

На правах рукописи

ЧЕРЕМНЫХ Ксения Михайловна

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

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2018

Работа выполнена в лаборатории алканотрофных микроорганизмов "Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук"- филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии ("ИЭГМ УрО РАН"), Пермь.

Научные руководители:

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

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией эковиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Ефременко Елена Николаевна,

кандидат биологических наук, начальник цеха вакцинно-сывороточных препаратов филиала АО "НПО Микроген" в г. Перми "Пермское НПО "Биомед"

Грязнова Диана Васильевна

Ведущая организация:

Институт фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18).

Защита диссертации состоится 1 февраля 2018 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: 8 (342) 280 92 11.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.ed.gov.ru>) и сайте "ИЭГМ УрО РАН" (<http://www.iegm.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке "ИЭГМ УрО РАН" и на сайте института (<http://www.iegm.ru>).

Автореферат разослан " ____ " _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

Химические методы очистки промышленных стоков не обеспечивают полную нейтрализацию смоляных кислот и предполагают применение агрессивных реагентов. Приоритет отдается природоподобным технологиям, основанным на использовании ферментативной активности микроорганизмов. Известно, что микроорганизмы проявляют биодеструктирующую активность при концентрации ДАК в среде культивирования не более 250 мг/л (Bicho *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1999; Gouiric *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; van Beek *et al.*, 2007; Choudhary *et al.*, 2014). Большинство описанных микробных изолятов относится к грамотрицательным микроорганизмам, в частности протеобактериям, биотехнологическое использование которых небезопасно ввиду потенциальной патогенности большинства их представителей. Грамположительные бактерии-деструкторы представлены лишь несколькими штаммами, принадлежащими к родам *Bacillus* и *Mycobacterium* (Côté, Otis 1989; Martin, Mohn 1999; Yu, Mohn 1999). В связи с этим необходим дальнейший поиск перспективных штаммов, способных к биодеструкции ДАК в условиях более высоких концентраций, а также эффективных способов нейтрализации экотоксичной ДАК.

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

При поиске новых биодеструкторов сложных органических соединений большая роль принадлежит микробным коллекциям, предоставляющим ценную информацию о свойствах и биотехнологическом потенциале депонированных штаммов. В Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной

федерации коллекций культур, <http://www.iegmcoll.ru/>, реестровый номер Уникальной научной установки www.ckr-rf.ru/usu/73559) широко представлены непатогенные штаммы актинобактерий, характеризующиеся большим разнообразием деградируемых экополлютантов. Типично бактериальный характер роста, наличие многоцелевых ферментных систем, а также способность метаболизировать в экстремальных условиях среды обуславливают целесообразность и перспективность поиска активных биодеструкторов ДАК среди коллекционных штаммов актинобактерий.

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

Основные задачи исследования

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

2. Определить динамику и условия оптимизации процесса биоконверсии ДАК.

3. Изучить влияние ДАК на морфометрические характеристики актинобактерий.

4. Определить основные продукты и возможные пути биоконверсии ДАК.

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

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные расширяют представление о каталитическом потенциале актинобактерий *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* и их возможном вкладе в детоксикацию смоляных кислот в природных экосистемах. Отобраны наиболее эффективные штаммы актинобактерий, способные к полной деструкции (*R. rhodochrous* ИЭГМ 107), а также к трансформации (*G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 120, ИЭГМ 132, *R. erythropolis* ИЭГМ 267) ДАК с образованием ранее не описанных метаболитов. Обоснована возможность существенного сокращения (с 7 до 3 сут) продолжительности процесса биодеструкции с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания. Использование приема

предварительной адаптации клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 к ДАК обеспечивало максимальный (87 %) уровень продукции метаболитов (5 α -гидрокси-ДАК и соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа) с прогнозируемой биоактивностью. Способ биодеструкции ДАК с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, депонированного во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ АС-2065, защищен Патентом на изобретение РФ. Результаты диссертационного исследования используются в лекционном курсе “Биоразнообразие и биотехнологический потенциал микроорганизмов” для магистрантов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о наиболее активных штаммах-биодеструкторах ДАК включена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет (www.iegmc.ru/strains/index.html).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Актинобактерии родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %) способны к биодеструкции ДАК. Штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 120, ИЭГМ 132 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 трансформируют ДАК с образованием ранее не описанного метаболита – 5 α -гидрокси-ДАК.

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

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

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

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на VII, VIII Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов “Симбиоз–Россия”, Екатеринбург, 2014, Новосибирск, 2016, Казань, 2017; X Студенческом региональном конкурсе научных проектов по программе УМНИК, Пермь, 2014; Всероссийской конференции “Теория и практика хроматографии”, Самара, 2015; II Всероссийской школе-конференции молодых ученых “Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии”, Пермь, 2015; 20-ой и 22-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пушкино, 2016, 2018; Всероссийской научно-практической с международным участием конференции “Научное биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”, Пермь, 2016; XXI Международной

экологической студенческой конференции “Экология России и сопредельных территорий”, Новосибирск, 2016; IV Международной конференции “Микробное разнообразие: ресурсный потенциал (ICOMID)”, Москва, 2016; V Всероссийской конференции с международным участием “Енамины в органическом синтезе”, Пермь, 2017; II Международной научной конференции “Высокие технологии, определяющие качество жизни”, Пермь, 2018; Региональной студенческой научной конференции с международным участием “Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии”, Пермь, 2018; VI Международной научно-практической конференции “Биотехнология: наука и практика”, Ялта, 2018.

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

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

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Работа выполнена в соответствии с планом НИР “ИЭГМ УрО РАН” – филиала ПФИЦ УрО РАН, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций ФАНО (2016, 2017) и Госзаданий 6.1194.2014/К, 6.3330.2017/ПЧ Минобрнауки РФ, Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект 15-12-4-10, 18-4-8-21), и поддержана грантом «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К) 4328ГУ1/2014 от 17.12.2014. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора. Исследования с использованием системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования проводили на базе кабинета микроскопии *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Идентификацию продуктов биодеструкции ДАК проводили на базе лаборатории биологически активных соединений (зав. лабораторией – к.х.н. Гришко В.В.) “ИТХ УрО РАН” – филиала ПФИЦ УрО РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Определение минимальной подавляющей концентрации. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ДАК в отношении актинобактерий определяли методом двукратных серийных разведений (Performance Standards ..., 2017) с использованием 96-луночных полистероловых планшетов.

Условия культивирования актинобактерий. Актинобактерии выращивали в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с объемом среды 100 мл при перемешивании 160 об/мин и температуре 28 °С. В экспериментах использовали минеральную среду следующего состава (г/л): KNO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; FeCl_3 – 0,001; дрожжевой экстракт (Микроген, Россия) – 0,1 %; раствор микроэлементов по Постгейту – 0,1 об. % (Романенко, Кузнецов, 1974; Каталог штаммов..., 1994). В качестве дополнительного источника углерода вносили *n*-гексадекан (0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 и 3,0 об. %) или глюкозу (1,0 г/л). В отдельных экспериментах для культивирования актинобактерий использовали мясопептонный бульон (МПБ) производства ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия. В качестве инокулята использовали бактериальные клетки, предварительно выращенные в течение 2 сут на мясопептонном агаре (МПА) производства ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия и суспендированные в 0,5 %-ом растворе хлорида натрия. Бактерии вносили в среду культивирования до конечной концентрации 5×10^6 клеток/мл. ДАК (500 мг/л), растворенную в этаноле (1:10), вносили в питательную среду через 48 ч культивирования бактериальных клеток. В экспериментах с предварительно адаптированными актинобактериями ДАК (500 мг/л) вносили в минеральную среду одновременно с инокулятом. Для этого бактериальные клетки предварительно выращивали в течение 2 сут в присутствии 0,06 об. % *n*-гексадекана, затем дополнительно инкубировали (2 сут) в присутствии ДАК (500 мг/л). В экспериментах с использованием предварительно адаптированных клеток *n*-гексадекана в среду культивирования родококков не вносили. В качестве контролей использовали (1) стерильный раствор ДАК (500 мг/л) в минеральной среде (для оценки абиотической стабильности ДАК); (2) минеральную среду, содержащую *n*-гексадекан и бактериальные клетки (для разграничения возможных метаболитов).

Получение актинобактериальных клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания. Актинобактерии предварительно выращивали в МПБ, минеральной среде в присутствии *n*-гексадекана (1 об. %) или глюкозы (1 г/л). Бактериальные клетки в стационарной фазе их роста осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин) и трижды отмывали эквивалентным объемом фосфатного буферного раствора (рН 7,0). Отмытые клетки ресуспендировали в 50 мл фосфатного буфера (рН 6,0; 7,0; 8,0), OP_{600} доводили до значений 1,5, 2,0 и 2,5.

Иммобилизация бактериальных клеток. Актинобактерии закрепляли на поверхности твердых носителей (техническая ткань ($S=1,0 \text{ см}^2$) из нитей СВМ производства ООО “УкрматериалИнвест”, Украина, полипропиленовые диски ($d=0,5 \text{ мм}$) производства “Wuhu Ecotech Trade Co”, Китай), а также в макропористый гетерофазный криогель на основе поливинилового спирта (ПВС) производства ОАО “Невинномысский азот”, Невинномысск, Россия. Процесс адсорбционной иммобилизации проводили в течение 3 сут при постоянном перемешивании (130 об/мин) и температуре (28 °С) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, в которые вносили 100 мл клеточной суспензии (OP_{600} 1,0) в фосфатном буфере (рН 7,0) и 10 образцов технической ткани или 200 полипропиленовых дисков. Неадсорбированные клетки трижды отмывали фосфатным буфером (рН 7,0).

Закрепление актинобактерий в криогеле на основе ПВС осуществляли согласно методике, описанной в работе (Куукина *et al.*, 2006). Для этого бактериальную суспензию (ОП₆₀₀ 1,6) смешивали со стерильным раствором ПВС (12 %) в соотношении 1:2 v/v. Этапы замораживания и оттаивания осуществляли согласно указанной выше методике. Хранение полученных биокатализаторов осуществляли при 4 °С. Перед использованием иммобилизованные клетки предварительно регидратировали в 0,5 %-ом растворе хлорида натрия в течение 24 ч.

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

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

Микроскопические исследования. В работе использовали методы световой, атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Фотодокументирование изображений бактериальных клеток, полученных с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста, а также измерение размеров клеточных агрегатов осуществляли с помощью фотокамеры PRO-150ES (Pixera, USA) и компьютерной программы ВидеоТест, Размер 5.0 (Санкт-Петербург, Россия). Для исследования бактериальных клеток с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего

микроскопа (КЛСМ) Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (Asylum Research, США), клеточную суспензию (15–20 мкл) смешивали с эквивалентным объемом флуоресцентного красителя LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и подсушивали на воздухе на покровном стекле в темноте в течение 10–15 мин. Далее препарат промывали деионизированной водой и сканировали с помощью КЛСМ с использованием иммерсионного объектива ($\times 100$, числовая апертура 1,4). Для возбуждения флуоресценции SYTO9 и пропидиум йодида, входящих в состав красителя LIVE/DEAD[®], применяли аргоновый лазер ($\lambda=488$ нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda=543$ нм) с 560/660-нм барьерным фильтром, соответственно. Изображения размером 0,12 \times 0,12 мм (с разрешением 1600 \times 1600 пикселей) получали со скоростью 40 нм/пиксель. Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). КЛСМ-изображения импортировали в программное обеспечение АСМ Igor Pro 6/22A (WaveMetrics, США). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS со скоростью 0,2 Гц. При микроскопировании измеряли длину, ширину и среднеквадратичную шероховатость клеточной поверхности. Объем и площадь клеток дополнительно рассчитывали по формулам, приведенным в работе (Neumann *et al.*, 2005).

Определение жизнеспособности бактериальных клеток осуществляли посредством окрашивания 100 мкл образца в 96-луночном полистероловом планшете путем внесения в лунку 50 мкл 0,2 % водного раствора йодонитротетразоля хлорида (Kuyukina *et al.*, 2006). В результате восстановления йодонитротетразоля хлорида до нерастворимого формазана наблюдалось возникновение характерного красно-фиолетового окрашивания, свидетельствующего о присутствии в образце активно респираторных бактериальных клеток. Образцы инкубировали при температуре 28 °С в течение 24 ч. Оптическую плотность (ОП₆₃₀) окрашенной суспензии измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия) с программным обеспечением Ascent Software v.2.6 (Thermo LabSystems, Финляндия).

Определение дыхательной активности актинобактерий проводили с использованием высокочувствительного 6-канального респирометра Micro-Oxymax[®] (Columbus Instruments, USA) непрямого замкнутого цикла, подключенного к персональному компьютеру. Эксперименты проводили в стеклянных флаконах Micro-Oxymax вместимостью 300 мл при постоянном встряхивании (300 об/мин, 28 \pm 2 °С) на многоместной магнитной мешалке RT 10 (Power IKAMAG, Германия). Параметры респираторной активности (количество (мкл), скорость (мкл/мин) потребляемого O₂ и выделяемого CO₂) регистрировали автоматически каждые 42 мин.

Измерение электрокинетического потенциала бактериальных клеток проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) и программного обеспечения Malvern ZetaSizer, v. 2.2. Для этого отобранные в процессе биодеструкции ДАК клетки дважды отмывали и ресуспендировали в 10 мМ KNO₃ до достижения показателя оптической плотности (ОП₆₀₀), равного 0,2.

Антимикробную активность ДАК и ее метаболитов определяли методом двукратных серийных разведений (Performance Standards ..., 2017) с использованием бактериальных тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922,

Micrococcus luteus NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Культуры инкубировали 24 ч при температуре 37 °С, за исключением *M. luteus* NCIMB 196, которую инкубировали при температуре 28 °С. В качестве препаратов сравнения использовали антибиотические вещества (ампицилин и эритромицин, в частности).

Качественный и количественный анализ ДАК и ее метаболитов. Для выделения ДАК и ее возможных метаболитов постферментационную среду подкисляли 10 %-ым водным раствором HCl (до pH 4,0) и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные экстракты последовательно промывали 1 %-ым водным раствором NaHCO₃ и дистиллированной водой (до pH 7,0). Полученный этилацетатный экстракт обезвоживали над Na₂SO₄. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя (Heidolph, Германия). Смесь метаболитов ДАК метилировали (триметилселил)диазометаном (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч. Качественный состав продуктов биодеструкции ДАК контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах с силикагелем (Merck, Германия). Наличие продуктов окисления ДАК фиксировали при обработке пластин в системе растворителей этилацетат:гексан (3:7) и опрыскивании пластинок 5 %-ым раствором H₂SO₄ с последующим прогреванием в течение 2–3 мин при температуре 95–100 °С. Анализ ДАК и продуктов ее биодеструкции осуществляли методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на хроматографе Agilent 6890N/5975B (Agilent Technologies, США), оборудованном капиллярной колонкой HP-5ms (30 м×0,25 мм, 0,25 мкм) и работавшем в режиме ионизации электронным ударом (70 эВ). В качестве газа-носителя использовали гелий (1 мл/мин). Температуру колонки программировали от 120 до 320 °С. Масс-спектры регистрировали в диапазоне *m/z* от 40 до 460 а.е.м. Отнесение масс-спектров подтверждали с помощью библиотеки NIST08. В экспериментах по исследованию динамики биодеструкции ДАК количественный анализ осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа LC Prominence 20AD (Shimadzu, Япония), оборудованного хроматографической колонкой с обращенно-фазным адсорбентом SupelcosilTM LC-18 (150×4,5 мм, 5 мкм) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Подвижная фаза 70 %-ый раствор ацетонитрила; расход подвижной фазы 1 мл/мин; температура колонки 40 °С; длина волны детектирования ДАК 190 нм. В описанных условиях время удерживания ДАК составляло 14,99±0,02 мин. Регистрацию и обработку данных осуществляли с помощью программы LCSolution (v/1.25). Все химические реагенты, использованные для анализа ТСХ, ГХ-МС и ВЭЖХ, имели квалификацию х.ч., ч.д.а. или ос.ч. (НПК Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США).

Препаративное выделение и идентификация продуктов биодеструкции ДАК. Для препаративного получения продуктов биодеструкции ДАК смесь этилацетатных экстрактов (3 г) метилировали метилиодидом и разделяли с помощью флеш-хроматографа (BÜCHI, Швейцария) с использованием картриджа (диаметр 40 мм, длина 150 мм) на основе силикагеля 60 (90 г, размер частиц 40–63 мкм). Соотношение вещества и сорбента – 1:30. Элюирование проводили смесью гексан:этилацетат с градиентом концентраций от 99:1 до 9:1.

ИК-спектр метилового эфира соединения *m/z* 330,3 регистрировали с использованием Фурье-спектрометра Bruker 66/S IFS (Bruker, Германия) в тонкой пленке, полученной испарением раствора вещества в CHCl₃; спектры 1D и 2D ЯМР – ЯМР-спектрофотометра Bruker AVANCE II (Bruker BioSpin GmbH, Германия) при

частоте 400 и 100 МГц для ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров, соответственно. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin Elmer 341 (Perkin Elmer, США) при длине волны 589 нм для раствора в CHCl_3 . Точку плавления регистрировали с помощью автоматического прибора измерения температуры OptiMelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) со скоростью нагрева 1 °С/мин.

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование способности коллекционных штаммов актинобактерий к деструкции и трансформации ДАК. По нашим данным, большинство исследованных культур не сохраняли жизнеспособность в присутствии ДАК в концентрации выше 20 мг/л, что указывало на высокую токсичность данного соединения. Для отдельных представителей диетций, гордоний и родококков показатели МПК были значительно выше (таблица 1). Оказалось, что наиболее устойчивые к воздействию ДАК штаммы *D. maris* ИЭГМ 55 (МПК 390), *G. rubripertincta* ИЭГМ 104 (МПК 390), *G. terrae* ИЭГМ 150 (МПК 390), *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (МПК 780) были изолированы из нефтезагрязненной почвы и воды реки Днепр, в бассейне которой сконцентрированы крупные предприятия нефтехимической, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности Украины и Беларуси.

Таблица 1 – МПК ДАК в отношении актинобактерий

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

Примечание. *Для величины МПК значения указаны в пределах точности $\pm 1 \log_2$ разведения. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$.

Данные штаммы не использовали ДАК в качестве единственного источника углерода. В связи с этим способность актинобактерий к биодеструкции ДАК оценивали в присутствии дополнительного источника энергии – *n*-гексадекана. Из всего массива исследованных культур (147 штаммов) отобраны 12 штаммов (таблица 2), способных к биоконверсии ДАК в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %).

Таблица 2 – Биодеструкция ДАК актинобактериями в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %)

| Штамм | Биодеструкция, % | |
|-----------------------------------|------------------|--------------------------|
| | Остаточная ДАК | 5 α -гидрокси-ДАК |
| Абиотический контроль | 100,0 | – |
| <i>D. maris</i> ИЭГМ 295 | 44,6 \pm 4,8 | – |
| <i>D. maris</i> ИЭГМ 55 | 5,1 \pm 2,2 | – |
| <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 100 | 90,5 \pm 5,2 | 9,5 \pm 0,9 |
| <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 104 | 9,0 \pm 0,5 | – |
| <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 105 | 44,0 \pm 5,2 | – |
| <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 109 | 41,0 \pm 4,8 | – |
| <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 120 | 98,8 \pm 0,9 | 1,2 \pm 0,5 |
| <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 132 | 92,1 \pm 3,5 | 8,1 \pm 3,5 |
| <i>G. terrae</i> ИЭГМ 150 | 35,0 \pm 3,7 | – |
| <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267 | 86,0 \pm 4,9 | 14,0 \pm 1,2 |
| <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107 | \leq 2,0 | – |
| <i>R. ruber</i> ИЭГМ 80 | 49,0 \pm 5,7 | – |

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

Отдельные штаммы практически полностью деградируют ДАК. Наибольшей (>98 %) деструктирующей активностью отличался штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. Другие культуры трансформировали ДАК с образованием ранее не описанного метаболита (*m/z* 330,3), идентифицированного как 5 α -гидрокси-ДАК, максимальный выход которого зарегистрирован в случае использования штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267. При этом культуры, способные окислять ДАК до 5 α -гидрокси-ДАК, характеризовались значительно меньшей устойчивостью к воздействию ДАК (МПК <100 мг/л), по сравнению со штаммами, обеспечивающими полную деструкцию ДАК.

Для наиболее устойчивого к воздействию ДАК штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 и менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 проведено детальное сравнительное исследование процесса биоконверсии ДАК. Как видно из рисунка 1А, в течение 48 ч после внесения ДАК в среду культивирования устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 практически не наблюдалось прироста биомассы. Предположительно, данный этап эксперимента соответствовал адаптационному периоду клеток к воздействию ДАК. На 5 сут отмечалось резкое увеличение численности и деструктирующей активности родококков. В этих условиях в среде культивирования родококков остаточное содержание ДАК составляло 104 мг/л. В результате постепенного снижения концентрации ДАК на 9 сут эксперимента ее остаточное содержание составляло менее 5 мг/л.

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

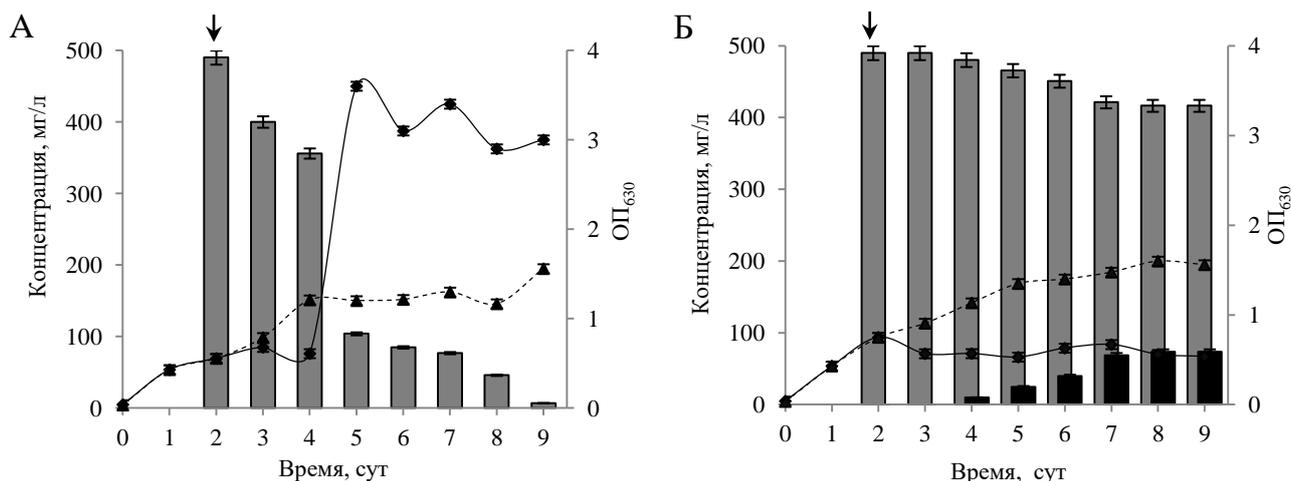


Рисунок 1 – Динамика биодеструкции ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (А) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (Б). Концентрация ДАК (■) и 5α-гидрокси-ДАК (■); количество (ОП₆₃₀) бактериальных клеток в присутствии *n*-гексадекана (▲), после внесения 500 мг/л ДАК (◆). Стрелкой указано время внесения ДАК.

Для мониторинга процесса биодеструкции ДАК был проведен анализ респираторной активности бактериальных клеток, как одного из показателей их жизнеспособности и интенсивности метаболических процессов. По нашим данным, динамика дыхательной активности характеризовалась стабильным выделением CO₂ и потреблением O₂, при этом скорости выделения CO₂ и потребления O₂ были зеркальным отражением друг друга. Как видно из рисунка 2А,Б, добавление ДАК в среду культивирования родококков в первые двое сут приводило к снижению скорости их респираторной активности.

В случае использования устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 снижение интенсивности дыхания коррелировало с уменьшением количества жизнеспособных клеток. На 5 сут эксперимента, когда регистрировалось увеличение роста биомассы, выявлялось и соответствующее повышение скорости дыхания родококков (рисунок 2А). Скорости поглощения O₂ и выделения CO₂ клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267 не зависели от количества жизнеспособных клеток в течение эксперимента и коррелировали с процессом образования и накопления метаболита. Так, наиболее высокие (13,41–14,28 мкл/мин) показатели интенсивности дыхания после добавления в питательную среду ДАК регистрировали на 7 сут эксперимента (рисунок 2Б). В это же время наблюдался максимальный уровень образования метаболита (см. рисунок 1Б). Общее количество выделенного CO₂ (223959 мкл) и поглощенного O₂ (216549 мкл) за 9 сут процесса биодеструкции ДАК с использованием устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в 1,5 раза выше, по сравнению с таковым менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (139088 мкл и 149941 мкл, соответственно). При этом рассчитанная средняя скорость (количество поглощенного O₂ 15 мкл/мин) дыхания клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в течение эксперимента была достоверно выше, по сравнению с аналогичным показателем клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (10 мкл/мин). Необходимо отметить, что респираторная активность родококков в присутствии ДАК была значительно выше таковой, зарегистрированной в контрольных вариантах опыта. Это дает основание предполагать, что процесс разложения экотоксиканта обусловлен деструктирующей активностью бактериальных клеток.

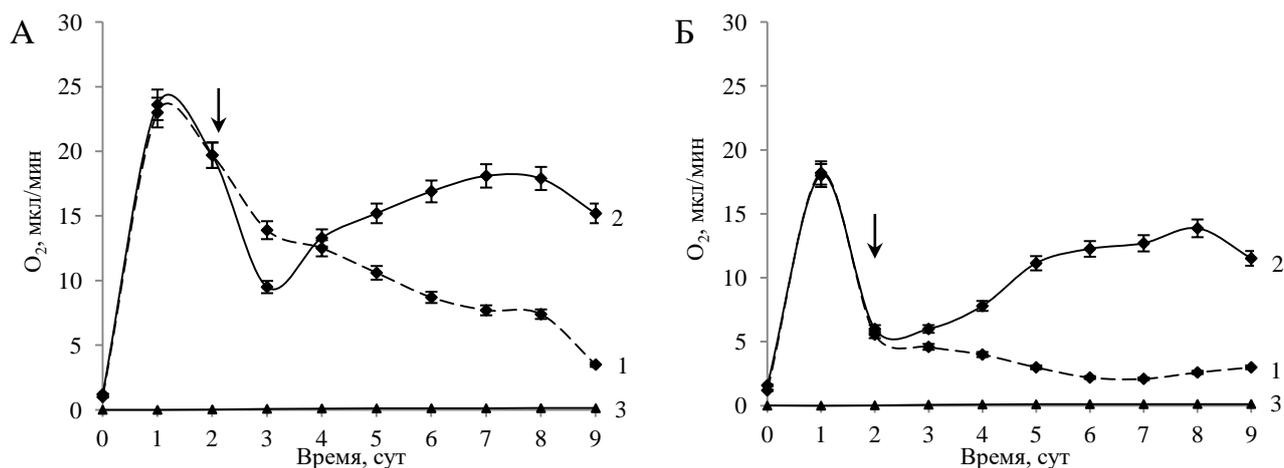


Рисунок 2 – Динамика респираторной активности клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (А) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (Б) в присутствии *n*-гексадекана (1) и после внесения ДАК (2). Стрелкой указано время внесения ДАК, 3 – абиотический контроль.

Результаты исследования антимикробной активности ДАК, этилацетатных экстрактов остаточной ДАК и ее метаболитов представлены в таблице 3. Наиболее чувствительными к воздействию ДАК оказались грамположительные бактерии. Так, показатели МПК для штаммов *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* NCIMB 196 и *S. aureus* ATCC 25923 составляли от 12 до 97 мг/л ДАК. Более устойчивыми к токсическому воздействию ДАК оказались штаммы грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853. По нашим данным, экстракты метаболитов не проявляли выраженной противомикробной активности, по сравнению с таковой ДАК.

Таблица 3 – Антимикробная активность (МПК, мг/л) ДАК и экстрактов ее метаболитов

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

Примечание. *Антимикробная активность не обнаружена. Для величины МПК значения указаны в пределах точности $\pm 1 \log_2$ разведения. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$.

Адаптивные реакции актинобактерий на токсическое воздействие ДАК. По данным фазово-контрастной микроскопии, в минеральной среде в присутствии *n*-гексадекана родококки формировали компактные клеточные агрегаты от 10 до 50 мкм, содержащие более десяти жизнеспособных клеток. Добавление ДАК в среду культивирования актинобактерий приводило к укрупнению размеров клеточных агрегатов до 0,5 мм в случае использования устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 и 5 мм в случае использования менее устойчивого *R. erythropolis* ИЭГМ 267.

Агрегаты представляли собой скопление бактериальных клеток на поверхности частиц ДАК.

О физиологическом состоянии родококков в присутствии ДАК свидетельствовали результаты, полученные при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. В случае использования штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 через 48 ч после добавления ДАК в исследованных препаратах присутствовали клетки с красной флуоресценцией, что, вероятно, свидетельствовало о некотором токсичном влиянии смоляной кислоты (рисунок 3А). Однако после 72 ч инкубирования родококков с ДАК регистрировалось увеличение количества живых (зеленых) клеток, что, по-видимому, связано с возможной адаптацией бактериальных клеток к экотоксиканту. В среде культивирования *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в присутствии ДАК наряду с живыми и мертвыми клетками обнаружены поврежденные клетки (рисунок 3Б). Характерное “двойное” (зелено-оранжевое) свечение, обнаруживаемое на отдельных участках или всей поверхности клетки, свидетельствовало о повреждении клеточной мембраны жизнеспособных клеток. Похожий эффект (двойное свечение) наблюдался при окрашивании родококков красителем LIVE/DEAD после воздействия на них органических растворителей в высоких концентрациях (Kuyukina *et al.*, 2014).

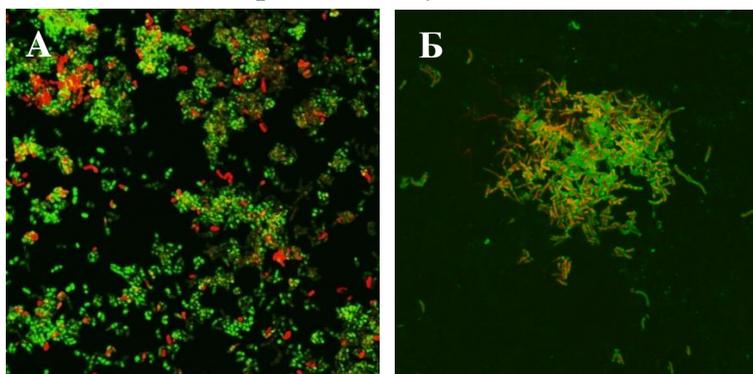


Рисунок 3 – Бактериальные клетки в КЛСМ-микроскопе *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (А) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (Б) в присутствии ДАК. Клетки с зеленой флуоресценцией – живые, красной – мертвые.

Установлено, что воздействие ДАК индуцировало изменение размеров клеток, в частности, увеличение их длины и ширины (таблица 4). Наиболее

Таблица 4 – Влияние ДАК на свойства актинобактерий

| Условия культивирования | Длина мкм | Ширина мкм | Объем мкм ³ | Площадь мкм ² | Шероховатость нм | Электрокинетический потенциал, мВ |
|---|-----------|------------|------------------------|--------------------------|------------------|-----------------------------------|
| <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107 | | | | | | |
| Минеральная среда + С ₁₆ | 1,3±0,2 | 1,1±0,1 | 1,3±0,1 | 4,45±0,2 | 206,5±10,7 | -26,6±0,9 |
| Минеральная среда + С ₁₆ + ДАК | 1,8±0,2 | 1,2±0,2 | 2,2±0,1 | 6,09±0,2 | 365,9±6,9 | -27,3±1,1 |
| <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267 | | | | | | |
| Минеральная среда + С ₁₆ | 3,1±1,0 | 1,0±0,1 | 2,6±0,2 | 6,8±0,1 | 100,7±9,8 | -15,5±1,4 |
| Минеральная среда + С ₁₆ + ДАК | 6,8±1,9 | 0,85±0,1 | 3,8±0,3 | 10,2±0,2 | 289,2±12,4 | -19,8±1,2 |

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

существенные изменения этих показателей были зарегистрированы при воздействии ДАК на клетки менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267. При этом отмечалось увеличение соотношения площади поверхности клетки к объему, что, согласно литературным данным (Neumann *et al.*, 2005), способствует более эффективному контакту клетки с субстратом. Воздействие ДАК на бактериальные клетки сопровождалось изменением свойств их клеточной поверхности. Характерной особенностью родококков в присутствии токсиканта являлось увеличение показателя среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности и изменение их электрокинетического потенциала.

При АСМ-сканировании клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 после инкубации их в присутствии ДАК во многих исследованных образцах регистрировали образование внеклеточной жидкости (рисунок 4А). Данное явление не может быть следствием

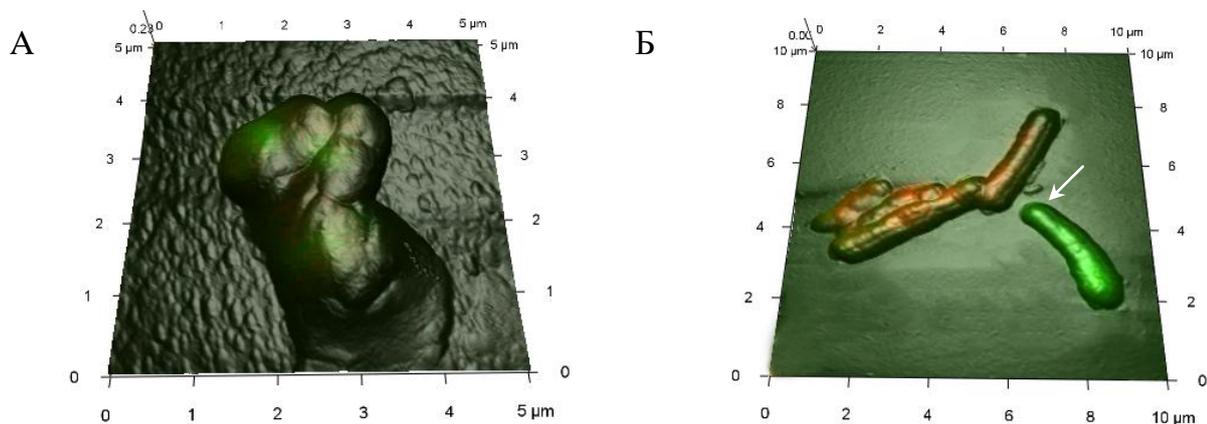


Рисунок 4 – АСМ-КЛСМ-изображения клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (А) и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (Б) после культивирования в присутствии ДАК и *n*-гексадекана. Стрелкой указаны гранулы ДАК.

лизиса бактериальных клеток, поскольку в клеточной популяции *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 не обнаруживались поврежденные клетки, а при исследовании КЛСМ- и АСМ-изображений в жидкости регистрировали только живые клетки. По-видимому, внеклеточная жидкость представляет собой биосурфактант или смесь биосурфактанта с *n*-гексадеканом и ДАК, так как известно, что синтез биосурфактантов способствует увеличению площади контакта актинобактерий с гидрофобным субстратом и повышению его биодоступности (Ivshina *et al.*, 1998). Аналогичные результаты были получены при сканировании актинобактериальных клеток в процессе биотрансформации пентациклического тритерпеноида бетулина (Tarasova *et al.*, 2017). В работе (Atrat *et al.*, 1991) высказано предположение о возможном образовании многокомпонентной подвижной липофильной мезофазы в процессе биотрансформации кристаллических гидрофобных соединений (β -ситостерола, в частности), функция которой состоит в постепенном растворении и запуске механизма транспорта субстрата в клетку. В работе (Kuyukina *et al.*, 2016) показано, что при АСМ-сканировании выделенный актинобактериальный биосурфактант, адсорбированный на стекле, образует вокруг бактериальных клеток мицеллы, визикулы и пузырьки. Подобные структуры отмечены и на полученных нами изображениях.

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

чем в контрольных вариантах опыта (58 ± 9 мг/мл). Возможна и другая природа обнаруживаемого факта. Если предположить, что агрегация родококков – это определенный этап формирования биопленки на поверхности кристаллических частиц ДАК, то внеклеточная жидкость, обнаруживаемая нами при АСМ-сканировании, может представлять собой внеклеточный полисахаридный матрикс.

Сканирование клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 после инкубирования их в присутствии ДАК не выявляло эффекта образования внеклеточной жидкости (рисунок 4Б). При этом концентрация экстрагируемого биосурфактанта (61 ± 8 мг/л) значительно не отличалась от контрольных вариантов опыта (57 ± 10 мг/л). На изображениях были замечены лишь адсорбированные гранулы ДАК на поверхности бактериальных клеток.

Бактериальные ферменты, участвующие в окислении ксенобиотиков, локализуются преимущественно в цитоплазме или связаны с клеточной мембраной (Bleif *et al.*, 2011; Janocha *et al.*, 2013). По нашим данным, наибольшая деструктирующая активность зарегистрирована при использовании супернатанта, полученного из клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 и содержащего цитоплазматические ферментные комплексы (таблица 5). Максимальное образование 5 α -гидрокси-производного обнаружено при использовании сониката из клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267, содержащего неэкстрагированные ферменты, прочно связанные с цитоплазматической мембраной. Полученные данные свидетельствуют о том, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в биодеструкции ДАК, локализованы в цитоплазме и характеризуются более умеренной активностью, по сравнению с ферментами, участвующими в образовании 5 α -гидрокси-производного и прочно связанными с плазматической мембраной.

Таблица 5 – Биодеструкция ДАК с использованием фракций клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 107

| Клеточная фракция | <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107 | | <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267 | |
|---|--------------------------------|---------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | ДАК, % | Метаболиты, % | ДАК, % | 5 α -гидрокси-ДАК, % |
| Целые клетки | $80,6 \pm 0,5$ | – | $98,1 \pm 1,9$ | $1,9 \pm 0,5$ |
| Супернатант с цитоплазматическими ферментами | $33,5 \pm 3,6$ | $30,3 \pm 3$ | 100 | – |
| Супернатант с тритон-экстрагированными мембранносвязанными ферментами | 100 | – | 100 | – |
| Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами | $84,7 \pm 3,4$ | – | $90,3 \pm 4,9$ | $8,2 \pm 1,0$ |

Примечание. Приведены результаты после 24 ч инкубирования с 500 мг/л ДАК.

Оптимизация процесса биодеструкции ДАК. В последнее время успешно применяются методы биодеструкции сложных органических соединений с использованием так называемых “нерастущих” клеток (“resting cells”) – клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания, или иммобилизованных клеток. По нашим данным, “нерастущие” клетки устойчивого штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в отличие от менее устойчивого штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267

сохраняли способность к биодеструкции ДАК. При этом наиболее эффективным оказалось использование клеток, предварительно выращенных в МПБ. Деструктирующая активность “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 находилась в прямой зависимости от количества биомассы (рисунок 5) и величины pH буферного раствора (рисунок 6). Использование суспензии нерастущих клеток с оптической плотностью 2,5 в слабощелочной среде (pH 8,0) привело к существенному сокращению продолжительности процесса биодеструкции ДАК с 7 до 3 сут.

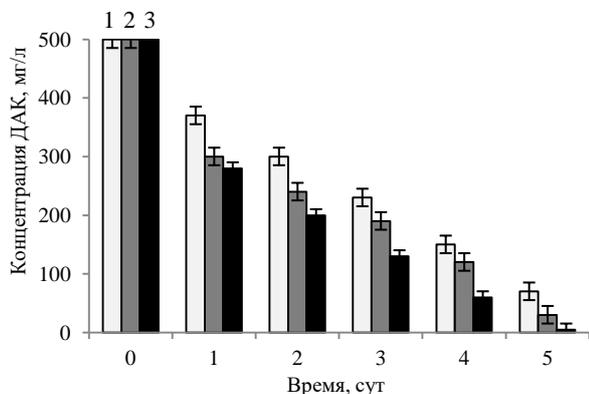


Рисунок 5 – Влияние оптической плотности суспензии “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, полученных в стадии стационарной фазы роста и ресуспендированных в фосфатном буферном растворе (pH 7,0), на уровень биодеструкции ДАК. 1 – ОП₆₀₀ 1,5; 2 – ОП₆₀₀ 2,0; 3 – ОП₆₀₀ 2,5. Фосфатный буфер pH 7,0.

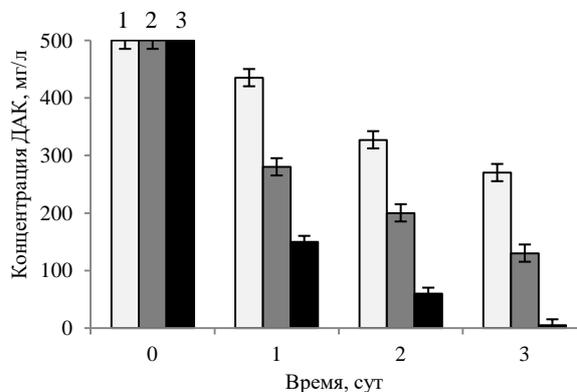


Рисунок 6 – Влияние показателя pH на деструктирующую активность “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. 1 – pH 6,0; 2 – pH 7,0; 3 – pH 8,0. ОП₆₀₀ 2,5.

Иммобилизованные на поверхности твердых носителей клетки сохраняли способность к биоконверсии ДАК. При этом продолжительность процесса практически не отличалась от таковой с использованием свободных клеток. Особо следует отметить, что в случае использования иммобилизованных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 среди выявляемых метаболитов появлялся новый ранее не описанный метаболит – соединение 15,16,17-тринор-абиетанового типа. В сравнительных экспериментах показано, что деструктирующая (с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107) и трансформирующая (с использованием штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 267) активность родококков достоверно снижалась после закрепления в криогель на основе ПВС.

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

Первоначально была исследована зависимость образования 5 α -гидрокси-ДАК в условиях снижения концентрации *n*-алкана в среде культивирования *R. erythropolis* ИЭГМ 267. Как видно из рисунка 7, максимальному (до 27 %) повышению уровня образования 5 α -гидрокси-производного способствовало предварительное выращивание родококков в присутствии 0,06 об. % *n*-гексадекана, при этом количество

жизнеспособных клеток по окончании эксперимента в среднем увеличивалось на 40 %, по сравнению с другими вариантами опыта. Следует отметить, что в данных условиях максимальное (выше 100 мг/л) количество 5 α -гидрокси-ДАК образуется уже на 2 сут эксперимента и до 7 сут остается на одном уровне.

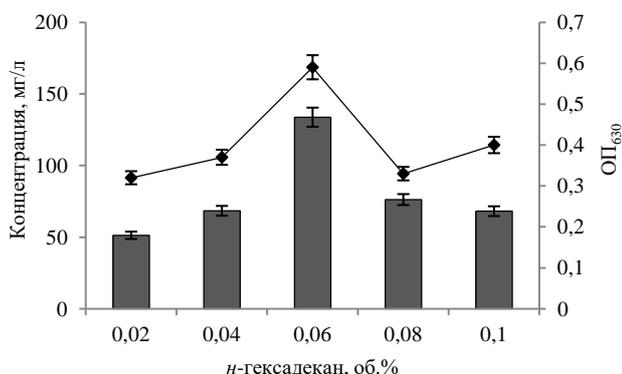


Рисунок 7 – Концентрация 5 α -гидрокси-ДАК в среде культивирования *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в присутствии ДАК в зависимости от исходной концентрации *n*-гексадекана.

Количество (ОП₆₃₀) бактериальных клеток (♦). Приведены результаты ГХ-МС, полученные после 7 сут культивирования родококков в присутствии ДАК.

Использование приема предварительной адаптации к ДАК клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 привело к повышению уровня трансформирующей активности родококков в отношении ДАК (рисунок 8) и накоплению продуктов ее трансформации – 244 мг/л 5 α -гидрокси-ДАК и 190 мг/л соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа. Исследование динамики процесса биоконверсии ДАК показало, что в реакционной среде оба продукта обнаруживались только на 4 сут после внесения ДАК и до 7 сут включительно их количество постепенно увеличивалось. Следует особо отметить, что в случае использования адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 внесение ДАК не оказало негативного влияния, как на прирост биомассы, так и на интенсивность дыхания, что свидетельствовало о бóльшей устойчивости адаптированных клеток к токсическому воздействию ДАК.

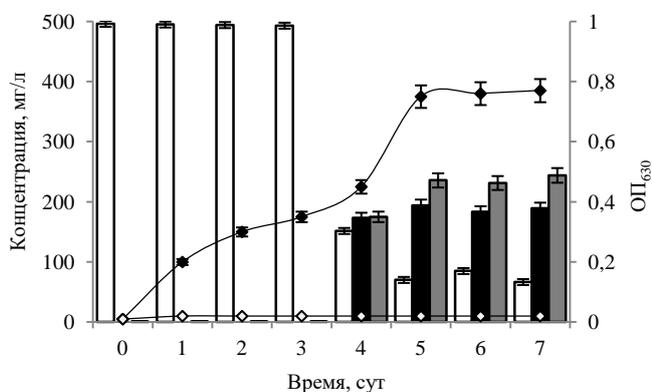


Рисунок 8 – Биодеструкция ДАК адаптированными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267.

Концентрация (мг/л) ДАК (□), 5 α -гидрокси-ДАК (■); соединение 15,16,17-тринор-абиетанового типа (▒); количество (ОП₆₃₀) бактериальных клеток в присутствии ДАК (♦), биотический контроль (◇).

Пути биодеструкции ДАК актинобактериями. В литературе описаны пути биодеструкции ДАК (1) для граммотрицательных протеобактерий. Нами в процессе использования клеточных фракций *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 были зарегистрированы метаболиты ДАК (соединение 1), масс-спектры которых соответствуют известным производным – 7-оксо-ДАК (соединение 2) и 7-оксо-11,12-дигидрокси-8,13-абиетадиеновая кислота (соединение 3) (рисунок 9). Образование метаболитов 2 и 3 в качестве промежуточных соединений характерно для биодеструкции ДАК клетками *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 (Martin, Mohn, 1999). Процесс актинобактериальной биодеструкции ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, по-видимому, протекает аналогично *P. abietaniphila* ВКМЕ-9 посредством окисления молекулы ДАК по атому С-7 углеродного кольца (соединение 2) с последующим дигидроксилированием ароматического цикла (соединение 3) и его дальнейшим *мета*-расщеплением (путь I).

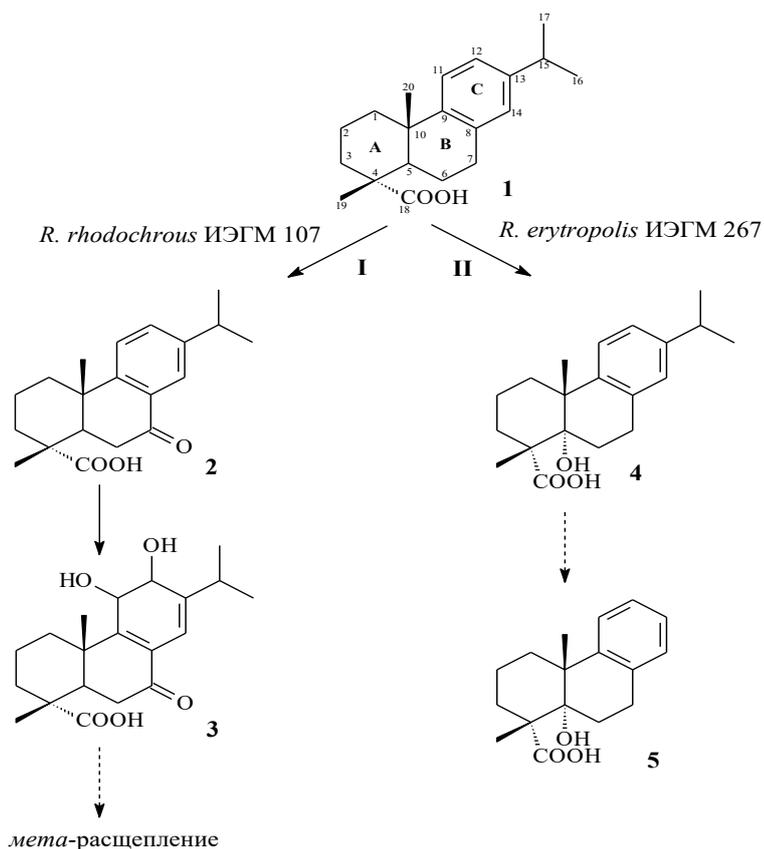


Рисунок 9 – Пути актино-бактериальной биодеструкции ДАК.

1 – ДАК, 2 – 7-оксо-ДАК,
3 – 7-оксо-11,12-дигидрокси-8,13-абиетадиеновая кислота,
4 – 5 α -гидрокси-ДАК,
5 – соединение 15,16,17-тринор-абиетанового типа.

Обнаружение новых метаболитов – 5 α -гидрокси-ДАК (соединение 4) и соединения 15,16,17-тринор-абиетанового типа (соединение 5), полученных в результате использования адаптированных клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267, дает основание предполагать существование нового пути биодеструкции ДАК. Факт гидроксирования по С-5 положению смоляных кислот абиетанового типа описан лишь в двух работах с образованием 5-гидрокси-7-оксо-ДАК из ДАК (Witzig *et al.*, 2007) и 5 α -гидрокси-производного из абиетиновой кислоты (Cross, Myers, 1968). Наиболее вероятно, что биотрансформация клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267 протекает путем окисления молекулы исходного соединения по атому С-5 углеродного кольца с последующим деизопропилированием ароматического кольца (путь II).

Оценка биологического потенциала новых метаболитов ДАК с помощью компьютерной программы PASS online (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>) показала, что с достаточно высоким (более 0,7) коэффициентом вероятности соединение 4 может проявлять антиэкземную, дерматологическую и противовоспалительную активность, соединение 5 – антисеборейную и антиэкземную активность. Оба метаболита с высокой (0,897–0,952) долей вероятности могут обладать мукомембранным протекторным свойством. Возможно (коэффициент вероятности более 0,5) использование полученных соединений 4 и 5 в лечении таких заболеваний, как ревматоидный артрит, алопеция, острые неврологические расстройства и т.д. Результаты предполагаемой биологической активности указывают на перспективность дальнейшего изучения полученных новых метаболитов ДАК.

Заключение. В результате проведенных исследований выполнена оценка возможности использования коллекционных культур актинобактерий для направленной биодеструкции ДАК – токсичного трициклического дитерпеноида. Впервые выявлена способность актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана к биодеструкции ДАК (500 мг/л). Показано, что

штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 132 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 катализируют процесс трансформации ДАК с образованием ранее не описанного метаболита – 5 α -гидрокси-ДАК. Воздействие ДАК на родококки сопровождается формированием макроагрегатов, изменением морфометрических параметров (увеличение размеров клеток) и свойств клеточной поверхности (повышение степени среднеквадратичной шероховатости, смещение величины электрокинетического потенциала в более отрицательную область). Экспериментально обосновано, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в биодеструкции ДАК, локализованы в цитоплазме, тогда как ферменты, участвующие в образовании 5 α -гидрокси-производного, прочно связаны с цитоплазматической мембраной. Существенное сокращение (с 7 до 3 сут) продолжительности процесса биодеструкции ДАК достигается при использовании “нерастущих” клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. При этом установлено, что оптимальными условиями биодеструкции ДАК является предварительное выращивание актинобактерий в МПБ, поддержание слабощелочной реакции среды (рН 8,0) и использование суспензии клеток с ОП₆₀₀ 2,5. Прием предварительной адаптации клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 к ДАК позволил достигнуть максимального уровня трансформации ДАК с образованием ранее не описанных метаболитов (5 α -гидрокси-ДАК и соединения 15,16,17-тринорабиетанового типа) с прогнозируемой биоактивностью. На основе идентифицированных метаболитов определены пути актинобактериальной биодеструкции ДАК.

Полученные данные расширяют представление о биодеструктирующей активности актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* и их возможном вкладе в детоксикацию смоляных кислот в природных экосистемах. Экспериментальные данные могут служить основой для разработки биотехнологических способов эффективного удаления смоляных кислот из промышленных стоков ЦБК. Полученные новые производные ДАК перспективны для возможного использования их в синтезе биологически активных соединений.

ВЫВОДЫ

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

2. Показано, что использование клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (ОП₆₀₀ 2,5) в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания, вдвое сокращает продолжительность (с 7 до 3 сут) процесса биодеструкции ДАК в слабощелочных (рН 8,0) условиях среды. Использование приема предварительной адаптации клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 к ДАК обеспечивает максимальный (87 %) выход продукции метаболитов (5 α -гидрокси-ДАК и соединение 15,16,17-тринор-абиетанового типа) с выраженной прогнозируемой биоактивностью.

3. Под воздействием ДАК выявлены характерные изменения морфометрических параметров (увеличение размеров клеток) и свойств клеточной поверхности (повышение степени среднеквадратичной шероховатости, смещение значения электрокинетического потенциала в более отрицательную область). Экспериментально обосновано, что ключевые ферментные комплексы, участвующие в биодеструкции ДАК, локализованы в

цитоплазме бактериальных клеток, окисление ДАК до 5 α -гидрокси-производного катализируют ферменты, прочно связанные с цитоплазматической мембраной.

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Черемных, К.М. Биодеструкция смоляных кислот – доминирующих токсичных соединений в отходах целлюлозно-бумажной промышленности / К.М. Черемных // Вестник Пермского университета. Серия Биология, Пермь. – 2014. – № 3. – С. 57–62.

2. Черемных, К.М. Поиск штаммов актинобактерий, катализирующих образование интермедиатов синтеза противовирусных веществ из дегидроабетиновой кислоты / К.М. Черемных // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18), № 2(1). – С. 769–770.

3. Черемных, К.М. Бактериальная деградация экотоксичной дегидроабетиновой кислоты / К.М. Черемных, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Катализ в промышленности. – 2017. – Т. 17, № 2. – С. 65–72. DOI: 10.18412/1816-0387-2017-2-153-160. (Scopus / Web of Science).

4. Cheremnykh, K.M. Bioconversion of ecotoxic dehydroabietic acid using *Rhodococcus actinobacteria* / K.M. Cheremnykh, N.A. Luchnikova, V.V. Grishko, I.B. Ivshina // Journal of Hazardous Materials. – 2018. – V. 346. – P. 103–112. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.12.025. (Scopus / Web of Science).

Публикации в других журналах и сборниках

1. Черемных, К.М. Биотрансформация дегидроабетиновой кислоты актинобактериями / К.М. Черемных // Материалы VII Всероссийской с международным участием конференции молодых биологов “Симбиоз-Россия 2014”, Екатеринбург. – 2014. – С. 97–99.

2. Черемных, К.М. Разработка способа детоксикации смоляных кислот – экотоксичных соединений в отходах бумажной промышленности / К.М. Черемных // Материалы X Студенческого регионального конкурса научных проектов по программе УМНИК. – 2014. – С. 175–178.

3. Черемных, К.М. Биокаталитическое окисление дегидроабетиновой кислоты / К.М. Черемных // Научный фонд “Биолог”. – 2014. – № 4. – С. 57–59.

4. Горбунов, А.А. Хромато-масс-спектрометрическое исследование продуктов биотрансформации терпеноидов актинобактериями рода *Rhodococcus* / А.А. Горбунов, К.М. Черемных, Е.В. Тарасова // Материалы Всероссийской конференции “Теория и практика хроматографии”, Самара. – 2015. – С. 221.

5. Черемных, К.М. Биотрансформация смоляных кислот актино-бактериями / К.М. Черемных, Н.А. Лучникова // Материалы VIII Всероссийского с международным участием конференции молодых ученых-биологов “Симбиоз-Россия 2015”, Новосибирск. – 2015. – С. 24.

6. Лучникова, Н.А. Актинобактериальная биодegradация дегидроабетиновой кислоты / Н.А. Лучникова, К.М. Черемных // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Наукоемкие биомедицинские

технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”, Пермь. – 2016. – С. 26–27.

7. Черемных К.М. Биодеградация дегидроабиетиновой кислоты актинобактериями рода *Dietzia* / К.М. Черемных // 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пущино. – 2016. – С. 56–57.

8. Лучникова, Н.А. Биодеструкция дегидроабиетиновой кислоты актинобактериями / Н.А. Лучникова, К.М. Черемных // Материалы XXI Международной экологической студенческой конференции “Экология России и сопредельных территорий”, Новосибирск. – 2016. – С. 239.

9. Лучникова Н.А., Поиск перспективных биодеструкторов экотоксичной дегидроабиетиновой кислоты / Н.А. Лучникова, К.М. Черемных, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Тезисы докладов IV Международной конференции “Микробное разнообразие: ресурсный потенциал”, Москва. – 2016. – С. 53.

10. Черемных, К.М. Морфометрические изменения актинобактерий в процессе биодеструкции экотоксичной дегидроабиетиновой кислоты / К.М. Черемных, Н.А. Лучникова, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Тезисы докладов IV Международной конференции “Микробное разнообразие: ресурсный потенциал”, Москва. – 2016. – С. 85.

11. Черемных К.М., Лучникова Н.А., Гришко В.В., Ившина И.Б. Исследование биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты с использованием актинобактерий // Материалы 1-го Российского микробиологического конгресса, Пущино. – 2017. – С. 181.

12. Черемных, К.М. Биоконверсия дегидроабиетиновой кислоты актинобактериями / К.М. Черемных, Н.А. Лучникова, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Тезисы докладов V Всероссийской конференции с международным участием “Енамины в органическом синтезе”, Пермь. – 2017. – С. 93.

13. Лучникова, Н.А. Детоксикация дегидроабиетиновой кислоты с использованием актинобактерий / Н.А. Лучникова, К.М. Черемных // Тезисы докладов X Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов “Симбиоз-Россия-2017”, Казань. – 2017. – С. 317.

14. Черемных, К.М. Биодеградация дегидроабиетиновой кислоты с использованием алканотрофных родококков / К.М. Черемных, Н.А. Лучникова // 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пущино. – 2018. – С. 82–83.

15. Лучникова, Н.А. Актинобактериальная деградация дегидроабиетиновой кислоты в высоких концентрациях / Н.А. Лучникова, К.М. Черемных // Материалы Региональной студенческой научной конференции с международным участием “Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии”, Пермь. – 2018. – С. 139–142.

16. Лучникова, Н.А. Биодеструкция токсичных смоляных кислот / Н.А. Лучникова, К.М. Черемных, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 3(26). – С. 260.

17. Черемных, К.М. Направленная биотрансформация экотоксичной дегидроабиетиновой кислоты / К.М. Черемных, Н.А. Лучникова, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Материалы II Международной научной конференции “Высокие технологии, определяющие качество жизни”, Пермь. – 2018. – С. 137–139.

Патенты

Черемных К.М., Лучникова Н.А., Гришко В.В., Ившина И.Б. Способ биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты с использованием штамма *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107 // Патент РФ 2656145. Зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 31.05.2018. Бюл. № 16.

ЧЕРЕМНЫХ Ксения Михайловна

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

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный.

Отпечатано в “ИЭГМ УрО РАН”

614081, г. Пермь, ул. Голева, 13