

УДК 579.695

БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНВЕРСИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНИТЕЛЯ МЕЛОКСИКАМА

С.М. Тян

Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), г. Пермь, Россия

*Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Россия*

Непрерывное использование нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) приводит к их широкому распространению в природных средах и вызывает негативные изменения в живых организмах на различных уровнях – от молекулярного до экосистемного. В связи с растущим интересом к биотехнологическим решениям в мировой биоэкономике, стрессоустойчивые актиномицеты (класс *Actinomycetes*) приобретают важное значение для решения проблемы фармацевтического загрязнения окружающей среды. Нами отобран штамм *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277, способный к биоконверсии мелоксикама, одного из наиболее часто обнаруживаемого НПВС в открытых экосистемах, с образованием гидроксиметил- и карбоксимелоксикама в сточных водах фармацевтического производства. Экспериментально обосновано, что метаболиты мелоксикама не токсичны в отношении позвоночных животных и тестовых бактериальных культур. С использованием высокочувствительных методов микро- и спектроскопии (АСМ, ПЭМ, ЭДС) установлено, что клетки гординий претерпевают выраженные адаптивные изменения – от модификации морфометрических характеристик (длина, ширина, объем и др.) и синтеза биосурфактантов до накопления внутриклеточных липидов и полифосфатов. Осуществлено полногеномное секвенирование штамма *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277 для создания Каталога генов, кодирующих ферменты окисления мелоксикама.

Ключевые слова: актиномицеты, *Gordonia*, биоконверсия, фармполлутанты, мелоксикам, метаболиты

BACTERIAL CONVERSION OF THE PHARMACEUTICAL CONTAMINANT MELOXICAM

S.M. Tyan

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences –
Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
Perm, Russia*

Perm State National Research University, Perm, Russia

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are extensively used in natural habitats as a result of ongoing use, which negatively affects living things at many levels, from the molecular to the ecological. Stress-tolerant actinomycetes (class *Actinomycetes*) are increasingly relevant to address the issue of pharmaceutical environmental pollution as interest in biotechnology solutions in the global bioeconomy grows. We chose the strain of *Gordonia alkanivorans* IEGM 1277, which is able to bioconvert meloxicam, one of the most often found NSAIDs in open ecosystems, to hydroxymethyl- and carboxymeloxicam in wastewater from pharmaceutical manufacturing. Meloxicam metabolites have not been shown to be harmful to test bacterial cultures or vertebrates in experiments. It was determined that gordonium cells undergo marked adaptive changes using extremely sensitive micro- and spectroscopy

techniques (AFM, TEM-EDX). These changes ranged from the synthesis of biosurfactants and modification of morphometric properties (length, width, volume, etc.) to the accumulation of intracellular lipids and polyphosphates. The actinomycete *G. alkanivorans* IEGM 1277 underwent whole genome sequencing in order to provide a Catalog of genes encoding meloxicam oxidation enzymes.

Keywords: actinomycetes, *Gordonia*, bioconversion, pharmpollutants, meloxicam, metabolites

Введение.

Фармацевтическое загрязнение окружающей среды обуславливает появление новых и более опасных рисков для здоровья человека и состояния природы. На сегодняшний день в водных объектах 104 странах мира обнаружено более 1000 лекарственных химикатов на уровне пико-, нано- и микрограммов в почвах, водных экосистемах и даже в бутилированной питьевой воде. В природных средах наиболее часто обнаруживаются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) [15]. Среди них особенно выделяется безрецептурный и широко применяемый в медицинской практике мелоксикам [7]. В литературе описано существенное неблагоприятное давление этого НПВС – от изменений в работе половой системы до нарушений в генетических конструкциях – на живые объекты практически всех уровней биологической организации [6, 12, 13].

Мелоксикам (Амелотекс®, Энтелокс®) является селективным ингибитором циклооксигеназы-2, обладает противовоспалительным, анальгезирующим и антипиретическим действиями [12]. Коэффициент распределения *n*-октанол-вода (3,43) указывает на липофильность мелоксикама, что свидетельствует о его способности адсорбироваться в почве, проникать через биологические мембраны и накапливаться в живых организмах, особенно в гидробиоте [4].

Основными источниками медикаментозного загрязнения природной окружающей среды являются интенсивное развитие фармацевтики, появление на рынке всё новых лекарственных препаратов, неполное удаление фармпрепаратов и их метаболитов в процессе очистки сточных вод, несовершенство способов утилизации фармотходов [15]. В связи с этим чрезвычайно актуальны разработка и внедрение альтернативных рентабельных стратегий очистки промышленных стоков, основанных на использовании ферментативной активности микроорганизмов.

Среди эколого-трофических групп бактерий, часто выявляемых в местах загрязнения и применяемых в биоремедиации, выделяются представители класса *Actinomycetes* (семейства *Nocardiaceae*). Доминирование в микробных сообществах загрязненных биотопов, метаболическая универсальность, способность разлагать широкий спектр устойчивых экотоксикантов в экстремальных условиях среды дают основание рассматривать актиномицетов в качестве идеальных агентов биоокисления фармацевтических загрязнителей [10, 14].

Материалы и методы.

Объектом исследования служил штамм актиномицета *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmcoll.ru>), отобранный в результате проведенного нами скрининга коллекционных культур на способность разлагать мелоксикам [3, 5].

В экспериментах по биодegradации применяли мелоксикамсодержащую сточную воду, полученную из цеха по производству таблеток мелоксикама Пермской фармкомпании «Медисорб» и разведенную фосфатно-щелочным буфером до исходной концентрации мелоксикама (10 мг/л). Для закрепления клеток в матрицу поливинилового спирта (ПВС) гординии предварительно выращивали в течение 72 ч при температуре 28°C в минеральной

среде в присутствии 3 об. % *n*-гексадекана (в качестве дополнительного источника углерода и энергии).

Бактериальную суспензию (ОП₆₀₀ 1,6) смешивали со стерильным раствором ПВС (12%) в соотношении 1:2 v/v [11]. Качественный контроль остаточного содержания мелоксикама в отходах (смывах с производственного оборудования) проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе *n*-гексан: этилацетат : ледяная уксусная кислота в соотношении 65:30:5 по объему. Детекцию химических соединений проводили обработкой хроматографических пластинок 15%-ной H₂SO₄, нагреванием при температуре 100–120°C в течение 2–3 мин и визуализацией при $\lambda = 365$ нм. Идентификацию полученных метаболитов проводили с помощью жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ/МС) [1].

Экотоксичность мелоксикама и продуктов его бактериальной декомпозиции рассчитывали с помощью компьютеризированной системы ECOSAR Ver. 1.11 (US EPA). Оценку биологического потенциала производных мелоксикама проводили методом двукратных серийных разведений с использованием бактериальных тест-культур (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas plecoglossicida* ИЭГМ 2044). Острую токсичность метаболитов в отношении белых нелинейных мышей определяли по методу Прозоровского [2].

Влияние мелоксикама на морфологию и рельеф поверхности бактериальных клеток оценивали с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ); ультраструктурные изменения регистрировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ); картирование биоэлементов выполняли методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС) [8]. NGS-секвенирование ИЭГМ 1277 активного-биодеструктора мелоксикама проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием секвенатора NovaSeq (Illumina, США) и метода сборки генома SPAdes (v. 3.14.1).

Результаты.

По нашим данным, клетки *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277, иммобилизованные в криогеле ПВС, трансформируют 93,75% исходного (10 мг/л) количества мелоксикама, присутствующего в сточных водах фармацевтического предприятия, в течение 7 сут.

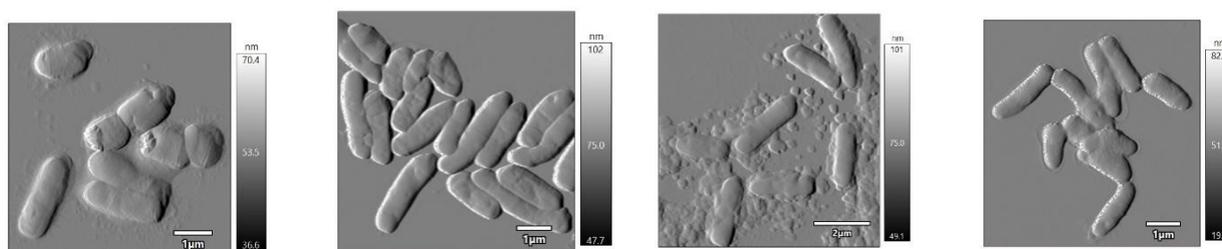
В то же время для достижения аналогичной степени биодеградации свободным клеткам требуется вдвое больший временной интервал – 14 сут. Процесс стабильной биоконверсии мелоксикама с использованием иммобилизованных гордоний регистрировали на протяжении 4-х циклов (1 цикл соответствует 1 нед использования) применения. В посткультуральной среде гордоний обнаружены молекулярные ионы с массами 368 и 382, принадлежащие протонированным метаболитам мелоксикама – гидроксиметил- и карбоксимелоксикам соответственно.

Показано, что процесс бактериальной деструкции мелоксикама сопровождается образованием метаболитов, характеризующихся сниженной токсичностью по сравнению с исходным соединением. По результатам проведенного прогнозного анализа, выполненного с применением программного обеспечения ECOSAR, мелоксикам относится ко II классу опасности по хронической токсичности для гидробионтов (дафний и зеленых водорослей), в то время как продукты его метаболизации проявляют менее выраженные токсические свойства, соответствующие III и IV классам опасности.

Установлено, что производные мелоксикама не ингибируют рост бактериальных тест-культур (МПК > 1 г/л) и, следовательно, попадание метаболитов в окружающую среду, по видимому, не будет иметь деструктивный характер.

В соответствии с ГОСТ 32419-2022 метаболиты мелоксикама относятся к III классу опасности, являются умеренно токсичными в отношении лабораторных животных (ЛД₅₀ > 200 мг/кг).

По данным АСМ (табл. 1, рис. 1), под действием мелоксикама на 7 сут эксперимента документировали достоверное повышение коэффициентов соотношения площади бактериальной клетки к её объему (S/V), что способствует более эффективному контакту бактериальных клеток с экотоксикантом. Этому также способствует выявленное образование внеклеточной жидкости, которая, по-видимому, представляет собой биосурфактант или смесь биосурфактанта с мелоксикамом.



А Б В Г

Рисунок 1 – АСМ-изображения клеток *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277: в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана (биотический контроль) на 7 (А) и 14 (Б) сут; в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана и 10 мг/л мелоксикама на 7 (В) и 14 (Г) сут.

Как известно [9], синтез биосурфактантов способствует увеличению площади контакта актиномицетов с гидрофобным субстратом и повышению его биодоступности. Обратная картина наблюдалась на 14 сут эксперимента, что связано с истощением мелоксикама из среды и накоплением метаболитов. Характерной особенностью гордоний в присутствии мелоксикама явилось увеличение показателя среднеквадратичной степени шероховатости клеточной поверхности.

Таблица 1

Морфометрические изменения клеток *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277 под действием мелоксикама (10 мг/л)

Характеристика	7 сут		14 сут	
	Биотический контроль	Мелоксикам	Биотический контроль	Мелоксикам
Длина, мкм	1,83±0,530	1,79±0,280	1,65±0,490	1,60±0,350
Ширина, мкм	0,61±0,090	0,59±0,030	0,83±0,120	0,59±0,040
Площадь (S), мкм ²	37,00±4,400	53,50±3,100	39,70±3,500	14,50±1,400
Объем (V), мкм ³	1,36±0,011	1,23±0,002	1,72±0,015	1,21±0,003
S/V , мкм ⁻¹	27,07±2,700	43,49±2,120	22,69±2,290	12,24±1,160
Шероховатость, мкм	0,12±0,064	0,24±0,067	0,12±0,062	0,16±0,087

Согласно полученным результатам, воздействие мелоксикама на клетки ИЭГМ 1277 сопровождается снижением пулов фосфора, серы и ряда других элементов (табл. 2), что свидетельствует о проявлении цитотоксического эффекта и нарушении целостности клеточных мембран.

Повышенное содержание меди в клетках, по-видимому, связано с активностью металлозависимых ферментов, катализирующих реакции окисления фармацевтического поллютанта, и может рассматриваться как адаптивный ответ гордоний на воздействие токсиканта.

Таблица 2

Суммарный спектр биоэлементов клеток *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277 в присутствии мелоксикама (10 мг/л)

Название спектра	C	O	Na	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca	Cu
Биотический контроль	69,55	8,49	5,6	0,55	0,68	1,78	0,34	4,79	1,94	0,79	5,43
Клетки в присутствии мелоксикама	81,78	6,02	0,43	0,12	0,65	0,48	0,12	0,01	0,8	0,24	9,3

Сравнительный анализ ультратонких срезов выявил накопление липидов в бактериальных клетках, о чем свидетельствует присутствие электронно-прозрачных включений (рис. 2 Б). Кроме того, зафиксировано накопление полифосфатов в виде электронно-непрозрачных включений (рис. 2 Б).

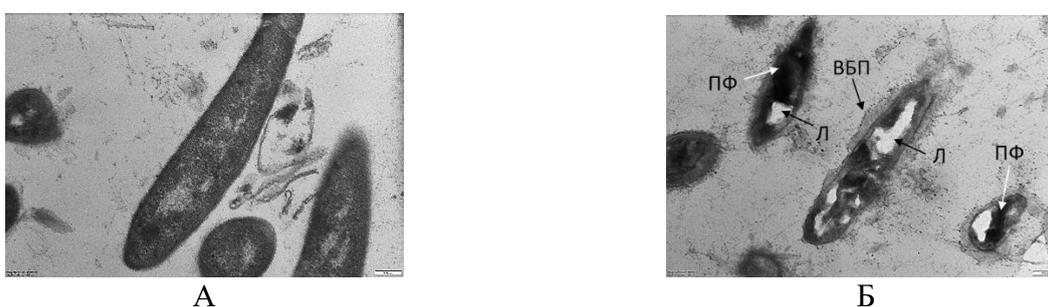


Рисунок 2. ПЭМ-изображения клеток *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277

А – в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана (биотический контроль); Б – в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана и 10 мг/л мелоксикама. ВБП, внеклеточные биополимер; Л, липидные включения; ПФ, включения полифосфатов.

Полногеномная последовательность штамма ИЭГМ 1277 доступна в базах данных DDBJ/ENA/GenBank под номерами JASIRQ010000001-JASIRQ010000143. Согласно NCBI, размер генома ИЭГМ 1277 составляет 5,1 Мб, а содержание GC находится на уровне 67,5%. Распределение генов с известной и неизвестной последовательностью составляло 20:80 соответственно. Методом геномного майнинга обнаружены генные кластеры синтеза P450-зависимых монооксигеназ, которые, вероятно, отвечают за начальное окисление молекулы мелоксикама.

Заключение.

Показано, что клетки *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277, иммобилизованные в криогеле ПВС, способны к эффективной биоконверсии (более 93%) мелоксикама в сточных водах фармацевтического предприятия в течение 7 сут. В настоящее время ведется работа по снижению продолжительности периода декомпозиции целевого НПВС. В результате проведенных исследований определены первичные метаболиты мелоксикама (гидроксиметил- и карбоксимелоксикам), образующиеся в процессе его бактериальной трансформации. Полученные соединения не токсичны в отношении позвоночных животных и тест-бактериальных культур. Установлено, что присутствие мелоксикама индуцирует морфометрические и ультраструктурные изменения бактериальных клеток. Полученные сведения рассматриваются как адаптационные механизмы, реализуемые гордониями в присутствии мелоксикама, и как стратегия повышения их устойчивости к токсическому действию фармполлютанта. С помощью полногеномного секвенирования выявлены основные особенности катаболизма мелоксикама.

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания 124020500028-4 с использованием оборудования ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследование материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Просвечивающая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия проведены на базе ЦКП «Коллекция UNIQEM» Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.).

Библиографический список

1. Вихарева Е.В., Карпенко Ю.Н., Селянинов А.А., Бажутин Г.А., Тюмина Е.А. Хроматографический анализ мелоксикама и его метаболитов в процессе бактериальной деструкции // Известия Академии наук. Серия химическая. 2022. № 11. С. 2358–2364.
2. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. 1978. № 41. С. 497–502.
3. Тянь С.М., Тюмина Е.А. Скрининг актинобактериальных штаммов – биодеструкторов мелоксикама. Микробиология: вчера, сегодня, завтра [Электронный ресурс]: тез. докл. Международной научной конференции, посвященной 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете, 20–21 декабря 2021 г., Казань: Изд-во Казанского университета, 2021. 77 с.
4. aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Küster A.H.A. Pharmaceuticals in the environment. Global occurrences and perspectives // Environmental Toxicology and Chemistry. 2016. Vol. 35. P. 823–835.
5. Bazhutina G.A., Tymina E.A., Subbotina M.V., Tyun S.M. Biotransformation of ibuprofen and meloxicam by *Rhodococcus cerastii* IEGM 1243 and *Gordonia amicalis* IEGM 1277 cells. Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Химия. Экология. Урбанистика” (28–29 апреля 2022 г.). Пермь: Издательство Пермского национального исследовательского политехнического университета. 2022. Т. 2. С. 199–202.
6. da Silva J.C., Bigolin C., da Silva L.C., Saraiva T.E.S., Menezes J.M., Veiverberg A., Charão M.F., Betti A.H. Neurotoxicity evaluation of meloxicam in the alternative *in vivo* model, *Caenorhabditis elegans* // International Journal for Innovation Education and Research. 2020. Vol. 8. P. 319–325.
7. Herrero-Villar M., Velarde R., Camarero P.R., Taggart M.A., Bandeira V., Fonseca C., Marco I., Mateo R. NSAIDs detected in Iberian avian scavengers and carrion after diclofenac registration for veterinary use in Spain // Environmental Pollution. 2020. Vol. 266. P. 269–278.
8. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Litvinenko L.V., Golysheva A.A., Kostrikina N.A., Sorokind V.V., Mulyukin A.L. Bioaccumulation of molybdate ions by alkanotrophic *Rhodococcus* leads to significant alterations in cellular ultrastructure and physiology // Environmental Pollution. 2024. Vol. 274. Article 116190.
9. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1998. Vol. 14. P. 711–717.
10. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. Article 9159.
11. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Gavrin A.Yu., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Jeffrey C., Philp J. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly (vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant // Journal of Microbiological Methods. 2006. Vol. 65. P. 596–603.
12. McCann N.C., Lynch T.J., Kim S.O., Duffy D.M. The COX-2 inhibitor meloxicam prevents pregnancy when administered as an emergency contraceptive to nonhuman primates // Contraception. 2013. Vol. 88. P. 744–748.
13. Sheikhlangi Z., Gharaei A., Harijani J.M., Davari S.A., Hassanein P., Rahdari A. Toxicological effects of meloxicam on physiological and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*) // Veterinary Medicine and Science. 2023. Vol. 9. P. 2085–2094.
14. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2007. Vol. 71. P. 495–548.
15. Wilkinson J.L., Thornhill I., Oldenkamp R., Gachanja A., Busquets R. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment: How can regions at risk be identified in the future? // Environmental Toxicology and Chemistry. 2024. Vol. 43. P. 575–588.