



Образование фталатов при деградации N-фенил-2-нафтиламина почвенными бактериями

© Л.Е. Макарова, А.С. Мориц, Н.А. Соколова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) и фталаты относят к веществам антибиотического действия. Появление и накопление этих веществ в биосфере обусловлено их техногенным и биогенным происхождением (метаболиты растений и бактерий). Цель работы – сравнить деградирующую активность в отношении N-ФНА у почвенных бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*, *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus*, *Azotobacter chroococcum*, различающихся по типу взаимоотношений с растениями гороха (*Pisum sativum* L.), синтезирующего вышеназванное соединение. Продукты деградации исследовали методом газовой хромато-масс-спектрометрии в этилацетатных экстрактах из культуральных жидких сред, куда вместе с бактериями вносили N-ФНА до концентрации 10 мкМ. С применением методов высокоэффективной жидкостной хроматографии в полученных при помощи этилацетата экстрактах из культуральных сред, куда вносили N-ФНА до концентрации 100 мкМ, через двое суток роста бактерий в этих средах прослеживали степень уменьшения его концентрации. Показано, что все исследованные виды бактерий способны деградировать N-ФНА с образованием фталатов. Наиболее высокую деградирующую активность обнаружили у бактерий *Rhizobium*, эндосимбионтов растений гороха, синтезирующего N-ФНА, и у свободноживущих азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*. N-ФНА снижал жизнеспособность всех видов бактерий, но в разной степени. В наибольшей мере негативное действие N-ФНА сказалось на жизнеспособности бактерий рода *Azotobacter*, показавшего при этом высокую деградирующую активность в отношении этого соединения. Зависимость эффекта негативного влияния на жизнеспособность от концентрации N-ФНА оказалась слабо выраженной у бактерий родов *Rhizobium* и *Pseudomonas*, а у бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Clavibacter* она оказалась существенной.

Ключевые слова: N-фенил-2-нафтиламин, фталаты, почвенные бактерии, биodeградация

Для цитирования: Макарова Л.Е., Мориц А.С., Соколова Н.А. Образование фталатов при деградации N-фенил-2-нафтиламина почвенными бактериями. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 107–115. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-107-115>

Formation of phthalates during the degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by soil bacteria

Lyudmila E. Makarova, Anna S. Morits, Natalia A. Sokolova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: N-phenyl-2-naphthylamine (N-PNA) and phthalates are classified as antibiotic substances. The appearance and accumulation of these substances in the biosphere is associated with their technogenic and biogenic origin (metabolites of plants and bacteria). In this article, we compare the degrading action of such soil bacteria as *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*, *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* and *Azotobacter chroococcum* against N-PNA. These bacteria differ in their interaction with pea plants (*Pisum sativum* L.) synthesising N-PNA. The degradation products were studied using gas chromatography-mass spectrometry in ethyl acetate extracts obtained from culture liquid media, in which N-PNA at a concentration of 10 μ M and the bacteria under study were introduced. The decrease in the N-PNA concentration in the extracts obtained using ethyl acetate from culture media, in which N-PNA had been added to a concentration of 100 μ M, was monitored following two days of bacterial growth using the methods of high-performance liquid chromatography. It was shown that all the studied bacterial species are capable of degrading N-PNA with the formation of phthalates. The *Rhizobium* bacteria, endosymbionts of pea plants synthesising N-PNA, and free-living nitrogen-fixing bacteria of the *Azotobacter* genus showed the highest degrading activity. It was found that N-PNA reduced the viability of all types of bacteria, although to a varying degree. N-PNA had the most negative effect on the viability of the *Azotobacter* genus, although these

bacteria showed a high degrading action against N-PNA. The dependence between the negative effect of N-PNA on bacterial viability and the N-PNA concentration was mildly pronounced for *Rhizobium* and *Pseudomonas*, although being significant for *Bradyrhizobium* and *Clavibacter*.

Keywords: N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates, soil bacteria, biodegradation

For citation: Makarova LE, Morits AS, Sokolova NA. Formation of phthalates during the degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by soil bacteria. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):107–115. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-107-115>

ВВЕДЕНИЕ

Поиски способов обезвреживания веществ токсического действия на живые системы, которые накапливаются в биосфере и имеют одновременно техногенное и биотическое происхождение, важны и актуальны для поддержания безопасности нашей экологии. N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) и фталаты относятся к опасным для живых организмов веществам [1–4]. Они производятся предприятиями химической промышленности и находят широкое применение в различных технологиях. N-ФНА известен в научной литературе с 1881 г., это алкалоид необычного строения [5], находит применение в производстве красителей и других органических химических веществ, в качестве антиокислителя резины, полимеров, в смазках, а также в смазочных и трансформаторных маслах, используется в качестве стабилизатора в электроизоляционных эмалях и т.д. Фталаты имеют широкое применение в химической промышленности: в производстве пластмасс в качестве пластификаторов, для получения косметических средств и др. [2–4].

Однако наряду с техногенными существуют и биогенные источники появления N-ФНА и фталатов в биосфере. Биотическое происхождение N-ФНА доказано результатами немногочисленных работ, авторами которых это соединение было обнаружено в тканях нескольких видов наземных и двух представителей водных растений [5–11]. В том числе и мы сообщали о выявлении N-ФНА и фталатов у трех представителей бобовых культур в корнях и в составе компонентов их корневых экссудатов [11]. Сведения о путях биосинтеза N-ФНА в клетках растений и присутствии его у микроорганизмов в литературе в настоящее время отсутствуют.

Фталаты были выявлены в начале 70-х годов прошлого столетия в клетках бактерий и в те же годы у этих организмов установлены пути биострукции фталатов [12]. Позднее были определены предшественники образования данных соединений – полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [13] и затем установлено, что образование о-фталевой кислоты происходит по одному из двух основных путей биodeградация ПАУ [14, 15]. Деградация фталатов может происходить разными путями [16]. Способность к деградации фталатов чаще выявляли у представителей таких родов бактерий, как *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Sphingo-*

monas, *Micrococcus*, *Burkholderia* [16, 17]. Результаты исследований более поздних лет предполагают возможность и самостоятельного биосинтеза фталатов в клетках некоторых видов бактерий [18]. В клетках некоторых представителей нитчатых грибов основным для биосинтеза бензольного кольца дибутилфталата, по всей вероятности, является путь его образования из углеводов по шикимовокислотному пути [19]. Этот путь биосинтеза фталатов у бактерий пока не исследован, но в бактериальных клетках имеются возможности для синтеза бензольного кольца [20].

В тканях растений, а также в составе их корневых экссудатов фталаты обнаружены сравнительно недавно [11, 21, 22]. В частности, впервые показав наличие диалкиловых о-фталатов в закрытых биологических системах – в культурах клеток и в растениях *in vitro*, авторы работы [22] предоставили достоверное доказательство самостоятельного синтеза этих соединений у растений.

Роль фталатов во взаимодействии между растениями и бактериями, а также в межмикробных взаимоотношениях определяется рядом обстоятельств. Согласно результатам исследований авторов работ [18, 23], эффект воздействия фталатов на бактерии зависит от концентрации, вида алкильных группировок в их молекулах, присоединенных эфирной связью к о-фталевой кислоте, от чувствительности к ним того или иного вида бактерий, и от того, существуют ли бактерии свободно или находятся в состоянии биопленок. Одной из функций фталатов в растениях является защита растений от бактериальных патогенов. При этом характер действия фталатов на фитопатогены видоспецифичен, и функции различных видов фталатных эфиров индивидуальны.

Результаты наших исследований засвидетельствовали негативный эффект N-ФНА на рост использованных нами почвенных бактерий, являющихся представителями родов *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Clavibacter*, и наличие возможности у этих бактерий деградировать данное соединение до фталатов [11, 24]. При деградации N-ФНА в клетках бактерий образовывались нафталиновые группировки, но они не появлялись во внешней среде, где обнаруживались только фталаты. Очевидно, основными конечными продуктами при деструкции N-ФНА были фталаты, которые выявлялись и в клетках, но

преимущественно оказывались в среде роста бактерий. В клетках животных среди мажорных продуктов деградации N-ФНА найдены известный канцероген 2-нафтиламин, и образующиеся при его окислении по атому азота N-гидрокси-2-аминонафталин и 2-нитрозо-нафталин, но не зафиксированы фталаты [25, 26]. Данные факты показывают на существенные отличия путей деградации N-ФНА в клетках животных и бактерий.

В настоящей работе приведены данные, с помощью которых можно оценить возможность деградации N-ФНА у бактерий, вступающих в симбиотические взаимодействия с растением гороха (*Pisum sativum* L.), синтезирующим это соединение, и у бактерий, не инфицирующих данное растение. Проведенное сравнение позволит выявить разницу деградирующей активности в отношении обсуждаемого негативного аллелопатического соединения растения-хозяина у адаптированных, в некоторой мере, к нему бактерий и у бактерий, оказавшихся в контакте с ним случайно. Из пяти видов бактерий два способны проникать в ткани растений гороха (данные приведены ниже). Это бактерии *R. Leguminosarum* bv. *viciae* (мутуалист), нодулирующие корни растений гороха, и бактерии *P. syringae* pv. *pisi* (патоген), инфицирующие его надземные органы. Для исследования были выбраны следующие виды бактерий, не инфицирующие растения гороха: *C. michiganensis* sps. *sepedonicus*, *B. japonicum* и *Az. chroococcum*. Первый из названных видов является патогеном для картофеля. Для бактерий рода *Bradyrhizobium* растением-хозяином является другой вид бобовых культур – растение сои (*Glycine max*), в корнях и корневых экссудатах которой так же, как и у растений гороха, выявлен N-ФНА [11]. *Az. Chroococcum* – свободноживущие азотфиксирующие почвенные бактерии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являлись бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae* (штамм RCAM 1022), *B. japonicum* (штамм 626), *P. syringae* pv. *pisi* (штамм 1845), *C. michiganensis* sps. *Sepe-donicus* (Cms. штамм 6889), *Az. chroococcum* (штамм Az d10, № ВКМ В-2272 Д), взятые из коллекции лаборатории физиологии устойчивости растений Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

Получение бактериальных культур. Твердые среды для *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Bradyrhizobium* составляли по методике, представленной в работе В.А. Берестецкого¹. Среда для бактерий *Cms*, приготовленная на отваре из клубней картофеля, содержала 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л глюкозы, 20 г/л агара (рН = 7,0).

Культивирование бактерий *Azotobacter* проводили на среде Эшби. Бактерии, выращенные на твердых агаросодержащих субстратах, переносили в конические колбы с жидкой минимальной средой, составленной по [27], для адаптации в течение суток, затем в такую же минимальную среду, но содержащую 10 или 100 мкМ N-ФНА. 10 мкМ N-ФНА вносили в среды, где бактерии росли в течение одних суток. В экстрактах из этих сред исследовали продукты деградации вышеуказанного субстрата. При 100 мкМ N-ФНА бактерии росли в течение двух суток, в экстрактах из этих сред определяли оставшееся количество субстрата, чтобы оценить активность деградации указанного соединения бактериями. Титр бактерий в начале роста в обоих вариантах эксперимента составлял $1,5 \cdot 10^3$ кл/мл. Титр определяли исходя из показателей плотности среды с бактериями, измеренной при 675 нм на планшетном спектрофотометре Immunochem-2100 («High Technology Inc.», США).

Изучение жизнеспособности бактерий. Наличие жизнеспособных клеток в культуральных средах контролировали по флуоресценции, позволяющей детектировать наличие мертвых и живых клеток после обработки их последовательно 0,5%-м пропидий йодидом, затем 50 мМ флуоресцеин диацетатом. Для просмотра бактерийсодержащих суспензий использовали инвертированный микроскоп Axio Observer («Carl Zeiss Microscopy», Германия).

Получение экстрактов. Из культуральных сред получали этилацетатные экстракты после отделения сред от бактерий центрифугированием при 8000 g в течение 20 мин при 4 °С и подкисления 2 н HCl до рН = 3,0–4,0. Экстракты упаривали досуха в вакууме в условиях темноты, сухие остатки перерастворяли в небольших объемах этилацетата (для ГХ-МС-анализа) или метанола (для ВЭЖХ-анализа) и помещали в стеклянные бутылочки. Состав продуктов деградации N-ФНА исследовали методом ГХ-МС.

Анализ состава ароматических соединений методом ГХ-МС. Метод ГХ-МС-анализа, использованный для изучения состава соединений, появившихся при деградации N-ФНА, подробно изложен в работе [24]. Для идентификации анализируемых соединений использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7, а также проводили сравнение с аутентичными образцами бис(2-этилгексил)фталата (диоктилфталат, «Sigma-Aldrich», Германия) и дибутилфталата («Реахим», Россия).

Определение содержания N-ФНА методом ВЭЖХ. Данным методом определяли количество неразрушенного бактериями N-ФНА, по которому сравнивали деградирующую активность у бакте-

¹Берестецкий В.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и оценки их эффективности. Л.: ВНИИСХМ, 1976. 31 с.

рий. ВЭЖХ-анализ осуществляли на хроматографе Shimadzu LC-10ATvp с УФ-детектором («Shimadzu», Япония). Условия разделения, детектирования и способы количественных расчетов содержащегося в экстрактах N-ФНА подробно описаны в работе [24].

Статистическая обработка данных. Полученные результаты обрабатывали статистически с вычислением средних значений и стандартных отклонений для них. Эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее на примере бактерий, проникающих в ткани растений гороха – *R. leguminosarum* bv. *viceae* (мутуалист) и *P. syringae* pv. *pisi* (патоген), было показано, что оба вида бактерий способны не только деградировать N-ФНА до фталатов, но и преобразовывать одни виды фталатов в другие, хотя и с разной степенью активности [24]. Результаты, полученные для этих бактерий, частично приведены в таблицах и на рисунке. Вместе с тем было замечено, что у бактерий *C. michiganensis* sps. *sepedonicus*, для которых растения гороха не являются хозяевами, насколько иная реакция на N-ФНА: в начальный период действия на эти бактерии N-ФНА деградирующая активность у них в отношении данного соединения была низкая, но постепенно усиливалась. Следовательно, у бактерий, вступающих в исторически сложившиеся мутуалистические или антагонистические взаимоотношения с растением гороха, метаболические системы более приспособлены к деградации вышеуказанного соединения, а также к воздействию на них продуктов его деградации – фталатов [24].

Для сравнения в табл. 1 приведены новые данные о деградирующей активности в отношении N-ФНА бактерий, которые не способны проникать в ткани гороха. Это бактерии *B. Japunicum*, нодулирующие корни растений сои, также синтезирующие N-ФНА [11]. Исползованный штамм свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Az. chroococcum* устойчив к воздействию дельтометрина – соединения ароматической структуры [28].

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что азотобактер и брадиризобии также способны деградировать N-ФНА с образованием фталатов. Примечательным является то, что в среде с азотобактером 10 мкМ N-ФНА за сутки экспозиции был полностью деградирован до фталатов. В среде с брадиризобиями преобладал N-ФНА, но при этом достаточно высокий процент составляли дибутил- и диоктилфталаты.

Отметим, что при 100 мкМ N-ФНА азотобактер деградировал так же активно, как ризобии. Далее по активности деградации в ряду убывания оказались брадиризобии, псевдомонады и занимающий последнее место в этом ряду кла-

вибактер. На диаграмме представлено процентное содержание N-ФНА в среде с бактериями относительно содержания в культуральной жидкости без бактерий (контроль). Обозначения бактерий такие же, как в табл. 1, данные для бактерий родов *Rhizobium* (Rhiz), *Pseudomonas* (Psp) и *Clavibacter* (Cms) взяты из работы [24].

N-ФНА понижал жизнеспособность всех исследуемых бактерий (табл. 2). Степень этого понижения возрастала с повышением концентрации N-ФНА. Характер реакции на N-ФНА и на повышение его концентрации в ростовых средах у сравниваемых бактерий существенно отличался. Менее всего чувствительными к изменению концентрации от 10 до 100 мкМ N-ФНА оказались ризобии и псевдомонады. В сравнении с контролем у брадиризобий при 10 мкМ N-ФНА снижение жизнеспособности происходило в меньшей степени, чем у представителей четырех других видов бактерий. Однако при изменении концентрации N-ФНА от 10 до 100 мкМ жизнеспособность у брадиризобий снизилась в 7,5 раз. При том же изменении концентрации N-ФНА у клавибактера падение показателя жизнеспособности произошло в меньшей степени – в 2,8 раза. У азотобактера в контроле наблюдался наибольший по сравнению с другими бактериями показатель жизнеспособности, под влиянием N-ФНА он оказался минимальным уже при концентрации N-ФНА 10 мкМ и еще немного снизился при концентрации 100 мкМ.

Сопоставление данных о деградирующей активности в отношении N-ФНА и влиянии последнего на жизнеспособность штаммов сравниваемых видов бактерий позволяет увидеть несоответствия между их показателями. Возможным объяснением будут результаты исследования у представителей этих видов бактерий степени (полноты) деградации изучаемого ароматического соединения. Известно, что многие виды бактерий способны полностью расщеплять ароматические структуры до ациклических кислот, используемых далее в общих метаболических процессах [12–16]. При этом у одних представителей бактериальной микрофлоры ферментные системы, необходимые для деградации ароматических соединений, индуцируются с их появлением в среде, а у других указанные ферменты синтезируются конститутивно [19]. Деградация полициклических соединений осуществляется в основном по двум путям: по пути образования катехола и по фталатному пути [5, 14]. Фталатный путь при этом может завершаться расщеплением протокатеховой кислоты до β-карбоксис-цис-цис-мукона при участии фермента протокатехоат оксигеназы (ЕС 1.13.11.3) [16]. Наличие возможности у бактерий для более полного расщепления ПАУ позволяет использовать данные соединения в качестве трофического материала. С другой стороны, отдельные этапы процессов

расщепления ПАУ требуют затрат энергии [13, 14]. Не исключено, что в случае, когда ПАУ является единственным углеводородным источ-

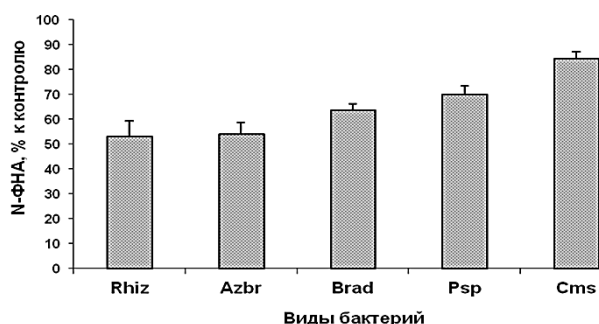
ником питания для бактерий, то прохождение полного цикла их расщепления может приводить к снижению их жизнеспособности.

Таблица 1. Состав продуктов деструкции 10 мкМ N-фенил-2-нафтиламина в этилацетатных экстрактах из ростовой среды бактерий после экспозиции в течение суток

Table 1. Composition of 10 µM N-phenyl-2-naphthylamine destruction products in ethyl acetate extracts from bacteria growth medium after 1 day of exposure

Соединение	$t_{уд.}$, мин	Ver., %	S, %				
			Rhiz*	Psp*	Cms*	Azbr	Brad
Фталевый ангидрид	8,0	50,5	0,3	0,2	0,7	–	0,4
Диэтилфталат	14,1	35,0	–	–	–	8,4	–
Бутилтетрадецилфталат	19,7	13,3	–	–	2,3	–	1,6
Бутилоктилфталат	19,9	11,8	–	–	–	3,3	–
Дибутилфталат	21,6	29,3	3,2	74,0	19,3	100	41,4
N-фенил-2-нафтиламин	26,6	47,5	30,2	100	100	–	100
Диоктилфталат	31,7	71,5	100	60,1	–	57,7	31,2
Бс(7-метилоктил)фталат	35,0	65,9	1,2	–	–	–	–

Примечание. $t_{уд.}$ – время удерживания; Ver. – вероятность, %; S – относительная площадь пика, %, для бактерий: Rhiz – *R. leguminosarum* bv. *viceae*; Psp – *P. syringae* pv. *pisi*; Cms – *C. michiganensis* sps. *sepedonicus*; Azbr – *Az. chroococcum*; Brad – *B. japonicum*. Для S приведены средние показатели, стандартные отклонения для которых не превышали 10%. * – данные взяты из работы [24].



Содержание N-ФНА в среде роста бактерий через двое суток экспозиции

N-PNA content in the bacteria growth medium after 2 days of exposure

Для суждения о возможности полной деградации N-ФНА у представителей исследуемых видов бактерий пока недостаточно данных. Сведения, приведенные в сообщении на Всероссийской научной конференции (2019 г.) [29], свидетельствуют о конститутивном синтезе протокатехоат оксигеназы в клетках *B. japonicum* и *C. Michiganensis* sps. *sepedonicus*, а у *R. Leguminosarum* bv. *viceae* и *P. syringae* pv. *pisi* синтез данного фермента может индуцироваться нарингенином. У бактерий *Az. chroococcum* активность протокатехоат оксигеназы выявлена нами как при их росте без N-ФНА, так и в его присутствии (данные не опубликованы). Протокатехоат оксигеназа из *Az. vinelandii* была очищена и изучена после выращивания этих бактерий на среде с п-гидроксibenзоатом [30].

Таблица 2. Процент жизнеспособных клеток в составе аутоагрегатов бактерий, росших в течение суток в планктонных культурах без внесения (контроль) и с внесением в среду 10 и 100 мкМ N-ФНА

Table 2. Percentage of viable cells in the bacterial self-aggregates after 1 day grew in planktonic cultures in the absence (control) and in the presence of 10 and 100 µM N-PNA in the medium

Вариант	Вид бактерий				
	Rhiz*	Psp*	Cms*	Brad	Azbr
Контроль	8,2±1,7	15,0±4,7	17,5±3,5	11,2±3,1	18,8±6,3
10 мкМ N-ФНА	3,2±1,2	4,8±2,2	11,0±3,2	9,8±5,1	1,1±0,5
100 мкМ N-ФНА	3,0±0,7	3,5±1,2	4,0±1,6	1,3±0,5	0,8±0,3

Обозначения бактерий те же, что и в табл. 1. * – данные взяты из работы [24].

ВЫВОДЫ

1. Исследованные штаммы почвенных бактерий *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *B. Japonicum*, *P. syringae* pv. *pisi*, *C. michiganensis* sps. *Sepe-donicus*, *Az. chroococcum* способны деградировать с образованием фталатов негативное аллелопатическое соединение N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА), появление которого в почве возможно вследствие его техногенного (продукты химической промышленности) и биогенного про-

исхождения (источники – растения, его синтезирующие).

2. Наиболее высокую деградирующую активность в отношении N-ФНА показали бактерии *Rhizobium*, вступающие в эндосимбиотические отношения с синтезирующими вышеназванное соединение растениями гороха, и свободноживущие азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*.

3. N-ФНА снижал жизнеспособность всех

штаммов бактерий, но в разной степени. В наибольшей мере негативное действие N-ФНА сказалось на жизнеспособности бактерий рода *Azotobacter*, показавшего при этом высокую деградирующую активность в отношении указанного соединения. Зависимость эффекта негативно-

го влияния на жизнеспособность от концентрации N-ФНА оказалась слабо выраженной у бактерий родов *Rhizobium* и *Pseudomonas*, а у бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Clavibacter* она оказалась существенной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Grott M., Jung K., Ovari A., et al. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants // *Environmental Science & Technology*. 2006. Vol. 40. Issue 19. P. 6163–6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>
2. Hauser R., Calafat A.M. Phthalates and human health // *Occupational and Environmental Medicine*. 2005. Vol. 62. Issue 11. P. 806–818. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>
3. Mankidy R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P. Biological impact of phthalates // *Toxicology Letters*. 2013. Vol. 217. Issue 1. P. 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>
4. Dobrzynska M.M. Phthalates – widespread occurrence and the effect on male gametes. Part 1. General characteristics, sources and human exposure // *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2016. Vol. 67. Issue 2. P. 97–103.
5. Yu R., Li B.-G., Ye Q., Zhang G.-I. A novel alkaloid *Mitrephora maingayi* // *Natural Product Research*. 2005. Vol. 19. Issue 4. P. 359–362. <https://doi.org/10.1080/14786410412331280104>
6. Султанходжаев М.Н., Таджибаев М.М. Фенил-β-нафтиламин из трех видов растений // *Химия природных соединений*. 1976. Т. 12. Вып. 3. С. 406.
7. Евстратова Р.И., Запесочная Г.Г. N-фенил-2-нафтиламин из *Centaurea salnitana* // *Химия природных соединений*. 1977. Т. 13. Вып. 4. С. 582.
8. Жанаева Т.А., Кривошекова О.Е., Семенов А.А., Минаева В.Г. N-фенил-2-нафтиламин из цветков *Vupleurum aureum* // *Химия природных соединений*. 1989. Т. 25. Вып. 3. С. 377.
9. Shi D.Y., Han L.J., Sun J., Wang Y., Yang Y.C., Shi J.G., et al. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorsa* // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2005. Vol. 30. Issue 5. P. 347–350.
10. Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F. Allelopathic interactions between *Potamogeton maackia* and *Microcystis aeruginosa* // *Allelopathy Journal*. 2007. Vol. 20. Issue 2. P. 327–338.
11. Makarova L.E., Smirnov V.I., Klyba L.V., Petrova I.G., Dudareva L.V. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48. Issue 4. P. 355–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>
12. Keyser P., Pujar B.G., Eaton R.W., Ribbons D.W. Biodegradation of phthalates and their esters by bacteria // *Environmental Health Perspectives*. 1976. Vol. 18. P. 159–166. <https://doi.org/10.1289/ehp.7618159>
13. Kiyohra H., Nagao K. The catabolism of phenantrene and naphthalene by bacteria // *The Journal of General Microbiology*. 1978. Vol. 105. Issue 1. P. 69–75. <https://doi.org/10.1099/00221287-105-1-69>
14. Puntus I.F., Filonov A.E., Akhmetov L.I., Karpov A.V., Boronin A.M. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems // *Microbiology*. 2008. Vol. 77. Issue 1. P. 7–15. <https://doi.org/10.1007/s11021-008-1002-9>
15. Seo J.-S., Keum Y.-S., Li Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2009. Vol. 6. Issue 1. P. 279–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
16. Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. Phthalates biodegradation in the environment // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. Vol. 80. Issue 2. P. 183–198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
17. Eaton R.W., Ribbons D.W. Metabolism of dibutylphthalate and phthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B // *Journal of Bacteriology*. 1982. Vol. 151. Issue 1. P. 48–57. <https://doi.org/10.1128/JB.151.1.48-57.1982>
18. Al-Bari M.A.A., Sayeed M.A., Rahman M.S., Mossadik M.A. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshensis* a novel species collected in Bangladesh // *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2006. Vol. 1. Issue 2. P. 77–81.
19. Babu B., Wu J.-T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria // *Science of the Total Environment*. 2010. Vol. 408. Issue 21. P. 4969–4975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.032>
20. Parke D., Ornston L.N. Enzymes of the β-ketoadipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. // *Journal of Bacteriology*. 1986. Vol. 165. Issue 1. P. 288–292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>
21. Husein A.I., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Jondi W.J., Zatar N.A.-A. Phthalate derivatives are naturally occurring in *Arum palaestinum* // *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2014. Vol. 2. Issue 9. P. 195–203.
22. Enikeev A.G., Semenov A.A., Permyakov

- A.V., Sokolova N.A., Gamborg K.Z., Dudareva L.V. Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. Vol. 55. Issue 3. P. 294–297. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020066>
23. Shafikova T.N., Omelichkina Y.V., Enikeev A.G., Boyarkina S.V., Gvildis D.E., Semenov A.A. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation // *Doklady Biological Sciences*. 2018. Vol. 480. Issue 3. P. 107–109. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>
24. Makarova L.E., Morits A.S., Sokolova N.A., Petrova I.G., Semenov A.A., Dudareva L.V., et al. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. Issue 2. P. 202–210. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>
25. Weiss T., Bolt H.M., Schlüter G., Koslitz S., Taeger D., Welge P., et al. Metabolic dephenylation of the rubber antioxidant N-phenyl-2-naphthylamine to carcinogenic 2-naphthylamine in rats // *Archives of Toxicology*. 2013. Vol. 87. Issue 7. P. 1265–1272. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1025-5>
26. Marek E.M., Koslitz S., Weiss T., Fartasch M., Schlüter G., Kafferlein H.U., et al. Quantification of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatography and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption ex vivo under workplace conditions // *Archives of Toxicology*. 2017. Vol. 91. Issue 11. P. 3587–3596. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>
27. Hartwig U.A., Joseph C.M., Phillips D.A. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti* // *Plant Physiology*. 1991. Vol. 95. Issue 3. P. 797–803. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.95.3.797>
28. Пат. № 2231546, Российская Федерация. Штамм бактерий AZ D10 ВКМ В-2272, обладающий ростстимулирующими свойствами и устойчивый к дельтаметрину / О.Б. Вайшля, А.А. Бондаренко; патентообладатель Томский государственный университет; заявл. 28.08.2002; опубл. 27.06.2004.
29. Макарова Л.Е., Мориц А.С. Изучение участия протокатехоат оксигеназы в деградации N-фенил-2-нафтиламина и нарингенина у *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Bradyrhizobium japonicum* и *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тез. докл. Всерос. науч. конф. с междунар. участием (Иркутск, 04–07 июня 2019 г.). Иркутск: Изд-во ИГУ, 2019 г. С. 72–74.
30. Durham D.R., Stirling L.A., Ornston L.N., Perry J.J. Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii* // *Biochemistry*. 1980. Vol. 19. Issue 1. P. 149–155. <https://doi.org/10.1021/bi00542a023>
- ### REFERENCES
1. Altenburger R, Brack W, Greco WR, Grott M, Jung K, Ovari A, et al. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants. *Environmental Science & Technology*. 2006;40(19):6163–6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>
2. Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occupational and Environmental Medicine*. 2005;62(11):806–818. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>
3. Mankidy R, Wiseman S, Ma H, Giesy JP. Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*. 2013;217(1):50–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>
4. Dobrzynska MM. Phthalates – widespread occurrence and the effect on male gametes. Part 1. General characteristics, sources and human exposure. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2016;67(2):97–103.
5. Yu R, Li B-G, Ye Q, Zhang G-I. A novel alkaloid *Mitrephora maingayi*. *Natural Product Research*. 2005;19(4):359–362. <https://doi.org/10.1080/14786410412331280104>
6. Sultankhodzhaev MN., Tadzhibaev MM. N-phenyl-β-naphthylamine from three species of plants. *Khimiya prirodnikh soedinenii*. 1976;12(3):406. (In Russian)
7. Evstratova R.I., Zapesochaya G.G. N-phenyl-β-naphthylamine from *Centaurea salonitana*. *Khimiya prirodnikh soedinenii*. 1977;13(4):582. (In Russian)
8. Zhanaeva TA, Krivoshchekova OE, Semenov AA, Minaeva VG. N-phenyl-2-naphthylamine from *Bupleurum aureum* flowers. *Khimiya prirodnikh soedinenii*. 1989;25(3):377. (In Russian)
9. Shi DY, Han LJ, Sun J, Wang Y, Yang YC, Shi JG, et al. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorsa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* = *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2005;30(5):347–350. (In Chinese)
10. Wu ZB, Zhang SH, Wu XH, Cheng SP, He F. Allelopathic interactions between *Potamogeton maackia* and *Microcystis aeruginosa*. *Allelopathy Journal*. 2007;20(2):327–338.
11. Makarova LE, Smirnov VI, Klyba LV, Petrova IG, Dudareva LV. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012;48(4):355–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>
12. Keyser P., Pujar B.G., Eaton R.W., Ribbons D.W. Biodegradation of phthalates and their esters by bacteria // *Environmental Health Perspectives*. 1976. Vol. 18. P. 159–166. <https://doi.org/10.1289/ehp.7618159>
13. Kiyohra H, Nagao K. The catabolism of phen-

antrene and naphthalene by bacteria. *The Journal of General Microbiology*. 1978;105(1):69–75. <https://doi.org/10.1099/00221287-105-1-69>

14. Puntus IF, Filonov AE, Akhmetov LI, Karpov AV, Boronin AM. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems. *Microbiology*. 2008;77(1):7–15. <https://doi.org/10.1007/s11021-008-1002-9>

15. Seo J-S, Keum Y-S, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2009;6(1):279–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>

16. Liang D-W, Zhang T, Fang HHP, He J. Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;80(2):183–198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>

17. Eaton RW, Ribbons DW. Metabolism of dibutylphthalate and phthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B. *Journal of Bacteriology*. 1982;151(1):48–57. <https://doi.org/10.1128/JB.151.1.48-57.1982>

18. Al-Bari MAA, Sayeed MA, Rahman MS, Mosadik MA. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis* a novel species collected in Bangladesh // *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2006;1(2):77–81.

19. Babu B, Wu J-T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. *Science of the Total Environment*. 2010;408(21):4969–4975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.032>

20. Parke D, Ornston LN. Enzymes of the β -ketoadipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. *Journal of Bacteriology*. 1986;165(1):288–292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>

21. Husein AI, Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Jondi WJ, Zatar NA-A. Phthalate derivatives are naturally occurring in *Arum palaestinum*. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2014;2(9):195–203.

22. Enikeev AG, Semenov AA, Permyakov AV, Sokolova NA, Gamburg KZ, Dudareva LV. Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(3):294–297. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020066>

23. Shafikova TN, Omelichkina YV, Enikeev AG, Boyarkina SV, Gvildis DE, Semenov AA. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation. *Doklady Biological Sci-*

ences. 2018;480(3):107–109. <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>

24. Makarova LE, Morits AS, Sokolova NA, Petrova IG, Semenov AA, Dudareva LV, et al. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(2):202–210. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>

25. Weiss T, Bolt HM, Schlüter G, Koslitz S, Taeger D, Welge P, et al. Metabolic dephenylation of the rubber antioxidant N-phenyl-2-naphthylamine to carcinogenic 2-naphthylamine in rats // *Archives of Toxicology*. 2013;87(7):1265–1272. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1025-5>

26. Marek EM, Koslitz S, Weiss T, Fartasch M, Schlüter G, Käßler HU, et al. Quantification of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatography and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption ex vivo under workplace conditions. *Archives of Toxicology*. 2017;91(11):3587–3596. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>

27. Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*. 1991;95(3):797–803. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.95.3.797>

28. Vajshlja OB, Bondarenko AA. *Strain of bacterium AZ D10 VKM B-2272 eliciting growth-stimulating properties and resistant to deltamethrin*. Patent RF no. 2231546; 2002 (In Russian)

29. Makarova LE, Morits AS. Study of protocatechoate oxygenase participation in N-phenyl-2-naphthylamine and naringenin degradation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*. In: *Mekhanizmy adaptatsii mikroorganizmov k razlichnym usloviyam sredy obitaniya: tezisy dokladov Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem = Adaptation mechanisms of microorganisms to various environmental conditions: Proceedings of the All-Russian Scientific Conference with International Participation*. 04–07 June 2019, Irkutsk. Irkutsk: Irkutsk State University; 2019, p. 72–74 (In Russian)

30. Durham DR, Stirling LA, Ornston LN, Perry JJ. Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*. 1980;19(1):149–155. <https://doi.org/10.1021/bi00542a023>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Макарова Людмила Евгеньевна,
д.б.н., главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lyudmila E. Makarova,
Dr. Sci. (of Biology), Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,

Российская Федерация,
✉ e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Мориц Анна Сергеевна,
ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация

Соколова Наталья Александровна,
ведущий технолог,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 09.03.2020.
Одобрена после рецензирования 26.04.2020;
Принята к публикации 28.02.2021.*

Russian Federation,
✉ e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Anna S. Morits,
Lead Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation

Natalia A. Sokolova,
Lead Technologist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 09.03.2020.
Approved after reviewing 26.04.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*