральным каучуком (НК) широко применяется нитрильный каучук. Содержание акрилонитрила в БНК придает изделиям лучшую устойчивость к проколам и износу по сравнению с НК. Перчатки из БНК отличаются большим сроком хранения, но меньшей тактильной передачей в сравнении с НК перчатками. БНК является одним из наиболее широко используемых синтетических каучуков из-за его низкой, по сравнению с другими, стоимости. Они стали критически важным средством индивидуальной защиты (Lovato *et al.*, 2023; Jędruchniewicz, Oleszczuk, 2021).

Воздействие вулканизованного каучука на окружающую среду является глобальной проблемой из-за его широкого использования (Heydari *et al.*, 2026). Отходы, а также производственные побочные продукты и обрезки выбрасываются в больших количествах, и большая их часть сжигается без эффективного повторного использования. По данным Японской ассоциации производителей каучука, объем отходов БНК только в Японии оценивается как минимум в 0,1 мегатонны в год (Chiba *et al.*, 2025).

Мировой спрос на резиновые перчатки продолжает расти, несмотря на сопутствующие экологические проблемы, связанные с их утилизацией. Резиновые перчатки составляют 24% общих твердых медицинских отходов (Lovato *et al.*, 2023). Их утилизация становится актуальной экологической проблемой, поскольку классические резиновые материалы устойчивы к естественной деградации. Переработка и восстановление отходов каучука экономически сложны из-за энергоемких процессов, необходимых для восстановления и повторной обработки вулканизированного каучука. Традиционные методы переработки перчаток, такие как механическое измельчение и химическая девулканизация, как правило, малоэффективны, что приводит к захоронению миллионов из них на полигонах твердых бытовых отходов ежегодно (Kilmartin-Lynch *et al.*, 2022; Heydari *et al.*, 2026; Dzulkaflly *et al.*, 2025).

В тех случаях, когда перчатки выбрасываются или утилизируются ненадлежащим образом, они могут попадать в окружающую среду. Как и другие обычные пластики с ограниченной разлагаемостью, они не являются экологически инертными, как было отмечено ранее (Albertsson, Karlsson, 1993; Elizalde-Velazquez *et al.*, 2020). Хотя их прямая токсичность еще недостаточно изучена, подобно другим пластиковым материалам, БНК перчатки обладают адсорбционными свойствами, которые позволяют им накапливать различные неорганические вещества, такие как тяжелые металлы (Besson *et al.*, 2020; Brennecke *et al.*, 2020), органические загрязнители, полициклические ароматические углеводороды (Lei *et al.*, 2020; Rochman *et al.*, 2013) и фармацевтические препараты (Elizalde-Velazquez *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2016). Эти вещества могут быть адсорбированы, накоплены, транспортированы пластиковым материалом (Jędruchniewicz, Oleszczuk, 2021) и, наконец, выщелочены из полимерной матрицы, что может приводить к загрязнению водной и почвенной среды (Garçon *et al.*, 2017; Reichel, 2012). В дополнение к неблагоприятным экологическим последствиям пластикового загрязнения (Bodor *et al.*, 2024), постепенное высвобождение сопутствующих загрязнителей

также может вызвать ряд расстройств в функционировании экосистем (Christiansson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2022). Так, потенциально опасно содержание фталатов среди пластификаторов БНК (Samantarai *et al.*, 2019; Bui *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2023).

Небиоразлагаемая природа перчаток представляет долгосрочную опасность, так как они могут сохраняться в окружающей среде в течение многих лет, потенциально приводя к загрязнению МП (Das *et al.*, 2021; Mészáros *et al.*, 2025; World Health Organization, 2020).

Благодаря своим размерам МП способен оказывать воздействие на широкий спектр биологических объектов — от бактерий до человека. Именно этот фактор обуславливает пристальный интерес исследователей к его токсикологическому профилю. Несколько комплексных исследований документально подтвердили токсическое воздействие МП на микроорганизмы, водные организмы, растения, животных и человека (Wang *et al.*, 2021; Elizalde-Velazquez, Gómez-Oliván, 2020; Yin *et al.* 2021).

Плазмиды, как мобильные генетические элементы, являются распространенными переносчиками генов устойчивости к антибиотикам. Адсорбция плазмидной ДНК на МП незначительна, но они служат субстратом для биопленок, что может усиливать горизонтальный перенос генов и влиять на распространение резистентности к антибиотикам (Sverenkárová *et al.*, 2026).

Пластиковые отходы могут разлагаться до микронных или наноразмеров под воздействием длительных физических, химических и биологических процессов. Независимо от того, используются ли резиновые изделия повторно, перерабатываются или выбрасываются, их конечные продукты всё равно попадают в окружающую среду в основном в виде микрочастиц и очень медленно разлагаются (Basik *et al.*, 2021; Иони и др., 2025; Sorasan *et al.*, 2022).

Микрочастицы можно в широком смысле определить как синтетические или полусинтетические полимеры размером менее 5 мм (Barbosa *et al.*, 2020; Conti *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2022). В то же время в научном сообществе до сих

пор ведутся дебаты по поводу определения термина «наночастица»: должен ли их верхний предел размера составлять 100 или 1000 нм (Mitrano *et al.*, 2021).

Износ шин, приводящий к образованию отходов диаметром от 1 мкм до 5 мм, считается одним из основных источников загрязнения окружающей среды МП (Halle *et al.*, 2020). Этот МП в основном смывается в океаны. Благодаря большому соотношению площади поверхности к объему, он адсорбирует гидрофобные загрязняющие вещества и токсины из водной системы до попадания в пищевую цепь и концентрации в морской пищевой цепи (Chatterjee, Sharma, 2019).

Увеличение токсичности МП с уменьшением размера частиц является хорошо документированным явлением, причем нанопластики считаются наиболее токсичными. Например, нанопластики, инкубированные с плазмидой, несущей ген устойчивости к ампициллину, и *Escherichia coli* DH5 α , генерировали активные формы кислорода, повышая проницаемость мембраны и увеличивая скорость горизонтального переноса генов (Wang *et al.* 2022). МП из полилактида размером 0,09–1,25 мкм, в отличие от более крупных частиц размером 1,25–2,8 мкм, повышал частоту мутаций *S. Typhimurium*, приводящих к устойчивости к ципрофлоксацину, почти в 3,5 раза по сравнению со спонтанным уровнем и увеличивал скорость их возникновения более чем в четыре раза (Cverenkárová *et al.*, 2026).

Разработка и внедрение новых компонентов эластомеров и их комбинаций для продления срока службы обеспечивает разнообразие уникальных химических структур (Tayefi *et al.*, 2023). Это усложняет решение проблемы образования и накопления МП, поскольку определяет не только свойства, но и механизмы деградации в окружающей среде, а также влияние на здоровье живых организмов. Это подчеркивает важность тщательных, индивидуальных исследований каждого типа полимеров для полного понимания долгосрочного эффекта их применения и необходимость разработки инструкций по их ответственному производству, использованию и утилизации (Иони и др., 2025).

1.5.2 Деструкция бутадиен-нитрильного каучука под воздействием физических факторов

Старение БНК – сложный и длительный процесс, являющийся результатом совместного действия внутренних и внешних факторов. Поскольку механические свойства полимеров зависят от молекулярной структуры, деградация материала, связанная с разрывом ненасыщенных связей БНК и снижением молекулярной массы, может привести к механическому разрушению (Vega-Cantú *et al.*, 2003; Tang, Zhang, 2014).

Известно, что воздействие кислорода, озона, тепла и света вызывает разрушение полимеров (Vega-Cantú *et al.*, 2003; Tang, Zhang, 2014). Фотодеградация – еще один важный процесс, который оказывает пагубное влияние на характеристики эластомеров. В условиях внешней среды доминирующей абиотической деградацией считается фотодеградация. Фотодеградация состоит из трех фаз: инициирования, распространения и обрыва. Первая фаза включает инициированный светом или теплом разрыв химических связей полимера и образование свободных радикалов, для чего необходимы ненасыщенные группы, способные поглощать световую энергию. Гидропероксиды являются промежуточными продуктами при термической и фотодеградации многих органических материалов (Tayefi *et al.*, 2023).

В сшитом каучуке УФ-окисление происходит по ненасыщенной связи ($C=C$) и дает пероксид ($-OOH$), который обнаруживается как гидроксильная полоса в ИК-спектре. Однако пероксид имеет тенденцию перегруппировываться в более стабильную структуру, такую как карбонильная группа. Поверхностные трещины образуются спонтанно во время УФ-воздействия в результате увеличения кристалличности поверхностных слоев, что приводит к усадке (Noriman *et al.*, 2010). Гидролиз нитрильной группы влияет на физические свойства эластомеров, поскольку образующиеся амидные и карбоксильные группы могут служить точками инициирования термической деградации (Vega-Cantú *et al.*, 2003).

При повышении температуры до пороговых значений полимерная цепь начинает разрушаться в области соединения мономеров, которые могут начать реагировать друг с другом (Tayefi *et al.*, 2023).

Наряду с указанными выше видами воздействия, озон влияет на ненасыщенные связи в цепях молекул полимеров. Среди последствий – снижение молекулярной массы полимера, постепенное уменьшение двойных связей и образование карбонильных/карбоксильных продуктов и озонидов. Так, для озонового старения натурального каучука характерно:

1) Начало старения эластомера с поверхности внутрь, а также от центра к краям.

2) Структуры сшивок и цепей подвергаются разрыву под влиянием атаки озона, и трещины на поверхности резины возникают перпендикулярно направлению растяжения.

3) Под влиянием озона двойные связи разрушаются, и в натуральном каучуке образуются соединения $C=O$ (алкилальдегиды и кетоны), алифатические сложные эфиры и простые эфиры. Кроме того, также обнаружено образование свободных радикалов, которые могут ускорять процесс (Tayefi *et al.*, 2023).

Окислительная деградация может происходить в полимерах либо термическим, либо фотохимическим путем во время обработки и производства, а также при воздействии солнечного света или УФ-излучения. Процесс радикализации является движущей силой деградации, которая вызывает разрыв или сшивание основной цепи полимера (Tayefi *et al.*, 2023).

Ключевым фактором старения БНК является содержание акрилонитрила. Более высокое содержание акрилонитрила способствует повышению прочности, большей устойчивости к набуханию под действием углеводородных масел и более низкой проницаемости, что достигается ценой меньшей гибкости при низких температурах (Tang, Zhang, 2014). Варьирование содержания акрилонитрила (от 15 до 41%) в структуре БНК определяет межфазное взаимодействие (Samthong *et al.*, 2019).

Поведение при взаимодействии эластомера с жидкостью основано на нескольких переменных: химической структуре полимера, кристалличности и наличии поперечных связей. Сшивание ограничивает проникновение жидкостей в материал из-за дополнительных точек связывания (Balasooriya *et al.*, 2018).

Исследование естественной деградации резин ограничено длительными временными интервалами, необходимыми для проявления признаков износа. В экспериментальной практике эту проблему решают путем моделирования процессов деструкции в условиях искусственного старения. Например, искусственно созданная тепловая среда (65 °C, до 90 суток) запускает интенсивные термоокислительные процессы в БНК. В ходе испытаний фиксируется линейный рост плотности пространственной сетки за счет реакций дополнительного сшивания. Ускоренное старение форсирует такие физико-химические процессы, как накопление гидроксильных групп в структуре матриц и миграция пластификаторов и антиоксидантов из внутренних слоев материала на его поверхность (Liu *et al.*, 2016).

1.5.3 Биodeградация бутадиен-нитрильного каучука, её перспективы и ограничения

Биodeградация определяется как процесс снижения сложности химических соединений посредством биологического катализа с участием живых микробных организмов (бактерий, грибов, актиномицетов) или выделенных из них ферментов. Биodeградацию можно классифицировать на первичную (изменение химической структуры), экологически приемлемую (удаление нежелательных свойств) и полную (минерализация до CO₂, CH₄, H₂O, солей). Полная биodeградация считается подтвержденной только после стадии минерализации, когда органический углерод полимера превращается в газообразные неорганические соединения (Silva *et al.*, 2023). Физические/химические изменения материала происходят из-за активности микроорганизмов, растущих на поверхности или/и внутри. Микроорганизмы, ответственные за деградацию каучука, в основном являются бактериями и

грибами, которые выделяют ферменты, расщепляющие химические связи каучука на более простые соединения, используемые в качестве источников углерода и энергии.

Полимерная структура и ее свойства определяют ход процесса деградации, однако определенные условия окружающей среды, такие как влажность, температура, инсоляция и атмосферные загрязнители, также важны (Guajardo, Andler, 2024; Tayefi *et al.*, 2023). Полимерные материалы уникальны по химическому составу, физической форме, механическим свойствам и применению. Биodeградация определяется различными факторами, которые включают тип организма и характер предварительной обработки. Характеристики полимера, такие как его подвижность, кристалличность, молекулярная масса, тип функциональных групп и заместителей, присутствующих в его структуре, и добавки, введенные в полимер, играют важную роль. Небольшое изменение химических структур может привести к большому различиям с точки зрения биodeградируемости (Artham, Doble, 2008; Odian, 2004; Tansel, 2019). Доминирующие группы микроорганизмов и пути деградации, связанные с разрушением полимеров, часто определяются условиями окружающей среды. При наличии O_2 за разрушение сложных материалов преимущественно отвечают аэробные микроорганизмы, конечными продуктами деятельности которых являются микробная биомасса, CO_2 и H_2O . Напротив, в анаэробных условиях за разрушение полимеров отвечают анаэробные консорциумы микроорганизмов. В метаногенных (анаэробных) условиях основными продуктами являются микробная биомасса, CO_2 , CH_4 и H_2O (Shah *et al.*, 2008).

В отличие от сжигания или захоронения на полигонах твердых бытовых отходов, микробная биodeградация каучука экологически выгодна, поскольку не производит вредных побочных продуктов и не требует дополнительного энергетического топлива (Guajardo, Andler, 2024).

Для изучения биodeградации наиболее распространены такие методы как ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) и сканирующая электронная

микроскопия. Первая является идеальным инструментом для выяснения химических и физических свойств полимеров, качественного и количественного анализа полимерных смесей, а также отслеживания процессов их деградации. Индексы связей, рассчитанные по FTIR-спектрам, применяются для оценки изменений, которые пластик претерпевает при атмосферном старении (Sorasan *et al.*, 2022). В наблюдаемом спектре характерные длины волн закреплены за различными веществами. Отношение нитрильного пика к С-Н и двойной связи бутадиена может использоваться для характеристики нитрильного каучука, например, для определения содержания акрилонитрила (Rempel, Wang, 2016). Однако индексы, основанные на определенных пиках FTIR-спектров, не могут быть напрямую скоррелированы с историей деградации, по крайней мере, для разных пластиковых частиц (Sorasan *et al.*, 2022).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) позволяет создавать изображения топографии поверхности образца с высоким разрешением (Rempel, Wang, 2016). При изучении биodeградации каучука СЭМ демонстрирует эффективную колонизацию поверхности каучука бактериями и образование биопленки во время культивирования, а также характерные кратеры проникновения на поверхности (Shah *et al.*, 2013).

Помимо названных методов для подтверждения биodeградации пластика используется рамановская спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография и ряд других методов (Colachis, 2024).

Большинство известных в настоящее время и хорошо охарактеризованных бактерий, разлагающих каучук, являются грамположительными. Грамотрицательные бактерии, разлагающие каучук, по-видимому, встречаются реже, и до недавнего времени был известен лишь один грамотрицательный штамм (Jendrossek, Birke, 2019). Две исследованные и классифицированные группы каучук-деградирующих микроорганизмов включают актиномицеты (*Corynebacterium*, *Nocardia* и *Mycobacterium*), требующие прямого контакта с каучуковыми субстратами, и *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Actinoplanes*, образующие прозрачные ореолы при культивировании на минеральном агаре,

содержащем полиизопреновый латекс, что указывает на секрецию ферментов. *R. rhodochrous* также способен разлагать синтетический каучук (Guajardo, Andler, 2024). Bode *et al.* (2001) экспериментально подтвердили способность *Nocardia* sp. DSMZ43191, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas citronellolis* и *Xanthomonas* sp. разлагать синтетический поли(цис-1,4-изопрен) с увеличением белка в культуре до 1250 мкг/мл. При этом контрольные штаммы (*Streptomyces lividans* и *Streptomyces exfoliatus*) не проявляли деградиционной активности, что указывает на специфичность процесса. В культурах контрольных штаммов концентрация белка незначительно снижалась, поскольку бактерии поглощали следовые количества дрожжевого экстракта из среды, но оказались не способны усваивать каучук. Анализ методом гель-проникающей хроматографии подтвердил, что молекулярная масса полимера в контроле не изменилась, а сам образец сохранил исходный цвет и структуру, не приобретая характерной для деструкции липкости. Потеря массы полимерного материала (латексных перчаток) при инкубации с контрольными штаммами составила менее 3%, в то время как активные штаммы уничтожали до 18% массы образца (Bode *et al.*, 2001; Tsuchii, Takeda, 1990). Shah *et al.* (2012) подтвердили способность *Bacillus* sp. AF-666 деградировать латексные перчатки из натурального каучука (НК). Способность штамма использовать латекс в качестве единственного источника углерода и энергии доказана эрозией поверхности, окислительным разрывом полимерных связей экспоненциальным ростом биомассы и интенсификацией выделения углекислого газа. Linos *et al.* (2000 a, b) сообщили о выделении граммотрицательной бактерии из водного экстракта разрушающейся автомобильной шины, которая таксономически охарактеризованной как *Pseudomonas aeruginosa* AL98. СЭМ-анализ также показал эффективную колонизацию поверхности каучука штаммом AL98 и образование биопленки во время культивирования. Однако видимая деградация каучука начиналась только через 2-3 недели (Linos *et al.*, 2000 a, b).

Есть крайне незначительное количество информации о воздействии микроорганизмов на БНК. Так, Delgado-Nungaray et. al. сообщали о способности *P. aeruginosa* использовать нитриловые перчатки в качестве единственного источника углерода (Delgado-Nungaray, 2024), однако, при описании экспериментов было указано, что полимер добавляли в среду LB, что не позволяет согласиться с тезисом об использовании БНК бактериями как единственного источника питания. Chiba et al. исследовали деградацию углеродного скелета БНК посредством *Gordonia* sp. J1A и показали, что Nro1 является ключевым ферментом, катализирующим начальный этап реакции разложения БНК. За 10 дней штамм J1A вызвал потерю веса образца на 6,5–11%. Штамм разлагает: отходы нитрильного каучука, каучук без добавок и сшивок, каучук только с серными сшивками, пластификатор диоктиладипат. При этом штамм не разлагает полиакрилонитрил и цис-1,4-полиизопрен (Chiba et al., 2025). Механизм, лежащий в основе разложения БНК, в частности, с участием ферментов, расщепляющих нитрилы/амиды, еще не до конца понят (Peter et al., 2024).

Известно, что деградация полимеров тесно связана с образованием биопленки, которая представляет собой сообщество микроорганизмов, погруженных в полимерный матрикс. Микроорганизмы, участвующие в деградации МП, первоначально прикрепляются к его поверхности. Большая часть бактериальной колонизации гидрофобных субстратов зависит от гидрофобности клеточной поверхности (Zhang et al., 2021). Механизм биodeградации МП обычно можно разделить на пять стадий: образование биопленки на частицах МП, биodeградация, биофрагментация, ассимиляция и минерализация (Kothawale et al., 2023).

Пример переработки и восстановления НК с помощью микробного действия включает следующие этапы:

- 1) Отходы НК измельчаются для облегчения микробного воздействия.
- 2) Измельченный каучук нагревают для денатурации нестабильных соединений, одновременно стерилизуя каучук.

3) Проводится процесс детоксикации, в котором грибы белой гнили используются для разложения добавок НК.

4) После удаления добавок проводится процесс девулканизации с помощью *Thiobacillus ferrooxidans* для разрыва серных связей НК.

5) Разложение может быть завершено с помощью мощных биodeградирующих агентов, таких как *Nocardia* sp. и *Gordonia polyisoprenivorans*.

6) Молекулы с более низкой молекулярной массой могут быть катаболизированы *Streptomyces* sp. или *Xanthomonas* sp (Lovato *et al.*, 2023; Tsuchii, Takeda, 1990; Arenskötter *et al.*, 2001).

Характеристики поверхности исследуемого материала имеют решающее значение, поскольку наличие шероховатых поверхностей каучука и трещин благоприятны для роста и прикрепления микроорганизмов. Наблюдения с помощью сканирующего электронного микроскопа показали, что гифальная сеть штамма *Paecilomyces variotii* SFA-25 и эрозия резиновой поверхности были более интенсивными на шероховатых и потрескавшихся поверхностях по сравнению с гладкими поверхностями (Basik *et al.*, 2021). Для того чтобы микроорганизмы могли использовать полимеры в качестве источника питательных веществ, требуется предварительное окисление полимеров посредством абиотического процесса, такого как воздействие ультрафиолетового (УФ) излучения, тепла и/или химических веществ из окружающей среды (Serumgard, 1998).

Предпринимались попытки оценки микробной устойчивости невулканизированных синтетических каучуков-сырцов путем наблюдения за интенсивностью роста грибов на образцах (Schwartz, 1963; Zyska, 1988, Williams, 1982).

Недавно было проведено сравнение использования монокультур, микробных консорциумов из двух и более микроорганизмов в исследованиях деградации каучука, имитирующих естественные условия окружающей среды (Watcharakul, 2017; Nawong *et al.*, 2018; Krishnaswamy, Ahongsangbam, 2017;

Muralidharan, Krishnaswamy, 2016; (Adams *et al.*, 2015; Akkharabunditsakul *et al.*, 2017). Деградация сложных молекул достигается за счет кооперативной деградации, при которой один организм преобразует исходный материал в продукты, которые могут быть использованы другими организмами. Деградация каучука эффективнее при взаимодействии нескольких штаммов (Watcharakul, 2017; Rahman *et al.*, 2019).

Различные синтетические полимеры могут быть подвергнуты деструкции гетерогенной группой ферментов, среди которых липазы, эстеразы, лакказы, амидазы, кутиназы, карбоксиэстеразы, монооксигеназы, диоксигеназы и другие. Ферменты, такие как монооксигеназы, отвечают за реакции деалкилирования, эпоксидирования, гидроксирования, дегалогенирования, дезаминирования, десульфурирования, сульфоокисления и восстановления N-оксидов. Предполагается общий механизм окислительного расщепления для всех типов организмов, разлагающих каучук. Внеклеточные гидролитические ферменты, такие как гидролазы и другие неспецифические ферменты, например, пероксидазы, лакказы, лигнинпероксидазы, также обладают способностью разлагать МП. Гидролазы способны разлагать поверхность полимера, делая его более восприимчивым к разложению другими ферментами, тогда как лакказа деполимеризует эти материалы путем окислительного расщепления, что приводит к образованию микротрещин на его поверхности (Deu, 2023). Микробные ферменты расщепляют полимеры пластика на небольшие цепочки мономеров, димеров и олигомеров, которые могут быстро проникать через клеточную мембрану и далее использоваться микробами в качестве источника углерода и энергии (Jaiswal *et al.*, 2020).

Предполагается общий механизм окислительного расщепления каучука различными организмами. Поскольку двойные связи поли(цис-1,4-изопрена) расщепляются путем включения кислорода, реакция может катализироваться монооксигеназой или диоксигеназой (Shah *et al.*, 2013). Известно три каучуковых оксигеназы, участвующих в расщеплении НК, его синтетических аналогов, а также некоторых виды пластика: каучуковая оксигеназа A (RoxA), каучуковая

оксигеназа В (RoxB) и Lcp (Latex-Clearing Protein). RoxA демонстрирует механизм экзо-расщепления, продуцируя 12-оксо-4,8-диметилтридека-4,8-диен-1-аль в качестве основного продукта. Lcp и RoxB обладают механизмом эндо-расщепления, производя смесь более длинных олиго-изопреноидов (от C20 до C100) (Guajardo, Andler, 2024; Watcharakul *et al.*, 2016; Yikmis, Steinbüchel, 2012; Andler *et al.*, 2022). Анализ продуктов деградации натурального и синтетического каучука, выделенных из различных бактериальных культур, без исключения показал, что происходит окислительное расщепление двойной связи в полимерной цепи (Rose, Steinbüchel, 2005).

Nro1 – фермент, расщепляющий основную цепь БНК (связи C–C и C=C), относится к гем-содержащим оксигеназам (33,6 кДа). Ген *nro1*, экспрессированный в *E. coli*, позволяет производить фермент, разлагающий отходы БНК и чистый БНК (без серных сшивок, пластификаторов, антиоксидантов и технического углерода) с потерей веса 0,20% и 0,07% за 24 ч соответственно и продуцирует альдегиды/кетоны. Nro1 на 99,3% идентична белкам семейства мембрано-связанных оксигеназ и не имеет сходства с белками Lcp, но имеет сходную трехмерную структуру. Фермент Nro1 катализирует окислительное расщепление двойных связей C=C в основной цепи БНК с образованием альдегидов (аналогично MraB и Lcp). Продукты деградации включают: 4-циано-1-циклогексен, олигомеры C22–C58, содержащие альдегидные, сложноэфирные и гидроксильные группы, технический углерод и белые осадки (предположительно сложные эфиры с C=C, но без CN-групп) (Chiba *et al.*, 2025).

Эффективность ферментативной деградации каучука ограничена несколькими ключевыми факторами. Деградация затруднена из-за структурной сложности и нерастворимости каучука в воде, поэтому процесс обычно идет только на поверхности материала. Дополнительную проблему создают промышленные добавки, продлевающие срок службы изделий — ускорители, антиоксиданты и стабилизаторы, которые препятствуют работе ферментов (Guajardo, Andler, 2024; Tayefi *et al.*, 2023). Среди пластификаторов нефтяное

масло ингибирует рост микроорганизмов, а парафиновое масло в малых дозах даже стимулирует его. Активаторы вроде оксида цинка и стеариновой кислоты могут способствовать росту микроорганизмов (Guajardo, Andler, 2024).

Особенно устойчив к биодegradации вулканизированный каучук благодаря своей трехмерной сетчатой структуре с поперечными связями между полимерными цепями (Guajardo, Andler, 2024). Вулканизация каучука серой создает трехмерную сеть внутри резиновой матрицы, которая предотвращает скольжение полимерных цепей под нагрузкой и увеличивает механическую прочность, но одновременно затрудняет биодegradацию (Dzulkaflly *et al.*, 2025).

Скорость биоконверсии снижается из-за ингибирования промежуточными продуктами распада и ограничений массопереноса, а сама биодegradация коммерческих полимеров протекает медленно и часто не полностью, что ведет к накоплению МП. Масштабирование процесса до промышленного уровня остается серьезной инженерной задачей (Guajardo, Andler, 2024).

Экстракция латексных перчаток органическими растворителями перед инкубацией усиливает рост некоторых штаммов, разлагающих каучук (Shah *et al.*, 2013). Было продемонстрировано, что экстракция ингибирующих веществ (антиоксидантов) с использованием органических растворителей способствует размножению представителей видов *Gordonia* и *Micromonospora*. Однако использование химических растворителей для удаления ингибиторов каучука не является экологически чистым (Lovato *et al.*, 2023; Berekaa *et al.*, 2000).

Использование природных наполнителей позволяет регулировать дegradацию полимерного материала. Добавление природных наполнителей улучшает биоразлагаемость, так как они способствуют разрушению полимерной матрицы, стимулируя микробную активность и ферментативное расщепление цепи (Dzulkaflly *et al.*, 2025). Скорость дegradации полимера можно контролировать, изменяя соотношение органических компонентов (Banerjee *et al.*, 2014). Так, скорость биодegradации композитов джут-БНК напрямую зависит от объемной доли джута в композите (чем больше нитрила, тем медленнее разложение) (Kumar *et al.*, 2010). В каучуковых композитах с содержанием

нанокристаллов целлюлозы бактерии непрерывно разрушают последние и увеличивают структуру пор с образованием крупных полостей и сетей между ними, что увеличивает водопоглощение, повышая скорость биodeградации (Heydari *et al.*, 2026).

Необходимость переработки отслуживших каучуковых и пластиковых изделий стимулирует поиск биологических подходов к деструкции этих устойчивых материалов. Микробная деградация рассматривается как перспективный метод очистки почв и вод от полимерных отходов, однако её эффективность ограничена сложностью состава каучуков, а также биологическими и экспериментальными факторами (Guajardo, Andler, 2024).

Обзор литературных источников показал, что нитрилы – это токсичные соединения природного и антропогенного происхождения, вовлеченные в азотный цикл. Нитрилгидролизующие ферменты бактерий (нитрилазы, нитрилгидратазы, амидазы) эффективно трансформируют их в менее опасные продукты. Особый интерес вызывают экстремофилы, способные функционировать в жестких условиях промышленных стоков и производства. С другой стороны, нитрильные полимеры, такие как БНК, устойчивы к разложению и накапливаются в виде МП, известные штаммы-деструкторы единичны, а механизмы деградации изучены слабо.

В связи с этим в экспериментальная часть посвящена изучению способности галоалкалотолерантных бактерий – деструкторов нитрилов, выделенных из отложений содового шламохранилища, расположенного на северо-западной окраине г. Березники (Пермский край), разлагать нитрильные соединения и способствовать деградации БНК. Результаты помогут оценить перспективы использования этих культур в биотехнологии и ремедиации загрязненных сред.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Микробиологические методы

2.1.1 Места отбора проб и их характеристика

Бактериальные изоляты выделены из проб содового шлама и грунта старой карты содового шламохранилища АО “Березниковский содовый завод” (Maksimova *et al.*, 2025). Общая площадь шламохранилища составляет 2,4 км², общий объем шлама превышает 10 млн. м³ (Блинов и др., 2003). Грунт был отобран с поверхности, на глубине 5 и 10 см, также для выделения нитрилгидролизующих бактерий использовалась объединенная проба грунта. Отбор проб проводили в сентябре 2017 г. Координаты отбора проб: 59.439393° N, 56.717480° E – новая карта (действующее шламохранилище); 59.428500° N, 56.731097° E – старая карта (восстанавливающиеся территории).

Для водной составляющей содового шламохранилища характерны экстремальные значения pH в диапазоне 11–12,6, в донных отложениях содовых озер – pH 11. Образцы грунта с территории осушенного содового озера умеренно-щелочные (pH 8–8,5). Минерализация на глубине 5 см в районе старой карты шламохранилища достигает 3,8 г/л, на осушенной поверхности 17 г/л, шлама 98,2 г/л (Шилова и др., 2020).

В поверхностных техногенных образованиях прибрежной зоны действующего шламонакопителя и в водных пробах содержание кальция минимально по сравнению с другими пробами, и составляет в кислоторастворимой и ацетатно-аммонийной фракциях 54–116 г/кг. В остальных точках содержание кальция в кислоторастворимой и ацетатно-аммонийной фракциях варьирует в пределах 260–470 г/кг грунта. Происходит аккумуляция тяжелых металлов в поверхностных техногенных образованиях (грунтах) территории старой карты содового шламохранилища: максимальные концентрации в кислоторастворимой фракции Fe – 2244 мг/кг, Mn – 93,1 мг/кг, Ni – 7,5 мг/кг, Pb – 53,4 мг/кг и Cd – 0,25 мг/кг (Шилова и др., 2020).

2.1.2 Бактериальные изоляты и штаммы

Для идентификации изолятов, выделенных на селективной агаризованной минеральной среде (0,05% NaCl, pH 7,2) с 10 мМ ацетамида или 0,25% ацетонитрила в качестве единственного источника углерода, использован метод секвенирования гена 16S рРНК. Наиболее детально изучены перспективные штаммы *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э, депонированные нами в Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов (WDCM # 768) (<http://iegmcol.ru/>) под номерами IEGM 1416 и IEGM 1417 соответственно (Приложение А.1, А.2). Остальные выделенные и описанные в работе изоляты поддерживаются в лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН.

2.1.3 Среда и условия культивирования бактерий

В зависимости от целей культивирования использовали среду Лурия-Бертани (LB), коммерческую богатую питательную среду БТН (ООО «Биотехновация», Россия) или минимальную среду следующего состава (г/л):

- Среда LB: триптон – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 5,0;
- Среда БТН: Гидролизат ферментативный белковый, сухой – 9,1; пептон ферментативный сухой – 9,9; экстракт автолизированных дрожжей осветленный – 4,7; натрий хлористый – 5,0; натрий углекислый – 0,3.
- Минимальная минеральная среда N: KH_2PO_4 – 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 3,7; NaCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; pH 7,2 $\pm$ 0,2.

Для первой группы изолятов (выделенных на ацетамиде) использовали 50 мМ ацетамида в качестве источника углерода и азота. Среда с 0,1 % глюкозы и 9,12 мМ ацетонитрила в виде источника углерода и азота соответственно использована для второй группы изолятов (выделенных на ацетонитриле). Для штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)

источниками углерода были 1% сорбит и 50 мМ ацетамида, источниками азота - 9,12 мМ ацетонитрил.

Для подготовки инокулята бактерии культивировали в 100 мл среды N в конических колбах объемом 250 мл в течение 10-12 сут. на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью 120 об./мин при температуре 22–25°C.

Рост культур оценивали по изменению оптической плотности (ОП) среды культивирования. ОП клеточной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия) при $\lambda = 540$ нм в 0,5 см кюветах.

Концентрацию клеток определяли гравиметрическим методом. Для этого предварительно определяли массу пустых пробирок на аналитических весах. Биомассу центрифугировали в микропробирках типа Эппендорф объемом 1 мл в течение 10 минут при ускорении 10 000–14 000 g с использованием центрифуги 5415 D («Eppendorf», Германия). После удаления надосадочной жидкости осадок сушили в термостате при температуре 30°C на протяжении 3–7 суток до достижения постоянной массы. Затем проводили взвешивание пробирок с клеточным осадком. Массу сухих клеток для каждого штамма рассчитывали путем вычитания массы пустой пробирки из общей массы. Все измерения выполнялись в трех независимых повторях.

2.1.4 Оценка бактериостатической и бактерицидной активности алифатических нитрилов

Оценку бактериостатической и бактерицидной активности алифатических нитрилов, а именно предельного ацетонитрила и непредельного акрилонитрила, проводили с использованием метода серийных разведений в жидкой питательной среде. Эксперимент выполняли в 96-луночных плоскодонных планшетах, содержащих жидкую среду БТН. В среду вносили исследуемые соединения в диапазоне концентраций от 0,5 до 1,5 М для каждого нитрила. После приготовления серий разведений каждую лунку инокулировали микробной суспензией штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis*

6Э (IEGM 1417) в объеме 10 мкл ($ОП_{540}=0,5$). Планшеты инкубировали при постоянной температуре 30°C в течение периода от 7 до 10 суток.

Для количественного определения бактерицидного эффекта по истечении срока инкубации содержимое лунок высевали на агаризованную питательную среду БТН с последующим учетом наличия или отсутствия роста колоний. Оценку бактериостатического действия, который проявляется в подавлении роста клеток, выполняли путем измерения ОП культуральной жидкости в лунках планшета при длине волны 540 нм с использованием планшетного ридера Infinite M1000 pro «TECAN» (Швейцария).

2.1.5 Влияние растворителей на рост штаммов

Оценивали толерантность штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) к органическим растворителям, включая гексан, толуол, бутанол, ацетон, этанол и этилацетат. Каждый из растворителей добавляли к среде БТН в четырех процентных соотношениях: 10, 20, 50 и 80% с конечным объемом 5 мл. Культивировали штаммы в пробирках типа Эппендорф до стационарной фазы 7 суток при 22–25°C.

Рост культур оценивали по изменению ОП среды культивирования. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия) при $\lambda = 540$ нм в 0,5 см кюветах.

2.1.6 Культивирование родококков с бутадиен-нитрильным каучуком

R. qingshengii 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (0,7 мл, $ОП_{540}=0,5$) инокулировали в минеральную безазотистую среду с 1,5% сорбитом или 1 % глюкозой соответственно. В качестве источника азота вносили БНК (источник – перчатки нитриловые неопудренные нестерильные смотровые, одноразовые, цвет голубой, «Venovu», Малайзия), разрезанный на квадраты 1 x 1 см, 10 шт на 200 мл среды. Минеральную безазотистую среду с БНК автоклавировали при 0,6 избыточных атмосфер 40 мин, предварительно стерилизованные источники углерода вносили стерильно после автоклавирования. *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM

1417) выращивали в течение 14 дней при 25 °С и 120 об/мин на качалке. Определяли количество акриламида, акриловой кислоты и акрилонитрила методом ВЭЖХ в культуральной жидкости, которую предварительно центрифугировали 10 мин при 14000 g, надосадочную жидкость фильтровали через шприцевый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. БНК предварительно обрабатывали ультрафиолетовым облучателем (модель д-01) «Солнышко» мощностью 300 ВА на расстоянии 10 см, в течение 15 мин с двух сторон и / или трижды подвергали циклам замораживания и оттаивания в течение 15 мин каждый (-20°С/+25°С). В качестве контроля использовали БНК без обработки, минеральную среду без источника азота с засевом и БНК в минеральной среде без засева. В культуральной жидкости подсчитывали количество КОЕ/мл после высева десятикратных разведений на питательный агаризованный бульон (ООО «Биотехновация», Россия). Образование биопленки на БНК контролировали методом сканирующей микроскопии.

Предварительно культивировали *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) на минеральной среде с 9,12 mM ацетонитрила в качестве азотного субстрата и источниками углерода – 1,5% сорбита и 50 mM ацетамида соответственно. После 10 сут культивирования биомассу концентрировали центрифугированием, отмывали от питательной среды фосфатным буфером (pH 7) и вносили 3,098 г и 3,427 г сырой биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) в минеральную среду с 1,5% сорбитом или 1 % глюкозой соответственно. БНК предварительно обрабатывали УФ и замораживанием / оттаиванием как описано ранее, разрезали на квадраты 1 x 1 см и вносили в среду в количестве 10 шт на 200 мл. После культивирования в течение 1 месяца БНК отмывали от среды фосфатным буфером и исследовали методом Фурье-спектроскопии, а также визуализировали биопленки методом сканирующей электронной микроскопии. БНК пятикратно обрабатывали в ультразвуковой ванне (Elma, Германия) при 37 кГц в 1 мл стерильного раствора 0,9% NaCl в течение 1 мин с интервалом 2 мин и

подсчитывали количество КОЕ/мл после посева десятикратных разведений на питательный агаризованный бульон (ООО «Биотехновация», Россия).

2.2 Физиолого-биохимические методы

2.2.1 Изучение влияния источника углерода на рост бактериальных изолятов содового шламохранилища

В стерильный 96-ти луночный полистирольный планшет «Медполимер» (Россия) вносили 200 мкл среды N со следующими источниками углерода: глюкоза, сорбит, дульцит, инозит, манноза, мальтоза, лактоза, сахароза, лимонная кислота, янтарная кислота, ацетамид, уксусная кислота. Помимо ацетамида с конечной концентрацией 0,05 М, содержание остальных источников углерода составляло 1%. Объем внесенного инокулята составлял 10 мкл, ОП₅₄₀=0,5, микроорганизмы культивировали при постоянной температуре 30°C в течение 7 суток без принудительной аэрации. Определяли ОП среды на планшетном ридере Tecan (Infiniti M1000, Швейцария) при длине волны 540 нм.

2.2.2 Подбор оптимальной концентрации источника углерода

Оценку влияния концентрации источника углерода на рост и активность нитрилгидролизующих ферментов штаммов проводили путем варьирования содержания сорбита или ацетамида (как наилучших субстратов роста по предварительным экспериментам) в колбах с объемом среды N 100 мл. Для *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) концентрация сорбита в среде культивирования составила 0,1, 0,5, 1, 1,5%; для *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) концентрация ацетамида была 5, 25, 50, 100 мМ. Штаммы культивировали на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью 120 об./мин и температуре 22–25°C. По истечении 10-14 сут. измеряли ОП при $\lambda = 540$ нм в 0,5 см кюветах и определяли нитрилгидролизующую активность клеток биомассы (см. раздел 2.2.8).

2.2.3 Подбор оптимального источника азота

Для выбора наиболее оптимального источника азота использовали минеральную среду, содержащую в качестве источника углерода сорбит или глюкозу для *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) соответственно. В качестве источника азота вносили NH_4Cl , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NaNO_2 , NaNO_3 (0,01 М); ацетонитрил (9,12 мМ) или ацетамид (50 мМ). У штамма *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) присутствует риск потребления ацетамида, являющегося источником углерода, в качестве источника азота. В связи с этим в данном эксперименте ацетамид был заменен на глюкозу. Штаммы культивировали в колбах на шейкере при 120 об/мин и 22°C. По истечении 10-14 сут. измеряли ОП среды культивирования и нитрилгидролизующую активность биомассы (раздел 2.2.8).

2.2.4 Подбор оптимальной концентрации источника азота

Оптимальную концентрацию источника азота для накопления биомассы штаммов с нитрилгидролизующей активностью определяли в процессе периодического культивирования. В минеральную среду N, содержащую в качестве источника углерода сорбит для *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) или ацетамид для *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), вносили 4,56; 9,12; 13,68 и 18,24 мМ ацетонитрила. Штаммы культивировали в колбах на качалке (120 об/мин, 22–25°C) в течение 10-14 суток с последующим измерением ОП и определением нитрилгидратазной и амидазной активности клеток (см. раздел 2.2.8). ОП клеточной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия) при $\lambda = 540$ нм в 0,5 см кюветах.

2.2.5 Исследование воздействия различных концентраций NaCl и pH реакционной среды на активность нитрилгидролизующих бактерий

Штаммы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) культивировали в 100 мл минеральной среды N с 0,5 г/л хлорида натрия (pH 7,0) в плоскодонных колбах на роторной качалке (120 об/мин, 22–25°C) в течение 10 сут. По достижении стационарной фазы роста клеточную биомассу отделяли от

культуральной жидкости центрифугированием при 5000 g в течение 15 минут. Полученный клеточный осадок дважды отмывали стерильным калий-фосфатным буфером (0,1 М, рН 7,2). Подготовленную биомассу ресуспендировали в 1 мл среды N с 0,5 и 50 г/л NaCl (рН 7 и 10). Далее инкубировали 2 ч на качалке при 25°C и постоянном перемешивании со скоростью вращения 120 об/мин. Активность клеток биомассы измеряли методом, указанным в разделе 2.2.7.

2.2.6 Воздействие рН на рост и активность штаммов

Влияние рН на рост штаммов и активность их нитрилгидролизующих ферментов оценивали путем регистрации ОП и измерения ферментативной активности бактерий в процессе периодического культивирования. Штаммы выращивали в 100 мл минеральной среды с 0,5 г/л NaCl и рН 8 либо 10. Пробы отбирали с периодичностью 1-4 сут. Штаммы культивировали на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью 120 об./мин при 22°C в течение 33-37 сут., ОП измеряли при $\lambda = 540$ нм в 0,5 см кюветах на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия). Ферментативную активность клеток измеряли по методу в разделе 2.2.7.

2.2.7 Определение нитрилгидратазной и амидазной активности изолятов

Изоляты выращивали до стационарной фазы, культуральную жидкость (1 мл) центрифугировали 10 мин при 4500 g, клетки отмывали калий-фосфатным буфером (рН 7,2) и центрифугировали повторно. Клеточный преципитат суспендировали в 1 мл фосфатного буфера и вносили субстрат для определения нитрилгидратазной активности – акрилонитрил – до конечной концентрации 0,3 М. Амидазную активность определяли по образованию акриловой кислоты из акриламида, субстрат добавляли в концентрации 50 мМ. Реакцию осуществляли при постоянном перемешивании на роторной качалке со скоростью вращения 120 об/мин и температуре 25°C. Время ферментативной реакции для изолятов было увеличено и составляло 24 ч. Для *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) время реакции составляло 2 ч.

Реакцию останавливали внесением 50 мкл концентрированной HCl, центрифугировали 10 мин и определяли продукты реакции в надосадочной жидкости методом ВЭЖХ.

За единицу удельной активности нитрилгидратазы и амидазы принимали количество биокатализатора, образующего соответственно 1 ммоль акриламида или акриловой кислоты при трансформации акрилонитрила или акриламида за 1 ч и выражали в ммоль / г сухих клеток / ч.

Концентрации акриламида и акриловой кислоты в реакционной среде определяли методом ВЭЖХ. Разделение реакционной смеси проводили на хроматографе Infinity II LC 1260 (Agilent, Германия) с колонкой Synergi 4u Hydro-RP 80A (250 × 4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 25 мМ NaH₂PO₄ с 5% ацетонитрила, скорость потока составляла 0,500 мл/мин при 25°C, детекцию продуктов реакции проводили при длине волны 200 нм.

2.3 Молекулярно-генетические методы

2.3.1 Идентификация бактерий по последовательности гена 16S рPHK

Видовая идентификация бактериальных изолятов проведена путем анализа последовательности гена 16S рPHK. Праймеры 27F: 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3' и 1492R: 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3' (Weisburg *et al.*, 1991) были синтезированы ООО “Евроген”, г. Москва. Выделение хромосомной ДНК проводили методом щелочного лизиса. Амплификацию ДНК проводили с применением термостабильной Taq-полимеразы производства ООО “СибЭнзим” (Новосибирск) на термоциклере ТЗ (“Biometra”, Германия). Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР-реакции проводили в 1,2–1,5% агарозном геле в трис-боратном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали молекулярные маркеры 1 kb и 100 b (ООО “СибЭнзим” и Axigen®). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли после окрашивания геля бромистым этидием с использованием системы гельдокументации BioDocAnalyze (“Biometra”, Германия). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием

осуществляли двумя способами: с использованием смеси ферментов ExoSAPMix (Fermentas Life Sciences) и с помощью аппарата E--Gel (“Invitrogen”, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl (“Applied Biosystems”, США), следуя инструкциям фирмы-производителя. Гомологию полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с известными генами микроорганизмов анализировали с использованием программного пакета BLAST и программы Chromas lite 2.1. Сравнение нуклеотидных последовательностей проводили с применением программ ClustalW 2.0.9 и YACWGUI 1.2.

2.3.2 Детекция генов амидаз, нитрилгидратаз и нитрилаз

Амплификацию ДНК проводили с применением термостабильной Taq-SE ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим», Новосибирск) на термоциклере T100 (Biometra, Германия). Праймеры, использованные для детекции генов метаболизма нитрилов и амидов, сконструированы в лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН» (Демаков и др., 2009а,б; Павлова и др., 2011).

Режим амплификации включал начальный цикл денатурации – 1 мин при 94°C; денатурацию, 94°C – 20 с; отжиг, 53° – 30 с; элонгацию, 72°C – 60 с; (35 циклов) и завершающий этап – 60 с при 72°C. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили в 1,2 % агарозном геле в трис-боратном буфере при напряженности электрического поля 6 В/см. Для положительного контроля использована ДНК *R. erythropolis* E-84 и *R. erythropolis* 4-1. Праймеры для выявления генов ферментов, участвующих в трансформации нитрилов и амидов, основаны на генах родококков. Амидаза 1 типа *R. erythropolis* (E12517) и *R. rhodochrous* N-774 (X54074); алифатическая амидаза 2 типа *R. erythropolis* (M88614, Genbank); энантиоселективная амидаза *R. erythropolis* (AY026386, Genbank); Со-нитрилгидратаза *R. rhodochrous* J1 (D67027); Fe-нитрилгидратазы *R. rhodochrous* N-774, (X54074); нитрилазы алифатическая *R. rhodochrous* K22 (D12583) и ароматическая *R. rhodochrous* J1 (D67026). Праймеры представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры для выявления генов амидаз, нитрилгидратаз, нитрилаз*

Выявляемые гены	Праймер	Последовательность, 5'-3'	Длина ПЦР-продукта
Амидаза <i>R. erythropolis</i> (E12517) и <i>R. rhodochrous</i> N-774 (X54074)	ARh499f ARh1002r	GAAGCAGGTGGATCATCCGG TCCGTGGCGATCACGTTCCA	503
Амидаза <i>R. erythropolis</i> (M88614)	AReR-1 AReR-2	ATGCGACACGGTGACATCTCCTCGA TTACGCTTCGACGGTCTTCTCGAC	1094
Амидаза <i>R. rhodochrous</i> J1 (D16207)	AmiJ1-1 AmiJ1-2	ATGTCTTCGTTGACTCCCCCAATT TTATGTCAGGGTGCCGGCTGCAGC	1547
Амидаза <i>Rhodococcus</i> sp. (A19131)	ARsp-1 ARsp-2	ATGGGCTTGCATGAACTGACGCTCG TCAAAGCGGCGCCAGTCGCGGCCA	1388
α -субъединица Со- нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> J1 (D67027)	NHCoAF NHCoAR	GTGATACATATGAGCGAGCACGTC AAT ATGCATCATACGATCACTTCCTG	611
β -субъединица Со- нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> J1 (D67027)	NHCoBF NHCoBR	GTGATACATATGGATGGTATCCACG AC ATGCATCACGCAGAGATCAGGTA	689
α -субъединица Fe-нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> N-774, (X54074)	NHFeAF NHFeAR	CATATGTCAGTAACGATCGAC ATGCATCAGACGGTGGGAACCTG	623
β -субъединица Fe-нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> N-774 (X54074)	NHFeBF NHFeBR	CATATGGATGGAGTACACGAT ATGCATCAGGCCGCAGGCTCGAG	638
Нитрилаза <i>R. rhodochrous</i> K22 (D12583)	NitK22F NitK22R	ATGTCCAGCAATCCAGAGCTCAAG TACAC CTAGGCCTCCGCCTTGGCCC	1151
Нитрилаза <i>R. rhodochrous</i> J1 (D67026)	NitJ1F NitJ1R	ATGGTCGAATACACAAACACATTC AAAG TCAGATGGAGGCTGTCGCCC	1100

* Демаков и др., 2009а,б; Павлова и др., 2011

2.4 Оценка биопленкообразования

2.4.1 *Определение способности изолятов содового шламохранилища к биопленкообразованию*

Биопленкообразующую способность штаммов оценивали методом окраски кристаллическим фиолетовым. Для этого культивирование бактериальных изолятов осуществляли в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах («Медполимер», Россия) в питательном бульоне БТН. После десяти суток инкубации при 30°C содержимое лунок удаляли методом однократной декантации. Прикрепленные к стенкам лунок биопленки отмывали 200 мкл калий-фосфатного буфера (pH 7,0-7,2) для удаления неадгезированных клеток, после чего окрашивали 0,1% водным раствором кристаллического фиолетового в течение 40 минут.

Интенсивность образования биопленки, пропорциональная количеству связанного красителя, оценивалась спектрофотометрически. После экстракции красителя из биопленки 200 мкл 96% этанола для каждой лунки измеряли ОП полученных растворов при длине волны 540 нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro «TECAN» (Швейцария).

2.4.2 *Зависимость биопленкообразования от концентрации NaCl в среде*

Влияние осмотического стресса на биопленкообразование выделенных микроорганизмов оценивали по ОП экстрагированного красителя кристаллического фиолетового (см. раздел 2.4.1) после культивирования в питательном бульоне БТН с различными концентрациями NaCl (5, 10, 50, 100, 150 и 200 г/л) при pH 7,0. Бактерии культивировали в 96-луночных полистирольных планшетах «Медполимер» (Россия) при 30 °C в течение 7 суток. Объем питательной среды в лунке составлял 150 мкл, объем внесенного инокулята – 10 мкл.

2.4.3 *Зависимость биопленкообразования от температуры*

Для оценки влияния температуры на процесс формирования биопленки изоляты ССОП 1, ССОП 2, ССОЗ 3, ССОЗ 4 и штаммы *R. qingshengii* 5Э (IEGM

1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) инкубировали при 8, 15, 30 и 37°C. За контроль принимали температуру 30°C. Бактерии культивировали в 96-луночных полистирольных планшетах «Медполимер» (Россия) в питательном бульоне БТН объемом 150 мкл в течение 7 суток. Объем внесенного инокулята составлял 10 мкл ($ОП_{540} = 0,5$).

2.4.4 Зависимость биопленкообразования от pH среды

R. qingshengii 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) культивировали в стерильных 96-луночных полистирольных планшетах производства «Медполимер» (Россия) в течение 10 суток при постоянной температуре 30 °C. Объем питательного бульона БТН в каждой лунке составлял 200 мкл. Инокулят вносили в объеме 10 мкл, предварительно культивируя до $ОП_{540} = 0,5$. Кислотность среды варьировалась в диапазоне pH 6–12. Среду защелачивали внесением 1 М NaOH, концентрация хлорида натрия при этом составляла 0,5 г/л. Бактерии культивировали в 96-луночных полистирольных планшетах производства "Медполимер" (Россия) в течение 7 суток при 30°C, в 150 мкл питательной среды, инокулят вносили в объеме 10 мкл.

Интенсивность биопленкообразования оценивали спектрофотометрически после окрашивания, см. раздел 2.4.1. ОП суспензии клеток регистрировали методом спектрофотометрии при длине волны 540 нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro, «TECAN» (Швейцария). Интенсивность биопленкообразования оценивали по отношению оптической плотности экстрагированного красителя биопленки к оптической плотности планктонной культуры. Полученный безразмерный коэффициент использовали для оценки способности исследуемых штаммов к формированию биопленок с поправкой на изменение ОП суспензии.

2.5 Сканирующая электронная микроскопия

Электронные микрофотографии получали при ускоряющем напряжении 20 кВ на сканирующем электронном микроскопе VEGA 3 LMN с системой

рентгеновского энергодисперсионного микроанализа Oxford Instruments INCA Energy 250/X-max 20 (Tescan, Чехия). Нативные и обработанные УФ и замораживанием/оттаиванием фрагменты БНК предварительно напыляли углеродом для создания наноразмерного токопроводящего слоя, обеспечивающего эффективный отвод статического электрического заряда с непроводящей поверхности.

2.6 Фурье-спектрометрия

Инфракрасные спектры поглощения образцов БНК регистрировали на Фурье-спектрометре VERTEX-80v (“Bruker”, Германия) в диапазоне 4000–400 см⁻¹ при спектральном разрешении 4 см⁻¹. Обработку спектров проводили с помощью пакета прикладных программ OPUS.

На основании полученных Фурье-спектров БНК были рассчитаны углеводородный и карбонильный индексы, а также степени их изменения.

Углеводородный индекс (I_h) был рассчитан по формуле (1):

$$I_h = \frac{H_{CH}}{H_{CN}}, \quad (1)$$

где H_{CH} – площадь пика (3060–2716 см⁻¹) в усл. ед., H_{CN} – площадь пика (2271–2209 см⁻¹) в усл. ед.

Карбонильный индекс (I_c) рассчитывали по формуле (2):

$$I_c = \frac{H_{CO}}{H_{CN}}, \quad (2)$$

где H_{CO} – площадь пика (1807–1492 см⁻¹) в усл. ед.

Степень изменения показателей рассчитывалась по формуле (3):

$$\Delta I = \frac{I_{Smpl}}{I_{Contr}}, \quad (3)$$

где I_{Smpl} – углеводородный или карбонильный индекс БНК после воздействия, I_{Contr} – углеводородный или карбонильный индекс БНК без обработки.

2.7 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Microsoft Excel 2021 и GraphPad Prism 8.0.1. Результаты были получены как минимум из трех независимых экспериментов. Были определены среднее значение, стандартное отклонение и стандартная ошибка среднего. Данные были проверены на нормальность распределения, в случае нормального распределения значимость различий анализировалась с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), $p < 0,05$, с последующим апостериорным тестом Тьюки (HSD). В случае ненормального распределения использовали критерий Краскела–Уоллиса.

Глава 3. ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА¹

3.1 Таксономическое разнообразие нитрилутилизирующих бактерий содового шламохранилища

Проведен микробиологический скрининг проб грунта, отобранных на территории шламонакопителя АО «Березниковский содовый завод», на наличие бактериальных изолятов, обладающих способностью к гидролизу нитрилов и амидов. Культуры выделяли методом обогащения на минеральной среде с единственным источником углерода и энергии – ацетонитрилом либо ацетамидом. Пробы для выделения отбирали с различных глубин грунта для оценки вертикального распределения активной микробиоты: с поверхности грунта (изоляты обозначали как ССОП), с глубины 5 см (ССОЗ₅) и 10 см (ССОЗ₁₀). В дальнейшем у выделенных изолятов изучена способность к образованию биопленки.

Выделенные изоляты нитрил- и амид-утилизирующих бактерий были идентифицированы методом секвенирования гена 16S рРНК. Результаты идентификации представлены в таблице 2.

¹ Опубликовано: Сыровацкая Г.А., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Филогенетическое разнообразие нитрилутилизирующих бактерий содового шламохранилища и их некоторые физиолого-биохимические особенности // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2025. – № 3. – С. 279–288.

Таблица 2 – Идентификация нитрилгидролизующих бактерий, выделенных с территории содового шламохранилища АО "Березниковский содовый завод"

Изолят	Источник выделения	Вид	Типовой штамм	Сходство, %	Длина прочтения, нукл.	Таксономия
1	2	3	4	5	6	7
Источник углерода – ацетонитрил						
ССОЗ1 (ацн)	Грунт, старая карта	<i>Rhizobium radiobacter</i>	ATCC 19358(T)	100,00	809	<i>Bacteria;</i> <i>Pseudomonadota;</i> <i>Alphaproteobacteria;</i> <i>Rhizobiales;</i> <i>Rhizobiaceae;</i> <i>Rhizobium</i>
ССОП 1 (ацн)	Поверхность грунта, старая карта	<i>Rhizobium nepotum</i>	39/7(T)	99,75	807	
ССОП (ацн)	Поверхность грунта, старая карта	<i>Pseudomonas mandelii</i>	NBRC 103147(T)	99,87	782	<i>Bacteria;</i> <i>Pseudomonadota;</i> <i>Gammaproteobacteria;</i> <i>Pseudomonadales;</i> <i>Pseudomonadaceae;</i> <i>Pseudomonas</i>
ССОЗ 1.1 (ацн)	Грунт, старая карта	<i>Microbacterium hatanonis</i>	JCM 14558(T)	98,42	699	<i>Bacteria;</i> <i>Actinomycetota;</i> <i>Actinomycetes,</i> <i>Micrococcales;</i> <i>Microbacteriaceae;</i> <i>Microbacterium</i>
5Э	Шлам, новая карта	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	JCM 15477(T)	99,42	537	<i>Bacteria;</i> <i>Actinomycetota;</i> <i>Actinomycetes,</i> <i>Corynebacteriales;</i> <i>Nocardiaceae;</i> <i>Rhodococcus</i>
6Э	Грунт, 5 см глубины, старая карта	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NBRC 15567(T)	99,84	651	
Источник углерода – ацетамид						
ССОЗ1 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	98,99	701	<i>Bacteria;</i> <i>Pseudomonadota;</i> <i>Alphaproteobacteria</i> <i>Hyphomicrobiales;</i> <i>Rhizobiaceae;</i> <i>Ensifer</i>
ССОЗ 1.3 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	99,87	781	
ССОЗ ₁₀ 4 (ацд)	Грунт, старая карта, 10 см глубины	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	100,00	847	

Окончание таблицы 2.

ССОЗ 1.2 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Pseudomonas</i> sp,	DSM 18928(T)	99,53	853	<i>Bacteria;</i> <i>Pseudomonadota;</i> <i>Gammaproteobacteri</i> <i>a; Pseudomonadales;</i> <i>Pseudomonadaceae;</i> <i>Pseudomonas</i>
ССОЗ 3 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Pseudomonas</i> <i>mandelii</i>	NBRC 103147(T)	98,00	751	
ССОЗ 1.4 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Rhodococcus</i> sp,	JCM 15477(T)	100	666	<i>Bacteria;</i> <i>Actinomycetota;</i> <i>Actinomycetes;</i> <i>Corynebacteriales;</i> <i>Nocardiaceae;</i> <i>Rhodococcus</i>
ССОЗ ₁₀ 3 (ацд)	Грунт, старая карта, 10 см глубины	<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i>	NBRC 15567 (T)	99,85	701	
ССОЗ ₁₀ 1 (ацд)	Грунт, старая карта, 10 см глубины	<i>Arthrobacter</i> <i>globiformis</i>	NBRC 12137(T)	100,00	771	<i>Bacteria;</i> <i>Actinomycetota;</i> <i>Actinomycetes;</i> <i>Micrococcales;</i> <i>Micrococcaceae;</i> <i>Arthrobacter</i>
ССОП 1 (ацд)	Грунт, старая карта, поверхность	<i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i>	DSM 30006(T)	99,87	876	<i>Bacteria;</i> <i>Pseudomonadota;</i> <i>Gammaproteobacteri</i> <i>a; Pseudomonadales;</i> <i>Moraxellaceae;</i> <i>Acinetobacter</i>
ССОП 1.2 (ацд)	Грунт, старая карта, поверхность	<i>Rhizobium</i> <i>nepotum</i>	39/7(T)	99,77	876	<i>Bacteria;</i> <i>Pseudomonadota;</i> <i>Alphaproteobacteria;</i> <i>Rhizobiales;</i> <i>Rhizobiaceae;</i> <i>Rhizobium</i>

Нитрилутилизирующие бактерии, главным образом, были выделены из грунта старой карты шламохранилища, который характеризовался высокой минерализацией и был слабощелочным (pH 8). Ранее из различных сред содового шламохранилища (содового шлама, грунта восстанавливаемых территорий) были выделены бактериальные штаммы, обладающие различной гидролитической активностью и устойчивостью к широкому спектру pH и высокой минерализации (Шилова и др., 2020, 2021; Maksimova *et al.*, 2024). На территории старой карты шламохранилища наблюдалось восстановление

растительности. Содовый шлам состоял из ионов кальция, хлора, карбонатов и гидрокарбонатов и имел pH 11, что приводило к значительному снижению микробного разнообразия по сравнению с грунтом старой карты. Из содового шлама на ацетонитриле был изолирован только один штамм галоалкалотолерантного родококка. Выделенные изоляты принадлежали филумам *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*.

3.2 Нитрилгидратазная и амидазная активность выделенных изолятов

Определена активность ферментов метаболизма нитрилов выделенных культур. Показано, что изоляты обладают как амидазной, которая проявляется при гидролизе акриламида, так и нитрилгидратазной активностью, выявляющейся при трансформации акрилонитрила. Когда субстратом реакции является акрилонитрил, в реакционной смеси обнаруживается как акриламид, так и акриловая кислота, что подтверждает работу нитрилгидратазно-амидазной ферментативной системы. При гидролизе акриламида в реакционной среде детектировали акриловую кислоту. Ферментативные активности изолятов представлены в таблице 3. У известных ранее культур родококков нитрилгидратазная активность, как правило, значительно превышает амидазную (Максимова, Демаков, 2018), особенно у селекционированных продуцентов, однако, у большинства выделенных нами экстремотолерантных изолятов с территории содового шламохранилища, амидазная активность оказалась выше нитрилгидратазной.

Таблица 3 – Нитрилгидратазные и амидазные активности бактериальных изолятов, выделенных с территории содового шламохранилища АО "Березниковский содовый завод"

Субстрат реакции (фермент) Изолят	Акрилонитрил (нитрилгидратаза)	Акриламид (амидаза)
	Активность фермента, ммоль/г/ч	
ССОП (ацн)	1,6	2,8
ССОП 2 (ацд)	3,3	33,4
ССОЗ ₁₀ 2 (ацд)	27,2	14,2
ССОЗ ₁₀ 4 (ацд)	15,2	43,0
ССОЗ ₁₀ 3 (ацд)	26,8	10,7
ССОЗ ₅ 1 (ацн)	6,5	28,2
ССОЗ 2 (ацн)	26,1	38,0
ССОЗ 2 (ацд)	23,7	37,6
ССОЗ ₁₀ (ацн)	1,9	16,2
ССОЗ 4 (ацд)	19,1	49,0
ССОЗ ₁₀ 1 (ацд)	1,0	1,0
ССОП 1 (ацд)	0,4	3,4
ССОЗ 3 (ацд)	19,8	33,2
ССОЗ 1 (ацн)	7,8	14,5
ССОЗ 3 (ацн)	1,6	17,4
ССОЗ 1 (ацд)	33,2	22,8
5Э (ацн)	10,4	3,3
6Э (ацн)	0,3	11,0

Примечание: Независимые эксперименты по культивированию изолятов и определению ферментативной активности их клеток проведены в двухкратной повторности. В таблице приведены результаты единичного эксперимента.

3.3 Детекция генов амидаз, нитрилгидратаз, нитрилаз у изолятов и штаммов

Известно, что у родококков встречается несколько структурно-различных групп амидаз. Из щелочного высокоминерализованного биотопа были выделены бактериальные изоляты различной филогенетической принадлежности, в том числе изоляты родококков. Методом ПЦР установлено, что в ДНК всех исследуемых экстремотолерантных изолятов есть гены амидаз 1 и 2 типов

(Рисунок 3), но не обнаруживается энантиоселективная амидаза. Также у обоих штаммов обнаружены гены Fe-содержащей нитрилгидратазы (Рисунок 4, среди изолятов представлены 5) и отсутствует Co-содержащая. Гены нитрилаз также не обнаружены. *R. erythropolis* E-84, *R. erythropolis* 4-1 применяли как положительный контроль.

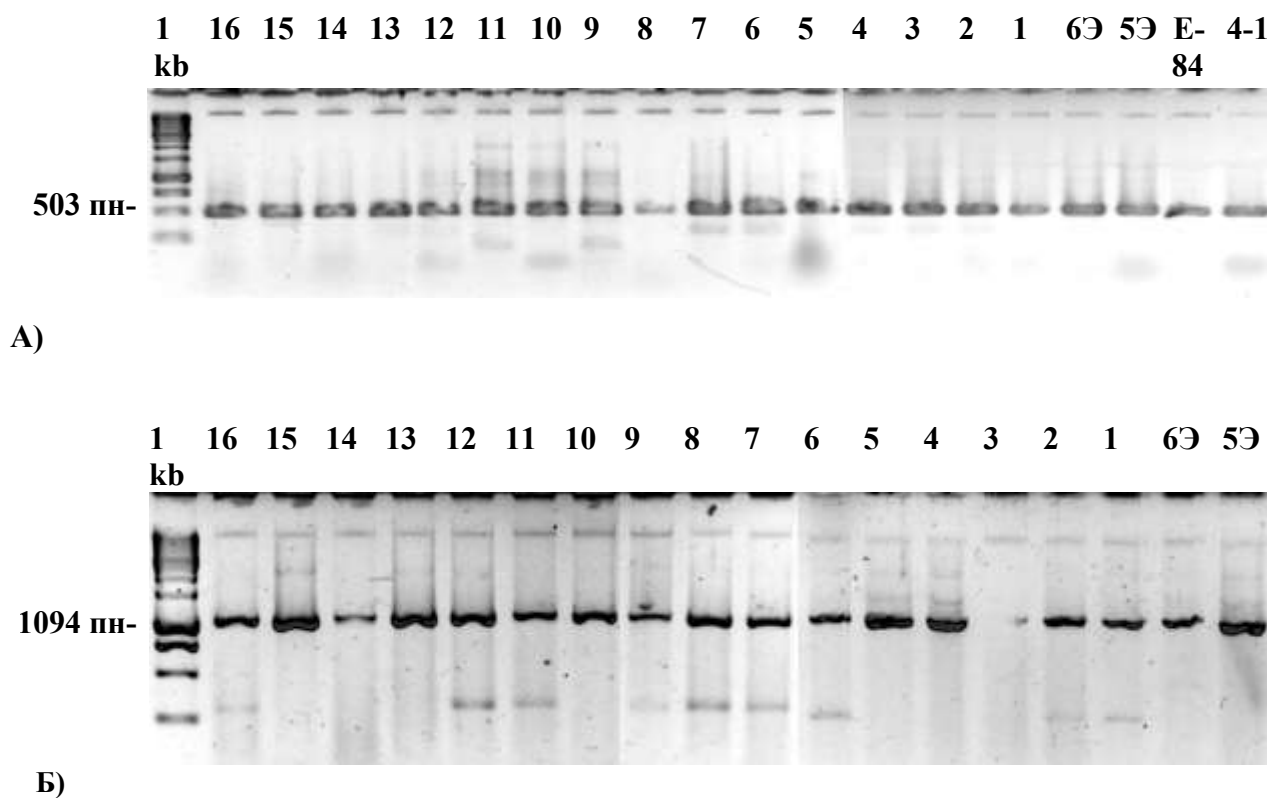


Рисунок 3 — ПЦР-продукты, соответствующие генам амидаз, гомологичных таковым по молекулярному весу амидазам 1 типа *R. erythropolis*, E12517, *R. rhodochrous* N-774, X54074 (А) и амидазам 2 типа *R. erythropolis*, M88614 (Б). Изоляты: 1 — ССОП (ацн), 2 — ССОП2 (ацд), 3 — ССОЗ₁₀2 (ацд), 4 — ССОЗ₁₀4 (ацд), 5 — ССОЗ₁₀3 (ацд) 6 — ССОЗ₅1 (ацн), 7 — ССОЗ2 (ацн), 8 — ССОЗ 2 (ацд), 9 — ССОЗ₁₀ (ацн), 10 — ССОЗ 4 (ацд), 11 — ССОЗ₁₀1 (ацд), 12 — ССОП 1 (ацд), 13 — ССОЗ3 (ацд), 14 — ССОЗ 1 (ацн), 15 — ССОЗ 3 (ацн), 16 — ССОЗ 1 (ацд), *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) (5Э), *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (6Э), *R. erythropolis* E-84, *R. erythropolis* 4-1.

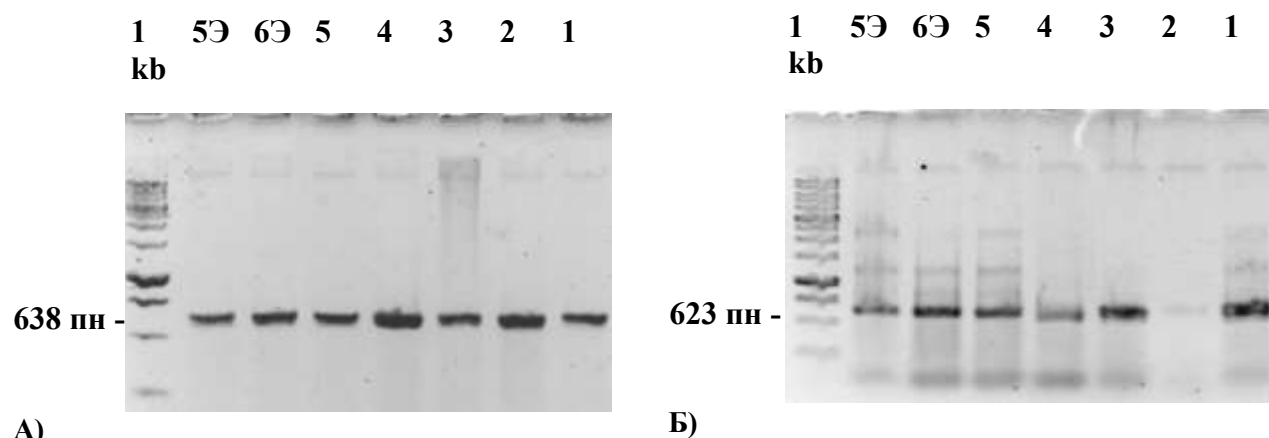


Рисунок 4 – ПЦР-продукты, соответствующие генам альфа (А) и бета (Б) субъединиц Fe-содержащей нитрилгидратазы, гомологичных таковым по молекулярному весу из *R. rhodochrous* N-774, X54074. Обозначение аналогично рисунку 3.

3.4 Биопленкообразование изолятов

Показано, что все изоляты формируют биопленки при культивировании на среде БТН (Рисунок 5).

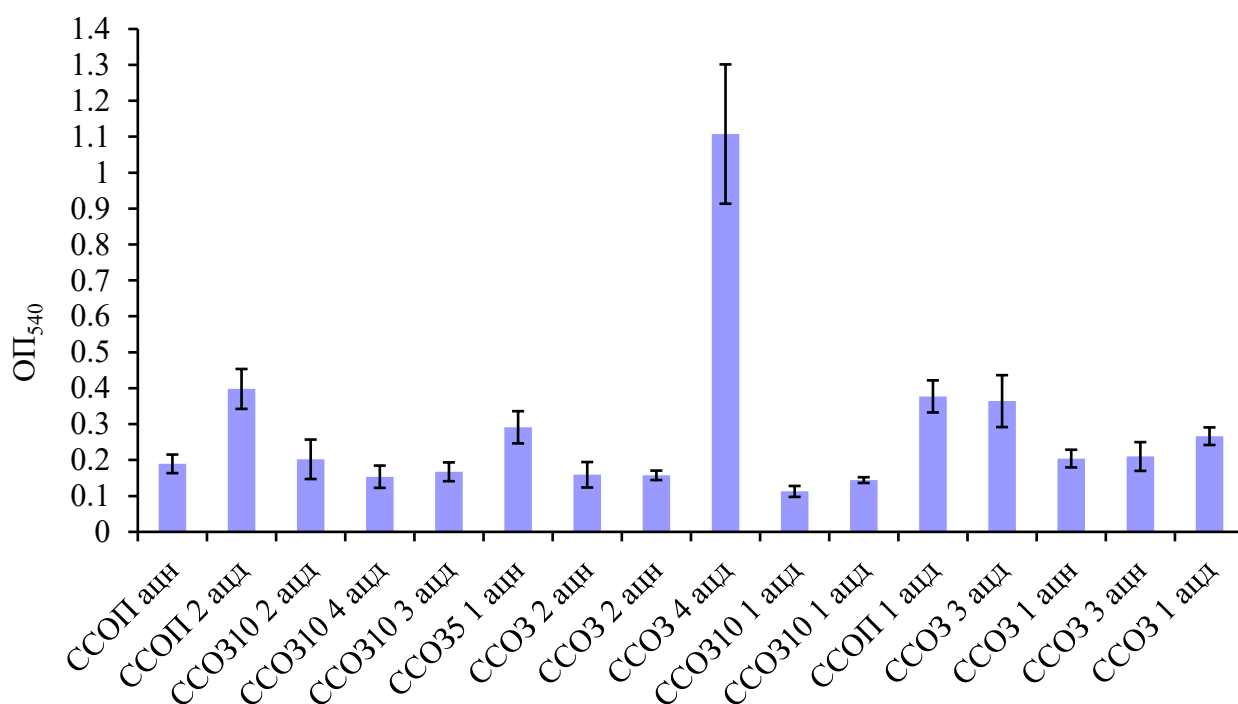
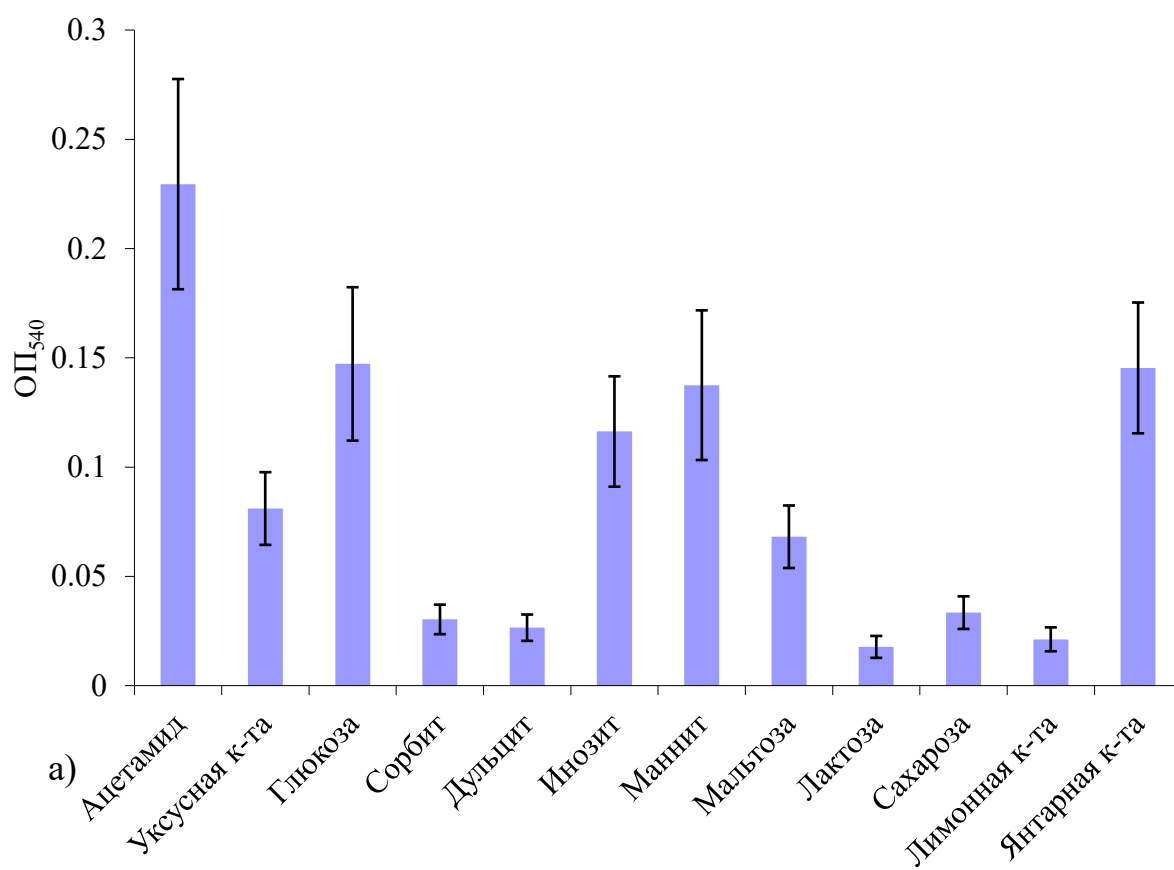


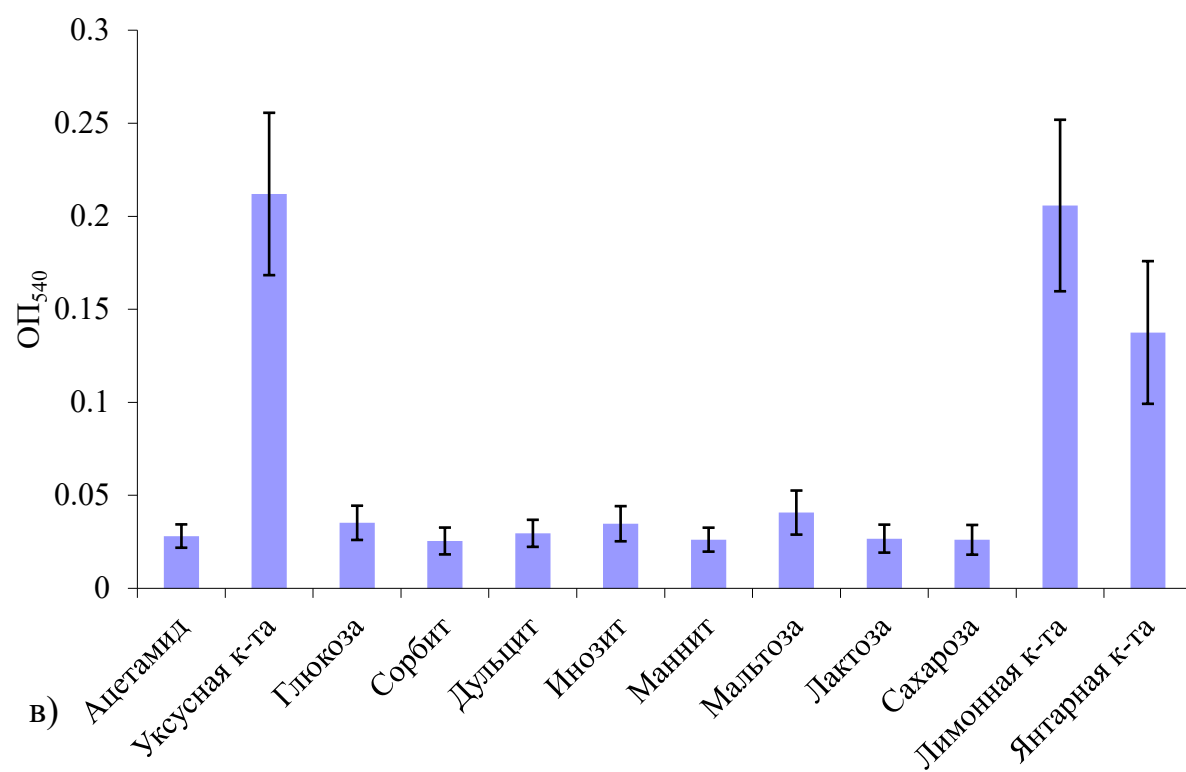
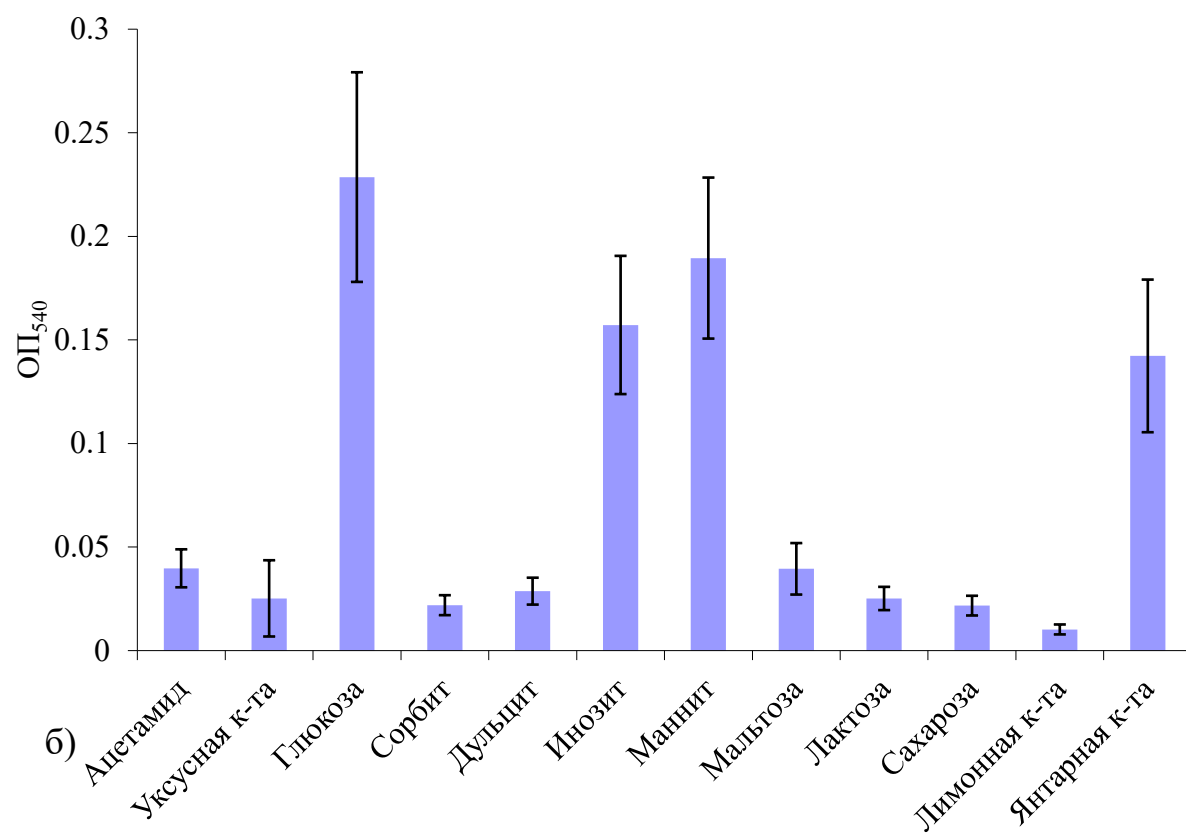
Рисунок 5 – Биоплёнкообразование нитрилгидролизующих изолятов содового шламохранилища

Биомасса биопленок нитрилгидролизующих изолятов, оцененная по ОП экстрагированного красителя кристаллического фиолетового, находилась в диапазоне от 0,15 до 0,4 ед. ОП₅₄₀, и только у изолята ССОЗ 4, выделенного на ацетамиде, составляла более 1 ед.

3.5 Зависимость роста изолятов от различных источников углерода

Проведен скрининг различных источников углерода для выявления оптимального субстрата для накопления биомассы. Для изолята ССОП 1 (ацд) наилучшим субстратом являлся ацетамид ($0,229 \pm 0,048$ ед. ОП), для ССОП 2 (ацд) – глюкоза ($0,228 \pm 0,05$ ед. ОП), для ССОЗ 3 (ацд) – уксусная кислота ($0,221 \pm 0,043$ ед. ОП), для ССОЗ 4 (ацд) – манноза ($0,308 \pm 0,063$ ед. ОП) (Рисунок 6).





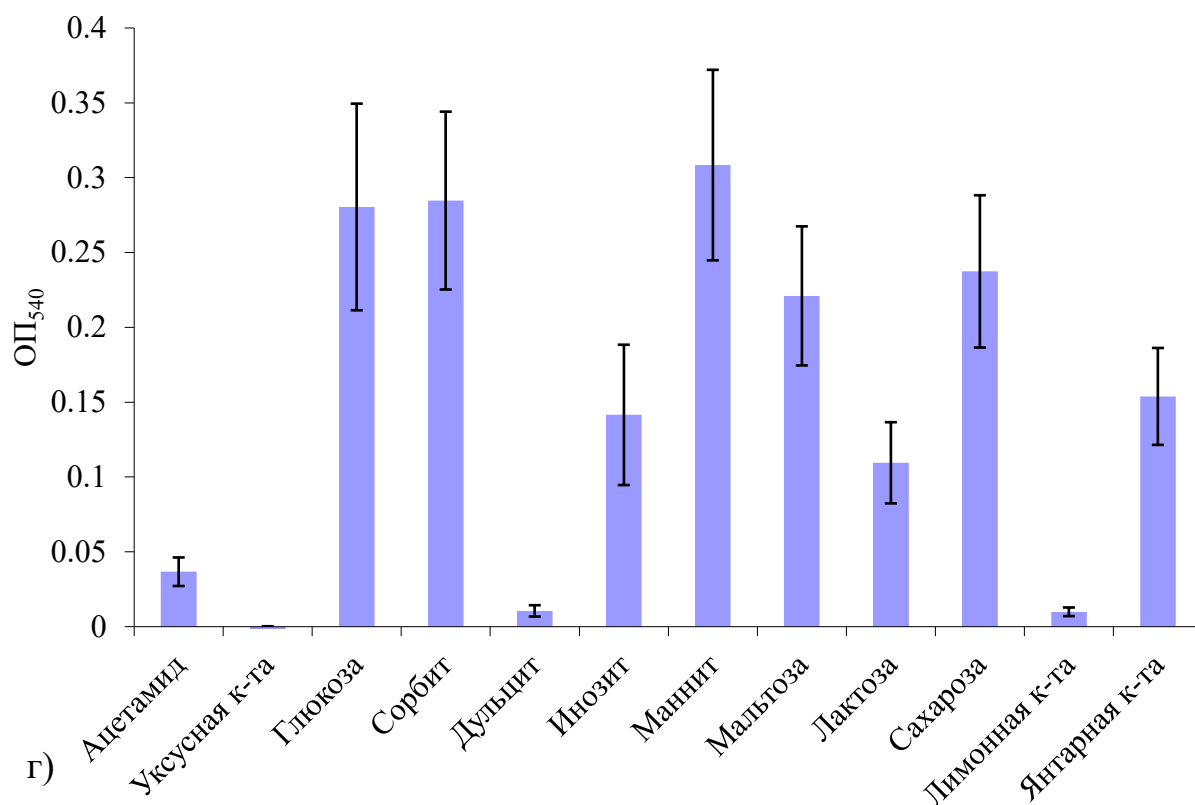


Рисунок 6 – Накопление биомассы в зависимости от различных источников углерода для изолятов ССОП 1 (ацд) (а), ССОП 2 (ацд) (б), ССОЗ 3 (ацд) (в), ССОЗ 4 (ацд) (г)

3.6 Формирование биопленок изолятами в зависимости от физико-химических воздействий

Установлено, что в условиях стандартного культивирования, без дополнительного воздействия экстремальных факторов среды, изоляты формируют биопленки. Из них наиболее массивные биопленки образуют *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas mandelii*, *Rhodococcus sp.* и *Rhizobium nepotum* (см. раздел 3.4). Способность изолятов к биопленкообразованию оценивали по отношению ОП биопленки к ОП планктонной формы в присутствии 5–50 г/л хлорида натрия, при pH 7–12 и 8–37°C (Таблица 4). При этом для четырех изолятов значения ОП экстрагированного из биопленок кристаллического фиолетового в исследованных условиях варьировались от 0,1 до 1,1, тогда как при 37°C составляли 0,024–0,097. Повышенные концентрации

соли подавляли рост изолятов, только у *A. calcoaceticus* и *P. mandelii* значительно увеличивалась биомасса биопленки в среде с 10 и 50 г/л NaCl соответственно. Влияние pH среды выражено для *R. nepotum*, биомасса биопленок увеличивалась при возрастании pH от 7 до 11, но снижалась при pH 12. У всех изолятов образование биопленок было достоверно выше в щелочной среде ($p < 0,05$), чем при pH 7. Температурное воздействие было сходным у всех изученных изолятов: при 37°C формирование биопленок подавлялось, тогда как планктонная культура росла достаточно активно (ОП₅₄₀ = 0,7–0,8). Снижение температуры до 8–15°C интенсифицировало процесс образования биопленок.

Таблица 4 – Влияние концентрации NaCl и pH на формирование биопленок изолятов, * $p < 0,05$

Условия		ОП, биопленка/планктонная форма			
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (ССОП 1 ацд)	<i>Rhizobium nepotum</i> (ССОП 2 ацд)	<i>Pseudomonas mandelii</i> (ССОЗ 3 ацд)	<i>Rhodococcus sp.</i> (ССОЗ 4 ацд)
NaCl г/л	5	0,154±0,016 (n = 8)	0,236±0,027 (n = 8)	0,151±0,019 (n = 8)	0,143±0,041 (n = 8)
	10	0,536±0,057 (n = 7)*	0,165±0,049 (n = 5)	0,106±0,010 (n = 5)*	0,094±0,020 (n = 4)
	50	0,066±0,010 (n = 6)*	0,165±0,042 (n = 4)	0,479±0,028 (n = 4)*	0,028±0,007 (n = 7)*
pH	7	0,154±0,016 (n = 8)	0,236±0,027 (n = 8)	0,151±0,019 (n = 8)	0,143±0,041 (n = 8)*
	8	0,620±0,123 (n = 5)*	0,548±0,130 (n = 5)*	0,283±0,039 (n = 7)*	0,335±0,080 (n = 7)*
	9	0,492±0,086 (n = 5)*	0,616±0,083 (n = 5)*	0,256±0,035 (n = 7)*	0,342±0,054 (n = 7)*
	10	0,519±0,059 (n = 6)*	0,647±0,059 (n = 5)*	0,268±0,059 (n = 6)*	0,284±0,039 (n = 8)*
	11	0,574±0,083 (n = 8)*	0,851±0,172 (n = 8)*	0,360±0,076 (n = 6)*	0,348±0,067 (n = 7)*
	12	0,429±0,050 (n = 7)*	0,535±0,046 (n = 6)*	0,513±0,103 (n = 6)*	0,409±0,062 (n = 6)*
T, °C	8	0,775±0,041 (n = 7)*	0,420±0,049 (n = 8)*	0,818±0,110 (n = 6)*	4,651±0,892 (n = 7)*
	15	0,969±0,063 (n = 7)*	0,403±0,025 (n = 8)*	1,364±0,107 (n = 7)*	0,455±0,051 (n = 8)*
	30	0,154±0,016 (n = 8)	0,236±0,027 (n = 8)	0,151±0,019 (n = 8)	0,143±0,041 (n = 8)
	37	0,048±0,031 (n = 6)*	0,023±0,004 (n = 7)*	0,119±0,019 (n = 6)	0,022±0,005 (n = 7)*

Таким образом, из грунта и осадка содового шламохранилища были выделены изоляты нитрилутилизирующих бактерий, относящиеся к филумам *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*, проявляющие более выраженную амидазную, а не нитрилгидратазную активность, и обладающие генами неэнантиоселективных амидаз и железо-зависимых нитрилгидратаз, а также способные к формированию биопленок, которое усиливается при снижении температуры и повышении pH.

Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА РОСТ, НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ И БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ

R. qingshengii 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)²

4.1 Влияние источников углерода и азота на рост и нитрилгидролизующую активность штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)

Выявлены оптимальные источники углерода для роста нитрилутилизирующих родококков. В среду добавляли сорбит в диапазоне от 0,1% до 1,5% для *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и ацетамид от 5 до 100 мМ для *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417). Наибольшее накопление биомассы и активность фермента наблюдали при росте бактериальных культур на минеральной среде с 1,5% сорбита (ОП₅₄₀=0,659; 6,9 ммоль/г/ч) и 50 мМ ацетамида (ОП₅₄₀= 0,587; 0,2 ммоль/г/ч) (Рисунок 7,8).

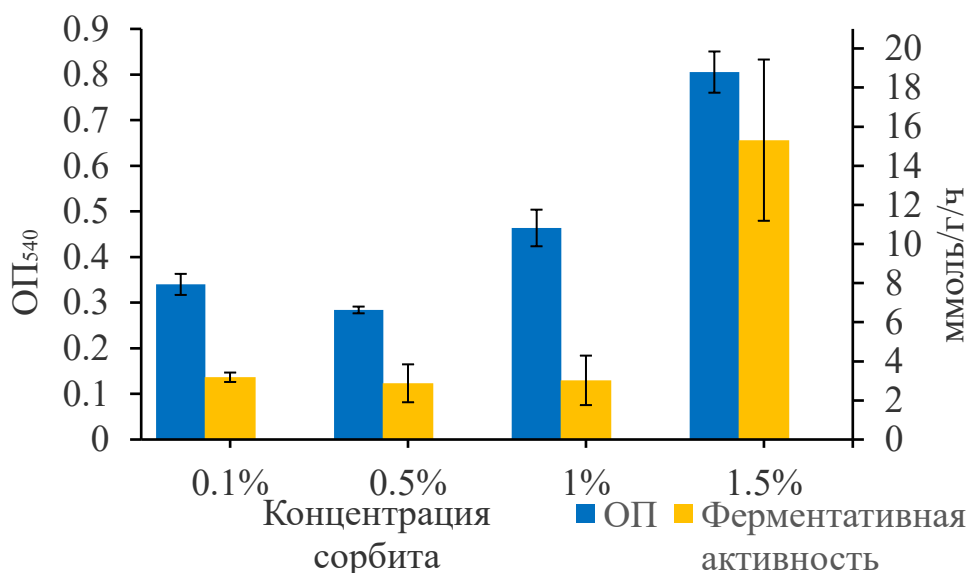


Рисунок 7 – Влияние различных концентраций источника углерода (сорбита) на накопление биомассы и активность нитрилгидролизующих ферментов штамма *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416), инкубация 10-14 сут

² Опубликовано: Maksimova Yu.G., Syrovatskaya G.A., Maksimov A.Y. Nitrile-hydrolyzing haloalkalitolerant *Rhodococci* of soda sludge storage // Indian Journal of Microbiology. – 2026. – Vol. 66., № 1. – P. 141-149.

Концентрации ацетонитрила варьировали от 4,56 до 18,24 мМ. Ферментативная активность и накопление биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) возрастали при 18,24 мМ ацетонитрила в среде до 25,4 ммоль/г/ч и ОП₅₄₀ = 0,879. У *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) при 9,12 мМ ацетонитрила – до 0,2 ммоль/г/ч и ОП₅₄₀ = 0,850.

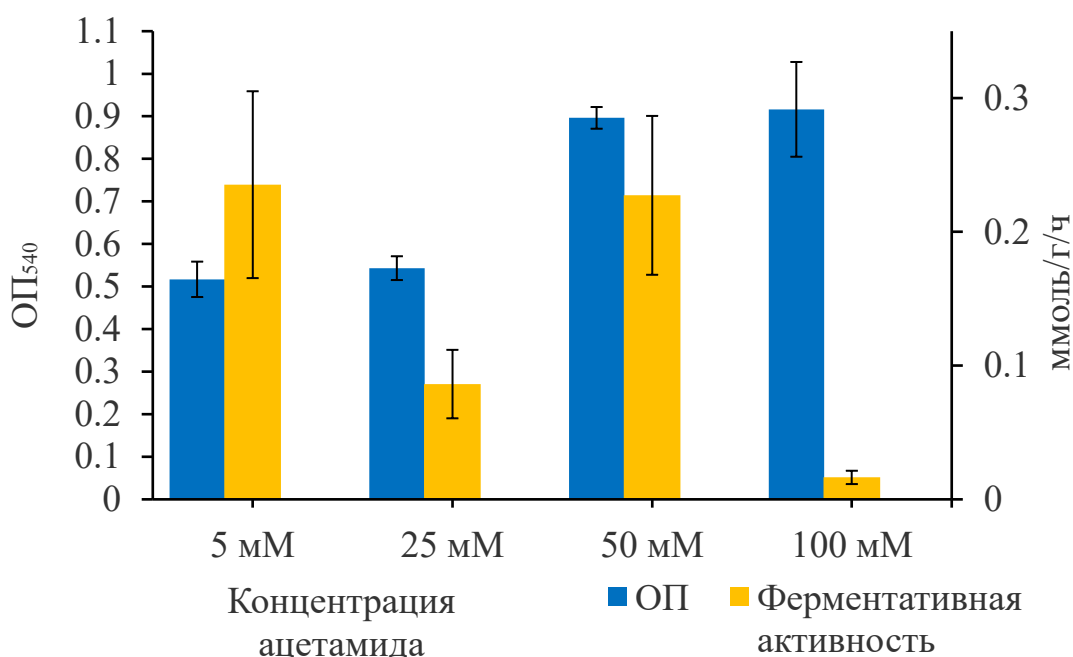


Рисунок 8 – Влияние различных концентраций источника углерода (ацетамида) на накопление биомассы и активность нитрилгидролизующих ферментов штамма *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), инкубация 10-14 сут

Определен оптимальный источник азота для роста и проявления нитрилгидратазной активности *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417). Установлено, что накопление биомассы *Rhodococcus qingshengii* 5Э (IEGM 1416) было максимальным при использовании ацетонитрила в качестве единственного источника азота. Пик нитрилгидратазной активности при подавлении амидазной фиксируется при культивировании в среде с нитритом натрия (Рисунок 9). Присутствие мочевины в качестве источника азота в среде ингибирует активность обоих ферментов. Следует отметить, что присутствие нитрит-ионов в среде приводит к супрессии амидазной активности штамма.

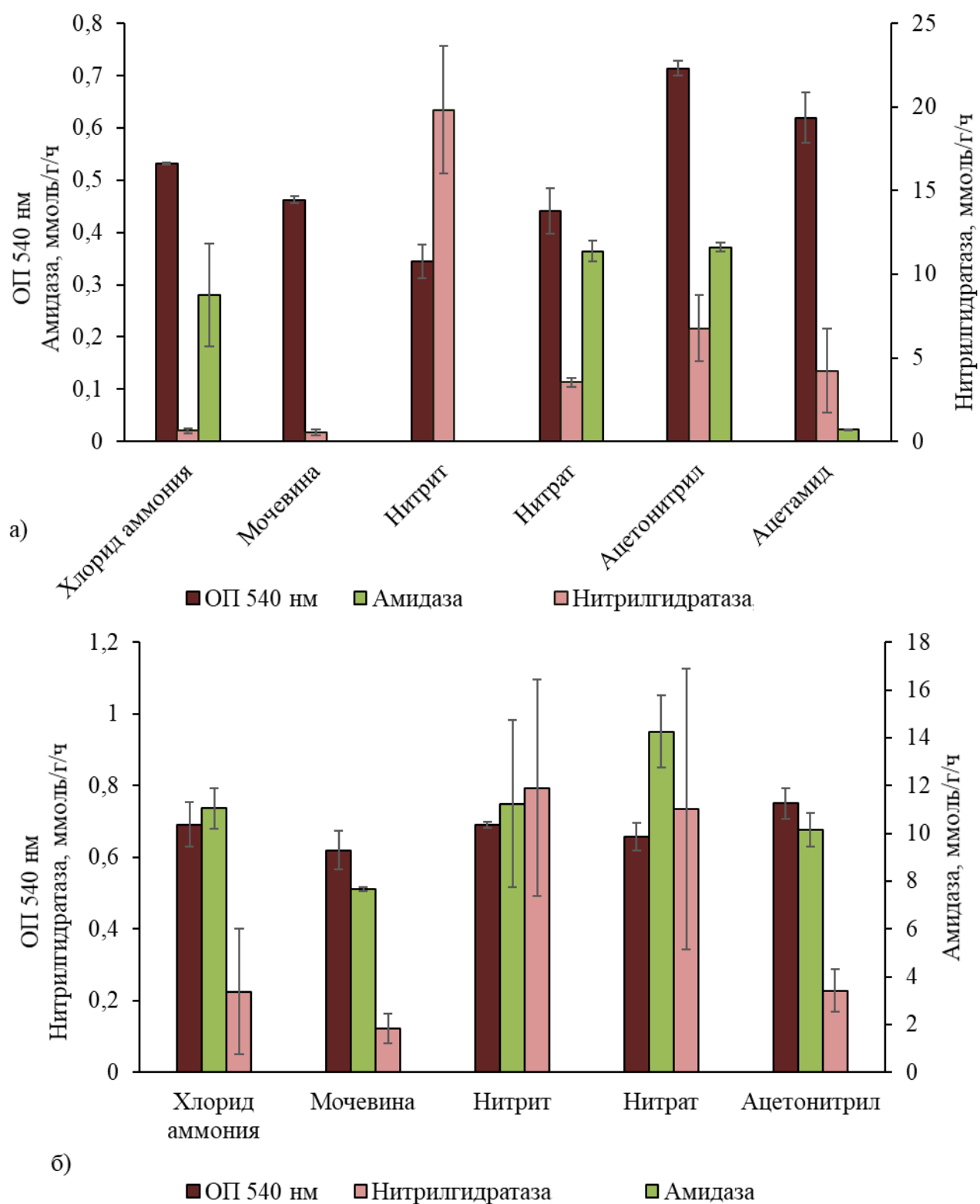


Рисунок 9 – Накопление биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) (а) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (б) на среде с различными источниками азота

У *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) нитрилгидратазная активность превышает амидазную, достигая 20 ммоль/г/ч, тогда как у *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), наоборот, амидазная активность значительно выше нитрилгидратазной, максимальна на нитрате и составляет 14 ммоль/г/ч. Накопление биомассы *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) не зависит от источника азота. Нитриты и нитраты приводят к равномерному проявлению активности как нитрилгидратазы, так и амидазы.

Ацетонитрил является селективным источником азота для бактерий, обладающих ферментами гидролиза нитрилов. Ацетонитрил привел к проявлению как нитрилгидратазной, так и амидазной активности, хотя они не были максимальны. В дальнейшем было изучено влияние различных концентраций ацетонитрила на накопление биомассы и проявление нитрилгидролизующей активности родококков (Рисунок 10, 11).

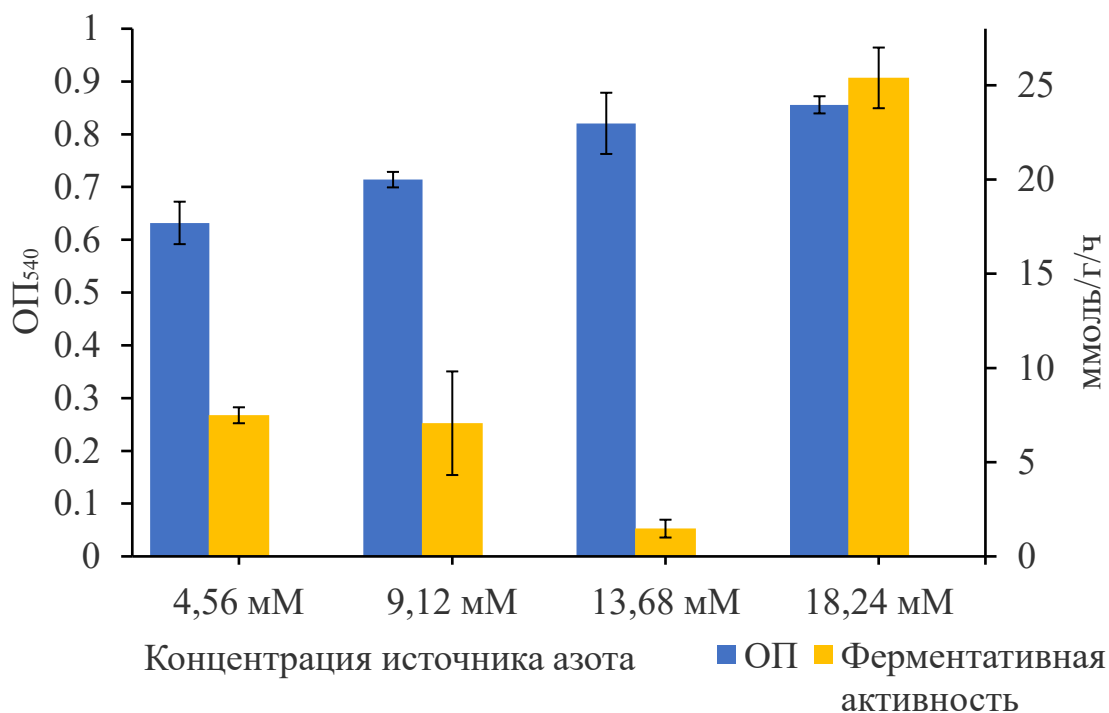


Рисунок 10 – Влияние различных концентраций источника азота (ацетонитрила) в среде на накопление биомассы и нитрилгидролизующую активность штамма *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416), инкубация 10-14 сут

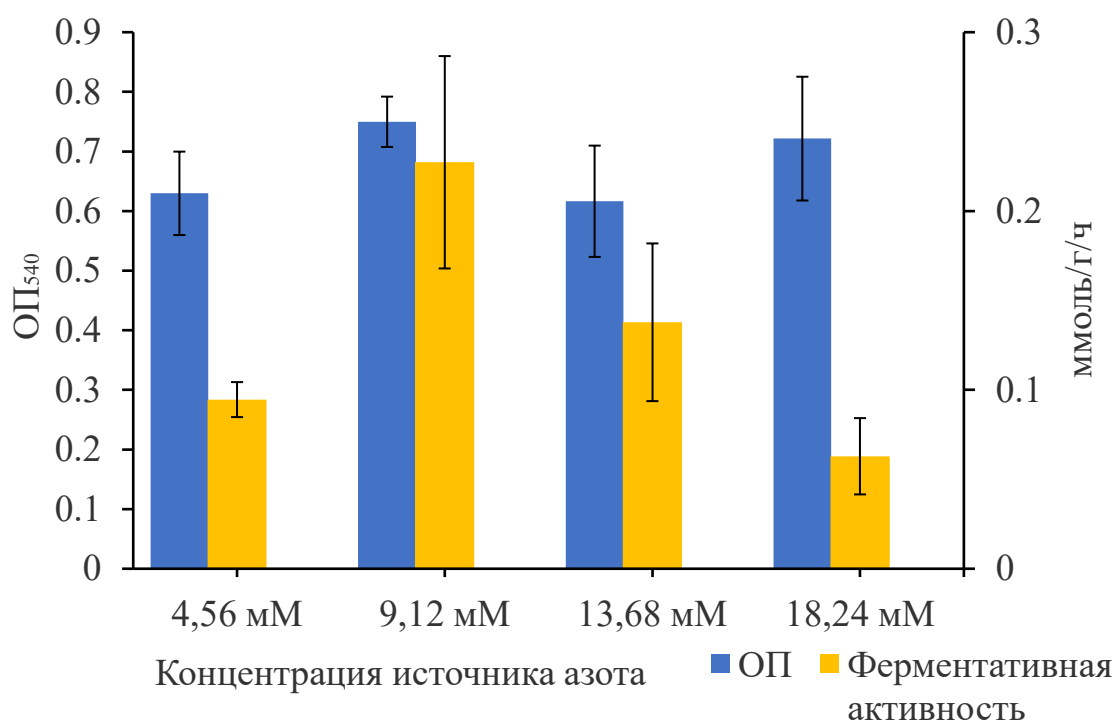


Рисунок 11 – Влияние различных концентраций источника азота (ацетонитрила) в среде на накопление биомассы и нитрилгидролизующую активность штамма *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), инкубация 10-14 сут

Таким образом, для дальнейших ростовых экспериментов и определения ферментативной активности в среду культивирования *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) в качестве источника углерода добавляли 1,5% сорбита и 50 мМ ацетамид соответственно, а в качестве источника азота 9,12 мМ ацетонитрил для обоих штаммов. Это позволило получить максимальную биомассу с выраженной ферментативной активностью.

4.2 Исследование способности штаммов рода *Rhodococcus* к росту в присутствии органических растворителей

Рост родококков не был ингибирован в присутствии ацето- и акрилонитрила в концентрациях, соответствующих пределу растворимости. Показано, что даже насыщающие концентрации нитрилов не ингибируют рост исследуемых штаммов и не являются бактерицидными (Таблица 5).

Экстремально высокая устойчивость штаммов к нитрилам может объясняться их адаптивной способностью, связанной с галотолерантностью.

Таблица 5 – Влияние алифатических нитрилов на накопление биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)

М	Биомасса, ОП ₅₄₀			
	<i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416)		<i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417)	
	Ацетонитрил	Акрилонитрил	Ацетонитрил	Акрилонитрил
0,5	1,148±0,066	0,958±0,051	1,007±0,026	0,818±0,048
0,75	1,083±0,039	0,840±0,071	0,995±0,045	0,889±0,022
1	1,074±0,093	0,837±0,037	0,965±0,038	0,784±0,062
1,25	1,096±0,061	0,826±0,061	0,993±0,038	0,836±0,073
1,5	1,039±0,059	0,900±0,043	1,049±0,035	0,772±0,026

Выдвинуто предположение, что галотолерантные бактериальные культуры будут проявлять повышенную устойчивость к растворителям. Известно, что галофильность и галотолерантность у большинства бактерий связаны с реализацией стратегии адаптации, называемой «соль вне», которая заключается в накоплении или поглощении осмотически активных соединений (Roberts, 2005; Yancey, 2005). Это позволяет им расти в гиперосмотических средах. Тот же механизм адаптации может быть реализован при высоком содержании растворителя в среде, снижающем активность воды. Для проверки этой гипотезы штаммы родококков культивировали в присутствии бутанола, ацетона, этанола и этилацетата в среде. Из изученных растворителей только гексан и толуол не ингибировали рост бактерий (Рисунок 12).

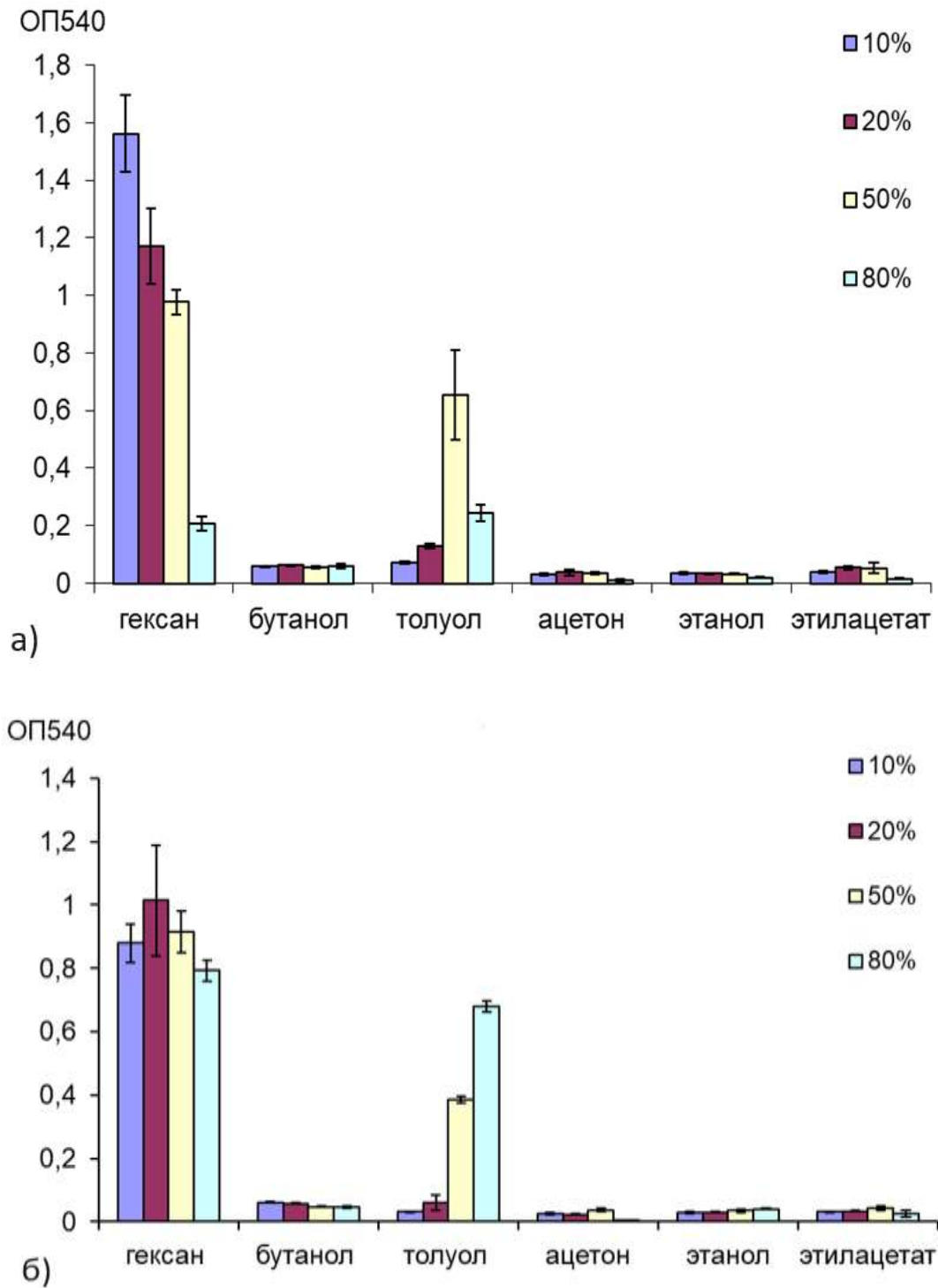


Рисунок 12 – Накопление биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) (а) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (б) на среде БТН с растворителями, культивирование 7 суток

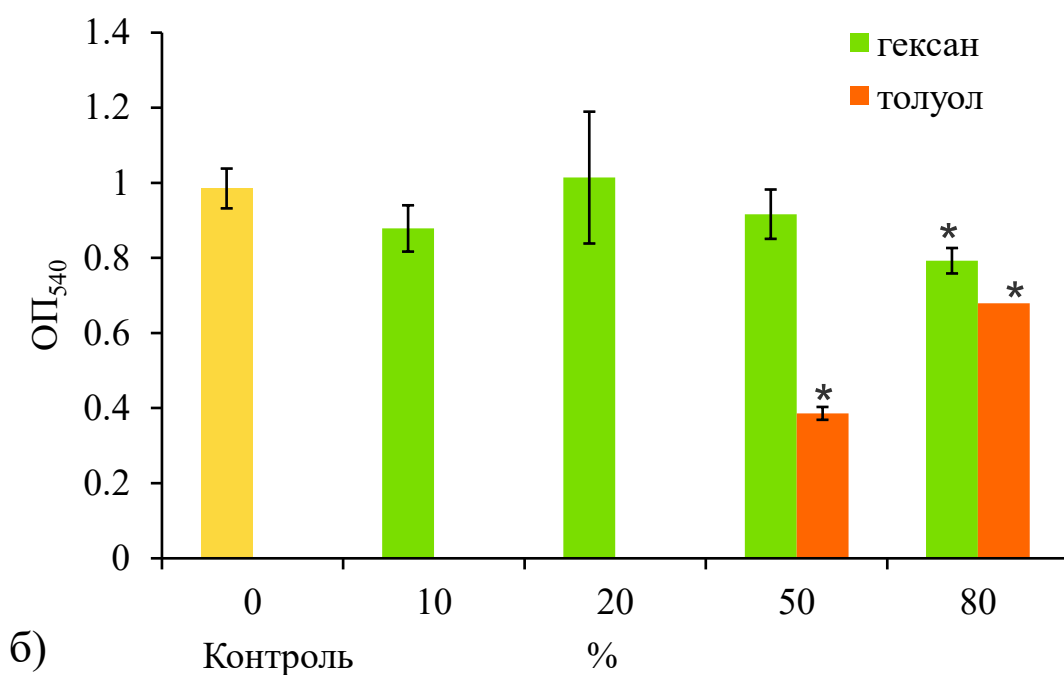
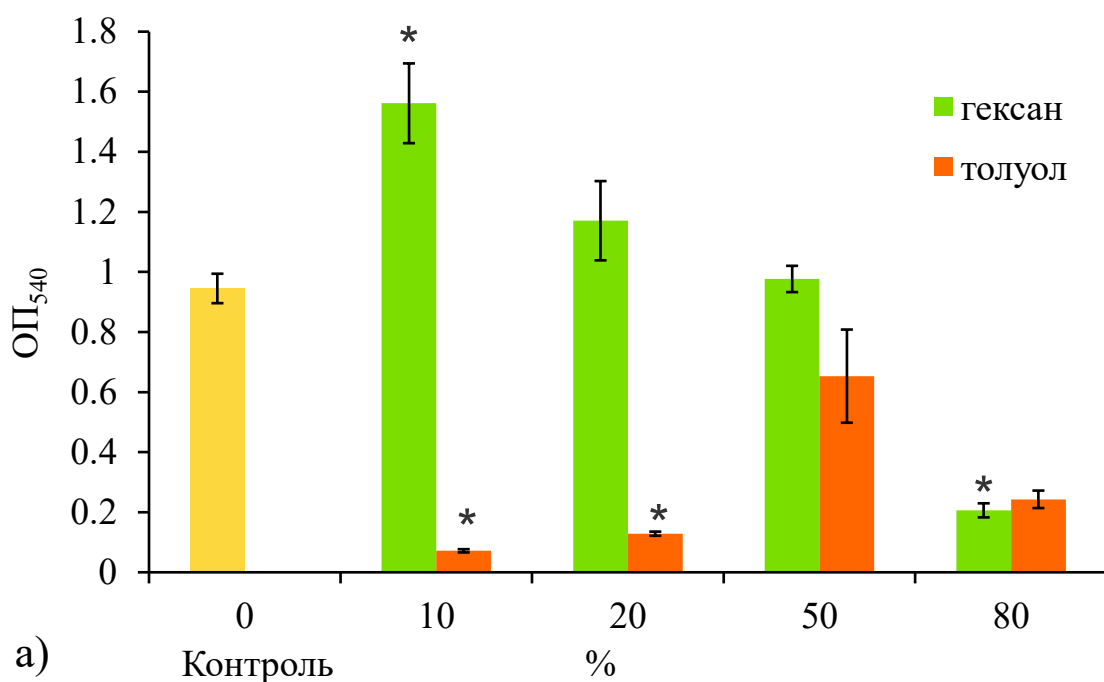


Рисунок 13 – Влияние 10-80% гексана и толуола на накопление биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) (а) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (б), $p < 0,05$, культивирование 7 суток

Определена достоверность отличий в накоплении биомассы штаммов в присутствии гексана и толуола в среде от контроля (рост на среде БТН без растворителей) (Рисунок 13). Гексан поддерживал накопление биомассы

исследуемых бактериальных культур, при этом штамм *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) сохранял значительную ростовую активность даже при 80% этого растворителя в питательной среде. Статистически значимыми были отличия роста *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) на 10% гексане (увеличение, $p < 0,05$) и 80% (уменьшение, $p < 0,05$). Рост *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) на среде с гексаном не отличался от контроля, и только в среде с 80% гексана достоверно снижался на 20%. Рост изучаемых штаммов наблюдался в присутствии высоких концентраций толуола в среде. Предположительно, это связано с фазовым разделением среды на гидрофобный и гидрофильный компоненты при повышенных концентрациях толуола, что снижало непосредственный контакт клеток с токсичным агентом по сравнению с системами, содержащими более низкие концентрации данного растворителя.

Экстремально высокая устойчивость к нитрилам у штаммов, впервые выделенных из сред содового шламохранилища, вероятно, связана с сочетанием галотолерантности со способностью к гидролизу нитрилов. Так, в работе А.В. Максимовой (Максимова, 2016) было показано, что для продуцента нитрилгидратазы *R. ruber* gt1 МИК акрилонитрила составляет 0,06 М.

4.3 Влияние pH и NaCl среды на ферментативную активность и рост штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)

4.3.1 Изучение совместного действия NaCl и pH среды на рост и нитрилгидролизующую активность родококков

Проведено изучение сочетанного воздействия кислотно-основных условий и осмотического стресса на процесс накопления биомассы штаммами *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417).

Для штамма *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) установлена способность к эффективному накоплению биомассы в средах с pH 6-12 при концентрациях NaCl 0,5-10 г/л. Более высокие концентрации хлорида натрия оказывали выраженное ингибирующее действие на ростовые процессы. Предельной концентрацией соли, допускающей возможность роста, являлось значение 50 г/л,

однако активный рост культуры наблюдался только при pH 6, что свидетельствует о синергетическом эффекте осмотического и кислотного стрессов.

Штамм *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) продемонстрировал повышенную чувствительность к осмотическому стрессу. При культивировании в присутствии 50 г/л NaCl наблюдалось существенное подавление ростовой активности: значения ОП₅₄₀ суспензии были близки к 0,1 в диапазоне pH 6-9. В оптимальных для данного штамма условиях (10 г/л NaCl, pH 6-11) его рост был достаточно активным с достижением значений ОП₅₄₀ > 0,4.

Полученные данные (Таблица 6) позволяют заключить, что оба штамма обладают галоалкалотолерантностью, однако демонстрируют различные диапазоны толерантности к комбинированному воздействию абиотических факторов.

Таблица 6 – Накопление биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) в зависимости от pH и концентрации NaCl

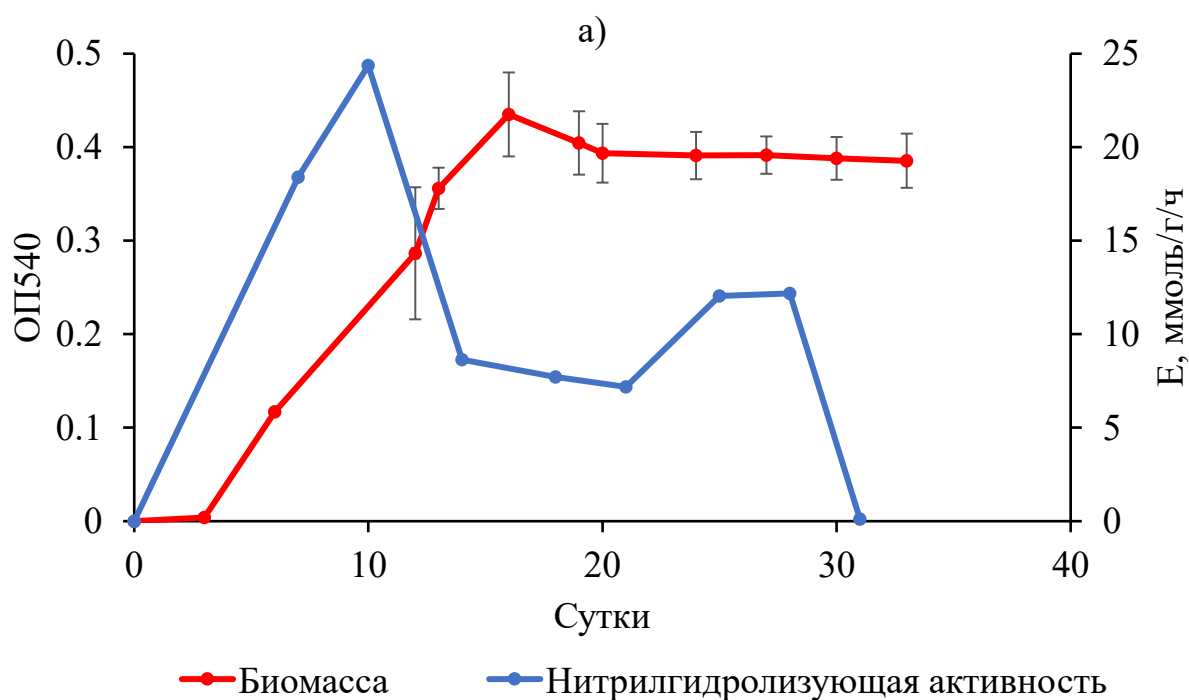
NaCl, г/л pH	Биомасса, ОП ₅₄₀							
	<i>R. qingshengii</i> 5Э (IEGM 1416)				<i>R. erythropolis</i> 6Э (IEGM 1417)			
	0,5	5	10	50	0,5	5	10	50
6	0,444 ±0,075	0,584 ±0,087	0,631 ±0,100	0,106 ±0,013	0,561 ±0,048	0,545 ±0,021	0,546 ±0,026	0,347 ±0,076
7	0,554 ±0,032	0,456 ±0,029	0,649 ±0,073	0,114 ±0,007	0,541 ±0,053	0,536 ±0,006	0,500 ±0,025	0,088 ±0,005
8	0,444 ±0,064	0,592 ±0,059	0,618 ±0,027	0,105 ±0,007	0,535 ±0,040	0,505 ±0,034	0,622 ±0,010	0,085 ±0,003
9	0,544 ±0,054	0,549 ±0,016	0,656 ±0,074	0,103 ±0,005	0,493 ±0,019	0,430 ±0,020	0,441 ±0,010	0,082 ±0,003
10	0,520 ±0,042	0,575 ±0,022	0,730 ±0,045	0,045 ±0,016	0,480 ±0,008	0,479 ±0,015	0,479 ±0,011	0,065 ±0,006
11	0,475 ±0,022	0,421 ±0,038	0,479 ±0,041	0,014 ±0,001	0,389 ±0,010	0,383 ±0,017	0,419 ±0,062	0,012 ±0,007
12	0,337 ±0,036	0,131 ±0,023	0,093 ±0,004	0,011 ±0,003	0,326 ±0,005	0,332 ±0,012	0,340 ±0,031	0,004 ±0,000

Выявленные особенности метаболического ответа коррелируют с экстремальными условиями места обитания исследуемых штаммов и отражают их адаптацию к условиям окружающей среды.

4.3.2 Влияние различных значений pH среды на рост и нитрилгидролизующую активность штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)

Изучена динамика роста и проявления ферментативной активности при гидролизе акрилонитрила у штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (Рисунок 14,15).

Установлено, что стационарная фаза роста *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) на минеральной среде с pH 8 наступает на 15-е сутки, при этом максимум нитрилгидролизующей активности наблюдается к завершению фазы активного накопления биомассы (Рисунок 14 а). На среде с pH 10 стационарная фаза роста начинается уже на 10-е сутки, а накопление биомассы превышает таковое при pH 8 в 2 раза. Нитрилгидролизующая активность при росте на среде с pH 10 достигает максимума в стационарной фазе роста.



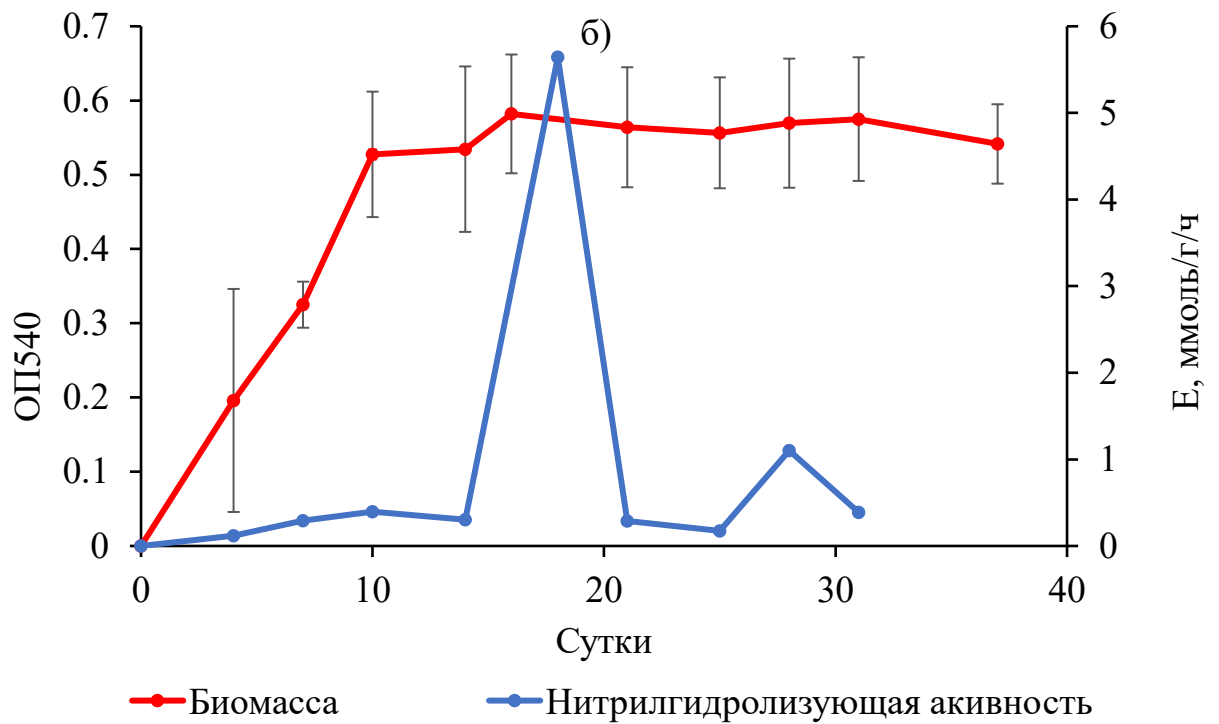
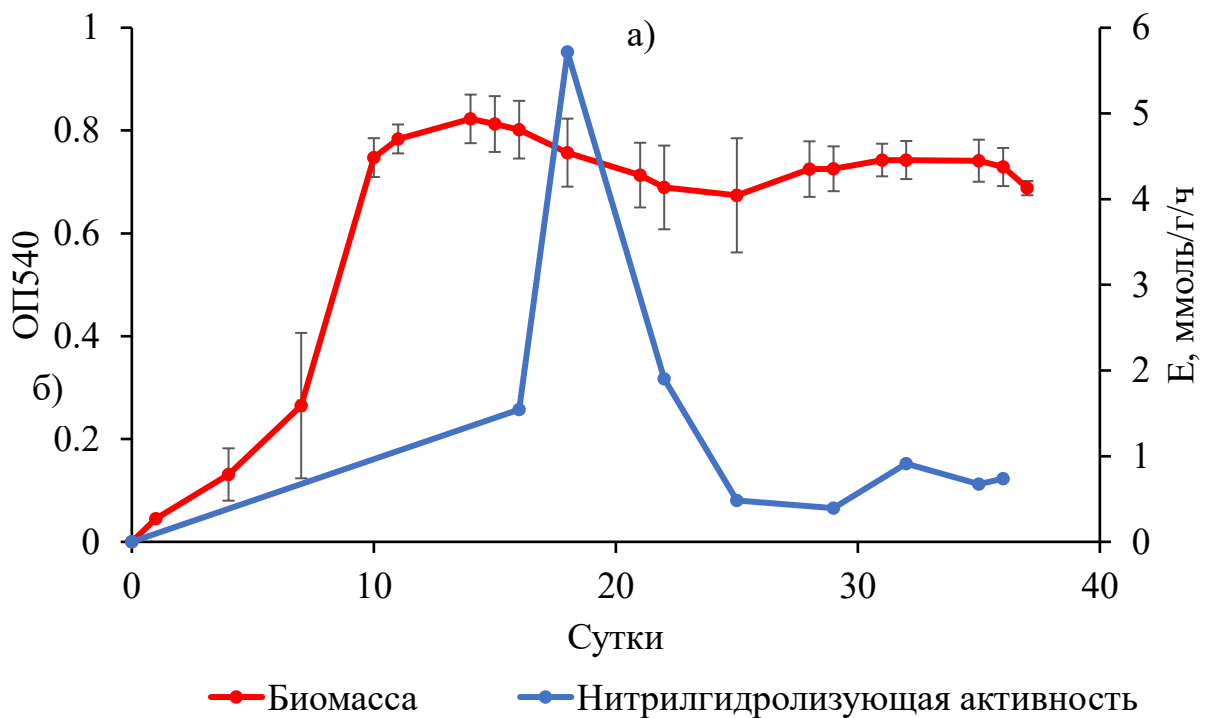


Рисунок 14 – Рост, ОП₅₄₀ и нитрилгидролизующая активность, E *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) а) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) б) на минеральной среде с pH 8 и 0,5 г/л NaCl в течение 33-37 сут.



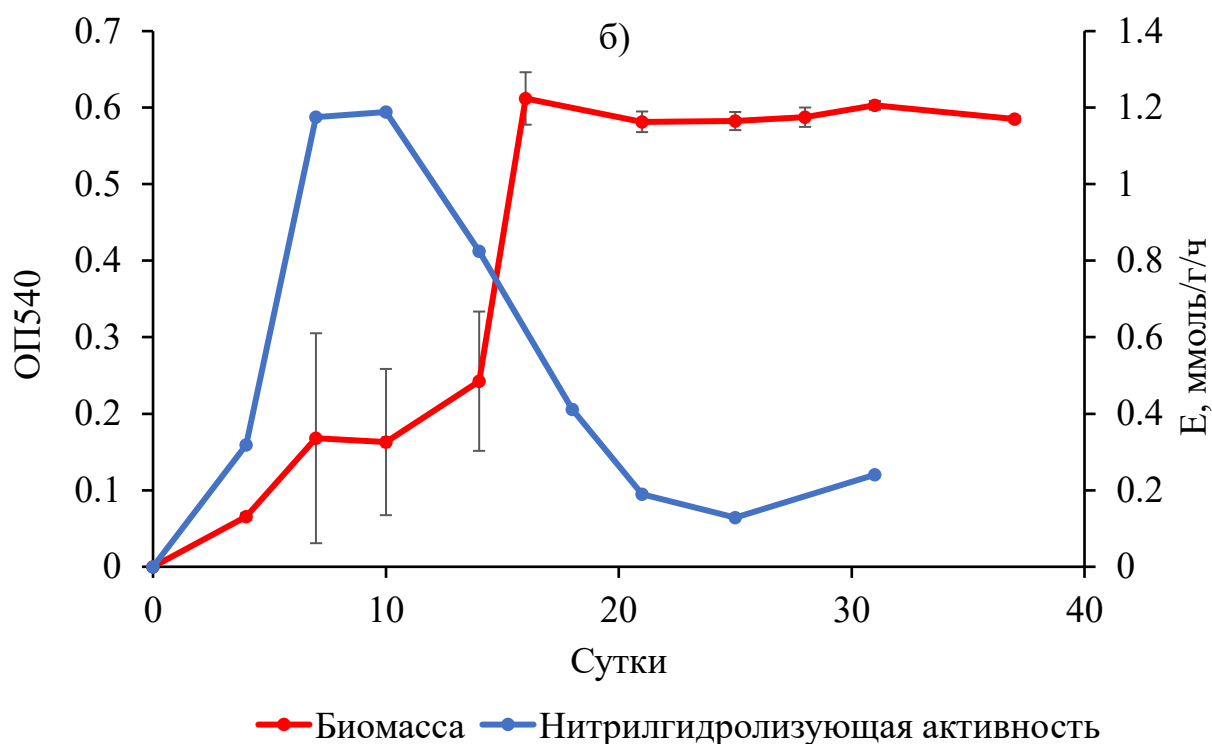


Рисунок 15 – Рост, ОП₅₄₀ и нитрилгидролизующая активность, E *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) а) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) б) на минеральной среде с pH 10 и 0,5 г/л NaCl в течение 33-37 сут.

У *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) стационарная фаза роста при pH 10 наступает позже, чем при pH 8, а максимальная нитрилгидролизующая активность регистрируется в начале логарифмической фазы роста. Существенных различий в накоплении биомассы при pH 8 и 10 не наблюдается.

Особенности ростовых характеристик изученных штаммов связаны с местом обитания микроорганизмов: *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) выделен из щелочного шлама с pH 11, а *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) — из грунта шламонакопителя с pH 8 и высоким содержанием солей.

4.4 Влияние pH и минерализации реакционной среды на нитрилгидролизующую активность *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)

Показано, что *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) проявлял наибольшую активность при pH 10 (Рисунок 16). Нитрилгидролизующая активность *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) при pH 7 и концентрациях NaCl 0,5 и 50 г/л составила 1,1 и 0,9 ммоль/г/ч соответственно, тогда как в среде с pH 10 активность достигала 2,6 и 1,2 ммоль/г/ч соответственно.

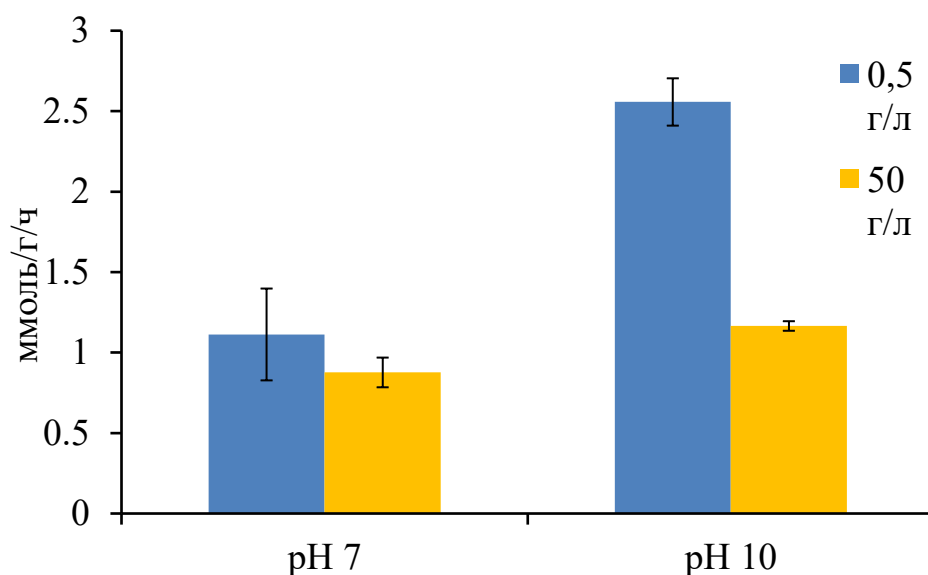


Рисунок 16 – Нитрилгидролизующая активность штамма *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) в реакционной среде при различных соотношениях pH и NaCl

Активность *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) при pH 10 ниже, чем при pH 7 (Рисунок 17).

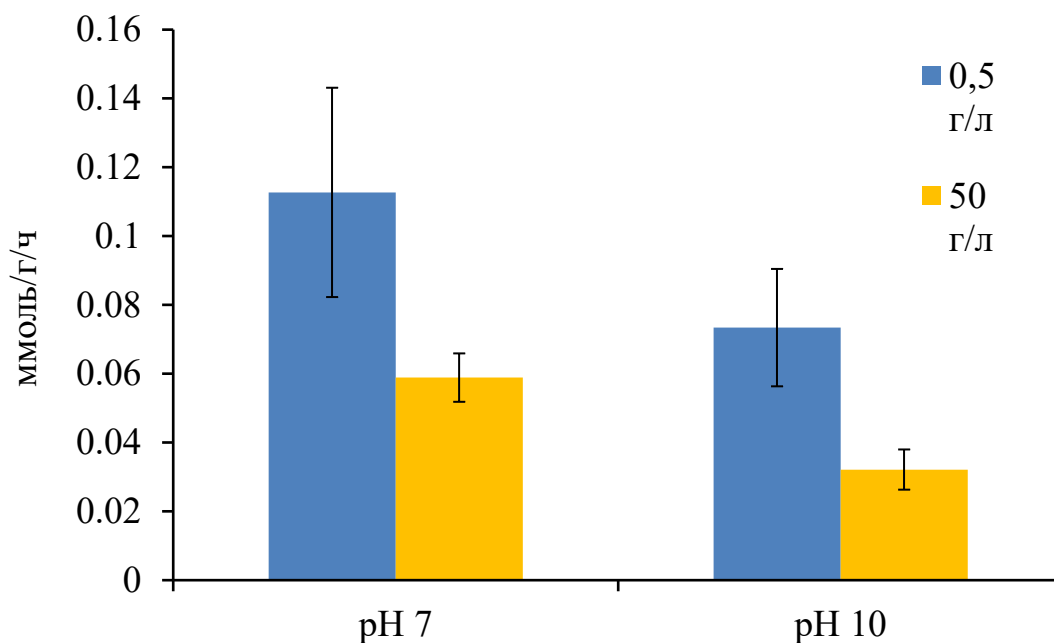


Рисунок 17 – Нитрилгидролизующая активность штамма *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) в реакционной среде при различных соотношениях pH и NaCl

Нитрилгидролизующая активность *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) при pH 7 составила 0,1 и 0,06 ммоль/г/ч в реакционной среде с содержанием NaCl 0,5 и 50 г/л соответственно.

4.5 Воздействие pH, NaCl и температуры на биопленкообразование *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)

Известно, что формирование биопленки у микроорганизмов является естественной стратегией существования в природе и усиливается в ответ на неблагоприятные условия среды, что дает основание считать биопленкообразование адаптивной реакцией. Исследовано биопленкообразование штаммов в условиях повышенной концентрации соли (5-200 г/л NaCl) и различной щелочности среды (pH 7-12). Для того чтобы оценить способность изолятов формировать биопленки, определяли отношение ОП экстрагированного красителя кристаллического фиолетового, отражающего биомассу биопленки, к ОП суспензии клеток в конце культивирования.

Установлено, что при концентрации NaCl выше 50 г/л в среде рост планктонной биомассы *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) снижается. Повышение концентрации NaCl в среде индуцировало переход клеток исследуемых штаммов к биопленкообразованию. Для штамма *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) достоверное увеличение индекса биопленкообразования наблюдается в широком диапазоне гиперосмотического стресса — от 50 до 200 г/л NaCl ($p < 0,05$) с максимумом при 200 г/л.

У штамма *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) адаптивный ответ на засоление носит характер выраженного скачка: экстремально высокий подъем интенсивности формирования биопленок регистрируется при концентрациях 10 г/л (возрастание более чем в 15 раз относительно контроля) и 50 г/л NaCl ($p < 0,05$). При дальнейшем увеличении минерализации среды (100–200 г/л) показатели биопленкообразования штамма 6Э снижаются, но остаются статистически значимыми на фоне глубокого угнетения планктонного роста культуры. Повышенное биопленкообразование у *R. erythropolis* 6Э при умеренном солевом стрессе (10–50 г/л) наглядно отражает его экологическую стратегию адаптации к условиям биотопа старой карты шламохранилища.

Соотношение биомассы биопленки к планктонной форме в щелочной среде также возрастало, достигая пика при значениях pH 12 и 10 для *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) соответственно. Таким образом, оба штамма усиленно формировали биопленки в ответ на воздействие этих стрессовых факторов (Рисунок 18, 19).

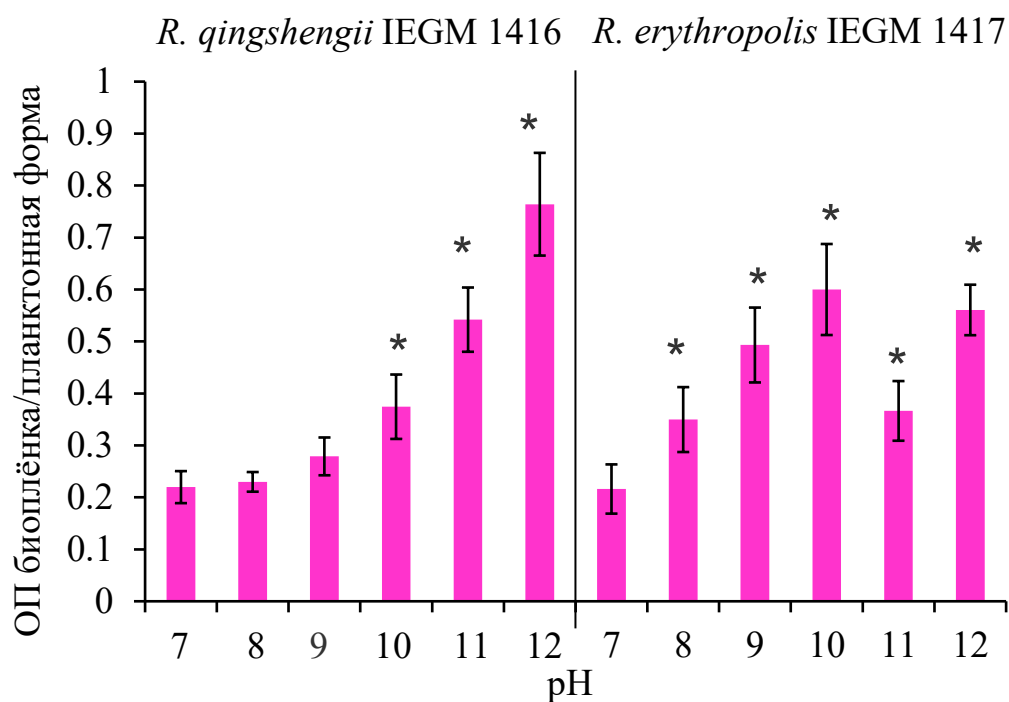


Рисунок 18 – Влияние pH среды на биопленкообразование штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), $*p < 0,05$, инкубация 7 суток

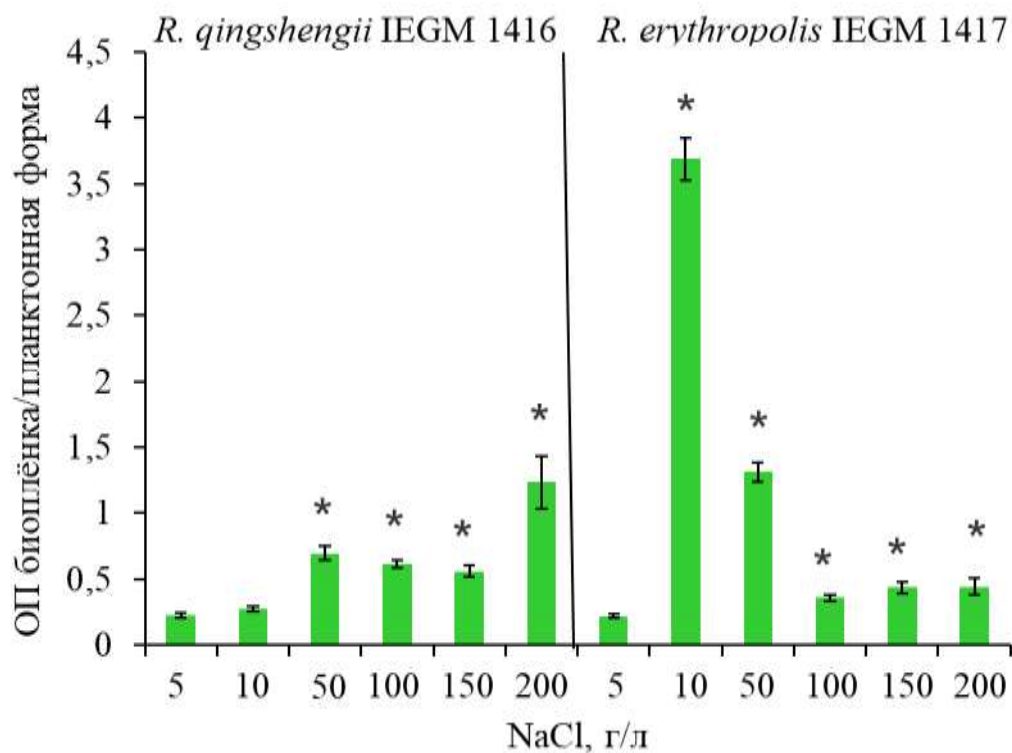


Рисунок 19 – Влияние концентрации NaCl в среде на биопленкообразование штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), $*p < 0,05$, инкубация 7 суток

Температура 37°C ингибирует накопление биомассы биопленки, в то время как биомасса планктонных клеток значительно превышает таковую при 30°C. ОП экстрагированного красителя, отражающего биомассу биопленки, у обоих штаммов при 37°C не превышала 0,027. Таким образом, повышение температуры подавляет образование биопленки у обоих штаммов. Также наблюдается некоторое снижение образования биопленки у *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) при 8°C. Из полученных результатов (Рисунок 20) следует, что усиленное образование биопленок наблюдается в неблагоприятных, но не летальных условиях. Данные штаммы являются галоалкалотолерантными, но не алкалофилами или галофилами, поэтому высокие показатели pH и минерализации являются для них стрессовыми условиями.

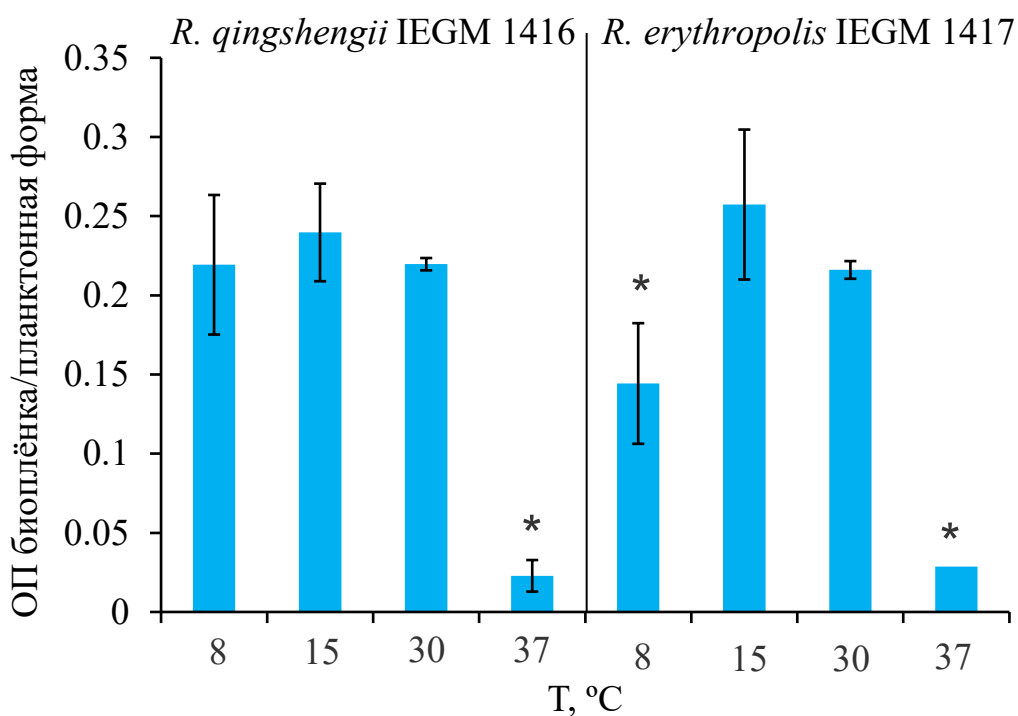


Рисунок 20 – Влияние температуры на биопленкообразование штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), * $p < 0,05$, инкубация 7 суток

Глава 5. ДЕГРАДАЦИЯ БУТАДИЕН-НИТРИЛЬНОГО КАУЧУКА
НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИМИ ГАЛОАЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫМИ
БАКТЕРИЯМИ *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и
R. erythropolis 6Э (IEGM 1417)³

5.1 Рост *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417)
на среде с бутадиен-нитрильным каучуком как единственным источником
азота

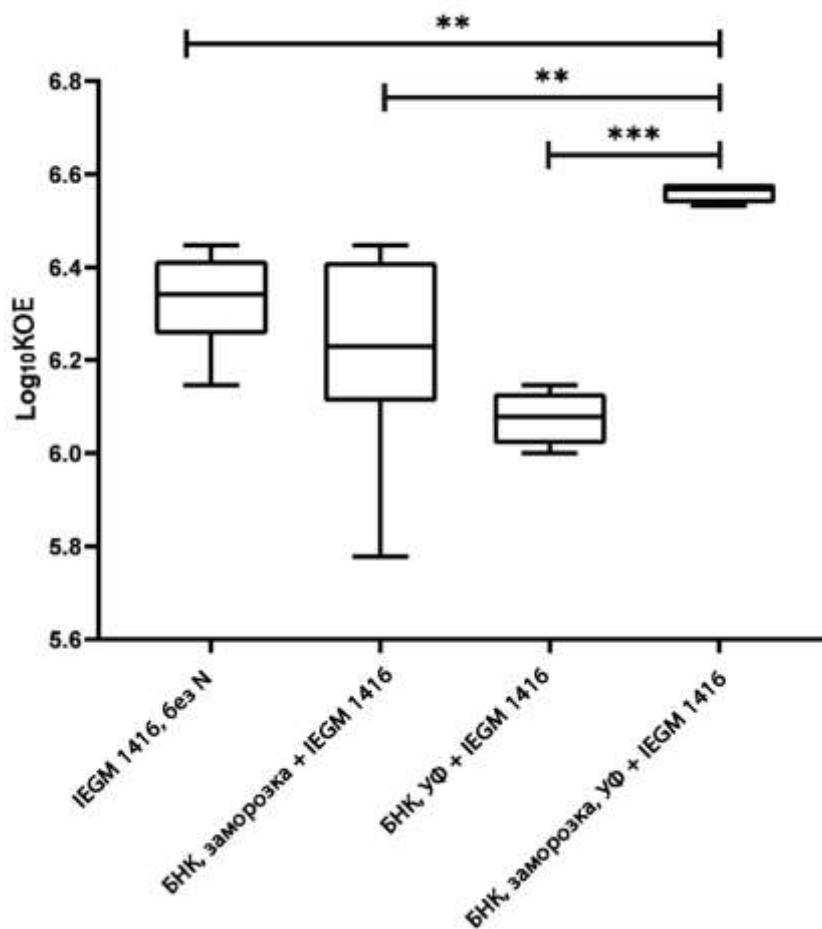
R. qingshengii 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) были выращены на среде с 1,5% сорбитом, либо 1% глюкозой соответственно. Растворимый источник азота не добавляли, вместо него были добавлены фрагменты (1×1 см) БНК в количестве 10 шт на 200 мл среды.

Определяли концентрацию акрилонитрила и продуктов его трансформации нитрилгидролизующими ферментами (нитрилгидратазой и амидазой) в среде после культивирования. БНК предварительно обрабатывали УФ и/или замораживанием, после чего стерилизовали вместе с минеральной основой среды, добавляли источник углерода, инокулировали суспензией *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) и выращивали в течение 2 недель. Акриламид не обнаруживался ни в одной из проб после культивирования. Известно, что бактерии, содержащие нитрилгидратазу и амидазу и способные утилизировать нитрилы, могут использовать акриламид в качестве единственного источника углерода для накопления биомассы (Maksimova *et al.*, 2018). Следовательно, акриламид, образующийся при превращении акрилонитрила, включается в метаболические пути этих бактерий. В жидкой фазе после воздействия УФ на БНК после инкубации в минеральной среде без бактериального воздействия были обнаружены акрилонитрил и акриловая кислота; в пробах после культивирования *R. erythropolis* 6Э (IEGM

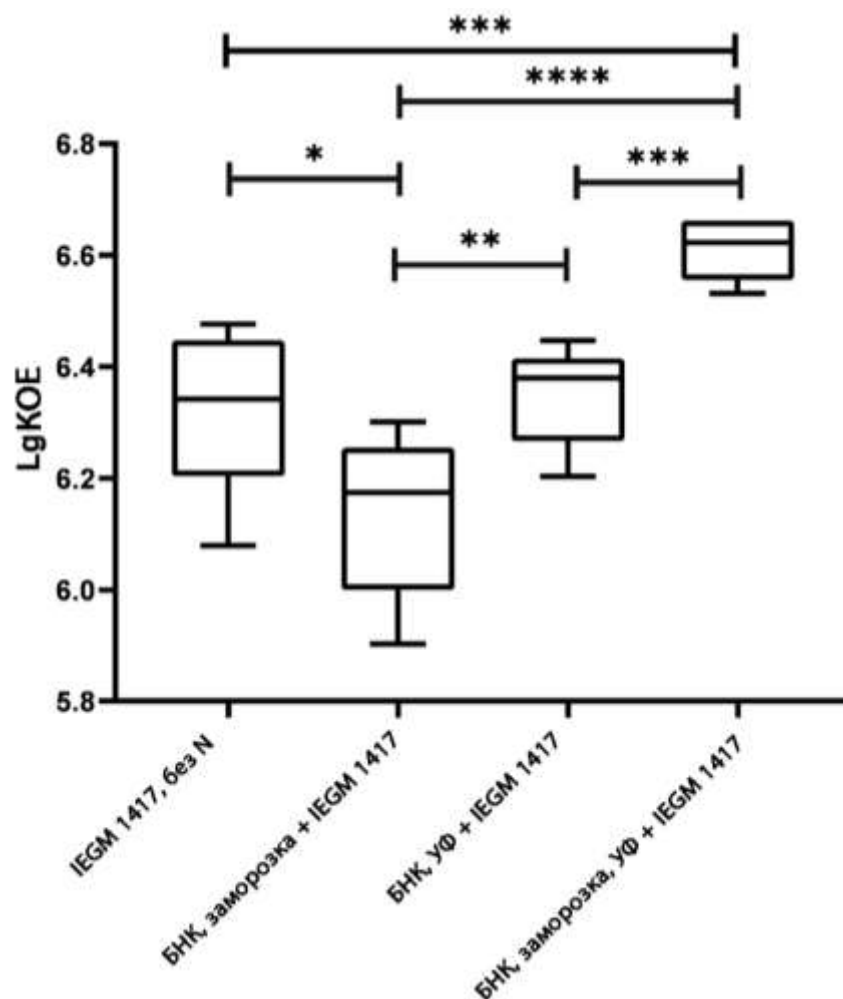
³ Опубликовано: Syrovatskaya, G.A., Maksimov, A.Yu., Korotchenkova, O.V., Maksimova, Yu.G. Haloalkalitolerant Nitrile-Utilizing *Rhodococcus* Strains Promote the Biodegradation of Nitrile-Butadiene Rubber // International Journal of Microbiology. – 2026. – Vol. 2026. – Article 7513883.

1417) – акрилонитрил. Количество акриловой кислоты в среде после роста бактерий не превышало 0,06 мг/л, количество акрилонитрила составляло от 5 до 9 мг/л. В остальных пробах, в том числе после культивирования *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416), мономеры акрилонитрила не детектировались, что могло быть связано с более активным ростом этого штамма, использующего их как источники питания.

Определили количество КОЕ/мл в культуральной жидкости после роста *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) с БНК в течение 2 недель (Рисунок 21, а, б). Показано, что после роста штаммов родококков на безазотистой минеральной среде с БНК, предварительно обработанном УФ и замораживанием-оттаиванием, количество КОЕ/мл в культуральной жидкости достоверно превышало ($p < 0,05$) таковое после роста бактерий на среде без источника азота.



а)



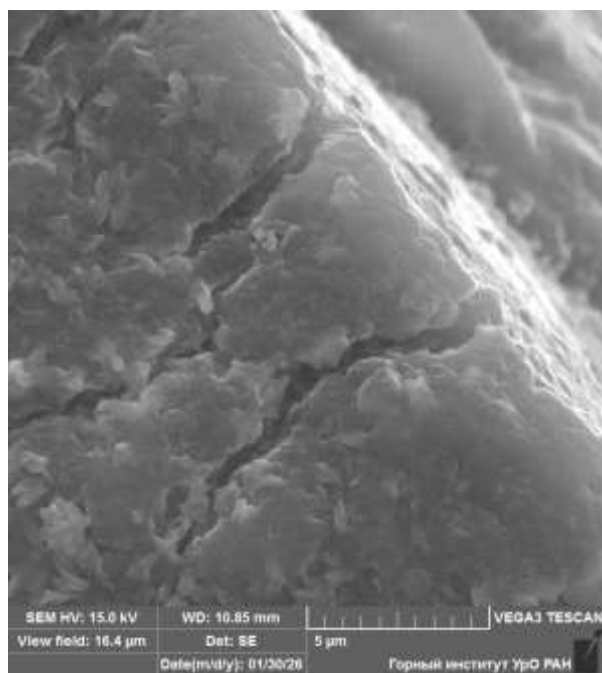
б)

Рисунок 21 – Количество КОЕ *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) (а) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (б) в культуральной жидкости после 2 недель культивирования с БНК, предварительно обработанным УФ и замораживанием-оттаиванием (ANOVA с пост-хок тестом Тьюки, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$).

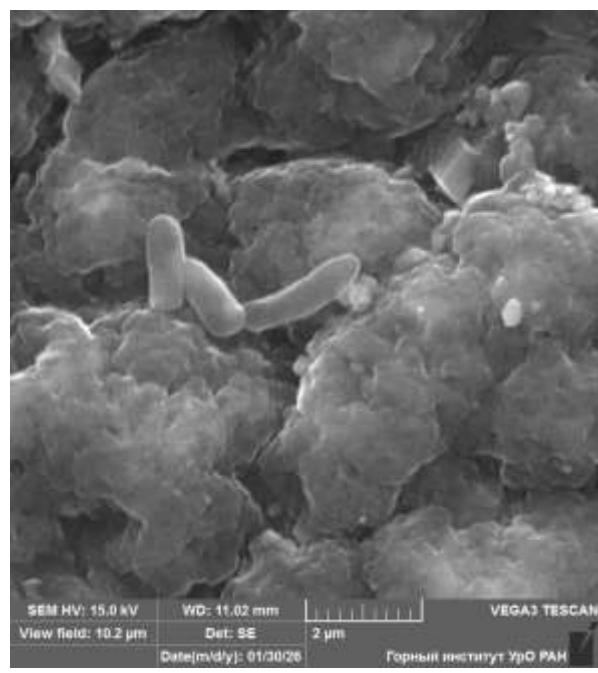
После культивирования *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) в течение месяца с БНК без дополнительного источника азота определили количество жизнеспособных клеток биопленки, выращенной на БНК. Биопленка *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), выращенная на БНК, обработанном УФ и замораживанием-оттаиванием, содержала $(7,28 \pm 0,48) \times 10^6$ и $(6,27 \pm 0,72) \times 10^6$ КОЕ/см² соответственно. Таким образом, предварительная обработка БНК УФ совместно с замораживанием-оттаиванием способствует нарастанию мощной биопленки.

5.2 Сканирующая электронная микроскопия биопленок родококков на поверхности бутадиен-нитрильного каучука

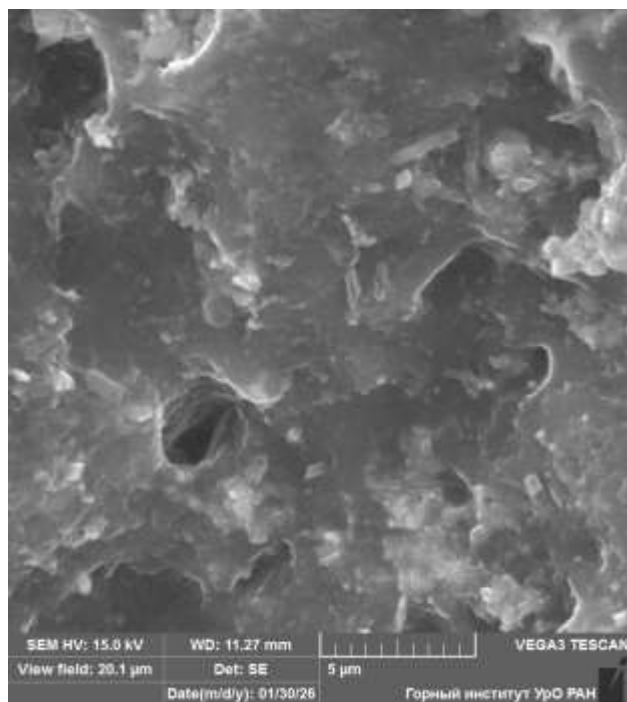
Получены микрофотографии биопленок *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) на поверхности фрагментов БНК (Рисунок 22). Поверхность нативных фрагментов БНК неоднородна и имеет две различные стороны: шероховатую (Рисунок 22 и, л) и гладкую пористую (Рисунок 22 з, к, м), что приводит к неравномерному росту биопленки. Однако различий между поверхностями БНК при обработке только УФ, УФ с замораживанием-оттаиванием или после инкубации предварительно обработанного полимера в стерильной минеральной среде не наблюдалось (Рисунок 22 з–м). Микрофотографии показали, что биопленка более активно формировалась на шероховатой поверхности полимера (Рисунок 22 а, б, г–е). На гладкой поверхности биопленка менее выражена (Рисунок 22 в). Массивная биопленка сформировалась на БНК через месяц культивирования при внесении большого объема биомассы (Рисунок 22 д, е). Биопленка представляла собой слизистый матрикс с палочковидными клетками, погруженными вглубь внеклеточного полимерного вещества. В структуре биопленок *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) были четко видны очертания вытянутых клеток. Слизистый полимерный матрикс с менее выраженными контурами клеток наблюдался после двух недель роста на БНК (Рисунок 22 а–г); в некоторых случаях на поверхности вне слизистого матрикса отмечались палочковидные клетки (Рисунок 22 б).



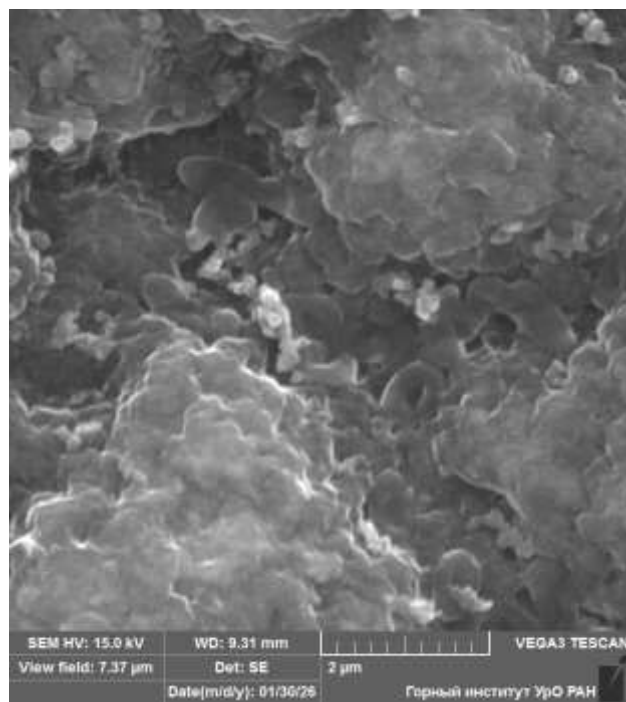
a)



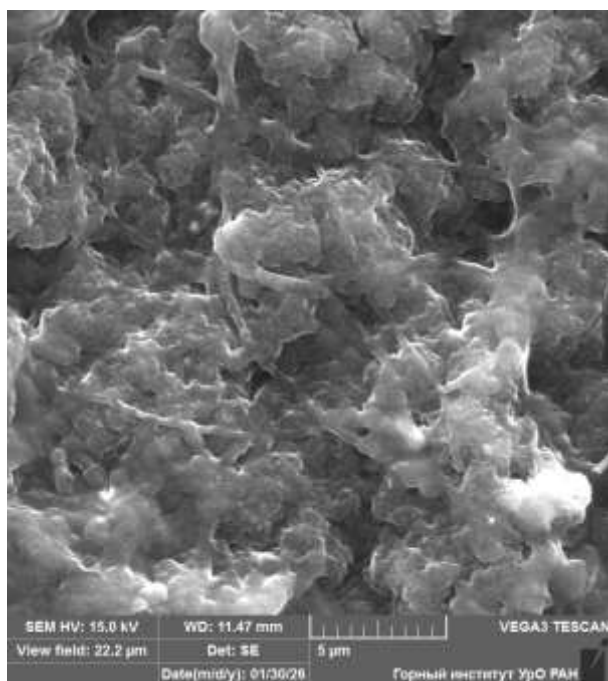
б)



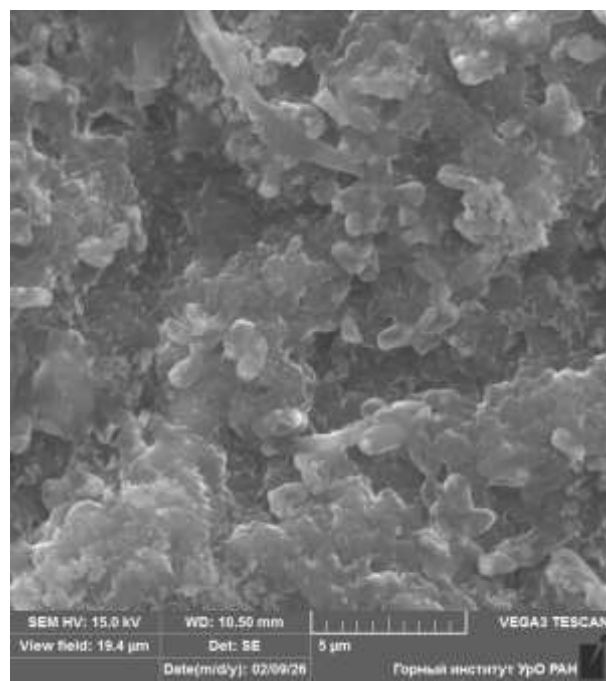
в)



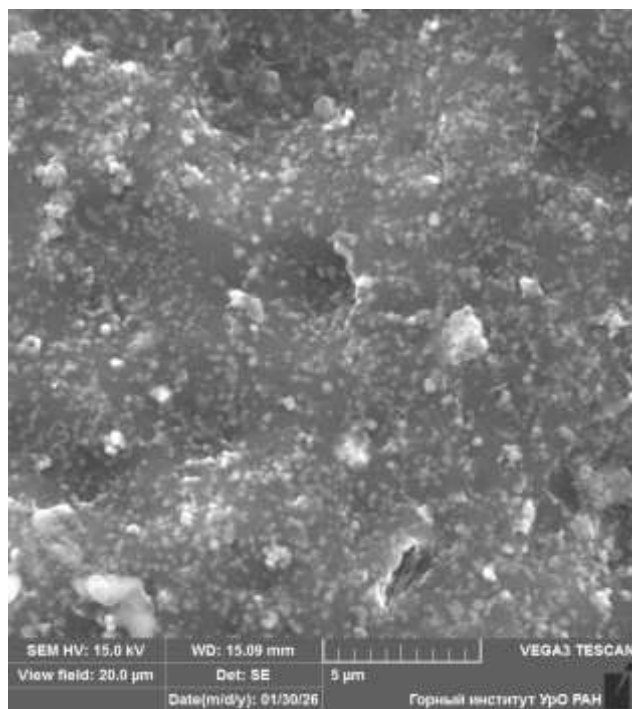
г)



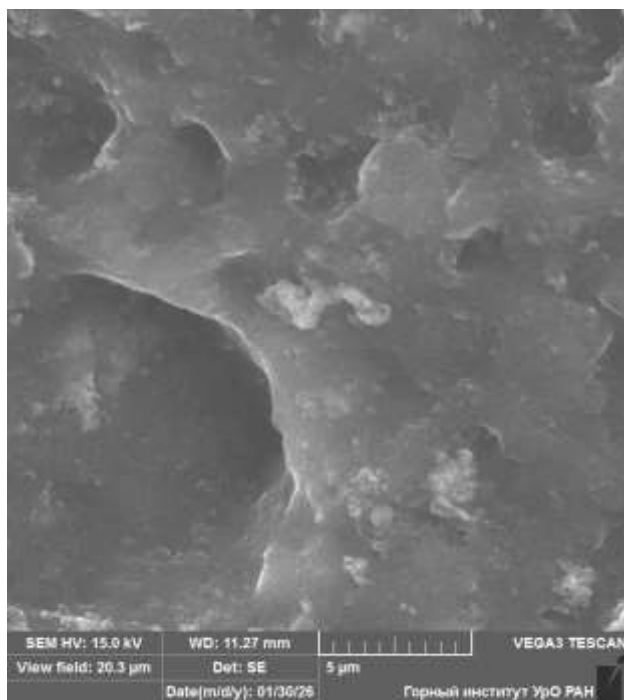
д)



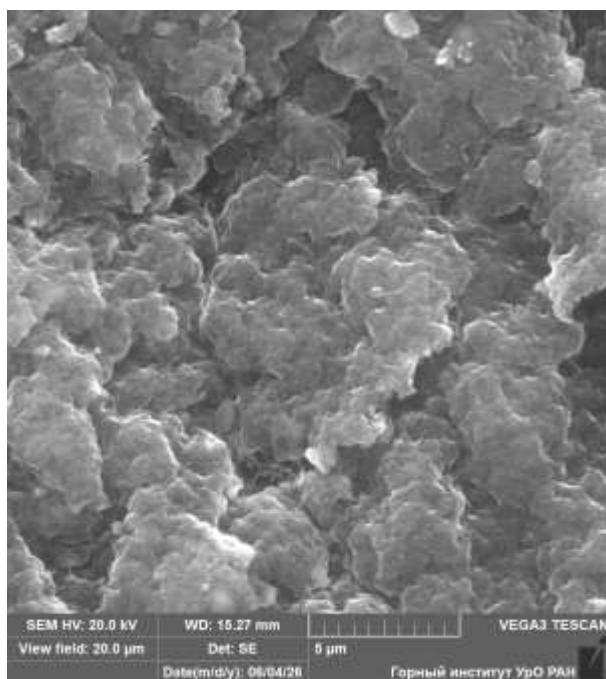
е)



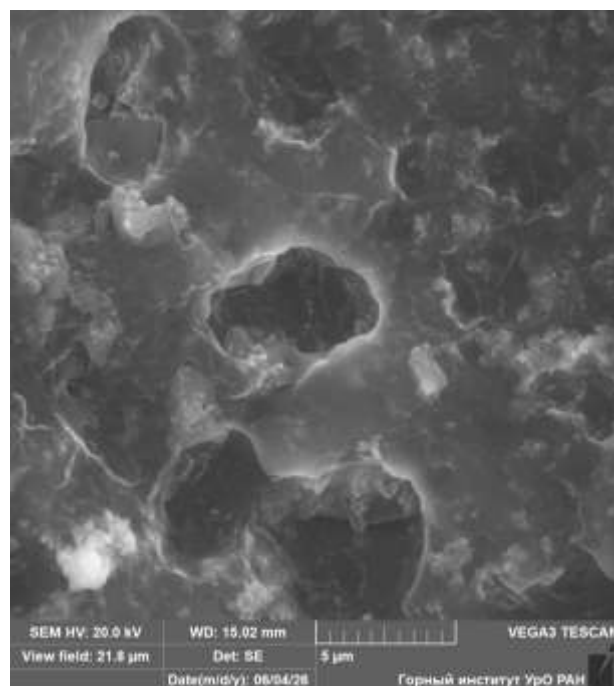
ж)



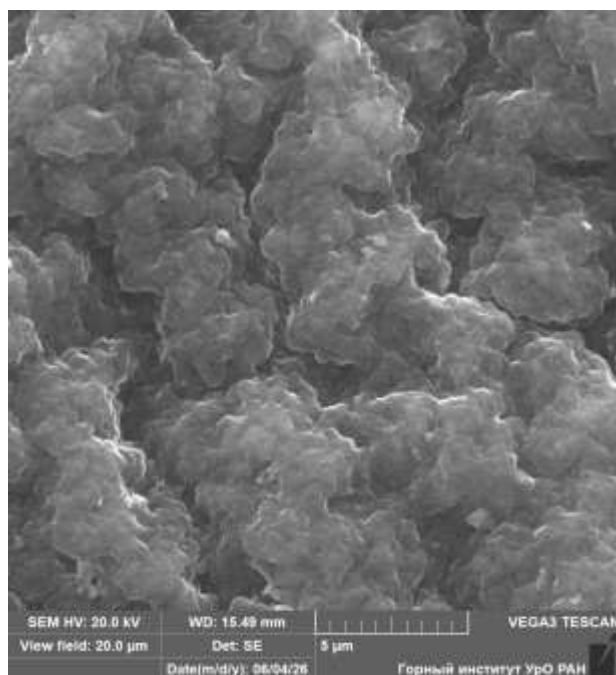
з)



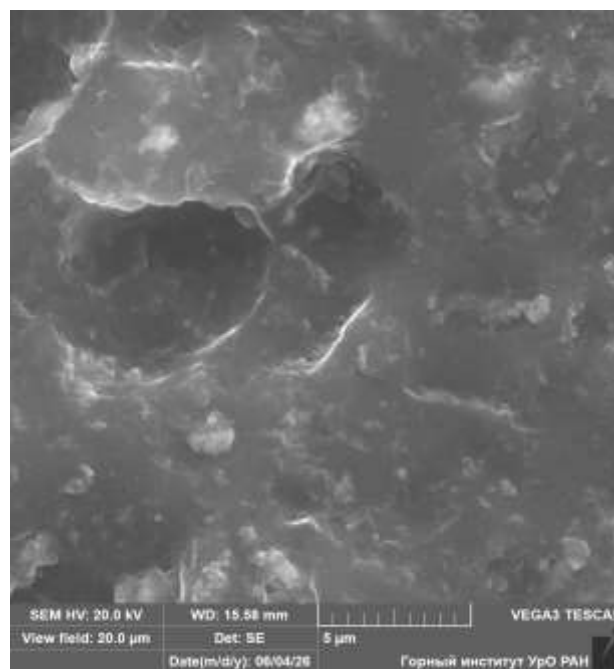
и)



к)



л)



м)

Рисунок 22 – Сканирующая электронная микроскопия БНК. Полимер был предварительно обработан УФ и замораживанием-оттаиванием (а, в, д, е) или только УФ (б, г). На микрофотографиях показаны биопленки *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) (а, б, д) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) (в, г, е), выращенные на полимере в течение 14 дней (а–г) и одного месяца (д, е).

Контроли: необработанный полимер без бактериального роста и без инкубации в минеральной среде (ж); полимер, обработанный УФ, без бактериального роста и без инкубации в минеральной среде (з); полимер, обработанный УФ, после инкубации в стерильной минеральной среде, шероховатая сторона (и) и гладкая сторона (к); полимер, обработанный УФ и замораживанием-оттаиванием, после инкубации в стерильной минеральной среде, обе стороны: шероховатая (л) и гладкая (м)

5.3 Оценка изменений структуры бутадиен-нитрильного каучука при культивировании родококков посредством Фурье-спектроскопии

ATR-FTIR спектры были получены для необработанного БНК, после УФ-облучения и замораживания-оттаивания, инкубации предварительно обработанного УФ и подвергнутого замораживанию-оттаиванию БНК в стерильной минеральной среде, а также после роста *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) в течение 1 месяца на БНК, предварительно обработанном УФ и замораживанием-оттаиванием, без дополнительного источника азота (Рисунок 23).

Сравнивали высоты пиков образцов (Таблица 7). ATR-FTIR спектры подтверждают, что материал является БНК (Kawashima, Ogawa, 2005; Chakraborty *et al.*, 2007). Все образцы демонстрировали стабильный пик, характерный для нитрильной группы (2237 см^{-1}), и интенсивный пик при 966 см^{-1} , типичный для деформационных колебаний транс-связей $\text{C}=\text{C}$, указывающих на бутадиеновые звенья.

Таблица 7 – Относительные интенсивности пиков поглощения на ИК-Фурье спектрах образцов БНК

Пик, длина волны, см ⁻¹	Химическая группа	БНК без инкубации в минеральной среде		БНК после УФ-обработки, замораживания-оттаивания и инкубации в минеральной среде			
		Исходный БНК	БНК после обработки УФ и замораживания/оттаивания	Стерильные		Бактериальный рост	
				Шероховатый	Гладкий	Шероховатый	Гладкий
Высота пиков, усл. ед.							
2919-2929	С-Н связи (алифатические группы)	0,179	0,070	0,072	0,195	0,048	0,327
2850-2866	С-Н связи (алифатические группы)	0,111	0,051	н/о	н/о	0,03	0,201
2237	нитрил	0,023	0,019	0,020	0,077	0,011	0,066
1769	сложноэфирные пластификаторы	н/о	0,024	0,026	н/о	н/о	н/о
1729	карбонильная группа	н/о	0,019	н/о	н/о	н/о	н/о
1667	амидные группы Амид I	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	0,050
1642-1663	валентные колебания С=С связей в бутадиеновых звеньях	0,038	0,025	0,046	н/о	н/о	н/о
1653	-					0,033	
1606-1607	ароматические кольца (наличие пластификаторов)	0,036	0,024	н/о	н/о	н/о	0,092
1548-1551	амидные группы Амид II	н/о	н/о	н/о	н/о	0,016	н/о
1438-1443	деформационные колебания СН ₂ -групп, находящихся рядом с нитрильной группой	0,11	0,053	0,052	0,113	0,045	0,153
1366	деформационные колебания СН ₃ -групп	н/о	0,037	н/о	н/о	н/о	н/о
1354	деформационные симметричные колебания С-Н связей в метильных группах (-СН ₃)	0,081	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
1110	связи С-О или С-О-С (простые эфиры)	н/о	0,125	н/о	н/о	н/о	н/о
966-967	С=С связь бутадиена	0,138	0,150	0,111	0,257	0,095	0,280

Примечание: н/о – не определяется в образце

Известно, что старение полимера вызывает поверхностные изменения (например, трещины и шероховатость) и изменения в ATR-FTIR спектрах (Campanale *et al.*, 2023). Сравнение пиков (Рисунок 23) показывает, что обработанные образцы, в отличие от исходного материала, демонстрируют уменьшение содержания гидроксильных/аминогрупп, исчезновение широкого плато при 3422 см^{-1} и перераспределение в карбонильной области ($1730\text{--}1770\text{ см}^{-1}$), что часто сопровождается старением или химическую модификацию полимеров. Низкая интенсивность спектра и изменения в области $1730\text{--}1770\text{ см}^{-1}$ подтверждают окисление под воздействием УФ-света. Различная интенсивность (0,10 против 0,35) пиков для образцов БНК после инкубации со штаммами *Rhodococcus* указывает на различия поверхности, которые могут быть связаны с различной шероховатостью, что, с одной стороны приводит к разной плотности контакта с кристаллом прибора, а с другой стороны – к неравномерному накоплению биопленки. Наблюдается изменение в карбонильной области ($1700\text{--}1800\text{ см}^{-1}$) УФ-облученных образцов, а именно появление пиков при 1769 и 1729 см^{-1} , что указывает на образование новых кислородсодержащих групп (кетонов, альдегидов или сложных эфиров) в результате разрыва полимерных цепей и присоединения кислорода под действием света. Амплитуда сигнала уменьшается, что является характерным признаком фотостарения. Однако нитрильные пики сохраняются, так как акрилонитрильные звенья сополимера более устойчивы к УФ-воздействию, чем бутадиеновые области или лабильные примеси.

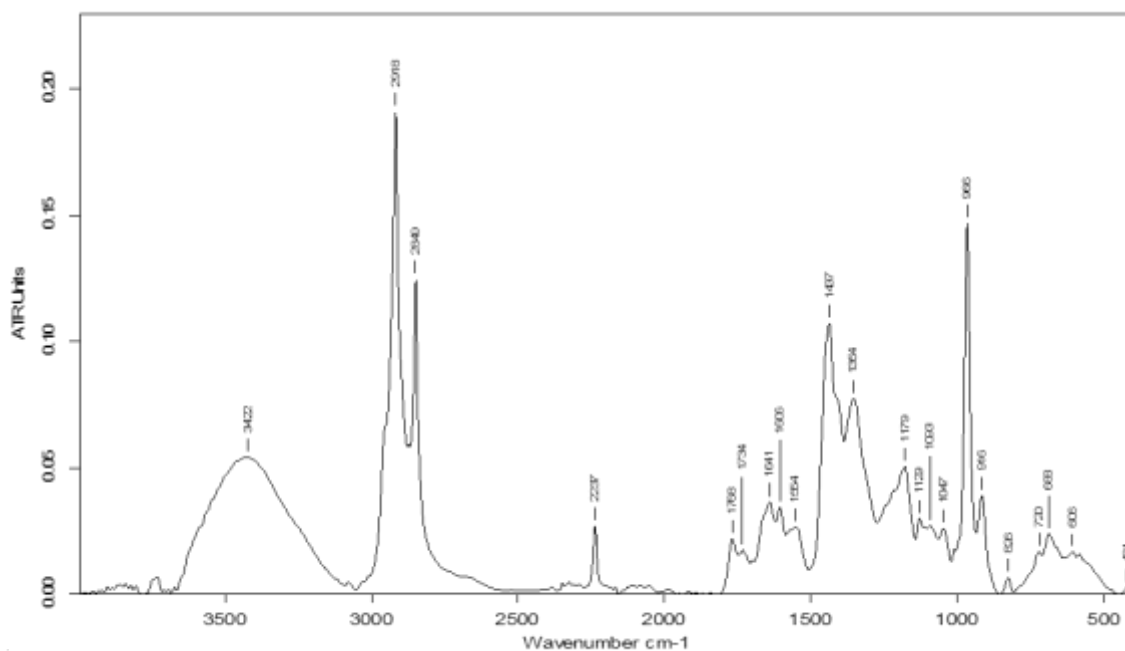
Пики в ATR-FTIR спектрах в диапазоне $1630\text{--}1690\text{ см}^{-1}$ и $1530\text{--}1560\text{ см}^{-1}$ указывают на присутствие амидных групп — Амид I и Амид II соответственно (Ji *et al.*, 2020; Threlfall, 2022). Появление новых пиков в области $1548\text{--}1667\text{ см}^{-1}$, характерных для амидных групп, в спектрах образцов после бактериальной обработки подтверждает превращение нитрилов в амиды, катализируемое нитрилгидратазами. На гладкой стороне полимера наблюдается пик (0,050) при 1667 см^{-1} , подтверждающий превращение нитрильной $\text{C}\equiv\text{N}$ группы в амидную

($-\text{CONH}_2$). Пик при 1608 см^{-1} может указывать на образование двойных связей, сопряженных с карбонилами, или на накопление промежуточных продуктов окисления. Разница в наборе пиков и их интенсивности между сторонами подтверждает, что бактериальный рост происходил неравномерно. Окислительное старение подтверждается появлением карбонильных групп (1729 см^{-1}) и амидных групп (1667 , $1548\text{--}1551\text{ см}^{-1}$) по отношению к неизменным группам, таким как нитрильные (2237 см^{-1}) или алифатические C–H ($2919\text{--}2924\text{ см}^{-1}$).

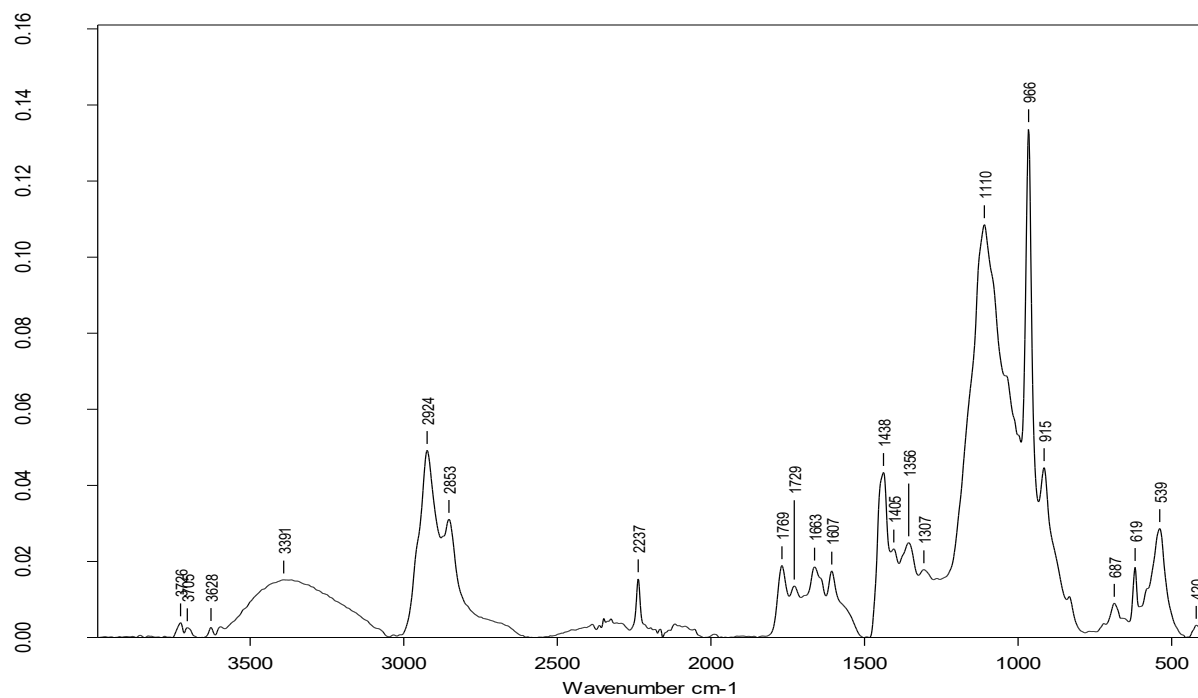
Было установлено, что амидные группы не образуются после УФ-облучения, замораживания-оттаивания и инкубации обработанного полимера в стерильной минеральной среде. Рост штаммов *Rhodococcus* приводит к накоплению амидных соединений, что указывает на изменения в полимерной цепи под влиянием микробных ферментов.

Наблюдаются значительные изменения площадей пиков, соответствующих различным химическим группам (Таблица 8). Площадь пика при $2919\text{--}2850\text{ см}^{-1}$, соответствующая углеводородным группам, уменьшается после УФ-обработки (с 17,944 до 13,131 усл. ед.) и значительно уменьшается в образцах БНК после их инкубации с бактериями обоих штаммов (до 6,627 усл. ед.) по сравнению с исходным образцом. Более того, инкубация полимера, предварительно обработанного УФ и замораживанием-оттаиванием в стерильной минеральной среде, приводит к уменьшению интегральных площадей пиков (до 8,384 усл. ед.), но остается выше, чем у БНК после бактериального роста. Это может указывать на модификацию углеводородной основы каучука под влиянием УФ-излучения, инкубации в стерильной минеральной среде, и особенно после воздействия штаммов *Rhodococcus*. Площадь пика при 2237 см^{-1} , соответствующая нитрильной группе, уменьшается после УФ-обработки (с 0,645 до 0,567 усл. ед.), после обработки и инкубации в стерильной минеральной среде (до 0,442 усл. ед.) и после бактериального роста

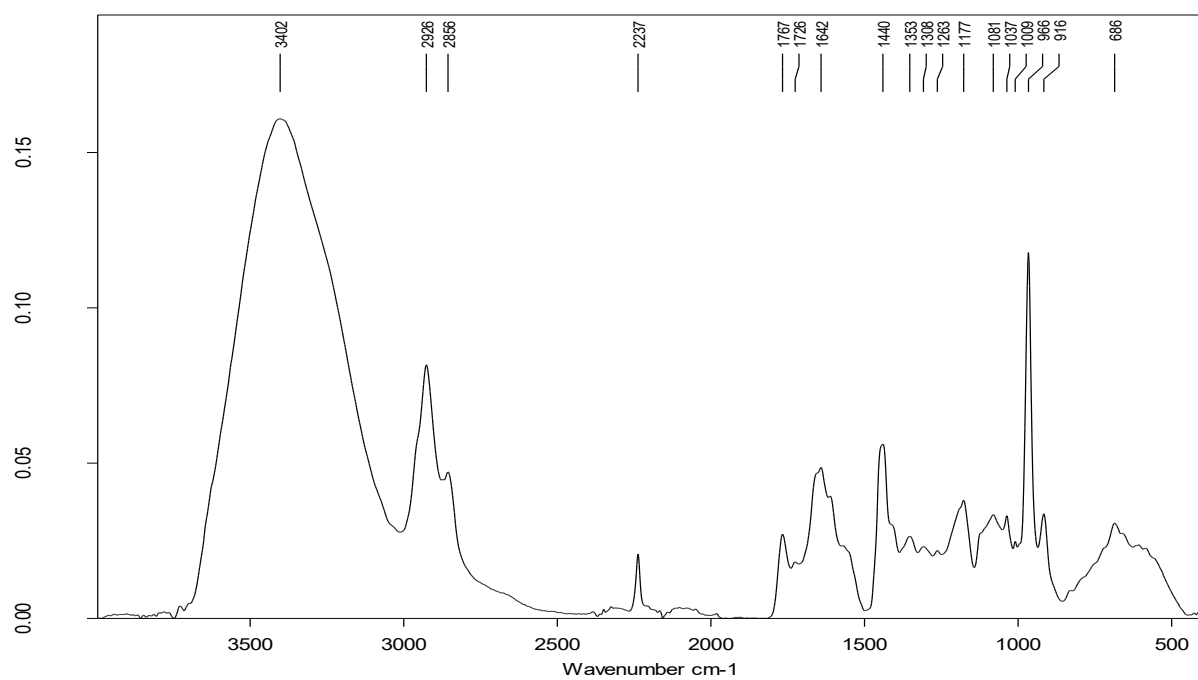
на шероховатой стороне (до 0,379 усл. ед.), что указывает на химические изменения или деградацию нитрильных групп в структуре полимера. Площадь пика в области 1807–1492 см^{-1} незначительно уменьшается после УФ-воздействия и инкубации в стерильной минеральной среде (с 6,931 до 6,662 усл. ед.) и уменьшается после бактериального роста на шероховатой стороне (до 5,892 усл. ед.). Появление или усиление пиков в этой области (около 1700 см^{-1}) часто связано с образованием карбонильных групп $\text{C}=\text{O}$ в результате окисления или других реакций деградации, что характерно для процессов старения полимеров под внешним воздействием. Изменения, наблюдаемые в области низкочастотной, высокоинформативной области спектра (ниже 1500 см^{-1}), указывают на химические превращения пластификаторов, присутствующих в исходном образце (пики при 1182, 1127, 1092, 1047 см^{-1}).



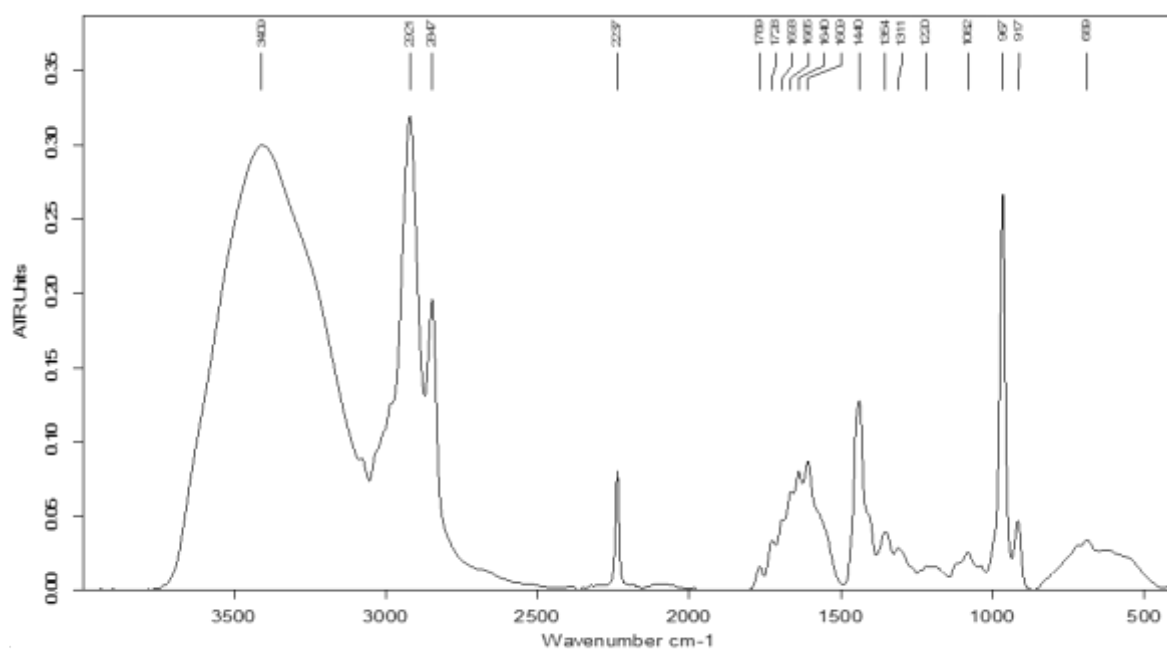
a)



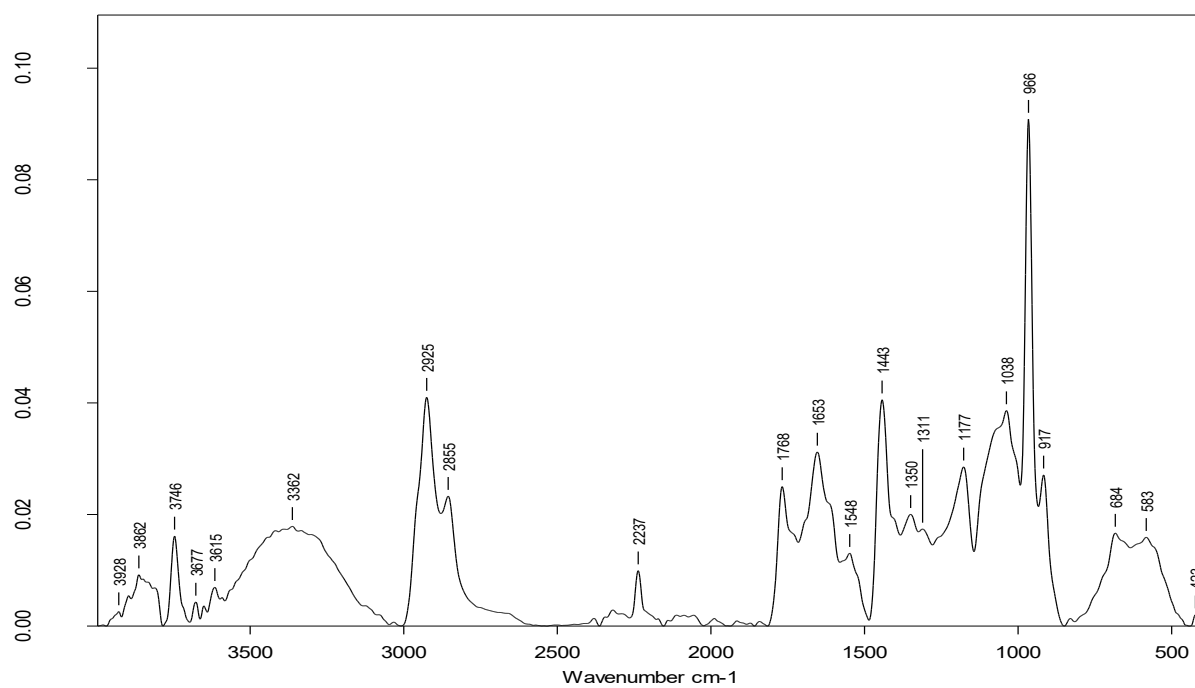
b)



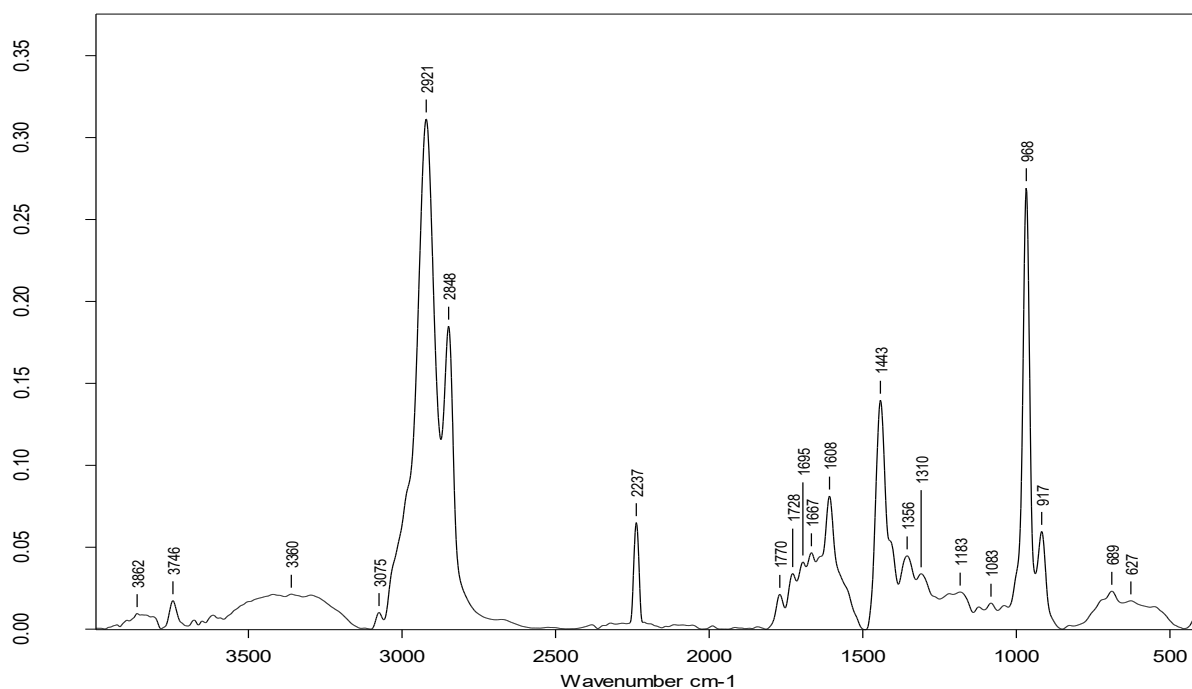
B)



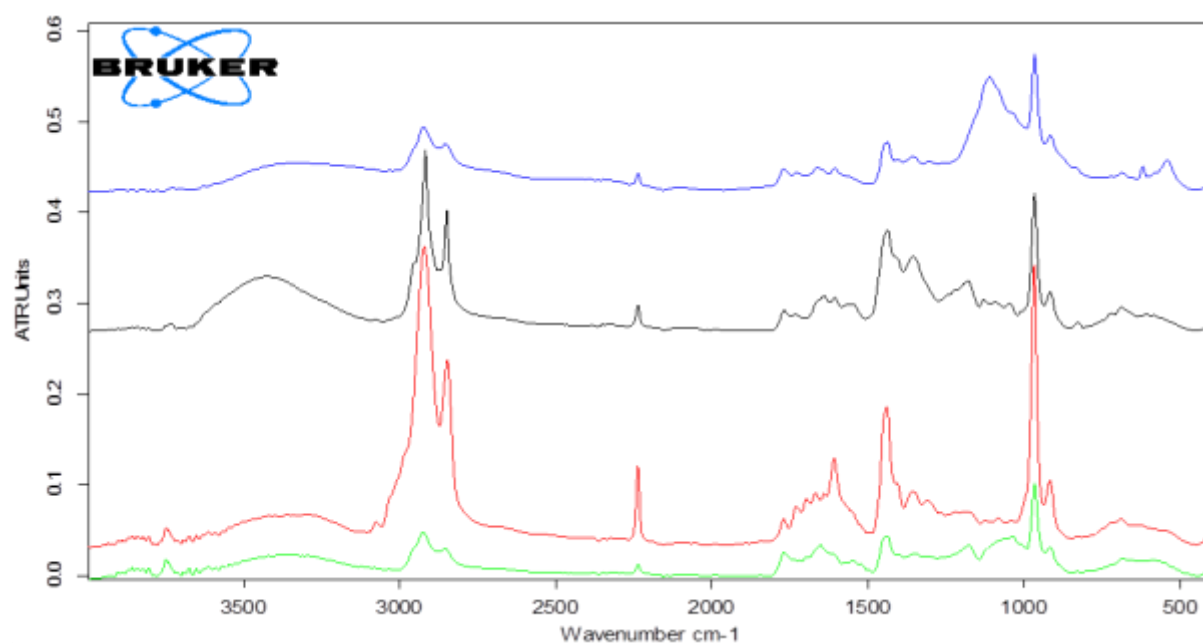
Г)



Д)



е)



ж)

Рисунок 23 – ИК-спектры БНК в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (ATR-FTIR): необработанный БНК (а); БНК после УФ-обработки и замораживания-оттаивания (б); БНК после УФ-обработки, замораживания-оттаивания и инкубации в стерильной минеральной среде,

шероховатая сторона (в) и гладкая сторона (г); БНК после роста *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) в течение одного месяца без дополнительного источника азота на предварительно обработанном полимере, шероховатая сторона (д) и гладкая сторона (е). Объединенные спектры (ж): черная линия – необработанный БНК; синяя линия – БНК после УФ-обработки и замораживания-оттаивания; зеленая и красная линии – БНК после роста *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) на шероховатой и гладкой сторонах соответственно.

Были рассчитаны углеводородный индекс, отражающий общую долю углеводородного скелета (как насыщенного, так и частично ненасыщенного) по отношению к полярным звеньям акрилонитрила, и карбонильный индекс, указывающий на степень окисления углеводородного скелета (Таблица 9).

Таблица 8 – Интегральные площади пиков на ИК-Фурье спектрах образцов БНК

Пик, длина волны, см ⁻¹	Химическая группа	БНК без инкубации в минеральной среде		БНК после УФ-обработки, замораживания-оттаивания и инкубации в минеральной среде			
		Исходный БНК	БНК после обработки УФ и замораживания /оттаивания	Стерильные		Бактериальный рост	
				Шероховатый	Гладкий	Шероховатый	Гладкий
Площадь пиков, усл. ед.							
3060–2716	Углеводородные группы	17,944	13,131	8,384	34,585	6,627	38,114
2271–2209	Нитрильная группа	0,645	0,567	0,442	1,258	0,379	1,370
1807–1492	Карбонильные группы	6,931	5,388	6,662	11,126	5,892	12,480
1492–848	—	29,951	38,646	14,126	17,865	18,351	32,668

Таблица 9 – Углеводородный и карбонильный индексы БНК

Образцы		Углеводородный индекс/А	Карбонильный индекс/А
БНК без инкубации в минеральной среде	Без воздействий	27,82/1	10,75/1
	После обработки УФ, циклов замораживания-оттаивания	23,16/0,83	9,50/0,88
БНК после обработки УФ, циклов замораживания-оттаивания и инкубации в минеральной среде	Стерильные	18,97/0,68	15,07/1,40
	После инкубации с бактериями	17,49/0,63	15,55/1,45

Было обнаружено, что углеводородный индекс БНК последовательно уменьшается после УФ-облучения, инкубации в стерильной среде и в присутствии бактерий, тогда как карбонильный индекс увеличивается как после инкубации в стерильной среде, так и при культивировании *Rhodococcus*.

Деградация БНК микроорганизмами – это сложный многостадийный процесс, затрагивающий как основную цепь полимера, так и функциональные группы. Ключевые изменения в полимере протекают по нескольким путям: во-первых, микробные оксигеназы и пероксидазы атакуют двойные связи бутадиеновых звеньев (пики при 966–967 см^{-1}), что приводит к разрыву цепи и образованию более коротких фрагментов. В местах разрыва появляются новые кислородсодержащие группы (альдегиды, кетоны и карбоновые кислоты), что объясняет изменения в области 1600–1750 см^{-1} . На основе расчетов углеводородного и карбонильного индексов можно заключить, что углеводородные цепи подвергаются частичной деградации под влиянием УФ и бактериальных ферментов. Их количество уменьшается, тогда как карбонильный индекс увеличивается, что указывает на окисление углеводородов. Значительное уменьшение высоты нитрильного пика (2237 см^{-1}) на шероховатой стороне БНК при воздействии бактерий, сопровождающееся незначительным уменьшением высоты пика бутадиеновых звеньев (966–967 см^{-1}), указывает на то, что бактерии преимущественно используют нитрильные группы. Это соответствует тому факту, что штаммы *Rhodococcus* росли в присутствии источника углерода, но с БНК в качестве единственного источника азота, что исключало необходимость использования углеродной основной цепи полимера в качестве субстрата для роста.

Гидролиз нитрильных групп происходит с помощью нитрилаз или нитрилгидратаз: нитрилы превращаются в карбоновые кислоты нитрилазами или в амиды нитрилгидратазами, причем последние далее гидролизуются в карбоновые кислоты амидазами. Появление новых пиков в области 1548–1667 см^{-1} , характерных для амидных групп, подтверждает этот процесс. Ранее

мы подтвердили, что *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) содержат гены, кодирующие железосодержащие нитрилгидратазы и амидазы (Сыровацкая и др., 2025), и проявляют нитрилгидратазную активность даже в щелочных средах (Maksimova *et al.*, 2025). Интенсивные пики при 1667 и 1551 см^{-1} , появляющиеся в ATR-FTIR спектрах БНК во время роста нитрил-утилизирующих родококков, служат доказательством биохимической деградации, которая не наблюдается при одной лишь УФ-обработке или при инкубации в стерильной минеральной среде после УФ-обработки. Ограничением этого исследования является короткий период наблюдения (от 2 недель до 1 месяца), который не может предоставить исчерпывающих данных о деградации БНК. Мы заключаем, что начальные изменения, происходящие на поверхности БНК, вызваны комбинацией физических факторов (УФ, замораживание и оттаивание, инкубация в минеральной среде) и биологических процессов (рост биопленки нитрил-утилизирующих бактерий на поверхности полимера).

Микроорганизмы часто инициируют деградацию не самого полимера, а низкомолекулярных добавок (пластификаторов и антиоксидантов), которые легче усваиваются. Изменения в области ниже 1500 см^{-1} указывают на химические изменения пластификаторов, присутствующих в исходном образце. Деградация пластика в природных условиях сложна и включает комбинацию фотодегradации и биодегradации; степень фотодегradации, которая предшествует биодегradации, значительно зависит от типов используемых добавок (Niu *et al.*, 2025). БНК, основной компонент нитрильных перчаток, может содержать остаточные ускорители вулканизации, антиоксиданты или родственные вещества, способные высвобождать следовые количества азота. После УФ-облучения, циклов замораживания-оттаивания и длительной инкубации БНК в стерильной среде содержание ионов аммония составляло 2 мг/л. Хотя этого недостаточно для поддержания устойчивого бактериального роста в качестве единственного источника азота, это следовое количество ионов

аммония может способствовать начальной пролиферации бактерий и усиливать на ранней стадии формирование биопленки на БНК.

Экзополисахаридный матрикс биопленки обеспечивает адгезию клеток, инициирует биокоррозию и служит защитным резервуаром для внеклеточных веществ. Удержание в этой структуре стабильных внутриклеточных ферментов (включая нитрилгидролизующие ферменты, высвобождаемые при лизисе клеток) фактически превращает матрикс во внешнюю метаболическую систему (Flemming *et al.*, 2023).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из экстремально щелочного (pH 8-11) и высокоминерализованного биотопа содового шламохранилища выделен ряд изолятов нитрил- и амидгидролизующих бактерий, демонстрирующих определенное таксономическое разнообразие. Изоляты принадлежат к филумам *Actinomycetota* (рода *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*) и *Pseudomonadota* (рода *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Acinetobacter*). Наибольшее разнообразие обнаружено в слабощелочном грунте (pH 8) старой карты шламонакопителя, где идет процесс восстановления экосистемы. Из крайне агрессивной среды содового шлама (pH 11) выделен лишь один штамм галоалкалотолерантных нитрилутилизующих родококков (*R. qingshengii*), что указывает на его исключительную способность к адаптации в щелочной среде, бедной органическим субстратом.

Все выделенные изоляты обладают нитрилгидратазной и амидазной активностью, причем у большинства изолятов амидазная активность превышает нитрилгидратазную, что может быть связано с отсутствием достаточной концентрации биогенных нитрильных соединений в таком биотопе. Подтверждена работа двухступенчатой нитрилгидратазно-амидазной системы: при трансформации акрилонитрила в среде обнаруживаются как промежуточный продукт (акриламид), образующийся при гидролизе нитрила ферментом нитрилгидратазой, так и конечный (акриловая кислота), который накапливается при трансформации амида в карбоновую кислоту амидазой.

Молекулярно-генетический анализ показал консервативность и специфичность генетического аппарата гидролиза нитрилов у исследованных экстремотолерантных штаммов. У всех изученных бактерий обнаружены гены, кодирующие амидазы 1 и 2 типа, а также Fe-содержащую нитрилгидратазу. Гены Co-содержащей нитрилгидратазы, нитрилазы и энантиоселективной амидазы

отсутствуют, что определяет возможный путь катализа и субстратную специфичность.

Установлены оптимальные концентрации источников углерода (сорбит, ацетамид) и азота (ацетонитрил) для накопления биомассы и максимальной ферментативной активности штаммов *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417), причем эти оптимумы являются штаммоспецифичными. Для *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) оптимальная концентрация источников углерода и азота в среде составляет 1,5% сорбита и 18,24 мМ ацетонитрила, для *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) – 50 мМ ацетамида и 9,12 мМ ацетонитрила. Это свидетельствует о разных метаболических стратегиях адаптации к конкретным условиям среды.

Штаммы проявляют исключительную толерантность к алифатическим нитрилам (ацетонитрилу и акрилонитрилу) в концентрациях, соответствующих пределу их растворимости (1,5 М), что, вероятно, является следствием их галоалкалотолерантности и перекрестной устойчивости. Из других растворителей рост поддерживал только гексан (до 80%). Толуол не оказывал значительного ингибирующего действия, вероятно, из-за фазового расслоения, ограничивающего контакт клеток с растворителем. Бутанол, ацетон, этанол и этилацетат сильно ингибировали рост во всем диапазоне концентраций (10-80%).

Подтверждена универсальная способность всех выделенных изолятов к образованию биопленок, что рассматривается как ключевой механизм выживания в экстремальных условиях шламохранилища.

Комплексное исследование подтвердило статус штаммов как галоалкалотолерантных и выявило, что образование биопленки является для них центральной адаптивной реакцией на стрессовые условия. Оба штамма способны расти в широком диапазоне pH (6-12) и умеренных концентрациях соли (до 10 г/л NaCl). *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) проявил бóльшую осмоотолерантность при pH 6 (рост при 50 г/л NaCl). Повышение солености (10-50 г/л NaCl) и

щелочности (pH 10-12) среды достоверно усиливало образование биопленки у обоих штаммов, при этом соотношение биопленка/планктонная биомасса значительно увеличивалось. В целом, щелочные условия (pH 8-11) и пониженные температуры (8-15°C) стимулировали биопленкообразование, в то время как высокая температура (37°C) и экстремальная соленость (50 г/л) подавляли его у большинства изолятов. *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) были более устойчивы к повышенной концентрации соли и формировали биопленки даже при 200 г/л NaCl в среде.

Выявленные стратегии (активное биопленкообразование в ответ на стресс) напрямую коррелируют с условиями местообитания штаммов и изолятов и являются механизмом выживания в нестабильной и агрессивной среде шламохранилища.

Процессы биокоррозии и биодеструкции полимеров связаны со способностью микроорганизмов формировать биопленки (Журина, 2020). Усиленный рост микроорганизмов происходит в тех местах, где уже имеются повреждения, вызванные воздействием абиотических факторов окружающей среды (Плакунов и др., 2020). Биообрастание является первым этапом деградации материала. Рост бактериальных колоний на поверхности создает микронапряжения, которые способствуют образованию микротрещин, что облегчает доступ кислорода и ферментов вглубь материала, ускоряя химическую деградацию. БНК является материалом, содержащим в своем составе бутадиеновые и акрилонитриловые звенья, поэтому для биodeградации этого полимера требуется способность микроорганизмов к деструкции как бутадиеновой составляющей (углеводородный остов), так и акрилонитриловых звеньев.

Среди бактерий, разлагающих каучук, чаще встречаются бактерии, содержащие миколовые кислоты в клеточной стенке (*Gordonia*, *Nocardia*, *Mycobacterium*). Процесс биоразложения ограничен поверхностью резины из-за

ее структурной сложности и нерастворимости в воде (Chittella *et al.*, 2021). Одним из важных препятствий к микробной деградации пластиков является их гидрофобность, затрудняющая контакт клеток с поверхностью пластика. Образование поверхностно-активных веществ бактериями является ключевым фактором при бактериальном разложении, поскольку секреция молекул биосурфактанта снижает поверхностное натяжение и облегчает прикрепление бактерий к поверхности (Котова и др., 2021). Актинобактерии рода *Rhodococcus* способны разлагать различные ксенобиотики, синтезируют широкий спектр разрушающих ферментов, таких как дегидрогеназы, пероксидазы, оксигеназы, алкилсульфатазы, и фенолгидролазы, а также производят гликолипидные биосурфактанты (Krivoruchko *et al.*, 2019).

Процесс разрушения БНК под воздействием микроорганизмов является сложным многостадийным процессом, затрагивающим как основную полимерную цепь, так и функциональные группы (Tauber *et al.*, 2020). Ключевые изменения в полимере происходят в нескольких направлениях: оксигеназы и пероксидазы микроорганизмов атакуют двойные связи бутадиеновых звеньев (пик $966\text{--}967\text{ см}^{-1}$ спектра), в результате происходит разрыв цепи с образованием более коротких фрагментов, а на месте разрывов появляются новые кислородсодержащие группы (альдегиды, кетоны и карбоновые кислоты), что объясняет изменения в области $1600\text{--}1750\text{ см}^{-1}$. Гидролиз нитрильных групп протекает при участии ферментов нитрилаз или нитрилгидратаз: нитрилы трансформируются до карбоновых кислот нитрилазами, либо нитрилгидратазами до амидов. Затем амидаза гидролизует амиды до карбоновых кислот. Появление новых пиков в области $1548\text{--}1667\text{ см}^{-1}$, соответствующих амидным группам, подтверждает протекание этого процесса. Нами было подтверждено, что *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) содержат гены железосодержащих нитрилгидратаз и амидаз (Сыровацкая и др., 2025), проявляя нитрилгидратазную активность даже в щелочной

реакционной среде (Maksimova *et al.*, 2025). Интенсивные пики 1667 и 1551 см^{-1} , появляющиеся в Фурье-спектре БНК после культивирования нитрилутилизующих родококков, являются доказательством биохимической деградации, которая не наблюдается при обработке одним только УФ или после инкубации обработанного полимера в стерильной питательной среде. Микроорганизмы нередко начинают деградацию не с самого полимера, а с низкомолекулярных добавок (пластификаторов, антиоксидантов), которые легче усваиваются. Изменения в области ниже 1500 см^{-1} под воздействием бактерий свидетельствуют о химическом изменении пластификаторов, которые присутствовали в исходном образце. Процесс деградации пластмасс в природных условиях достаточно сложен и является результатом одновременного воздействия физических факторов и биodeградации. Фотодеградация, как правило, предшествует биodeградации и может существенно зависеть от различных типов добавок, присутствующих в полимерах (Niu *et al.*, 2025).

Установлено, что галоалкалотолерантные *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) способны образовывать биопленки на БНК в отсутствие дополнительного источника азота. *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) изменяет структуру полимера при выращивании с БНК в качестве единственного источника азота. Для повышения эффективности этого процесса необходима предварительная обработка БНК УФ-излучением и замораживанием-оттаиванием. Было установлено появление амидных групп в структуре полимера после роста нитрил-утилизующих родококков, являющееся результатом трансформации нитрильных групп нитрилгидратазами этих бактерий. Окислительное старение материала наблюдалось как после УФ-облучения, так и после бактериального роста. Биопленкообразование было подтверждено как сканирующей электронной микроскопией, так и прямым подсчетом КОЕ. Ферменты галоалкалотолерантных нитрил-утилизующих родококков

индуцируют химические изменения в БНК, соответствующие начальным стадиям окисления основной цепи и трансформации нитрильных групп.

Перспективой дальнейшей разработки темы является более детальное и долговременное изучение изменений, происходящих в БНК под воздействием галоалкалотолерантных нитрилутилизирующих родококков, а также разработка технологии процесса утилизации акриловых полимеров с помощью отдельных штаммов и микробных сообществ (полимикробных биопленок).

ВЫВОДЫ

1. Из грунтов и осадков содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» на минеральной среде с ацетамидом или ацетонитрилом в качестве единственных источников углерода выделено соответственно 6 и 10 изолятов амид- и нитрилутилизирующих бактерий, 6 из которых относятся к филуму *Actinomycetota*, 10 – к филуму *Pseudomonadota*. Из содового шлама с экстремально высоким рН (11) и минерализацией (98,2 г/л) выделен единственный нитрилутилизирующий изолят, идентифицированный как *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416), обладающий нитрилгидратазной активностью.

2. Показано, что геном всех исследуемых экстремотолерантных изолятов содержал гены неэнантиоселективных амидаз 1 и 2 типов, а также Fe-содержащей нитрилгидратазы. Гены Co-содержащей нитрилгидратазы и нитрилазы отсутствовали. *Rhodococcus qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *Rhodococcus erythropolis* 6Э (IEGM 1417) проявляли нитрилгидролизующую активность в щелочной среде. Активность *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) в реакционной среде с рН 10 была выше в 2,36 раз по сравнению с рН 7 и достигала 2,6 ммоль/г/ч. Активность *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) при рН 10 и 50 г/л NaCl в 37,5 раза превышала таковую у *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417). Амидазная активность большинства изолятов значительно (до 10 раз) превышает нитрилгидратазную.

3. Определено, что *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) проявляет максимальную амидазную активность (2,8 ммоль/г/ч) и накапливает наибольшую биомассу ($ОП_{540} = 0,805$) при росте на жидкой минеральной среде с 1,5% сорбита. Для *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) максимальный выход биомассы ($ОП_{540} = 0,916$) и наибольшая активность (7,5 ммоль/г/ч) зафиксированы при 100 и 50 мМ ацетамида в среде соответственно. Оба штамма проявляют исключительную толерантность к высоким концентрациям нитрилов (до 1,5 М) и органических растворителей (гексан, толуол).

4. Установлено, что все выделенные изоляты способны к формированию биопленок. Щелочная среда (pH 12) достоверно увеличивает соотношение биомасс биопленки и планктонных клеток, особенно у *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416). Формирование биопленок было более интенсивным при понижении температуры до 8-15°C. Повышение минерализации среды до 10 и 50 г/л NaCl стимулирует биопленкообразование *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417).

5. Выявлено, что *R. qingshengii* 5Э (IEGM 1416) и *R. erythropolis* 6Э (IEGM 1417) способны к биопленочному росту на поверхности БНК и в планктонной форме в среде с БНК без дополнительных источников азота. Поверхностная модификация БНК после инкубации с родококками сопровождается появлением амидных групп в его структуре. Окислительное старение материала, доказанное изменением углеводородного индекса с 27,82 до 17,49 и карбонильного индекса с 10,75 до 15,55, возрастает в ряду: БНК без обработки → БНК после УФ-облучения → БНК после УФ-облучения и инкубации в стерильной минеральной среде → БНК после УФ-облучения и инкубирования с бактериями.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БНК — бутадиен-нитрильный каучук

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ — колониеобразующие единицы

МИК — минимальная ингибирующая концентрация

МП — микропластик

НК — натуральный каучук

ПЦР — полимеразная цепная реакция

AS — амидазная сигнатура (amidase signature)

ATR-FTIR — спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения с преобразованием Фурье в инфракрасном диапазоне (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared)

FmdA_AmdA — формамидаза А, амидаза А (formamidase A, amidase A)

Lcps — белки очистки латекса (каучук-разрушающих ферментов)

Nro1 — мембранно-связанная нитрильная каучуковая оксигеназа (nitrile rubber oxygenase 1)

RoxA — каучуковая оксигеназа А (rubber oxygenase A)

RoxB — каучуковая оксигеназа В (rubber oxygenase B)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов С.М., Максимович Н.Г., Найданова Н.Ф., Шлыков В.Г., Потапов С.С. Минералогические основы утилизации отходов ОАО «Березниковский содовый завод» // Минералогия техногенеза. – 2003. – Т. 4. – С. 51–55.
2. Демаков В.А., Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Ремезовская Н.Б., Максимова Ю.Г. Биологическое разнообразие нитрилметаболизирующих бактерий антропогенно-измененных почв Пермского края // Экология. – 2007. – № 3. – С. 185–190.
3. Демаков В.А., Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Козлов С.В. ПЦР-анализ генов ферментов гидролиза нитрилов карбоновых кислот // Вестник Пермского университета. – 2009а. – № 10 (36). – С. 73–78.
4. Демаков В.А., Павлова Ю.А., Максимов А.Ю., Кузнецова М.В. Почвенные актинобактерии рода *Rhodococcus*, обладающие высокой амидазной активностью // Вестник Пермского университета. – 2009б. – № 10 (36). – С. 79–83.
5. Журина М.В., Каллистова А.Ю., Панюшкина А.Е., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Герасин В.А., Сивов Н.А., Тихомиров В.А., Плакунов В.К. Специфика формирования мультивидовых микробных биопленок на поверхности полиэтилена // Микробиология. – 2020. – Т. 89, № 4. – С. 400–409.
6. Ибрахим И.М. Структурно-функциональная характеристика гликополимеров поверхности микроорганизмов, изолированных из гиперсоленых сред, и выявление их биотехнологического потенциала. Автореферат дис. канд. биол. наук, 13.12.2019. – Саратов: ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2019. – 24 с.
7. Ибрахим И.М., Коннова С.А., Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Сафронова В.И., Elbanna К.А. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет)

и Эльтон (Россия) // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 345–353.

8. Иони Ю.В., Красников Д.В., Насибулин А.Г. Производство, распространение и удаление микропластика из окружающей среды: обзор // Успехи химии. – 2025. – Т. 94, № 3. – С. 3.

9. Котова И.Б., Тактарова Ю.В., Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Бубнов И.А., Малахова Д.В., Ширинкина Л.И., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская Е.А. Микробная деградация пластика и пути ее интенсификации // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 6. – С. 627–659.

10. Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Кузнецова М.В., Олонцев В.Ф., Демаков В.А. Выделение и характеристика нитрилгидролизующих бактерий из щелочных сред // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 173–177.

11. Максимова А.В. Влияние синтетических нитрилов на почвенные микроорганизмы : дис. канд. биол. наук : 03.02.03 – Ин-т экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. – Пермь, 2016. – 142 с.

12. Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Трансформация 2- и 4-цианопиридинов свободными и иммобилизованными клетками нитрилгидролизующих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49, № 4. – С. 358–363.

13. Максимова Ю.Г., Горбунова А.Н., Зорина А.С., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Демаков В.А. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 1. – С. 53–58.

14. Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы: монография. – М.: РИОР, 2018. – 500 с.

15. Максимова Ю.Г., Коваленко Г.А., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Чуенко Т.В., Рудина Н.А. Иммобилизованные нерастущие клетки *Rhodococcus*

ruber как гетерогенные биокатализаторы для процесса гидратации акрилонитрила в акриламид // Катализ в промышленности. – 2008. – № 1. – С. 44–50.

16. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина, Г.В., Олонцев, В.Ф. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах // Биотехнология. – 2010. – Т. 47, № 4. – С. 51–58.

17. Максимова Ю.Г., Рогожникова Т.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Трансформация нитрилов иммобилизованными клетками *Rhodococcus ruber* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 5. – С. 484–489.

18. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? // Практическая медицина. – 2011. – № 53. – С. 7–10.

19. Ножевникова А.Н., Симанькова М.В., Литти Ю.В. Использование микробного процесса анаэробного окисления аммония (анаммокс) для биотехнологической очистки стоков // Биотехнология. – 2011. – № 5. – С. 8–31.

20. Павлова Ю.А., Неустроева А.Н., Максимов А.Ю. Сравнительный анализ последовательностей генов амидаз почвенных актинобактерий рода *Rhodococcus* // Изв. Самар. науч. цент. Рос. акад. наук. – 2011. – Т. 13, № 5(3). – С. 272–276.

21. Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Журина М.В. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты // Микробиология. – 2020. – Т. 89, № 6. – С. 631–645.

22. Саралов А.И. Адаптивность экстремофилов Archaea и Bacteria // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 4. – С. 377–400.

23. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбея, Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 435–446.

24. Сыровацкая Г.А., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Филогенетическое разнообразие нитрилутилизующих бактерий содового шламохранилища и их некоторые физиолого-биохимические особенности // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2025. – № 3. – С. 279–288.
25. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» // Вода и экология: проблемы и решения. – 2020. – № 1 (81). – С. 84–94.
26. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалотолерантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 2. – С. 155–165.
27. Adams G.O., Tawari-Fufeyin P., Igelenyah E. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review // International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation. – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 28–39.
28. Akkharabunditsakul V., Tanrattanakul V., Umsakul K. Biodegradation of synthetic rubbers by a mixed culture isolated from various rubber factory soils in Songkhla, Thailand // International Journal of Advanced Agricultural and Environmental Engineering. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 1–5.
29. Albertsson A.C., Karlsson S. Aspects of biodeterioration of inert and degradable polymers // International Biodeterioration & Biodegradation. – 1993. – Vol. 31, № 3. – P. 161–170.
30. An X., Sun Y., Wang H., Zhao Z., Shen J. Characterization and genome functional analysis of an efficient nitrile-degrading bacterium, *Rhodococcus rhodochrous* BX2, to lay the foundation for potential bioaugmentation for remediation of nitrile-contaminated environments // Journal of Hazardous Materials. – 2020. – Vol. 389. – Article 121906.
31. An X., Wang H., Sun Y., Wang J., Zhao Z., Shen J. Treating organic cyanide-containing groundwater by immobilization of a nitrile-degrading bacterium

with a biofilm-forming bacterium using fluidized bed reactors // *Environmental Pollution*. – 2018. – Vol. 237. – P. 908–916.

32. Andler R., Schüller A., Cabrera M.A., Steinbüchel A. Biodegradation of rubber in cultures of *Rhodococcus rhodochrous* and by its enzyme latex clearing protein // *Biodegradation*. – 2022. – Vol. 33, № 6. – P. 609–620.

33. Arenskötter M., Bröcker D., Steinbüchel A. Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences // *FEMS Microbiology Letters*. – 2001. – Vol. 205, № 2. – P. 277–282.

34. Armitano J., Méjean V., Jourlin-Castelli C. Gram-negative bacteria can choose between two modes of biofilm formation // *Environmental Microbiology Reports*. – 2014. – Vol. 6, № 6. – P. 711–717.

35. Artham T., Doble M. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates // *Macromolecular Bioscience*. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 14–24.

36. Asano Y., Tani Y., Yamada H. A new enzyme "nitrile hydratase" which degrades acetonitrile in combination with amidase // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1980. – Vol. 44, № 9. – P. 2251–2252.

37. Balasooriya W., Clough A.S., Schubert D.W., Meyer M., Sirisinha K., Focke W. Induced material degradation of elastomers in harsh environments // *Polymer Testing*. – 2018. – Vol. 69. – P. 107–115.

38. Banerjee A., Chatterjee K., Madras G. Enzymatic degradation of polymers: a brief review // *Materials Science and Technology*. – 2014. – Vol. 30, № 5. – P. 567–573.

39. Barbosa F., Adeyemi J.A., de Oliveira A.R.B., Alves V.N., de Souza S.S., de Oliveira F.A. A critical viewpoint on current issues, limitations, and future research needs on micro-and nanoplastic studies: From the detection to the toxicological assessment // *Environmental Research*. – 2020. – Vol. 182. – Article 109089.

40. Basik A.A., Zakaria Z., Ibrahim Z., Steinbüchel A. Microbial degradation of rubber: Actinobacteria // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13, № 12. – P. 1989.
41. Benedik M.J., Sewell B.T. Cyanide-degrading nitrilases in nature // *The Journal of General and Applied Microbiology*. – 2017. – Vol. 64, № 2. – P. 90–93.
42. Berekaa M.M., Steinbüchel A., Jendrossek D. Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria // *FEMS Microbiology Letters*. – 2000. – Vol. 184, № 2. – P. 199–206.
43. Besson M., Dumat C., Thomas F., Leveque T., El Samrani A. Preferential adsorption of Cd, Cs and Zn onto virgin polyethylene microplastic versus sediment particles // *Marine Pollution Bulletin*. – 2020. – Vol. 156. – Article 111223.
44. Bhalla T.C., Kumar V., Savitri N. Nitrile metabolizing enzymes in biocatalysis and biotransformation // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 185, № 3. – P. 925–946.
45. Bode H.B., Kerkhoff K., Jendrossek D. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber // *Biomacromolecules*. – 2001. – Vol. 2, № 1. – P. 295–303.
46. Bodor A., Kóbor A., Kerepesi A., Vincze B., Lakatos G., Nagy A. Soils in distress: The impacts and ecological risks of (micro) plastic pollution in the terrestrial environment // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2024. – Vol. 269. – Article 115807.
47. Brady D., Dube N., Petersen R. Green chemistry: highly selective biocatalytic hydrolysis of nitrile compounds: the CSIR at 60 // *South African Journal of Science*. – 2006. – Vol. 102, № 7. – P. 339–344.
48. Brandão P.F.B., Bull A.T. Nitrile hydrolysing activities of deep-sea and terrestrial mycolate actinomycetes // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2003. – Vol. 84, № 2. – P. 89–98.
49. Brenner C. Catalysis in the nitrilase superfamily // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2002. – Vol. 12, № 6. – P. 775–782.

50. Bunch A.W. Biotransformation of nitriles by rhodococci // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1998. – Vol. 74, № 1. – P. 89–97.
51. Bui T.T., Choi J.W., Lee B.J., Pham T.H., Lee J.H. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters // *Science of the Total Environment*. – 2016. – Vol. 541. – P. 451–467.
52. Cai Z., Li M., Zhu Z., Wang X., Huang Y., Li T., Gong H., Yan M. Biological degradation of plastics and microplastics: a recent perspective on associated mechanisms and influencing factors // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11, № 7. – P. 1661.
53. Campanale C., Savino I., Massarelli C., Uricchio V.F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Assess the Degree of Alteration of Artificially Aged and Environmentally Weathered Microplastics // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15, № 4. – Article 911.
54. Cárdenas J.P., Valdés J., Quatrini R., Duarte F., Holmes D.S. Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 88, № 3. – P. 605–620.
55. Cavicchioli R. Extremophiles and the search for extraterrestrial life // *Astrobiology*. – 2002. – Vol. 2, № 3. – P. 281–292.
56. Chakraborty S., Bandyopadhyay S., Ameta R., Mukhopadhyay R., Deuri A.S. Application of FTIR in Characterization of Acrylonitrile-Butadiene Rubber (Nitrile Rubber) // *Polymer Testing*. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 38–41.
57. Chatterjee S., Sharma S. Microplastics in our oceans and marine health // *Field Actions Science Reports. The Journal of Field Actions*. – 2019. – № Special Issue 19. – P. 54–61.
58. Chhiba-Govindjee V.P., van der Westhuyzen C.W., Bode M.L., Brady D. Bacterial nitrilases and their regulation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 103, № 12. – P. 4679–4692.

59. Chiba T., Nakaarai T., Sugimori D. Nitrile rubber biodegradation by *Gordonia* sp. strain J1A and discovery of an oxygenase involved in its degradation // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2025. – Vol. 91, № 12. – P. e02128-25.
60. Chittella H., Yoon L.W., Ramarad S., Lai Z.W. Rubber waste management: A review on methods, mechanism, and prospects // *Polymer Degradation and Stability*. – 2021. – Vol. 194. – Article 109761.
61. Christiansson M., Stenberg B., Holst O. Toxic Additives – A Problem for Microbial Waste Rubber Desulphurisation // *Resource and Environmental Biotechnology*. – 2000. – Vol. 3, № 1. – P. 11–21.
62. Coady T.M., Williams P.A., Williams M.C., Coady F.M., O'Connor L.N., Gallagher M.C. Substrate Evaluation of *Rhodococcus erythropolis* SET1, a Nitrile Hydrolysing Bacterium, Demonstrating Dual Activity Strongly Dependent on Nitrile Sub-Structure // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2015. – Vol. 2015, № 5. – P. 1108–1116.
63. Colachis M., Lilly J.L., Trigg E., Kucharzyk K.H. Analytical tools to assess polymer biodegradation: A critical review and recommendations // *Science of the Total Environment*. – 2024. – Vol. 955. – Article 176920.
64. Conti G.O., Ferrara F., Banni M., Gagliano G., Fazio G., Sciacca S., Spataro G., Copat C., Ferrante M. Micro-and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population // *Environmental Research*. – 2020. – Vol. 187. – Article 109677.
65. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Science*. – 1999. – Vol. 284, № 5418. – P. 1318–1322.
66. Cowan D., Cramp R., Pereira R., Graham D., Almatawah Q. Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes // *Extremophiles*. – 1998. – Vol. 2, № 3. – P. 207–216.

67. Cowan D.A., Ramond J.B., Makhalanyane T.P., De Maayer P. Metagenomics of extreme environments // *Current Opinion in Microbiology*. – 2015. – Vol. 25. – P. 97–102.
68. Cui Y.M., Zhang Y.Y., Li Y., Ji L.N. Engineering of nitrile hydratase for improving its catalytic efficiency and thermostability // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2014. – Vol. 102. – P. 165–171.
69. Cverenkárová K., Hrušková M., Bírošová L. Effect of selected microplastics on the development and spread of antibiotic resistance in bacteria // *Folia Microbiologica*. – 2026. – Vol. 71, № 2. – P. 1–17.
70. Das K.P. From outbreak of COVID-19 to launching of vaccination drive: invigorating single-use plastics, mitigation strategies, and way forward // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – Vol. 28, № 40. – P. 55811–55845.
71. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2000. – Vol. 64, № 4. – P. 847–867.
72. Debabov V.G., Yanenko A.S. Biocatalytic hydrolysis of nitriles // *Review Journal of Chemistry*. – 2011. – Vol. 1, № 4. – P. 376–394.
73. Delgado-García M., Valdivia-Urdiales B., Rodríguez-Herrera R., Contreras-Esquivel J.C., Aguilar C.N. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2012. – Vol. 92, № 13. – P. 2575–2580.
74. Delgado-Nungaray J.A., Lizárraga-Mendiola L., Álvarez-Zeferino J.C., Mendoza-Hernández M.R., Medina-Moreno S.A., Santos-López M.A., Beltrán-Hernández R.I., Juárez-Santillán L.F. Biodegradation of nitrile gloves as sole carbon source of *Pseudomonas aeruginosa* in liquid culture // *Polymers*. – 2024. – Vol. 16, № 8. – Article 1162.

75. Demirjian D.C., Morís-Varas F., Cassidy C.S. Enzymes from extremophiles // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2001. – Vol. 5, № 2. – P. 144–151.
76. DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W.A., Wong K., Chaplin J., Hanson S.R., Gould B., Short E.L., Burk M.J. An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – Vol. 124, № 31. – P. 9024–9025.
77. Deshkar A., Wate S.R., Devotta S., Chakrabarti T. Bioremediation of soil contaminated with organic compounds with special reference to acrylonitrile // *Annali di Chimica*. – 2003. – Vol. 93, № 9-10. – P. 729–737.
78. Dey P., Roy S., Premnath S.K., Sukumaran, R.K. Microbial and enzymatic degradation of plastics: A review on mechanisms, challenges, and future perspectives // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2023. – Vol. 22, № 2. – P. 445–471.
79. Dou X., Zhang Z., Zhang F., Yan X., Xie Y., Liu J., Zhang S. *Pseudomonas aeruginosa* SG01: A Novel Polyethylene-Degrading Bacterium in Petrochemical Wastewater // *Polymers*. – 2026. – Vol. 18, № 4. – Article 519.
80. Dumorne K., Córdova D.C., Astorga-Eló M., Renganathan P. Extremozymes: a potential source for industrial applications // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 27, № 4. – P. 649–659.
81. Dzulkafly N.S., Sarih N.M., Rashid A.A. Aging and Degradation Properties of Nanocellulose/Carboxylated Nitrile Butadiene Rubber (XNBR) Latex Films // *Macromolecular Symposia*. – 2025. – Vol. 414, № 4. – Article e70078.
82. Egelkamp R., Zimmermann T., Schneider D., Hertel R., Daniel R. Impact of nitriles on bacterial communities // *Frontiers in Environmental Science*. – 2019. – Vol. 7. – Article 103.

83. Elias S., Banin E. Multi-species biofilms: a new view // Trends in Microbiology. – 2012. – Vol. 20, № 6. – P. 284–290.
84. Elizalde-Velázquez A., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., Islas-Flores H., SanJuan-Reyes N., Rodríguez-SanJuan R., Ramírez-Durán N. Sorption of three common nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to microplastics // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 715. – Article 136974.
85. Endo I., Odaka M., Yohda M. An enzyme controlled by light: the molecular mechanism of photoreactivity in nitrile hydratase // Trends in Biotechnology. – 1999. – Vol. 17, № 6. – P. 244–248.
86. Faszczewska A., Piotrowska-Niczyporuk A., Karpińska J. Biodegradation of high-density polyethylene, polyethylene terephthalate, and polystyrene microplastics by bacteria, fungi and algae: A polymer-specific review // Journal of Environmental Sciences. – 2026. – Vol. 159. – P. 104–118.
87. Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology // Annual Review of Physiology. – 1999. – Vol. 61. – P. 243–282.
88. Feng Y.S., Chen P.C., Wen F.S., Hsiao W.Y., Lee C.M. Nitrile hydratase from *Mesorhizobium* sp. F28 and its potential for nitrile biotransformation // Process Biochemistry. – 2008. – Vol. 43, № 12. – P. 1391–1397.
89. Feng Y.S., Lee C.M. The potential of the acetonitrile biodegradation by *Mesorhizobium* sp. F28 // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Vol. 164, № 2–3. – P. 646–650.
90. Feng C., Chen J., Ye W., Wang Z. Nitrile hydratase as a promising biocatalyst: recent advances and future prospects // Biotechnology Letters. – 2024. – Vol. 46, № 6. – P. 1171–1185.
91. Flemming H.C., van Hullebusch E., Neu T., Nielsen P.H., Sauer K., Wingender J. The Biofilm Matrix: Multitasking in a Shared Space // Nature Reviews Microbiology. – 2023. – Vol. 21, № 2. – P. 70–86.

92. Garçon M., Sauzéat L., Pack A., Albalat E., Blichert-Toft J., Boyet M., Carignan J., Chmeleff J., Delpech G., El Albani A., Fraser N. Nitrile, latex, neoprene and vinyl gloves: a primary source of contamination for trace element and Zn isotopic analyses in geological and biological samples // *Geostandards and Geoanalytical Research*. – 2017. – Vol. 41, № 3. – P. 367–380.
93. Gavagan J.E., Fager S.K., Fallon R.D., Folsom P.W., Herkes F.E., Eisenberg A., Hann E.C., DiCosimo R. A Gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic dinitriles // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – Vol. 52, № 5. – P. 654–659.
94. Gong J.S., Lu Z.M., Li H., Shi J.S., Zhou Z.M., Xu Z.H. Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research // *Microbial Cell Factories*. – 2012. – Vol. 11, № 1. – P. 1–18.
95. Grant W.D., Mwatha W.E., Jones B.E. Alkaliphilic methanogens from East African Soda Lakes // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1990. – Vol. 75, № 2-3. – P. 259–270.
96. Grover R., Cessna A.J., Moyer J.R. Acrylonitrile and other nitriles in the environment // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1997. – Vol. 153. – P. 1–22.
97. Guajardo C., Andler R. Challenges and perspectives in enzymatic polymer fragmentation: the case of rubber and polyethylene terephthalate // *Journal of Cleaner Production*. – 2024. – Vol. 450. – Article 141875.
98. Halle L.L., Palmqvist A., Kampmann K., Khan F.R. Ecotoxicology of micronized tire rubber: Past, present and future considerations // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 706. – Article 135694.
99. Harper D.B., Gibbs P.A. Identification of isobutyronitrile and isobutyraldoxime O-methyl ether as volatile microbial catabolites of valine // *Biochemical Journal*. – 1979. – Vol. 182, № 2. – P. 609–611.

100. Harper D.B. Regio- and stereo-specific nitrile hydrolysis by the nitrile hydratase from *Rhodococcus* AJ270 // FEMS Microbiology Letters. – 1995. – Vol. 129, № 1. – P. 57–61.
101. Heydari M., Kordestani D., Shokri E., Ghasemi I. Effect of cellulose nanocrystals on physico-mechanical properties and biodegradation of acrylonitrile-butadiene rubber // Polymer Bulletin. – 2026. – Vol. 83, № 6. – Article 336.
102. Howden A.J., Preston G.M. Nitrilase enzymes and their role in plant–microbe interactions // Microbial Biotechnology. – 2009. – Vol. 2, № 4. – P. 441–451.
103. Ingvorsen K., Yde B., Godtfredsen S.E., Tani Y., Yamada H. Microbial hydrolysis of organic nitriles and amides // Ciba Foundation Symposium 140 - Cyanide Compounds in Biology: Cyanide Compounds in Biology: Ciba Foundation Symposium 140. – Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2007. – P. 16–31.
104. Irwin J.A., Baird A.W. Extremophiles and their application to veterinary medicine // Irish Veterinary Journal. – 2004. – Vol. 57, № 6. – P. 348.
105. Ismail M., Aggar D., Sunil K., Patil S. Biotransformation of aromatic and heterocyclic amides by amidase of whole cells of *Rhodococcus* sp. MTB5: biocatalytic characterization and substrate specificity // Biocatalysis and Biotransformation. – 2017. – Vol. 35, № 1. – P. 74–85.
106. Jaenicke R., Schurig H., Beaucamp N., Ostendorp R. Structure and stability of hyperstable proteins: glycolytic enzymes from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* // Advances in Protein Chemistry. – 1996. – Vol. 48. – P. 181–269.
107. Jaiswal S., Sharma B., Shukla P. Integrated approaches in microbial degradation of plastics // Environmental Technology & Innovation. – 2020. – Vol. 17. – Article 100567.
108. Jallageas J.C., Arnaud A., Galzy P. Bioconversions of nitriles and their applications // Advances in Biochemical Engineering, Volume 14. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. – P. 1–32.

109. Jędruchniewicz K., Oleszczuk P. COVID-19 discarded disposable gloves as a source and a vector of pollutants in the environment // *Science of The Total Environment*. – 2021. – Vol. 783. – Article 146964.
110. Jendrossek D., Birke J. Rubber oxygenases // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 103, № 1. – P. 125–142.
111. Jenrich R., Trompetter, I., Bak S., Okada K., Møller B.L., Piotrowski M. Evolution of heteromeric nitrilase complexes in Poaceae with new functions in nitrile metabolism // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104, № 47. – P. 18848–18853.
112. Ji Y., Yang X., Ji Z., Zhang, L., Wang B., Li X. DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components // *ACS Omega*. – 2020. – Vol. 5, № 15. – P. 8572–8578.
113. Jiao, M., Luo Y., Zhang F., Zhang T. Non-target screening and pollutant leaching during ozone and physical aging of tire and polymer wear particles // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2026. – Vol. 291, № 2. – Article 114620.
114. Kanekar P.P., Kanekar S.P., Kelkar A.S., Dhakephalkar P.K. Halophiles – taxonomy, diversity, physiology and applications // *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*. – 2012. – P. 1–34.
115. Kaplan, O., Bezouška K., Plíhal O., Ettrich R., Kulik N., Vaněk O., Martínková L. Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – Vol. 38, № 1-2. – P. 260–264.
116. Kapoor V., Elk M., Li X., Impellitteri C.A., Santo Domingo J.W. Inhibitory effect of cyanide on wastewater nitrification determined using SOUR and RNA-based gene-specific assays // *Letters in Applied Microbiology*. – 2016. – Vol. 63, № 2. – P. 155–161.
117. Karan R., Capes M.D., DasSarma S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity // *Aquatic Biosystems*. – 2012. – Vol. 8, № 1. – P. 4.

118. Katic J., Gladović M., Španinger E., Bren U. Nucleic Bases Alkylation with Acrylonitrile and Cyanoethylene Oxide // *Chemical Research in Toxicology*. – 2017. – Vol. 30, № 12. – P. 2121–2129.
119. Kato Y., Tsuda T., Asano Y. Nitrile hydratase involved in aldoxime metabolism from *Rhodococcus* sp. strain YH3-3: Purification and characterization // *European Journal of Biochemistry*. – 1999. – Vol. 263, № 3. – P. 662–670.
120. Kawashima T., Ogawa T. Prediction of the Lifetime of Nitrile-Butadiene Rubber by FT-IR // *Analytical Sciences*. – 2005. – Vol. 21, № 12. – P. 1475–1478.
121. Kikani B., Shukla R.J., Singh S.P. Solvent tolerant enzymes in extremophiles: adaptations and applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – Vol. 238. – Article 124051.
122. Kilmartin-Lynch S., Saberian M., Li J., Roychand R., Zhang G. Application of COVID-19 single-use shredded nitrile gloves in structural concrete: Case study from Australia // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 812. – Article 151423.
123. Klibanov A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents // *Nature*. – 2001. – Vol. 409, № 6817. – P. 241–246.
124. Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: purification and characterization // *European Journal of Biochemistry*. – 1989. – Vol. 182, № 2. – P. 349–356.
125. Kothawale S.S., Kumar L., Singh S.P. Role of organisms and their enzymes in the biodegradation of microplastics and nanoplastics: A review // *Environmental Research*. – 2023. – Vol. 232. – Article 116281.
126. Krishnaswamy V., Ahongsangbam N. Study on Mineralisation of Poly(cis-1,4-isoprene) and Synthetic Rubber Gloves (SRG) by the Bacterial Consortium // *Annals of Applied Microbiology and Biotechnology Journal*. – 2017. – Vol. 1, № 1. – P. 1–10.

127. Krivoruchko A.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Advanced *Rhodococcus* Biocatalysts for Environmental Biotechnologies // *Catalysts*. – 2019. – Vol. 9, № 3. – Article 236.
128. Kumar M.N.S., Siddaramaiah H. Studies on acrylonitrile-butadiene (NBR) latex-reinforced jute nonwoven fabric composites: Chemical resistance, mechanical properties, and water absorption // *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. – 2006. – Vol. 45, № 3. – P. 409–414.
129. Kumar M.N.S., Yaakob Z., Siddaramaiah H. Acrylonitrile-butadiene latex impregnated jute nonwoven fabric-composites: biodegradation/effect of cyclic humidity/salt water // *Polymers from Renewable Resources*. – 2010. – Vol. 1, № 3. – P. 161–172.
130. Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 15, № 2-3. – P. 74–92.
131. Lei P., Zhang H., Cui Q., Ding Y. Sorption kinetics of parent and substituted PAHs for low-density polyethylene (LDPE): Determining their partition coefficients between LDPE and water (KLDPE) for passive sampling // *Journal of Environmental Sciences*. – 2020. – Vol. 87. – P. 349–360.
132. Li T., Qiu J., Du J., Yuan X., Han M. Biodegradation of acetonitrile by adapted biofilm in a membrane-aerated biofilm reactor // *Biodegradation*. – 2009. – Vol. 20, № 4. – P. 569–580.
133. Linos A., Berekaa M.M., Reichelt R., Keller U., Schmitt J., Flemming H.C., Kroppenstedt R.M., Steinbüchel A.A. Gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic cis-1,4-polyisoprene // *FEMS Microbiology Letters*. – 2000a. – Vol. 182, № 1. – P. 155–161.
134. Linos A., Reichelt R., Keller U., Steinbüchel A. Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed

surface analysis // Applied and Environmental Microbiology. – 20006. – Vol. 66, № 4. – P. 1639–1645.

135. Liu J., Li X., Xu L., Zhang, P. Investigation of aging behavior and mechanism of nitrile-butadiene rubber (NBR) in the accelerated thermal aging environment // Polymer Testing. – 2016. – Vol. 54. – P. 59–66.

136. Liu M., Li S. Nitrile biosynthesis in nature: how and why? // Natural Product Reports. – 2024. – Vol. 41, № 4. – P. 649–671.

137. Lopez-Lopez O., Cerdan M.E., Gonzalez Siso M.I. New extremophilic lipases and esterases from metagenomics // Current Protein and Peptide Science. – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 445–455.

138. Lovato M.J., Shadi L., Mitchell V., Shah V., Riley M., Kumar A., King A. Performance-enhancing materials in medical gloves // Journal of Functional Biomaterials. – 2023. – Vol. 14, № 7. – Article 349.

139. Luque-Almagro V.M., Moreno-Vivián C., Blasco R., Roldán M.D. Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph // Biochemical Society Transactions. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 269–274.

140. Makhongela H.S., Glowacka A.E., Agarkar V.B., Sewell B.T., Cowan D.A., Burton S.G. A novel thermostable nitrilase superfamily amidase from *Geobacillus pallidus* showing acyl transfer activity // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 75, № 4. – P. 801–811.

141. Maksimova Y., Eliseeva A., Maksimov A. Metabolic and morphological aspects of adaptation of alkaliphilic *Bacillus aequororis* 5-DB and alkali-tolerant *Bacillus subtilis* ATCC 6633 to changes in pH and mineralization // International Journal of Microbiology. – 2024. – Vol. 2024. – Article ID 3087296. – P. 12.

142. Maksimova Y.G., Shchetinkin A.A., Demakov V.A. Acrylamide and acrylic acid biodegradation by *Alcaligenes faecalis* 2 planktonic cells and biofilms // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – Vol. 54, № 2. – P. 173–178.

143. Maksimova Yu.G., Syrovatskaya G.A., Maksimov A.Y. Nitrile-hydrolyzing haloalkalitolerant *Rhodococci* of soda sludge storage // Indian Journal of Microbiology. – 2025. – Vol. 66, № 1. – P. 141-149.
144. Martínková L., Křen V. Biotransformations with nitrilases // Current Opinion in Chemical Biology. – 2010. – Vol. 14, № 2. – P. 130-137.
145. Merino N., Aronson H.S., Salazar D.P., Lipus S., Motamedi H., Giovannelli D. Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 780.
146. Mészáros E. *et al.* Plastic contamination from latex and nitrile disposable gloves has the potential to influence plant productivity and soil health // Journal of Hazardous Materials Advances. – 2025. – Vol. 17. – P. 100605.
147. Miller J. M., Conn E. E. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants // Plant Physiology. – 1980. – T. 65, №. 6. – C. 1199-1202.
148. Mitrano D. M., Wick P., Nowack B. Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution // Nature Nanotechnology. – 2021. – T. 16, №. 5. – C. 491-500.
149. Mukram I. *et al.* Isolation and identification of a nitrile hydrolyzing bacterium and simultaneous utilization of aromatic and aliphatic nitriles // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2015. – T. 100. – C. 165-171.
150. Muralidharan M., Krishnaswamy V. Artificial rubber mineralization by co-cultured bacterial strains // International Journal of Biological Research. – 2016. – Vol. 4, № 2 – P. 105-111.
151. Mylerova V., Martinkova L. Synthetic applications of nitrile-converting enzymes // Current Organic Chemistry. – 2003. – T. 7, №. 13. – C. 1279-1295.
152. Nagasawa T., Nakamura T., Yamada H. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase // Applied microbiology and biotechnology. – 1990. – T. 34, №. 3. – C. 322-324.

153. Nagasawa T., Takeuchi K., Yamada H. Occurrence of a cobalt-induced and cobalt-containing nitrile hydratase in *Rhodococcus rhodochrous* J1 // Biochemical and biophysical research communications. – 1988. – T. 155, № 2. – C. 1008-1016.
154. Nagasawa T., Yamada H. Microbial transformations of nitriles // Trends in Biotechnology. – 1989. – Vol. 7, № 6. – P. 153-158.
155. Nawong C., Umsakul K., Sermwittayawong N. Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from soil samples // Brazilian Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 49, № 3. – P. 481-488.
156. Nigam P.S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications // Biomolecules. – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 597–611.
157. Niu L., Wang L., Zhou L., Zhang S., Jiang L., Jiang C. Plastic additives alter the influence of photodegradation on the biodegradation of polypropylene and polyethylene in river sediments // Journal of Hazardous Materials. – 2025. – Vol. 493. – Article 138394.
158. Noorname, Abidin M.N.Z., Abu Bakar N.K., Hashim N.A. Innovative solutions for the removal of emerging microplastics from water: A review // Marine Pollution Bulletin. – 2024. – Vol. 206. – Article 116752.
159. Noriman N.Z., Ismail H., Rashid A.A. Natural weathering test of styrene butadiene rubber and recycled acrylonitrile butadiene rubber (SBR/NBRr) blends // Polymer-Plastics Technology and Engineering. – 2010. – Vol. 49, № 7. – P. 731–741.
160. Odian G. Principles of polymerization. – John Wiley & Sons, 2004. – 848 p.
161. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity // Saline Systems. – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 2.
162. Pace H.C., Brenner C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function // Genome Biology. – 2001. – Vol. 2, № 1. – P. 1–9.

163. Payne M.S., Wu S., Fallon R.D., Tudor G., Stieglitz B., Turner I.M., Nelson M.J. A stereoselective cobalt-containing nitrile hydratase // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, № 18. – P. 5447–5454.
164. Peter J., Kumar A., Sharma S. Toxicity of nitriles/amides-based products in the environment and their enzymatic bioremediation: A comprehensive review // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2024. – Vol. 31, № 14. – P. 20115–20132.
165. Prasad S., Bhalla T.C. Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry // *Biotechnology Advances*. – 2010. – Vol. 28, № 6. – P. 725–741.
166. Pu Y., Kamendulis L.M., Klaunig J.E. Acrylonitrile-induced oxidative DNA damage in rat astrocytes // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, № 16. – P. 1639–1645.
167. Qin J., Zhao B., Wang X., Demeke M.M., Dien B.S., Assefa F. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp. 2–6 // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4, № 2. – Article e4359.
168. Rädisch R., Melzer M., Schwenck S., Piotrowski M. Metabolism of aldoximes and nitriles in plant-associated bacteria and its potential in plant-bacteria interactions // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10, № 3. – Article 549.
169. Rahman M.F.A., Sarih N.M., Rashid A.A. Studies on the influence of mixed culture from buried soil sample for biodegradation of sago starch filled natural rubber latex gloves // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – IOP Publishing, 2019. – Vol. 548, № 1. – Article 012018.
170. Rakshit A., Sharma S., Shinde M., Singh K., Biju A.T. The renaissance of organo nitriles in organic synthesis // *Chemistry – An Asian Journal*. – 2022. – Vol. 17, № 21. – Article e202200732.

171. Ramakrishna C., Dave H., Ravindranathan M. Microbial metabolism of nitriles and its biotechnological potential // *Journal of Scientific & Industrial Research*. – 1999. – Vol. 58, № 12. – P. 925–947.
172. Ramezani-Pour N., Badoei-Dalfard A., Namaki-Shoushtari A., Karami Z. Nitrile-metabolizing potential of *Bacillus cereus* strain FA12: Nitrilase production, purification, and characterization // *Biocatalysis and Biotransformation*. – 2015. – Vol. 33, № 3. – P. 156–166.
173. Rampelotto P.H. Extremophiles and extreme environments // *Life*. – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 482–485.
174. Rapheeha O.K.L., Makhongela H.S., Agarkar V.B., Sewell B.T., Cowan D.A., Burton S.G. Hydrolysis of nitriles by soil bacteria: variation with soil origin // *Journal of Applied Microbiology*. – 2017. – Vol. 122, № 3. – P. 686–697.
175. Reichel C. Mass spectrometric analysis of EPO IEF-PAGE interfering substances in nitrile examination gloves // *Drug Testing and Analysis*. – 2012. – Vol. 4, № 10. – P. 761–774.
176. Rempel G.L., Wang H. Nitrile rubber latex blends: Preparation, characterization and applications // *Rubber Nano Blends: Preparation, Characterization and Applications*. – Cham: Springer International Publishing, 2016. – P. 67–88.
177. Roberts M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // *Saline Systems*. – 2005. – Vol. 1, № 1. – P. 5.
178. Rochman C.M., Hoh E., Hentschel B.T., Kaye S. Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris // *Environmental Science & Technology*. – 2013. – Vol. 47, № 3. – P. 1646–1654.
179. Rose K., Steinbüchel A. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – Vol. 71, № 6. – P. 2803–2812.

180. Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments // *Nature*. – 2001. – Vol. 409, № 6823. – P. 1092–1101.
181. Rozzell J.D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 1999. – Vol. 7, № 10. – P. 2253–2261.
182. Rumbaugh K.P., Sauer K. Biofilm dispersion // *Nature Reviews Microbiology*. – 2020. – Vol. 18, № 9. – P. 571–586.
183. Sahu R., Meghavarman A.K., Janakiraman S. A simple, efficient and rapid screening technique for differentiating nitrile hydratase and nitrilase producing bacteria // *Biotechnology Reports*. – 2019. – Vol. 24. – Article e00396.
184. Sakkas V.A., Lambropoulou D.A., Albanis T.A. Photodegradation of chlorothalonil in natural waters and in the presence of humic substances // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2002. – Vol. 147, № 2. – P. 135–141.
185. Samantarai S., Mohanty S., Nayak S.K. Chemical modification of nitrile rubber in the latex stage by functionalizing phosphorylated cardanol prepolymer: A bio-based plasticizer and a renewable resource // *Journal of Elastomers & Plastics*. – 2019. – Vol. 51, № 2. – P. 99–129.
186. Samthong C., Tanpichai S., Thongsang S., Srimoao, P., Jarukumjorn K. Effect of acrylonitrile content of acrylonitrile butadiene rubber on mechanical and thermal properties of dynamically vulcanized poly (lactic acid) blends // *Polymer International*. – 2019. – Vol. 68, № 12. – P. 2004–2016.
187. Santoshkumar M., Veeranagouda Y., Lee K., Karegoudar T.B. Utilization of aliphatic nitrile by *Paracoccus* sp. SKG isolated from chemical waste samples // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2011. – Vol. 65, № 1. – P. 153–158.
188. Schwartz A. Mikrobielle Korrosion von Kunststoffen und ihren Bestandteilen // *Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. Klasse für Chemie, Geologie und Biologie*. – 1963. – № 5. – P. 138.

189. Schwartz S.L., Adney W.S., Taylor L.E., Allen M.S. A Proterozoic microbial origin of extant cyanide-hydrolyzing enzyme diversity // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14. – Article 1130310.
190. Seckbach J., Rampelotto P.H. *Model Ecosystems in Extreme Environments*. – Academic Press, 2019. – 58 p.
191. Serra I., Boratyński F., Denisiuk M., Tubio C.R. Marine microorganisms for biocatalysis: selective hydrolysis of nitriles with a salt-resistant strain of *Meyerozyma guilliermondii* // *Marine Biotechnology*. – 2019. – Vol. 21, № 2. – P. 229–239.
192. Serumgard J. Internalization of scrap tire management costs: a review of the North American experience // *Rubber and the Environment, Proceedings of the Joint Workshop of the Secretariat of the United Nations Conference on Trade and Development and the International Rubber Study Group on Rubber and the Environment, Bali, Indonesia*. – 1998. – P. 30.
193. Seth A., Chand D., Khatri M., Banerjee U.C. Exploring the catalytic potential of nitrilase from alkalophilic *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36 for nitrile degradation // *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. – 2017. – Vol. 8, № 4. – P. 75–86.
194. Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review // *Biotechnology Advances*. – 2008. – Vol. 26, № 3. – P. 246–265.
195. Shah A.A., Hasan F., Shah Z., Kanwal N., Zeb S. Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – Vol. 83. – P. 145–157.
196. Shah A.A., Sulaiman S., Hasan F. Degradation of polyisoprene rubber by newly isolated *Bacillus* sp. AF-666 from soil // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2012. – Vol. 48, № 1. – P. 37–42.

197. Shilova A.V., Syrovatskaya G.A., Shaikhatarova E.E., Maksimov A.Yu., Maksimova Yu.G. Biocatalytic potential of nitrile hydrolyzing bacteria isolated from alkaline technogenic environment // AIP Conference Proceedings. – 2022. – Vol. 2390, № 1. – Article 030087.
198. Silva R.R.A., Silva T.R., Santos B.O. Biodegradation of polymers: stages, measurement, standards and prospects // Macromol. – 2023. – Vol. 3, № 2. – P. 371–399.
199. Singh O.V., Gabani P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications // Journal of Applied Microbiology. – 2011. – Vol. 110, № 4. – P. 851–861.
200. Singh R.V., Sharma R., Sharma A.M., Singh K., Kumar S. Exploring a broad spectrum nitrilase from moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. IIIMB2797 isolated from saline lake // Journal of Basic Microbiology. – 2018. – Vol. 58, № 10. – P. 867–874.
201. Sorasan C., Garrido J., Fernandez J.M. Modelling the photodegradation of marine microplastics by means of infrared spectrometry and chemometric techniques // Microplastics. – 2022. – Vol. 1, № 1. – P. 198–210.
202. Sorokin D.Y., van Pelt S., Tourova T.P., Evtushenko L.I. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov // Microbiology. – 2007a. – Vol. 153, № 4. – P. 1157–1164.
203. Sorokin D.Y., van Pelt S., Tourova T.P., Evtushenko L.I. Microbial isobutyronitrile utilization under haloalkaline conditions // Applied and Environmental Microbiology. – 2007b. – Vol. 73, № 17. – P. 5574–5579.
204. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Galinski E.A., Belloch C., Tindall B.J. *Nitriliruptor alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a deep-lineage haloalkaliphilic actinobacterium from soda lakes capable of growth on aliphatic nitriles, and proposal of *Nitriliruptoraceae* fam. nov. and *Nitriliruptorales* ord. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2009. – Vol. 59, № 2. – P. 248–253.

205. Sorokin D.Y., van Pelt S., Tourova T.P., Evtushenko L.I. Utilization of aliphatic nitriles under haloalkaline conditions by *Bacillus alkalinitrilicus* sp. nov. isolated from soda solonchak soil // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – Vol. 288, № 2. – P. 235–240.
206. Sorokin D.Y., Kublanov I.V., Gavrilov S.N., Rojo D., Chernyh N.A. Halophilic and haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria // Microbiology Monographs. – 2011. – Vol. 21. – P. 139–164.
207. Stairs C.W., Moore C.E., Williams T.A., Sparangis R., Krahn T., MacLeod T., Eme L., Tamarit D., Sahr T. A Proterozoic microbial origin of extant cyanide-hydrolyzing enzyme diversity // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 14. – Article 1130310.
208. Stepankova V., Bidmanova S., Koudelakova T., Prokop Z., Chaloupka R., Damborsky J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents // ACS Catalysis. – 2013. – Vol. 3, № 12. – P. 2823–2836.
209. Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M., Costerton J.W. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, № 12. – P. 5608–5613.
210. Straathof A.J.J., Panke S., Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations // Current Opinion in Biotechnology. – 2002. – Vol. 13, № 6. – P. 548–556.
211. Syed Z., Kumar S., Bhatia A., Shanker R., Cameotra S.S. Microbial biofilms for environmental bioremediation of heavy metals: a review // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2023. – Vol. 195, № 9. – P. 5693–5711.
212. Syrovatskaya G.A., Maksimov A.Yu., Maksimova Yu.G. Extremophilic and extremotolerant nitrile-hydrolyzing microorganisms: distribution and biotechnological potential (review) // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2026. – Vol. 62, № 4. – P. 637–652.

213. Syrovatskaya G.A., Maksimov A.Yu., Korotchenkova O.V., Maksimova Yu.G. Haloalkalitolerant Nitrile-Utilizing *Rhodococcus* Strains Promote the Biodegradation of Nitrile-Butadiene Rubber // International Journal of Microbiology. – 2026. – Vol. 2026. – Article 7513883.
214. Tang Q.Y., Zhang W.F. Environmental factors on aging of nitrile butadiene rubber (NBR)-A review // Advanced Materials Research. – 2014. – Vol. 1033. – P. 987–990.
215. Tansel B. Persistence times of refractory materials in landfills: A review of rate limiting conditions by mass transfer and reaction kinetics // Journal of Environmental Management. – 2019. – Vol. 247. – P. 88–103.
216. Tauber M.M., Cavaco-Paulo A., Robra K.H., Gübitz G.M. Nitrile hydratase and amidase from *Rhodococcus rhodochrous* hydrolyze acrylic fibers and granular polyacrylonitriles // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66, № 4. – P. 1634–1638.
217. Tayefi M., Khorasani M.T., Solouk A., Mirzadeh H. Recent progress in the accelerated aging and lifetime prediction of elastomers: A review // Polymer Degradation and Stability. – 2023. – Vol. 214. – Article 110379.
218. Threlfall T. The Infrared Spectra of Amides. Part 1. The Stretching Vibrations of Primary Carboxamides // Vibrational Spectroscopy. – 2022. – Vol. 121. – Article 103386.
219. Thuku R.N., Brady D., Benedik M.J., Sewell, B.T. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 106, № 3. – P. 703–727.
220. Tsuchii A., Takeda K. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture // Applied and Environmental Microbiology. – 1990. – Vol. 56, № 1. – P. 269–274.
221. Van Wyk J.C., Sewell B.T., Danson M.J., Tsekoa T.L., Sayed M.F., Cowan D.A. Engineering enhanced thermostability into the *Geobacillus pallidus* nitrile hydratase // Current Research in Structural Biology. – 2022. – Vol. 4. – P. 256–270.

222. Vega-Cantú Y., Hauge R., Norman L., Billups W.E. O. ZnBr₂-catalyzed chemical effects in poly (acrylonitrile-co-butadiene) // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2003. – Vol. 89, № 5. – P. 1250–1257.
223. Vejvoda V., Kaplan O., Klozová J., Masák J., Čejková A., Jirků V., Stloukal R., Martínková L. Mild hydrolysis of nitriles by *Fusarium solani* strain O1 // *Folia Microbiologica*. – 2006. – Vol. 51, № 4. – P. 251–256.
224. Velankar H., Clarke K.G., du Preez R., Cowan D.A., Burton S.G. Developments in nitrile and amide biotransformation processes // *Trends in Biotechnology*. – 2010. – Vol. 28, № 11. – P. 561–569.
225. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1998. – Vol. 62, № 2. – P. 504–544.
226. Veselá A.B., Pelantová H., Bezouška K., Novotný C., Martínková L. Hydrolysis of benzonitrile herbicides by soil actinobacteria and metabolite toxicity // *Biodegradation*. – 2010. – Vol. 21, № 5. – P. 761–770.
227. Vink M.K.S., de Lange B., van Rantwijk F., Sheldon R.A. Nitrile hydrolysis activity of *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 whole cells // *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. – 2006. – Vol. 1, № 5. – P. 569–573.
228. Wang C., Zhao J., Xing B. Environmental source, fate, and toxicity of microplastics // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – Vol. 407. – Article 124357.
229. Wang C.C., Lee C.M., Chen L.J. Removal of nitriles from synthetic wastewater by acrylonitrile utilizing bacteria // *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. – 2004. – Vol. 39, № 7. – P. 1767–1779.
230. Wang X., Lu J., Zhou Y., Shaban B., Zhang G., Zhou S., Wang S. A neglected risk of nanoplastics as revealed by the promoted transformation of plasmid-borne ampicillin resistance gene by *Escherichia coli* // *Environmental Microbiology*. – 2022. – Vol. 24, № 10. – P. 4946–4959.

231. Watcharakul S., Birke J., Jendrossek D., Umsakul K. Biochemical and spectroscopic characterization of purified Latex Clearing Protein (Lcp) from newly isolated rubber degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain RPK1 reveals novel properties of Lcp // BMC Microbiology. – 2016. – Vol. 16, № 1. – Article 92.
232. Watcharakul S. Isolation of a novel rubber degrading bacterium from a consortium and characterization of its lcp gene products: Ph.D. Thesis / Watcharakul Suchada. – Songkhla, Thailand: Prince of Songkla University, 2017. – P. 184.
233. Waters C.M., Bassler B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 2005. – Vol. 21. – P. 319–346.
234. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // Journal of Bacteriology. – 1991. – Vol. 173, No. 2. – P. 697–703.
235. West S.A., Griffin A.S., Gardner A., Diggle S.P. Social evolution theory for microorganisms // Nature Reviews Microbiology. – 2006. – Vol. 4, № 8. – P. 597–607.
236. Whysner J., Stewart R.E., Galvin J.B., Daniels S.B., Chen J.X., Williams G.M. Acrylonitrile Induction of Rodent Neoplasia: Potential Modes of Action // Toxicological Sciences. – 2021. – Vol. 121, № 2. – P. 316–325.
237. Williams D.F. Biodegradation of surgical polymers // Journal of Materials Science. – 1982. – Vol. 17, № 5. – P. 1233–1246.
238. Wittstock U., Halkier B.A. Glucosinolate research in the Arabidopsis era // Trends in Plant Science. – 2002. – Vol. 7, № 6. – P. 263–270.
239. World Health Organization. Rational use of personal protective equipment for coronavirus disease (COVID-19) and considerations during severe shortages: interim guidance, 6 April 2020. – Geneva: World Health Organization, 2020. – P. 28.

240. Wu C., Zhang K., Huang X., Liu J. Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Vol. 23, № 9. – P. 8819–8826.
241. Yamada H., Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 1996. – Vol. 60, № 9. – P. 1391–1400.
242. Yamada H., Shimizu S., Kobayashi M. Hydratases involved in nitrile conversion: screening, characterization and application // *The Chemical Record*. – 2001. – Vol. 1, № 2. – P. 152–161.
243. Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // *Journal of Experimental Biology*. – 2005. – Vol. 208, № 15. – P. 2819–2830.
244. Yikmis M., Steinbüchel A. Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol. 78, № 13. – P. 4543–4551.
245. Yildiz S.Y., Radchenkova N., Arga K.Y., Kambourova M., Toksoy Oner, E. Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 99, № 5. – P. 2277–2289.
246. Yin K., Wang Y., Zhao H., Wang D., Guo M., Mu M., Liu Y., Nie X., Li B. A comparative review of microplastics and nanoplastics: Toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system // *Science of the Total Environment*. – 2021. – Vol. 774. – Article 145758.
247. Yuan Z., Nag R., Cummins E. Occurrence and human exposure risks of atmospheric microplastics: A review // *Gondwana Research*. – 2022. – Vol. 108. – P. 200–212.
248. Zagrobelny M., Bak S., Møller B.L. Cyanogenesis in plants and arthropods // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69, № 7. – P. 1457–1468.

249. Zhang M., Dong L., Ju Z., Wang J., Liu S., Li X. Recent advances in the nitrogen cycle involving actinomycetes: Current situation, prospect and challenge // *Bioresource Technology*. – 2025. – Vol. 419. – Article 132100.
250. Zhang X., Jiang K., Wang J., Liu Y., Zhang H., Wang J. Heavy metal contamination in the riverine atmosphere and the contribution of microplastics as a vector // *Environmental Science & Technology*. – 2020. – Vol. 54, № 19. – P. 12044–12052.
251. Zhang Y., Jiang L., Zhang M., Baseer M., Zheng H., Zheng Y., Tan X., Wang J. Response of microbial community structure and function to microplastics with different properties in agricultural soil // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – Vol. 419. – Article 126442.
252. Zorina A.S., Maksimov A.Y., Maksimova Y.G. Degradation of Nitriles by Mixed Biofilms of Nitrile-Hydrolyzing Bacteria in Submerged Packed-Bed Reactor // *Indian Journal of Microbiology*. – 2022. – Vol. 62, № 4. – P. 610–617.
253. Zyska B.J. Microbial deterioration of rubber // *Biodeterioration 7*; ed. by D. R. Houghton, R. N. Smith, H. O. W. Eggins. – Dordrecht: Springer Netherlands, 1988. – P. 535–552.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Приложение А.1 – Справка о депонировании штамма *Rhodococcus qingshengii* IEGM 1416



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Институт экологии и генетики микроорганизмов

г. Пермь

27 июля 2022 г.

По месту требования

СПРАВКА

Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ подтверждает, что штамм *Rhodococcus qingshengii* 5Э, выделенный аспирантом Сыровацкой Галиной Андреевной и д.б.н., зав. Лабораторией молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН Максимовой Юлией Геннадьевной в сентябре 2017 г. из проб донных отложений (соды) действующего шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» (г. Березники, Пермский край, Россия), депонирован 27 июля 2022 г. под названием *Rhodococcus qingshengii* с коллекционным номером ИЭГМ 1416.

Руководитель Региональной профилированной
коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ,
академик РАН

И.Б. Ившина

Приложение А.2 – Справка о депонировании штамма *Rhodococcus erythropolis*
ИЭГМ 1417



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Институт экологии и генетики микроорганизмов

г. Пермь

27 июля 2022 г.

По месту требования

СПРАВКА

Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ подтверждает, что штамм *Rhodococcus erythropolis* 6Э, выделенный аспирантом Сыровацкой Галиной Андреевной и д.б.н., зав. Лабораторией молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН Максимовой Юлией Геннадьевной в сентябре 2017 г. из грунта старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» (г. Березники, Пермский край, Россия), депонирован 27 июля 2022 г. под названием *Rhodococcus erythropolis* с коллекционным номером ИЭГМ 1417.

Руководитель Региональной профилированной
коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ,
академик РАН

И.Б. Ившина