

Зорина Анастасия Сергеевна

**БИОПЛЕНКИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ
ALCALIGENES FAECALIS 2 И *RHODOCOCCLUS RUBER* GT 1
В ПРОЦЕССАХ ТРАНСФОРМАЦИИ
НИТРИЛОВ И АМИДОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ**

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Максимова Юлия Геннадьевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, доцент кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Высшей школы биологии центра биологии и педагогического образования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Каюмов Айрат Рашитович

доктор медицинских наук, начальник отделения препаратов бактериотерапии АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» филиал в г. Пермь «Пермское научно-производственное объединение «Биомед»

Несчисляев Валерий Александрович

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68)

Защита диссертации состоится _____ 2020 г. в _____.00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последние годы большое внимание уделяется биокаталитическому гидролизу нитрилов карбоновых кислот. Этот процесс может быть применен как с целью получения коммерчески значимых амидов и карбоновых кислот, так и с целью очистки сточных вод и отходящих газов от токсичных соединений. Биокаталитические технологии выделяются в число приоритетных направлений, как правило, за счёт экономической и экологической выгоды, а также простоты использования по сравнению с химическими процессами (Vejvoda *et al.*, 2006; Yeom *et al.*, 2007; Reisner *et al.*, 2006). Химические способы очистки заключаются в окислении нитрилов под действием различных катализаторов и часто дают побочные продукты в виде аммиака и соединений аммония. Более того, использование химических способов не позволяет достигать стопроцентной очистки воды от нитрилов, а получение катализаторов часто является сложным процессом. В связи с существующими недостатками химических способов требуется разработка биологической очистки сточных вод от нитрилов. Более того, наблюдается активный переход от использования иммобилизованных ферментов и целых клеток к применению биопленок микроорганизмов как самоподдерживающихся систем.

Нитрилы имеют большое значение в органическом синтезе, широко используются во многих отраслях промышленности в качестве растворителей, экстрагентов, сырья для получения лекарственных средств. Большие объёмы производства и использования различных нитрилов, в частности ацето- и акрилонитрила, приводят к попаданию этих токсичных соединений в окружающую среду. Поскольку многие нитрилы являются высокотоксичными, мутагенными и канцерогенными веществами, насущной задачей является развитие и совершенствование современных методов биологической очистки сточных вод от этих соединений. К сожалению, биологическая очистка имеет ограничения, особенно когда целевые соединения являются токсичными, летучими и присутствуют в высоких концентрациях.

Биопленки микроорганизмов являются предпочтительными для очистки загрязнённых стоков, поскольку прикрепленные микроорганизмы более устойчивы к токсичным веществам. Кроме того, биопленки, используемые в качестве биокатализаторов, обладают рядом других преимуществ, среди которых можно выделить более продолжительную непрерывную и стабильную работу; достижение высоких концентраций биомассы; низкие капитальные и операционные затраты; отсутствие вымывания или незначительное вымывание клеток; возможность работы со смешанными культурами без асептических условий.

На сегодняшний день изолированы и селекционированы нитрилгидролизующие микроорганизмы, способные трансформировать широкий спектр нитрилов и амидов в одну или две стадии. Способность к трансформации нитрилов была обнаружена впервые у грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gibberella* и *Fusarium*, а впоследствии и у представителей родов бактерий *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Comamonas*, *Gordonia*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и др. (Martínková *et al.*, 2009, 2019; Asano, Kaul, 2012; Velankar *et al.*, 2010; Rapheeha *et al.*, 2017). На основе нитрилгидролизующих микроорганизмов разработаны и изучены различные биотехнологические процессы, включающие синтез амидов и/или карбоновых кислот из нитрилов, а также биodeградацию нитрилов до безвредных соединений, которая используется для очистки сточных вод.

Однако все более ужесточающиеся требования к очистке производственных стоков требуют разработки новых, более эффективных решений в этой области. Для управления процессами биологической очистки необходимы знания о физиологических особенностях клеток, растущих в прикрепленном состоянии, следовательно, изучение физиологических особенностей моно- и двувидовых биопленок нитрилутилизующих бактерий в процессах деградации нитрильных и амидных соединений представляется актуальным.

Цель настоящего исследования – охарактеризовать особенности физиологии клеток нитрилгидролизующих бактерий в составе моно- и двувидовых биопленок, способных к трансформации акриламида, акрило- и ацетонитрила, а также разработать способ очистки воды от нитрилов карбоновых кислот в реакторе погружного типа на основе биопленок этих бактерий.

Основные задачи исследования

1. Охарактеризовать ростовые и физиологические показатели клеток нитрилгидролизующих бактерий в составе моно- и двувидовых биопленок при оптимальных условиях культивирования и в условиях воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды.

2. Оценить энергетический статус, жизнеспособность и массивность полисахаридного каркаса матрикса биопленок нитрилгидролизующих бактерий при взаимном влиянии друга на друга.

3. Провести трансформацию акриламида, ацето- и акрилонитрила биопленками нитрилгидролизующих бактерий, выращенными на углеродных и базальтовых волокнах разного диаметра, и оценить возможность использования данных биокатализаторов для получения коммерчески значимых продуктов.

4. Охарактеризовать процесс деградации нитрилов в реакторе погружного типа на основе двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на базальтовом волокне и активированных углеродных волокнах.

Научная новизна. Впервые всесторонне охарактеризованы физиологические и ростовые параметры моно- и двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий: динамика роста, жизнеспособность, энергетический статус клеток, массивность полисахаридного каркаса матрикса, дисперсия клеток в оптимальных и неблагоприятных условиях. Показано взаимное влияние штаммов *Rhodococcus ruber* gt 1 и *Alcaligenes faecalis* 2 на биопленкообразование и устойчивость к разрушению (вследствие естественной миграции клеток из биопленки) как при совместном росте в смешанной культуре, так и при росте в монокультуре при внесении культуральной жидкости другого штамма-партнера. Выявлена усиленная выработка полисахаридного каркаса матрикса клетками *Al. faecalis* 2, приводящая к увеличению общего объема биопленки, в ответ на воздействие культуральной жидкости штамма-партнера *R. ruber* gt 1, содержащей метаболиты и аутоиндукторы. Показано, что в биопленке смешанной культуры клетки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 более жизнеспособны по сравнению с клетками в составе соответствующих монопленок и выживают в условиях высокой концентрации токсичного субстрата, голодания, отклонения температуры от оптимума и высушивания. Выявлено, что двувидовая биопленка более стабильна, чем монопленки соответствующих культур.

Проведена трансформация ацето- и акрилонитрила в системе реактора погружного типа на основе двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на базальтовом волокне, активированных углеродных волокнах и смешанном носителе из чередующихся слоев базальтового и углеродного волокна. Показана эффективность очистки воды от нитрилов в сконструированном реакторе на протяжении 3000 часов непрерывной работы.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты диссертационной работы расширяют представление о физиологических особенностях клеток нитрилгидролизующих бактерий, растущих в прикрепленном состоянии. На примере двух высокопродуктивных штаммов нитрилгидролизующих бактерий, различающихся по грамм-принадлежности, показаны закономерности развития двувидовой биопленки: рост, выработка полисахаридного каркаса матрикса, дисперсия и разрушение. Показана более выраженная жизнеспособность клеток, входящих в состав двувидовой биопленки, а также стабильность самой биопленки в условиях высокой концентрации токсичного субстрата;

голодания; отклонения температуры от оптимума и высушивания. Полученные данные могут служить теоретической основой для разработки биокатализаторов – смешанных биопленок как для получения органических веществ путем биохимической трансформации, так и для очистки сточных вод, содержащих повышенные концентрации токсичных веществ.

Сконструирован реактор погружного типа на основе двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на базальтовых или углеродных волокнах, а также монопленок нитрилгидролизующих бактерий на базальтовых и углеродных волокнах, уложенных слоями. Разработан способ очистки воды от нитрилов карбоновых кислот в реакторе такого типа. Показана трансформация ацетонитрила до менее токсичного соединения – уксусной кислоты, а в некоторых вариантах и полная минерализация акрило- и ацетонитрила в системе реактора погружного типа на основе биопленок нитрилгидролизующих бактерий. Предложенный биореактор может быть использован в системе очистки стоков специализированных предприятий. Полученные данные использованы в лекционных курсах для студентов бакалавриата и магистратуры биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Грамотрицательные протеобактерии *Al. faecalis* 2 и грамположительные актинобактерии *R. ruber* gt 1 формируют устойчивую двувидовую биопленку при росте на минеральной среде с глюкозой и ацетамидом в качестве источников углерода. В бинарной биопленке *Al. faecalis* 2 выступает в качестве первичного колонизатора, а *R. ruber* gt 1 – вторичного колонизатора.

2. Штаммы *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 оказывают положительное взаимное влияние на образование биопленки и ее устойчивость к диспергированию. Клетки в двувидовой биопленке *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 более устойчивы к неблагоприятным факторам (высушиванию, повышенной температуре, воздействию токсичного субстрата, голоданию), чем клетки монопленок.

3. Биопленки штаммов *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 эффективно утилизируют акрило- и ацетонитрил в системе реактора погружного типа с образованием нетоксичных соединений или с накоплением небольшого количества соответствующей кислоты, а также могут быть использованы для получения коммерчески значимых продуктов.

Апробация работы и публикации. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на Международной конференции «Biofilms7» (Порту, Португалия, 2016); I-ом Российском Микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017); X Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз – Россия» (Казань, 2017); II-ой Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018); 12-ой международной конференции «Биокатализ. Основы и применения» (Санкт-Петербург – Валаам – Кижы, 2019); Всероссийской конференции с международным участием «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019).

Результаты проведенных исследований опубликованы в 17 научных работах: 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 3 публикации в журналах, входящих в базу Scopus и Web of Sciences, а также тезисы 12 докладов.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка и 2 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, 2 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Список литературы включает 212 источников, из них 38 отечественных и 174 зарубежных авторов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» и является частью исследований, проводимых по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1. Работа поддержана программой Уральского отделения Российской академии наук № 18-3-38-2119, блок: 18-3-8-19 «Биодеструкция экологически опасных органических соединений в гомогенной и гетерогенной среде» (№ 0422-2018-1136) и грантом «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К) 4267ГУ1/2014 от 28.11.2014. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора. Электронная микроскопия образцов выполнена в лаборатории геологии месторождений полезных ископаемых Горного института УрО РАН – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН. Метагеномный анализ образцов выполнен в ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Посвящена обзору литературы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом исследования явились *Al. faecalis* 2, обладающий выраженной амидазной активностью, и *R. ruber* gt 1 с высокой нитрилгидратазной активностью, выделенные из активного ила коммунально-бытовых биологических очистных сооружений (Демаков и др., 2015) и антропогенно-загрязненной почвы Пермского края (Максимов и др., 2003) соответственно, и селекционированные в лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Среды и субстраты для культивирования. Бактериальные штаммы культивировали на синтетической среде N следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,6; NaCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,005; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; pH 7,2 ± 0,2. В качестве источника углерода для *R. ruber* gt 1 использовали глюкозу в концентрации 0,1%, в качестве источника азота – 0,01 М NH_4Cl . Для *Al. faecalis* 2 в качестве источника углерода и азота использовали 0,1 М ацетамид. При выращивании смешанной культуры и двувидовой биопленки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 в минеральную основу вносили глюкозу в концентрации 0,1%, 0,1 М ацетамид и 0,01 М NH_4Cl .

Добавки асептически вносили в стерильную среду. Чистоту культур контролировали высевом на агаризованную среду LB (Лурия-Бертани), содержащую (г/л): триптон – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 10, агар – 15.

Условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик. В автоклавированную при 121°C среду N асептически добавляли источники углерода и азота и микроэлементы. Клетки бактерий выращивали в 50 мл среды N в конических колбах объемом 100 мл на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью вращения 120 об/мин и температуре 28–30°C.

Бактериальный рост оценивали по изменению оптической плотности суспензии клеток при $\lambda=540$ нм с учетом разведения на фотоэлектроколориметре КФК-3 с использованием 0,5 см кюветы, либо на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro с использованием кварцевой 1 см кюветы. Абсолютно сухую биомассу определяли путем взвешивания на аналитических весах предварительно отцентрифугированных в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин и высушенных до постоянной массы клеток.

Рост бактерий в биопленках. В лунки полистерольного плоскодонного 96-луночного планшета (Медполимер, Санкт-Петербург, Россия) вносили 150 мкл синтетической минеральной среды N и инокулировали 10 мкл суспензии нитрилутилизующих бактерий, содержащей $(2,0 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл. Для изучения

влияния штаммов нитрилгидролизующих бактерий друг на друга вносили 25 мкл культуральной жидкости предварительно выращенных штаммов.

Биопленки выращивали 1–7 суток в термостате при 28–30°C без перемешивания. После планктонные клетки удаляли из лунок декантацией, отмывали биопленку 200 мкл калий-фосфатного буфера дважды и определяли биопленкообразование, массивность полисахаридного каркаса матрикса, энергетический статус клеток биопленок.

Культивирование биопленок на сорбентах осуществляли в 100 мл среды N в конических колбах объемом 250 мл. Среда N предварительно автоклавились с 1 г углеродного носителя или с 3,5–7 г базальтового носителя. В среду асептически добавляли источники углерода и азота и микроэлементы и инокулировали 4 мл бактериальной культуры ($(2,0 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл). Культивирование осуществляли на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью вращения 120 об/мин и температуре 28–30°C.

Культивирование биопленок на предметных стеклах (25×75 мм) осуществляли в 40 мл среды N в чашках Петри. В среду асептически добавляли источники углерода и азота и микроэлементы и инокулировали 1 мл бактериальной культуры ($(2,0 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл). Культивирование осуществляли в течение 2–7 суток в термостате при температуре 28–30°C.

Оценка биопленкообразования. Биопленки, выращенные на полистерольных плоскодонных 96-луночных планшетах, окрашивали 150 мкл 0,1% кристаллического фиолетового в течение 40 мин в темноте, удаляли краситель, отмывали биопленку 1 раз 200 мкл калий-фосфатного буфера и экстрагировали краситель 200 мкл 96% спирта. В качестве контроля краситель вносили в пустую лунку, удаляли и отмывали, как описано выше. Биопленкообразование оценивали по оптической плотности раствора красителя при $\lambda = 540$ нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro (TECAN, Швейцария).

Окраска полисахаридного каркаса матрикса. Биопленки, выращенные в лунках черного непрозрачного планшета (Nunc, Дания), окрашивали 150 мкл водного раствора конА-тетраметилпродамина (“Invitrogen”, Life Technologies, США) (500 мкг/мл) в течение 40 мин в темноте, удаляли краситель, отмывали биопленку 1 раз 150 мкл 0,9% NaCl. В качестве контроля краситель вносили в пустую лунку, удаляли и отмывали, как описано выше. Массивность полисахаридного каркаса матрикса оценивали по интенсивности флюоресценции биопленки на планшетном ридере Infinite M1000 pro (TECAN, Швейцария) при λ возбуждения/испускания 555/580 нм.

Определение концентрации АТФ в бактериальных клетках биолюминесцентным методом. Для оценки энергетического статуса клеток к биопленкам добавляли 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и экстрагировали АТФ в течение 15 мин на льду. Концентрацию АТФ определяли, используя стандартный набор реактивов (ATP Bioluminescent Assay Kit, Sigma). Пробы разводили в 10 раз деионизированной водой, смешивали 100 мкл образца с 100 мкл реагента, содержащего люциферин и люциферазу светляков. Интенсивность свечения измеряли на планшетном ридере Infinite M1000 pro (TECAN, Швейцария). Количество АТФ пересчитывали по калибровочной кривой.

Чтобы оценить влияние токсичного субстрата на биопленки нитрилгидролизующих бактерий, их выращивали в плоскодонном 24-луночном планшете (Eppendorf, США), планктонные клетки отделяли от семисуточных биопленок и переносили в пустые лунки. Биопленки промывали 1 мл фосфатного буфера дважды, вносили 1 мл буфера, в который добавляли ацетонитрил до конечной концентрации 1,3 М. Субстрат в той же концентрации вносили в суспензию планктонных клеток. После 10 циклов 10 мин и 24 ч экспозиции раствор с биопленок удаляли декантацией, а суспензию центрифугировали в планшетах 20 мин при 2500 g. Супернатант удаляли, к биопленкам и осадку клеток добавляли 1 мл ДМСО. Через 15 мин пробы отбирали, замораживали и хранили при –18°C.

Получение бесклеточной культуральной жидкости. Бесклеточную культуральную жидкость получали центрифугированием бактериальных культур 2-х, 4-х и

7-ми сут роста, и фильтрацией надосадочной жидкости через мембранный фильтр Millex®-GS (Merck Millipore Ltd, Ирландия) с размером пор 0,22 мкм.

Конструирование реактора погружного типа и трансформация нитрилов в реакторе. Деграцию акрилонитрила и ацетонитрила биопленками нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на углеродных и минеральных носителях, проводили в лабораторном реакторе с погруженным уплотненным слоем при скорости потока 6 мл/мин. Реактор состоял из полипропиленовой колонки общим объемом 40,84 мл и колбы на 250 мл, содержащей 200 мл калий-фосфатного буфера. Общий объем циркулирующей жидкости подавался через реактор с помощью перистальтического насоса LS 301 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург, Россия). Носители с биопленками нитрилгидролизующих бактерий были упакованы в биофильтр. В качестве носителей использовали минеральные волокна диаметром 4–12 мкм и 22 мкм в количестве 7 г и углеродное волокно в количестве 1 г. В случае использования биофильтра на основе двух разных носителей использовали уложенные слоями минеральные волокна диаметром 4–12 мкм и углеродные волокна в количестве 0,5 г (биофильтр типа «сэндвич»). В течение всего эксперимента ежедневно добавляли акрило- или ацетонитрил (95%) в количестве 4 мл/сут (16,2 г/л и 15,7 г/л соответственно).

Синтез концентрированных растворов акриламида и акриловой кислоты. Синтез акриламида и акриловой кислоты катализировали биопленками *R. ruber* gt1 и *Al. faecalis* 2, внося акрилонитрил / акриламид до концентрации 2% / 100 мМ с периодичностью 30 мин / 24 ч соответственно в 100 мл калий-фосфатного буфера (pH 7,2±0,2) при 30°C и перемешивании на шейкере (90 об/мин). Пробу в количестве 1 мл отбирали до внесения субстрата, останавливали реакцию 50 мкл концентрированной HCl и центрифугировали при 14000 g, надосадочную жидкость отбирали для определения продуктов реакции методом ГХ.

Газовая хроматография. Продукты трансформации акрило- и ацетонитрила определяли методом ГХ на хроматографе GC-2014 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой Полисорб-1 длиной 2 м. В качестве газа-носителя использовали азот, скорость потока составляла 35 мл/мин. Ацетонитрил и продукты его трансформации определяли при 180°C, акрилонитрил и продукты его трансформации – при 190°C.

Микроскопия. *Световая микроскопия.* Общий вид биопленок изучали под микроскопом «Биомед-6» (Россия) с 10-кратным увеличением объектива.

Флуоресцентная микроскопия. Биопленки выращивали в чашках Петри на предметных стеклах (25×75 мм), инокулируя среду N клетками соответствующего штамма. Биопленки бактерий окрашивали красителем LIVE/DEAD® (Syto 9/пропидиум иодид) BacLight™ Bacterial Viability Kits (“Invitrogen”, Life Technologies, США) из расчета 3 мкл смеси красителя на 1 мл физиологического раствора (0,9% NaCl) и отдельно конканавалин А-тетраметилпроламином (“Invitrogen”, Life Technologies, США) (500 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 20 и 40 мин соответственно и просматривали в световом микроскопе Leica DM LS с флуоресценцией. Длины волн λ возбуждения/испускания для Syto 9 составляют 480/500 нм, для пропидиум иодида – 490/635 нм, для конА-тетраметилпроламина – 555/580.

Сканирующая электронная микроскопия. Визуализацию бактериальных клеток биопленок на углеродном и базальтовом волокне проводили на сканирующем электронном микроскопе марки Vega 3 (“TESCAN”, Чехия) с ускоряющим напряжением 20 кВ. Образцы носителей с биопленками высушивали на воздухе и просматривали в сканирующем электронном микроскопе без каких-либо дополнительных модификаций.

Метагеномный анализ. Препараты бактериальной хромосомной ДНК получали фенольным методом, модифицированным для выделения ДНК из актиномицетов. Секвенирование проводили на оборудовании Applied Biosystem 3500XL. Полученные последовательности сравнивали с таковыми на сервере EzBioCloud, хранящимися в мировой базе данных (<https://www.ezbiocloud.net/>). Метагеномный анализ исследуемых образцов по генам 16S рРНК проводили на платформе MiSeq (Illumina, США). Подготовку

библиотеки для секвенирования проводили в соответствии с инструкциями и протоколами для секвенатора MiSeq (Illumina 50 Rxn / KAPA Kit, США).

Статистическая обработка. Полученные данные являются результатами не менее чем трех независимых опытов. При статистической обработке определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего. Достоверность различий определяли с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Анализ результатов проводили с помощью стандартного пакета лицензионной программы MS Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика роста биопленок *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2. Динамика роста двувидовой биопленки была охарактеризована по: 1) общему биопленкообразованию, оцененному по оптической плотности экстрагированного красителя кристаллического фиолетового; 2) массивности полисахаридного каркаса матрикса, определенному по уровню флюоресценции после окраски konA-тетраметилродамином; и 3) общему содержанию АТФ в клетках. Кристаллический фиолетовый, связываясь с отрицательно заряженными молекулами поверхности клетки и полисахаридами, окрашивает и жизнеспособные, и мертвые клетки, а также полисахаридный каркас матрикса, что дает представление об общей массивности биопленки. Содержание АТФ в клетках свидетельствует о количестве жизнеспособных клеток и их физиологическом состоянии; краситель konA-тетраметилродамин окрашивает полисахариды, что позволяет судить о массивности полисахаридного каркаса матрикса.

Для культивирования бактерий была использована оптимизированная минеральная среда с глюкозой и ацетамидом в качестве источников углерода. Штамм *Al. faecalis* 2 потребляет ацетамид как источник углерода и при росте на нем проявляет максимальную амидазную активность (Максимова и др., 2017), но не растет на глюкозе. Родоккок может потреблять и глюкозу, и ацетамид, но за счет разницы в скоростях роста алкалигенес в периодической культуре накапливает биомассу ранее, чем родоккок. На использованной нами среде возможно нарастить биомассу обоих штаммов.

Было обнаружено, что максимальное биопленкообразование *Al. faecalis* 2 приходится на 1–2 сутки (рис. 1). В работе Максимовой с соавт. (2015) показано максимальное биопленкообразование монокультуры *R. ruber* gt 1, которое наблюдается на 4 сутки культивирования. В смешанной культуре увеличение биопленкообразования наблюдается дважды, что соответствует максимальным показателям биопленкообразования сначала одного штамма, затем второго (рис. 1).

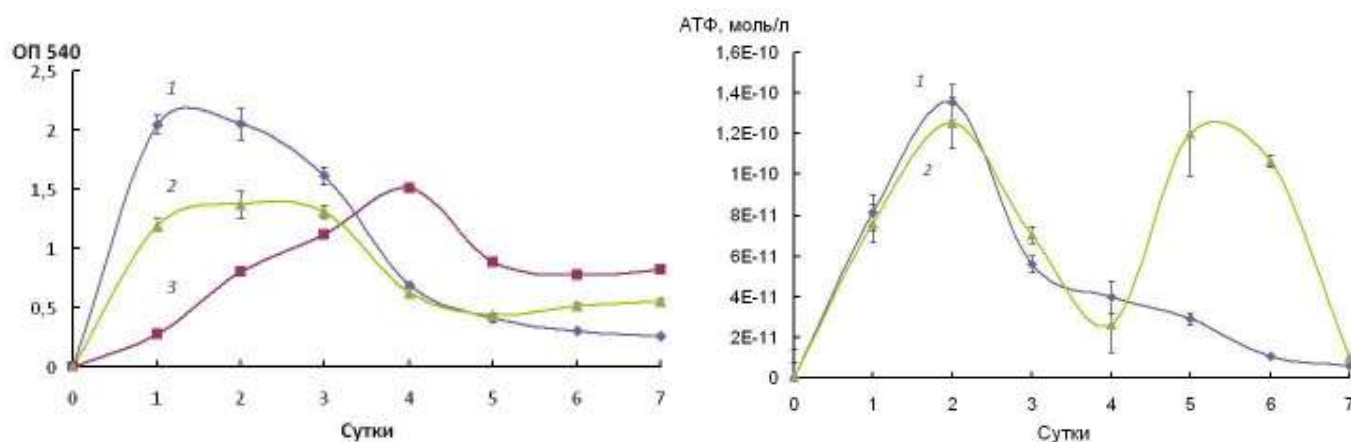


Рисунок 1 – Динамика роста (слева) и энергетический статус (справа) биопленок *Al. faecalis* 2 (1), *R. ruber* gt 1 (3) и биопленок смешанной культуры *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 (2).

Наибольшее количество АТФ в клетках биопленки *Al. faecalis* 2 наблюдали на 2 сутки, что соответствует максимальному накоплению биомассы данного штамма (рис. 1).

Увеличение общего содержания АТФ в двувидовой биопленке на 2 и 5–6 сутки культивирования соответствует максимуму роста *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1. Так в работе Максимовой и соавт. (2015) показано максимальное накопление биомассы моноопленки *R. ruber* gt 1, измеренное по оптической плотности экстрагированного красителя кристаллического фиолетового, на 4 сутки культивирования, а максимальное количество АТФ – на 3 сутки. При этом отмечена умеренная корреляция этих параметров.

Наблюдаемые закономерности биопленкообразования смешанной культуры *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 подтвердились данными определения массивности полисахаридного каркаса матрикса биопленок. Максимальное значение флюоресценции при окраске красителем, связывающимся с полисахаридами матрикса, в двувидовой биопленке наблюдалось на первые сутки культивирования и было на 36% больше максимального значения, наблюдаемого в моновидовой биопленке *Al. faecalis* 2 (рис. 2).

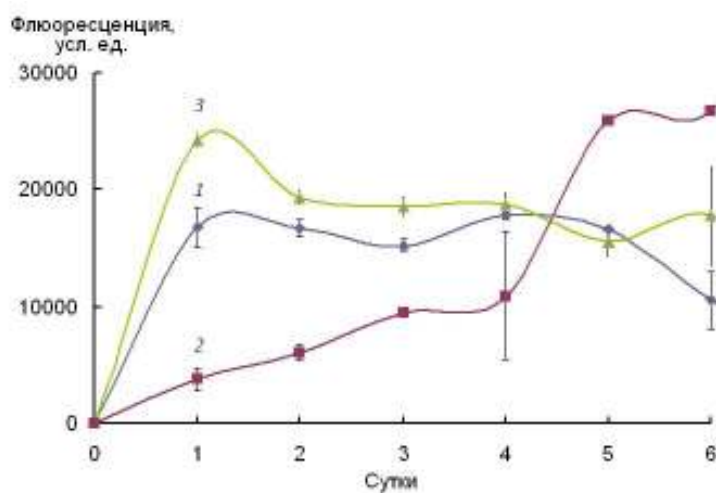


Рисунок 2 – Массивность полисахаридного каркаса матрикса клеток биопленок *Al. faecalis* 2 (1), *R. ruber* gt 1 (2) и биопленок смешанной культуры (3).

Таким образом, было показано, что различия в скорости роста нитрилгидролизующих бактерий *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 влияют на распределение ролей в двувидовых биопленках. Скорость роста *Al. faecalis* 2 в периодической культуре выше, чем *R. ruber* gt 1, в результате чего при развитии бинарной биопленки *Al. faecalis* 2 выступает в качестве первичного колонизатора, а *R. ruber* gt 1 – вторичного колонизатора. Это подтверждается графиками, отражающими биопленкообразование смешанной культуры, содержание АТФ в клетках и массивность полисахаридного каркаса матрикса при росте смешанной биопленки.

Влияние клеток нитрилгидролизующих бактерий на рост друг друга. Биопленки *Al. faecalis* 2 выращивали с добавлением культуральной жидкости 4-х и 7-и сут *R. ruber* gt 1. В качестве контроля использовали биопленку *Al. faecalis* 2, выращенную без дополнительных добавок. Оценка влияния бактерий *R. ruber* gt 1 на биопленкообразование *Al. faecalis* 2 показала, что энергетический статус клеток *Al. faecalis* 2 при добавлении культуральной жидкости родококка достоверно не изменялся. Однако оптическая плотность экстрагированного красителя кристаллического фиолетового при окраске клеток биопленок *Al. faecalis* 2 на 3–7 сут роста была существенно выше при добавлении культуральной жидкости *R. ruber* gt 1 (рис. 3). В среднем оптическая плотность биопленок *Al. faecalis* 2 в среде с добавлением культуральной жидкости *R. ruber* gt 1 была выше на 44% по сравнению с оптической плотностью клеток биопленок без влияния родококка. Биопленкообразование *R. ruber* gt 1 увеличивалось в ряду: 1) биопленки без воздействия; 2) с воздействием культуральной жидкости 2-х сут культуры *Al. faecalis* 2; 3) с воздействием культуральной жидкости 4-х сут культуры *Al. faecalis* 2 (рис. 3). Общее содержание АТФ в клетках биопленки *R. ruber* gt 1 увеличивалось по сравнению с контролем только на 2 и 3 сут при воздействии культуральной жидкости 2-х сут культуры *Al. faecalis* 2.

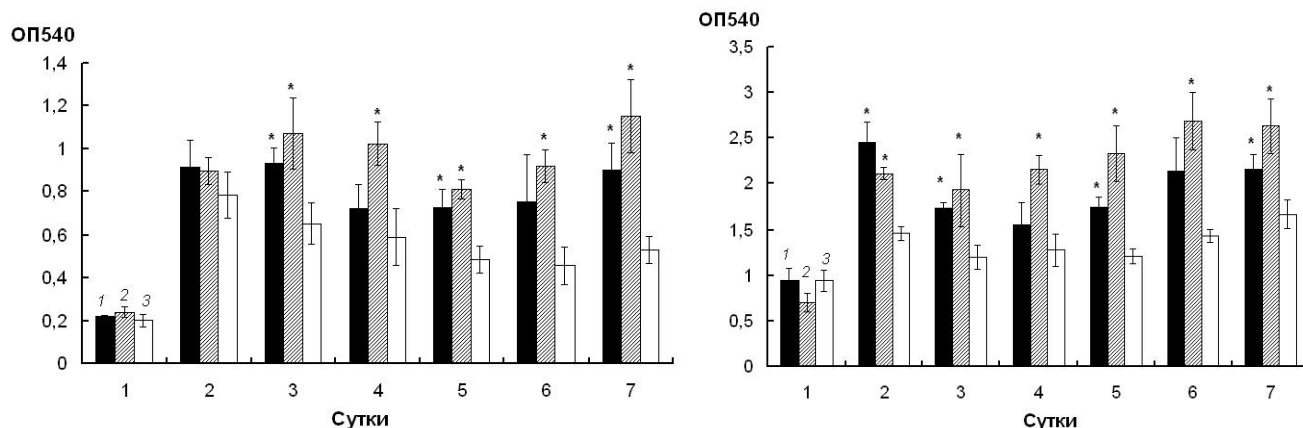


Рисунок 3 – Динамика роста биопленок *Al. faecalis* 2 (слева) с добавлением культуральной среды четырехсуточного (1) и семисуточного (2) *R. ruber* gt 1 и без дополнительных добавок (3) и динамика роста биопленок *R. ruber* gt 1 (справа) с добавлением культуральной среды двухсуточного (1) и четырехсуточного (2) *Al. faecalis* 2 и без дополнительных добавок (3).

Для подтверждения предположения, что увеличение биопленкообразования как *Al. faecalis* 2, так и *R. ruber* gt 1 при внесении культуральной жидкости штамма-партнера связано с усиленной выработкой полисахаридного матрикса, оценили массивность полисахаридного каркаса матрикса 4-х сут и 7-и сут биопленок *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1, при внесении культуральной жидкости 7-и сут культуры *R. ruber* gt 1 и 4-х сут культуры *Al. faecalis* 2 соответственно. Анализ данных показал увеличение массивности полисахаридного каркаса матрикса биопленки *R. ruber* gt 1 при добавлении культуральной жидкости *Al. faecalis* 2 на 6% и 18% на 4 и 7 сут культивирования соответственно (рис. 4). Массивность полисахаридного каркаса матрикса биопленки *Al. faecalis* 2 также была выше в среде с добавлением культуральной жидкости *R. ruber* gt 1 на 20% на 4 сут культивирования и на 27% на 7 сут культивирования (рис. 4).

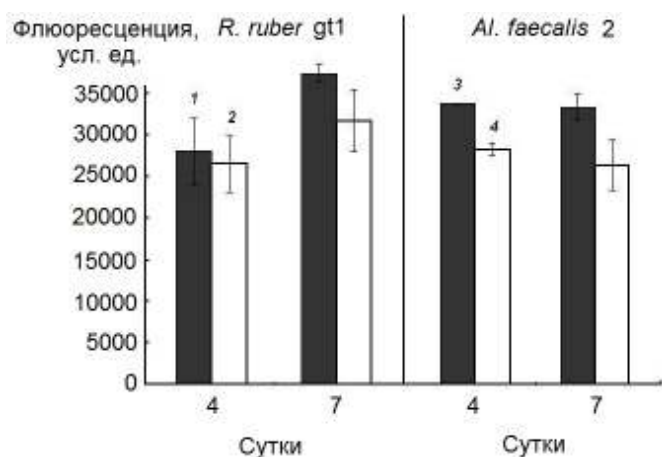


Рисунок 4 – Массивность полисахаридного каркаса матрикса клеток биопленок *R. ruber* gt 1 с добавлением культуральной жидкости четырехсуточного (1) *Al. faecalis* 2 и без дополнительных добавок (2); и клеток биопленок *Al. faecalis* 2 с добавлением культуральной жидкости семисуточного (3) *R. ruber* gt 1 и без дополнительных добавок (4).

Таким образом, культуральная жидкость *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2, содержащая метаболиты и аутоиндукторы, вызывает повышенное биопленкообразование штамма-партнера, связанное не с увеличением количества жизнеспособных клеток в биопленке за счет их более быстрого деления или более эффективной адгезии на начальном этапе формирования биопленки, а с усиленной выработкой полисахаридного матрикса, приводящей к увеличению общего объема биопленки.

Миграция клеток из биопленок. Миграцию клеток оценивали, учитывая два параметра: 1) различный возраст биопленки; 2) время экспозиции выращенной биопленки в физиологическом растворе без питательных веществ.

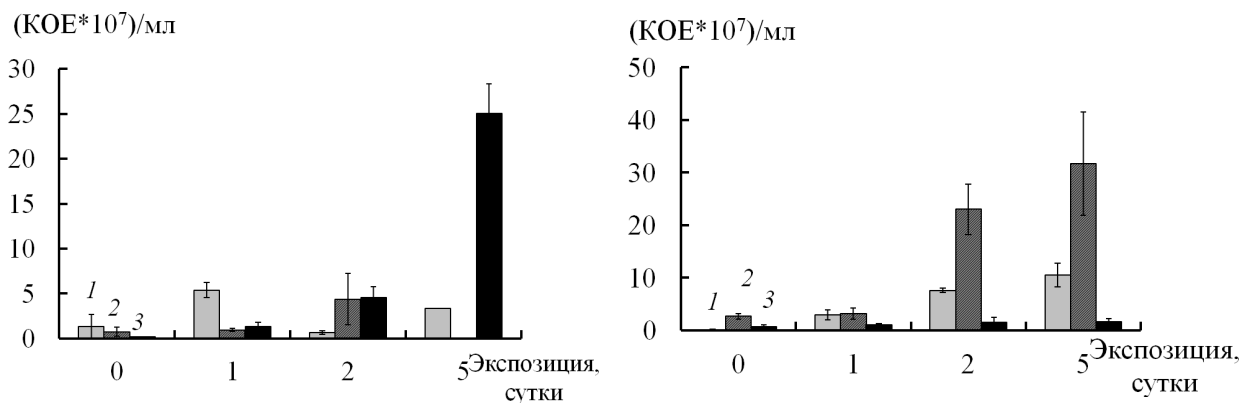


Рисунок 5 – Дисперсия клеток *Al. faecalis* 2 из моновидовой биопленки (слева) и двувидовой биопленки (справа): 1 – 1-суточная биопленка, 2 – 4-суточная биопленка, 3 – 7-суточная биопленка

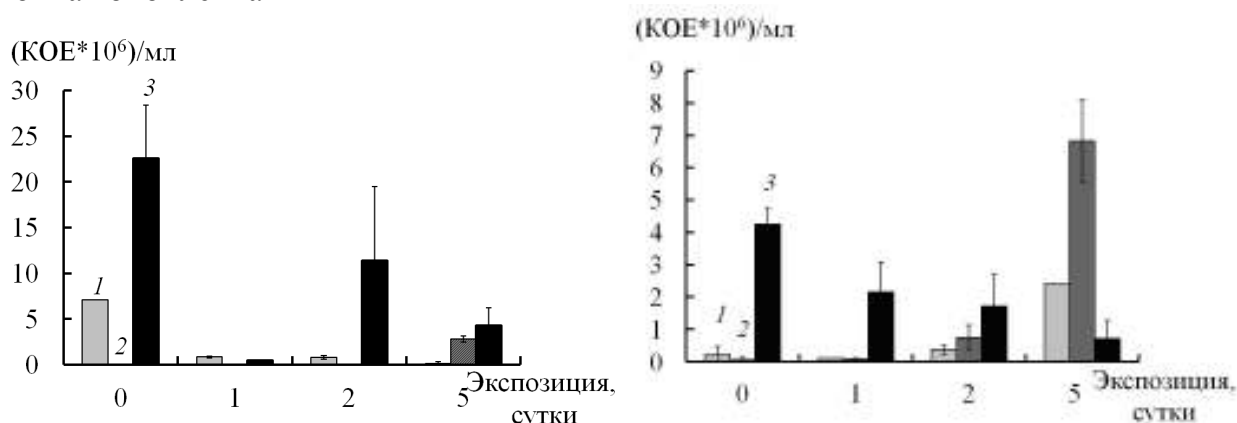


Рисунок 6 – Дисперсия клеток *R. ruber* gt 1 из моновидовой биопленки (слева) и двувидовой биопленки (справа): 1 – 1-суточная биопленка, 2 – 4-суточная биопленка, 3 – 7-суточная биопленка

Анализ дисперсии клеток из 1-суточной моновидовой биопленки *Al. faecalis* 2 показал, что наибольшее количество мигрировавших клеток наблюдается через сутки в условиях голодания по субстрату (рис. 5). На второй и пятый дни в физиологическом растворе планктонных клеток *Al. faecalis* 2 в среде становится меньше, что связано с процессами сорбции/десорбции клеток. Наибольшее количество мигрировавших клеток наблюдается из 7-суточной моноплёнки на 5 сут экспозиции. Наибольшее количество мигрировавших клеток *R. ruber* gt 1 наблюдается из 7-суточной моноплёнки на 1 сут экспозиции (рис. 6).

Анализ дисперсии клеток *Al. faecalis* 2 (рис. 5) и *R. ruber* gt 1 (рис. 6) из двувидовой биопленки показал, что наиболее подвержены диспергированию 4-суточные биопленки смешанной культуры. Показано, что в условиях голодания по субстрату 7-суточная двувидовая биопленка гораздо более стабильна, чем биопленки монокультур. В 7-суточной двувидовой биопленке дисперсия *Al. faecalis* 2 менее выражена, что подтверждается постоянным количеством КОЕ алкалигенеса в течение всех 5 дней в физиологическом растворе. В то же время, миграция клеток *R. ruber* gt 1 из двувидовой 7-суточной биопленки уменьшается со временем экспозиции.

Жизнеспособность клеток биопленок в условиях стресса. Для определения степени устойчивости биопленок нитрилгидролизующих бактерий к неблагоприятным факторам оценили жизнеспособность клеток, а также массивность полисахаридного каркаса матрикса моно- и двувидовых биопленок в оптимальных условиях, при нагревании, при голодании, при длительном воздействии токсичного субстрата, при высушивании.

В оптимальных условиях монопленка *Al. faecalis* 2 имеет массивный, многослойный полимерный матрикс, в котором прослеживается рельефность поверхности, включая каналы и поры (рис. 7). Биопленка образована большим скоплением клеток, около 90% из которых являются живыми.

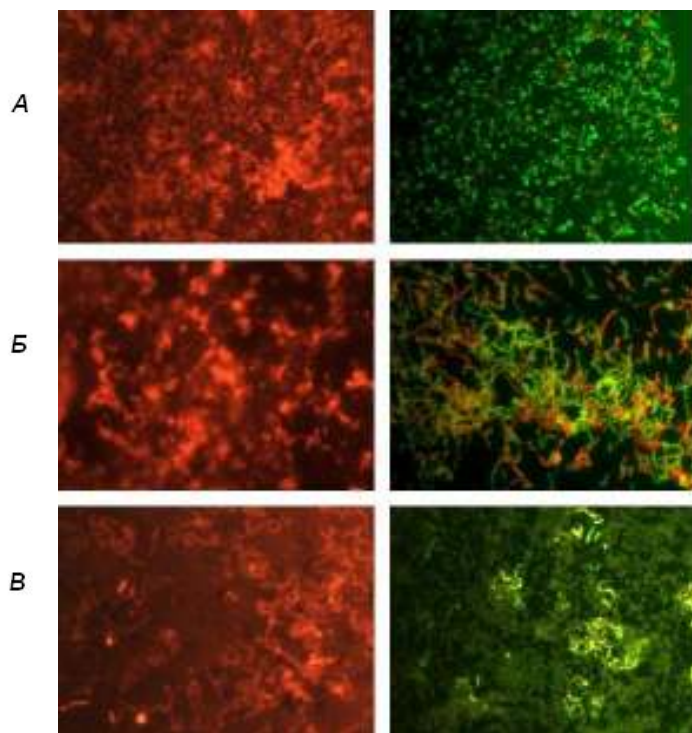


Рисунок 7 – Микрофотография полисахаридного каркаса матрикса (слева) и соотношения живых/мертвых клеток (справа) в монопленках *Al. faecalis* 2 (А) и *R. ruber* gt 1 (Б) и их двувидовой биопленке (В) в оптимальных условиях культивирования; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной.

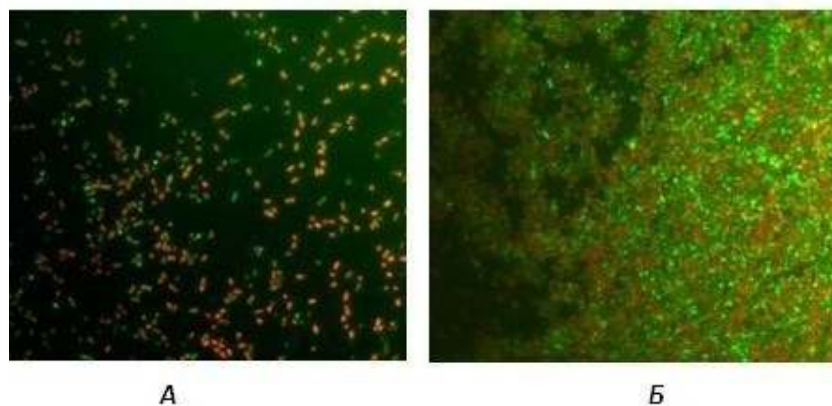


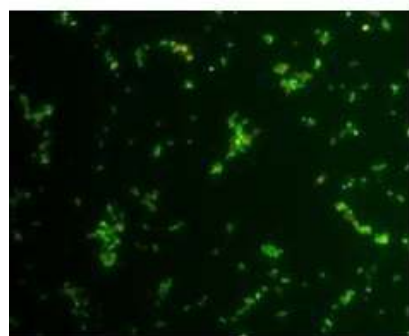
Рисунок 8 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в монопленке *Al. faecalis* 2 (А) и двувидовой биопленке *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 (Б) при нагревании до 50°C в течение 2 часов; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

Монопленка *R. ruber* gt 1 образована большим количеством клеток, подавляющее большинство которых жизнеспособно, также имеет хорошо обнаруживаемый полимерный матрикс, визуально, однако, менее объемный по сравнению с матриксом монопленки алкалигенеса (рис. 7). Двувидовая биопленка также образована большим количеством жизнеспособных клеток и имеет полисахаридный каркас матрикса, по массивности и многослойности сопоставимый с матриксом монопленки *Al. faecalis* 2 (рис. 7).

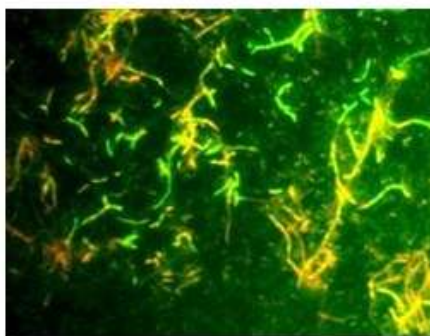
При нагревании в течение 2 часов при 50°C количество жизнеспособных клеток в монопленке *Al. faecalis* 2 значительно снижается (рис. 8, А). В двувидовой биопленке количество жизнеспособных клеток *Al. faecalis* 2 больше, чем в монопленке, хотя их количество снижается по сравнению с количеством жизнеспособных клеток в двувидовой биопленке без воздействия температуры (рис. 8, Б). Влияние отклонения температуры от оптимума на жизнеспособность клеток *R. ruber* gt 1 в монопленке не выявлено.

Оценка биопленок моно- и смешанной культур при хранении в физиологическом растворе в условиях отсутствия субстрата в течение 5 дней показала, что общее количество

клеток, доля жизнеспособных клеток и массивность полисахаридного каркаса матрикса в моноплёнке *R. ruber* gt 1 визуально не изменилась по сравнению с соответствующими биоплёнками в нормальных условиях. В условиях длительного хранения как таковой моноплёнки *Al. faecalis* 2 не обнаруживается (рис. 9, А). Большая часть клеток переходит в планктонное состояние, а на поверхности стекла остаются небольшие части биоплёнки с жизнеспособными клетками и большая часть полисахаридного каркаса матрикса. В смешанной культуре в условиях длительного хранения при отсутствии питательного субстрата наблюдается разрушение биоплёнки, как и в случае с монокультурой *Al. faecalis* 2 (рис. 9, Б). Однако двувидовая биоплёнка оказывается более стабильной, чем моноплёнка алкалигенеса.



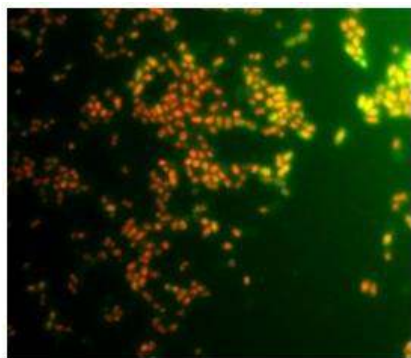
А



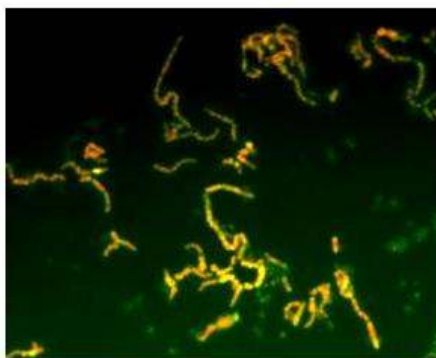
Б

Рисунок 9 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в моноплёнке *Al. faecalis* 2 (А) и двувидовой биоплёнке *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 (Б) при хранении в условиях голодания; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной.

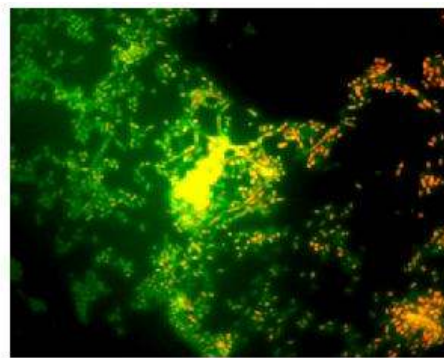
При высушивании на открытом воздухе в течение двух суток количество жизнеспособных клеток в моноплёнках *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 значительно снижается (рис. 10, А, Б). В двувидовой биоплёнке количество жизнеспособных клеток при высушивании снижается по сравнению с количеством жизнеспособных клеток в оптимальных условиях (рис. 10, В). Однако при этом остается большее количество жизнеспособных клеток по сравнению с таковым, оставшимся в моноплёнках *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1.



А



Б



В

Рисунок 10 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в моноплёнках *Al. faecalis* 2 (А) и *R. ruber* gt 1 (Б) и их двувидовой биоплёнке (В) при высушивании в течение 2 суток; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной.

При оценке воздействия токсичного субстрата при последовательном внесении ацетонитрила каждые сутки было показано, что большинство суспендированных клеток и клеток в составе биоплёнок выживают после десяти циклов внесения ацетонитрила до конечного объема, в два раза превышающего объем суспензии клеток и объем среды, в котором находились биоплёнки. В смешанной культуре при влиянии ацетонитрила

наблюдалось увеличение количества АТФ, что может быть связано с трансформацией токсичного нитрила нитрилгидратазой *R. ruber* gt 1.

Таким образом, показано, что клетки в составе двувидовой биопленки менее подвержены воздействию таких неблагоприятных факторов окружающей среды, как высокая концентрация токсичного субстрата, отсутствие питательного субстрата, отклонение температуры от оптимума и высушивание, а сама биопленка смешанной культуры более стабильна, чем монопенки соответствующих культур.

Динамика трансформации акриламида клетками *Al. faecalis* 2. Разница в скорости трансформации акриламида биопленками *Al. faecalis* 2 и свободными клетками в суспензии наблюдается на 4 час реакции, что выражается в снижении количества амида в среде в 2, 3 и 7 раз для волокна 22 мкм, контроля и волокна 4–12 мкм соответственно (рис. 11). Различия в скорости трансформации могут быть следствием разного количества клеток, выросших в суспензии и на волокне разного диаметра. В среднем к 6 часам реакции биопленки трансформируют 95% всего субстрата, тогда как планктонные клетки в суспензии 78%. Из графика, отражающего динамику накопления продукта реакции, видно, что и биопленки *Al. faecalis* 2, и клетки в суспензии накапливают акриловую кислоту в реакционной среде до определенного момента, после чего ее концентрация начинает снижаться (рис. 11). Свободные клетки в суспензии *Al. faecalis* 2 накапливают большее количество кислоты и в меньшей степени ее утилизируют, чем биопленки этой же культуры.

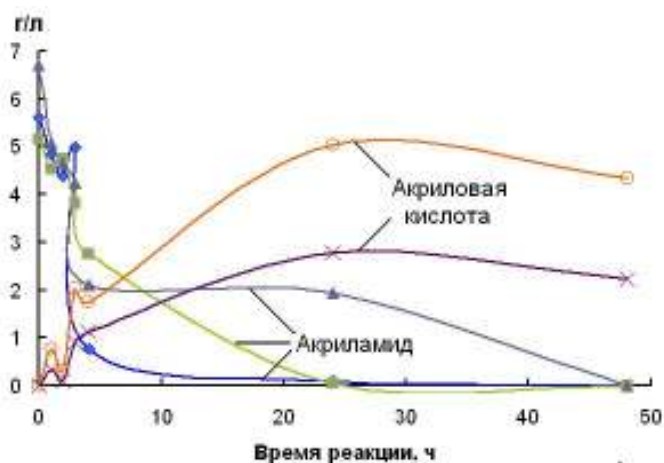


Рисунок 11 – Динамика трансформации акриламида и накопления акриловой кислоты биопленкой *Al. faecalis* 2, выращенной на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм (1), на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (2), на углеродном волокне Карбопон-В-актив (3), а также суспендированными клетками (4).

Для изучения возможности использования биопленок *Al. faecalis* 2 в биокатализе проведен эксперимент по синтезу раствора акриловой кислоты из акриламида биопленками, выращенными на базальтовом волокне диаметром 22 мкм. За 16 суток трансформации получен раствор акриловой кислоты концентрацией 26 г/л. Таким образом, показана возможность использования биопленок *Al. faecalis* 2 не только для целей биodeградации, но и для синтеза карбоновых кислот.

Исходя из того, что биопленки *Al. faecalis* 2 не только трансформируют амид до кислоты, но и утилизируют образующуюся кислоту, используя ее как субстрат роста, биопленки данного штамма наиболее эффективно могут быть использованы в качестве биокатализатора при очистке сточных вод. Отмечено также, что биопленки *Al. faecalis* 2 быстрее трансформируют амид в кислоту и в большей степени потребляют продукт реакции по сравнению с суспендированными клетками. В результате может быть достигнута полная очистка загрязненных вод от акриламида и продукта его трансформации — акриловой кислоты.

Динамика трансформации акрило- и ацетонитрила клетками *R. ruber* gt 1. Анализ динамики трансформации субстрата показал, что и биопленки *R. ruber* gt 1, и клетки в суспензии почти полностью трансформируют ацетонитрил за 40 минут реакции. Накопление продукта реакции (ацетамида) к 20 мин соответствует динамике

трансформации субстрата (рис. 12). Ацетамид накапливается в среде в течение 60 мин экспозиции, после чего происходит снижение его количества в реакционной среде. Снижение количества ацетамида в реакционной среде объясняется работой амидазы родококка, которая, как известно, экспрессируется в одном опероне с нитрилгидратазой и трансформирует ацетамид в уксусную кислоту (Gupta *et al.*, 2010; Prasad, Bhalla, 2010). Причем наименьшее количество кислоты к 90 мин реакции наблюдается в среде с биопленкой, выращенной на углеродном волокне, а наибольшее количество кислоты – в среде со свободными клетками в суспензии.

При проведении эксперимента по синтезу концентрированного раствора акриламида биопленками *R. ruber* gt 1 отмечена полная трансформация субстрата, вносимого ежедневно, в течение всего эксперимента (рис. 13). За 19 циклов трансформации получен раствор акриламида концентрацией 376 г/л. Из графика динамики накопления акриламида видно, что катализатор на основе биопленок *R. ruber* gt 1 мог функционировать более длительное время.

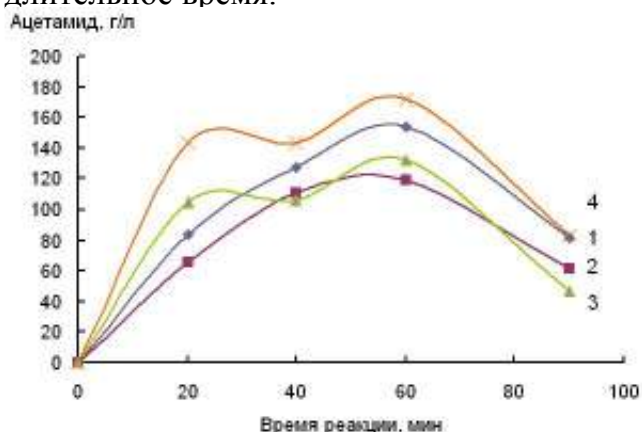


Рисунок 12 – Динамика накопления в реакционной среде и трансформации ацетамида биопленкой *R. ruber* gt 1, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (1), на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм (2), на углеродном волокне Карбопон-В-актив (3), а также суспендированными клетками (4).

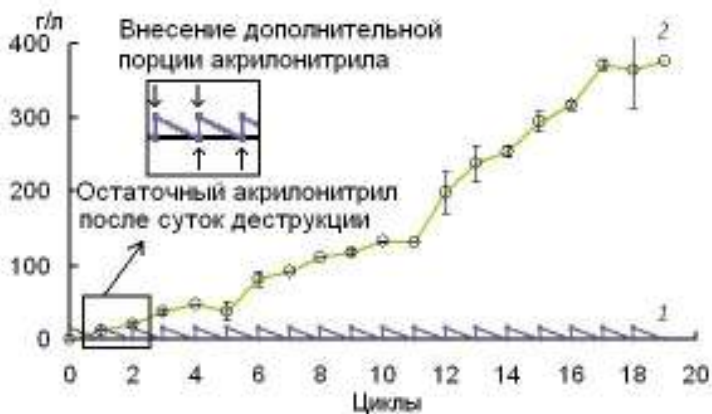


Рисунок 13 – Динамика трансформации акрилонитрила (1) и накопления акриламида (2) в реакционной среде биопленкой *R. ruber* gt 1, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм

Таким образом, показана возможность использования биопленок *R. ruber* gt 1 с целью синтеза концентрированных растворов амидов карбоновых кислот. Клетки *R. ruber* gt 1 имеют высокую нитрилгидратазную активность, которая выражается в высокой скорости трансформации нитрилов в соответствующие амиды. Данный штамм может быть использован в комплексе с *Al. faecalis* 2, не только трансформирующим амиды в соответствующие карбоновые кислоты, но и потребляющим последние на метаболические нужды клеток.

Трансформация акрило- и ацетонитрила двувидовыми биопленками *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2 в системе реактора погружного типа. Для подтверждения эффективности совместного использования штаммов *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 сконструирован реактор погружного типа на основе биопленок представленных бактерий. Проведено 8 вариантов опытов деградации нитрилов карбоновых кислот, различающихся по вносимому субстрату, используемой подложке – носителю биопленок, моно- или двувидовым биопленкам. Общее время работы каждого реактора составляло от 600 до 3000 ч непрерывной работы. Эксперименты также включали использование смешанного биокатализатора (биофильтр типа «сэндвич»). При этом для штамма *Al. faecalis* 2 в качестве носителя использовали базальтовое волокно с диаметром волокна 4–12 мкм, для штамма *R. ruber* gt 1 – углеродное волокно.

Показано, что динамика трансформации ацетонитрила сходна для всех вариантов носителей, на которых выращивались биопленки (рис. 14). Определено, что на протяжении всего эксперимента клетки *R. ruber* gt 1 трансформируют большую часть ацетонитрила в ацетамид. Амид практически не накапливается в реакционной среде, а сразу гидролизуются до кислоты клетками *Al. faecalis* 2. Уксусная кислота накапливается в среде до высоких концентраций: от 325 г/л («сэндвич») до 651 г/л (базальтовое волокно диаметром 4–12 мкм). К 600–1000 часам работы биофильтра наблюдается адаптация системы, которая выражается в снижении количества накопленной в среде кислоты и субстрата, вносимого ежедневно.

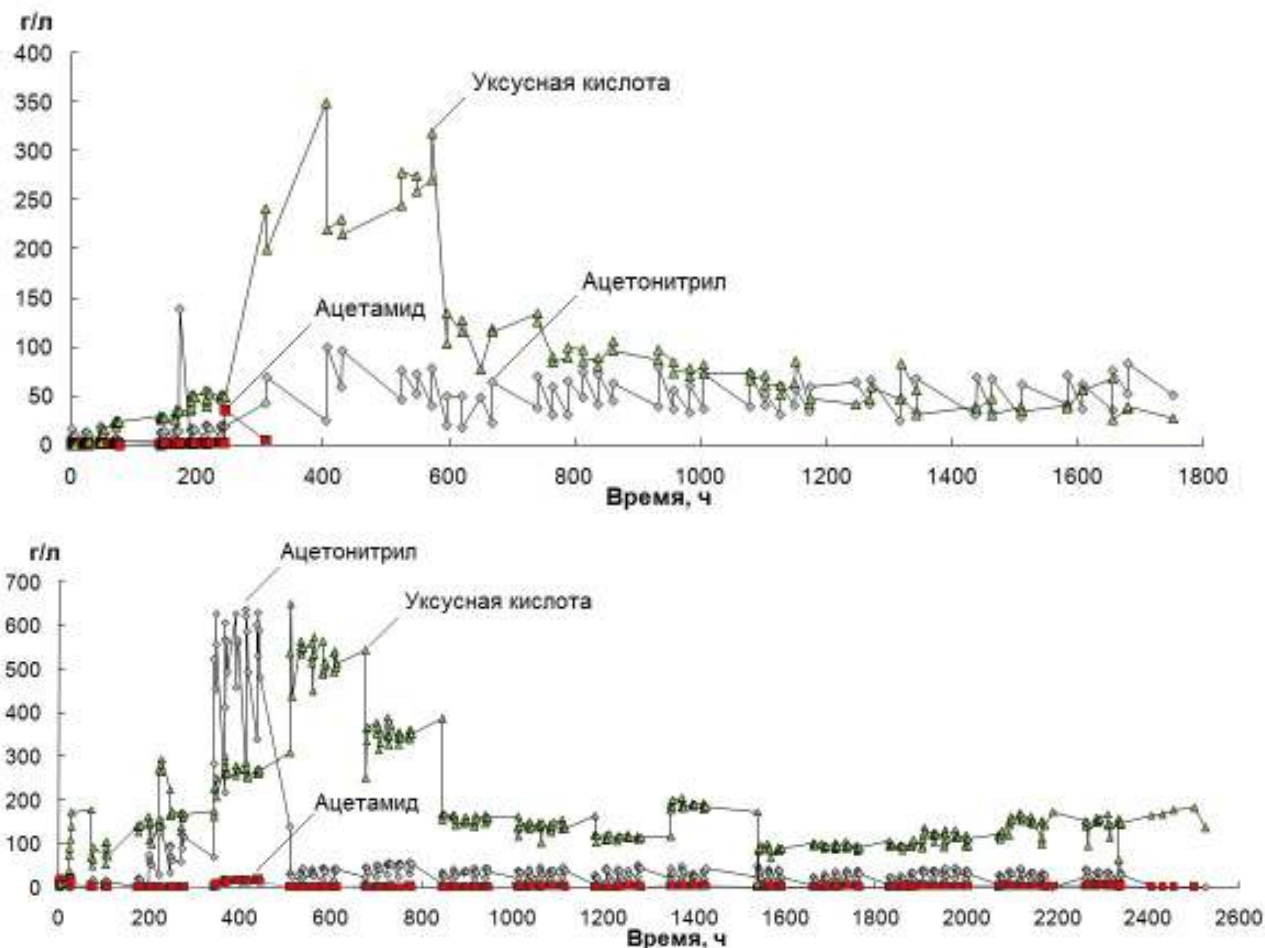


Рисунок 14 – Трансформация ацетонитрила биопленками нитрилгидролизующих бактерий, выращенными на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (сверху) и 4–12 мкм (снизу), в системе реактора погружного типа.

При трансформации акрилонитрила в случае использования в качестве носителей базальтового волокна различного диаметра продукты трансформации субстрата в среде не обнаруживались, что связано с быстрым потреблением получаемого акриламида за счет штамма *Al. faecalis* 2, клетки которого преобладают в биопленке.

На микрофотографии базальтового волокна, снятого после окончания работы биофильтра, можно видеть массивную биопленку толщиной до 5 мкм, которая покрывает большую часть поверхности волокна (рис. 15, А). На микрофотографиях видно, что *R. ruber* gt 1 образует довольно хорошую монослойную биопленку на углеродном волокне, в которой отчетливо видны отдельные клетки (рис. 15, Б).

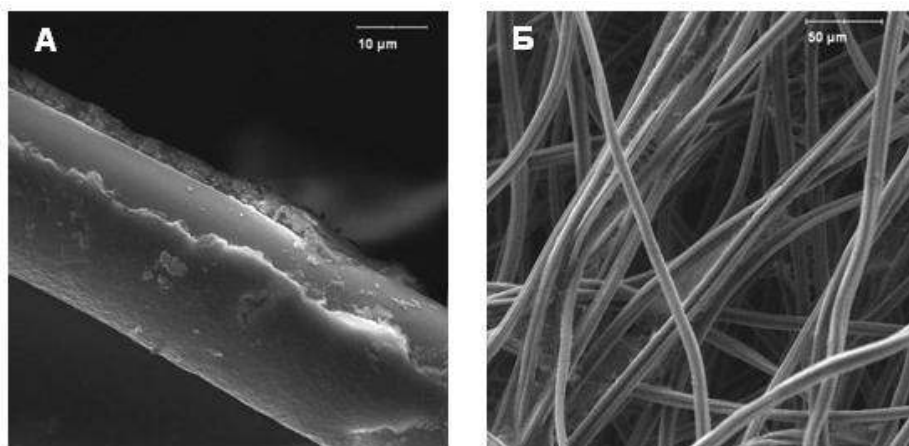


Рисунок 15 – Микрофотографии двухвидовой биопленки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (А), и биопленки *R. ruber* gt 1, выращенной на углеродном волокне Карбопон-В-актив (Б).

Метагеномный анализ образцов двухвидовых биопленок, выращенных на разных носителях, показал присутствие 82% *Al. faecalis* 2 и 0,36% *R. ruber* gt 1 на базальтовом волокне диаметром 22 мкм, 41% *R. ruber* gt 1 и 44% *Al. faecalis* 2 на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм, и 74% *R. ruber* gt 1 и 26% *Al. faecalis* 2 на углеродном волокне Карбопон-В-актив (рис. 16).

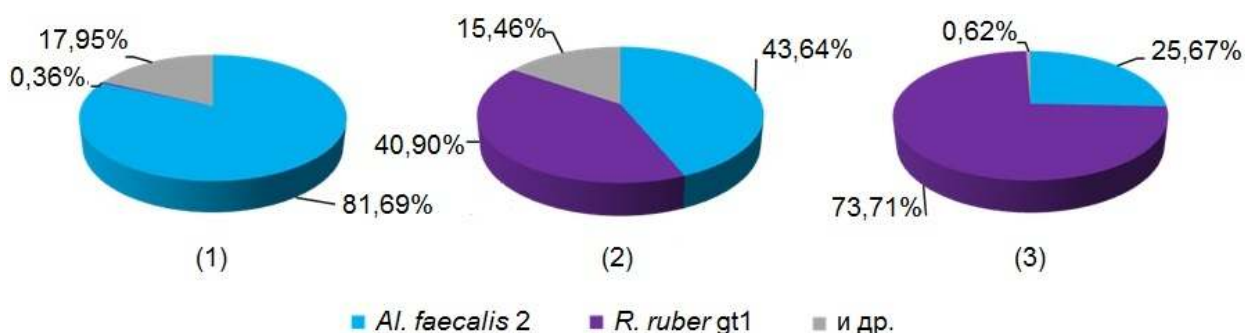


Рисунок 16 – Соотношение культур *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2 в двухвидовых биопленках, выращенных на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (1), базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм (2) и углеродном волокне Карбопон-В-актив (3).

Анализ данных показал, что на протяжении всего эксперимента с использованием биопленок, выращенных на Карбопоне-В-актив, среднее содержание субстрата в реакционной среде составляло 11,4 г/л, что на 17% и 71% меньше, чем в экспериментах с использованием в качестве носителя базальтового волокна диаметром 4–12 мкм и 22 мкм соответственно (рис. 17). Акриловая кислота накапливается в среде в небольших количествах и к концу эксперимента снижается до концентрации 13 г/л.

Трансформация ацетонитрила в системе биофильтра на основе смешанного носителя показала картину, схожую с трансформацией нитрилов в биофильтре на основе базальтового волокна (рис. 18). Показана полная минерализация субстрата, вносимого ежедневно, и накопление продуктов реакции: не только кислоты, как во всех предыдущих экспериментах, но и амида. Трансформация акрилонитрила также эффективна в течение всего срока службы биофильтра (рис. 18). Как в предыдущем случае, в среде накапливался акриламид, а не кислота, что могло быть обусловлено недостаточным количеством клеток *Al. faecalis* 2 и предпочтительным использованием в качестве субстрата только что трансформированной из акриламида акриловой кислоты.

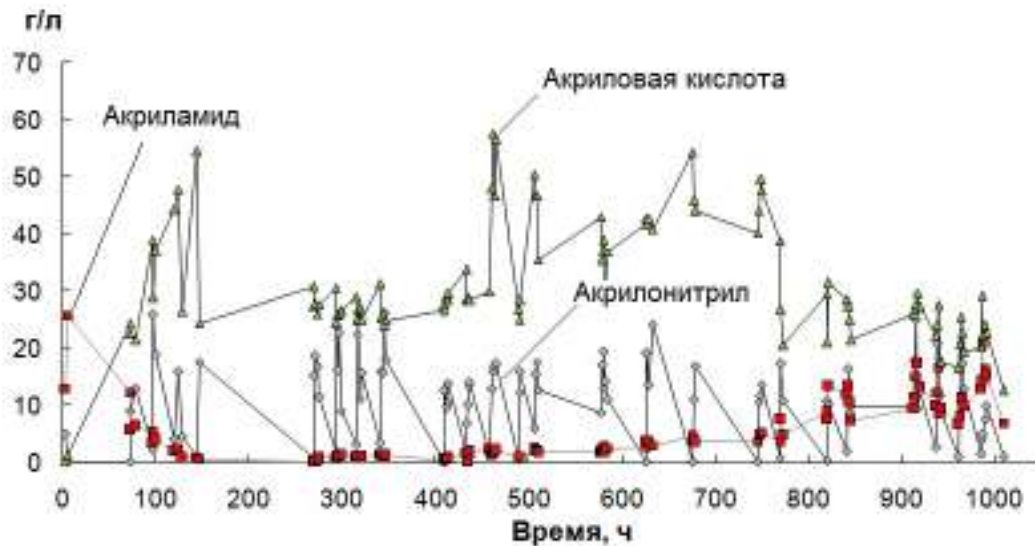


Рисунок 17 – Трансформация акрилонитрила биопленкой смешанной культуры, выращенной на углеродном волокне Карбопон-В-актив, в системе реактора погружного типа с накоплением акриламида и акриловой кислоты.

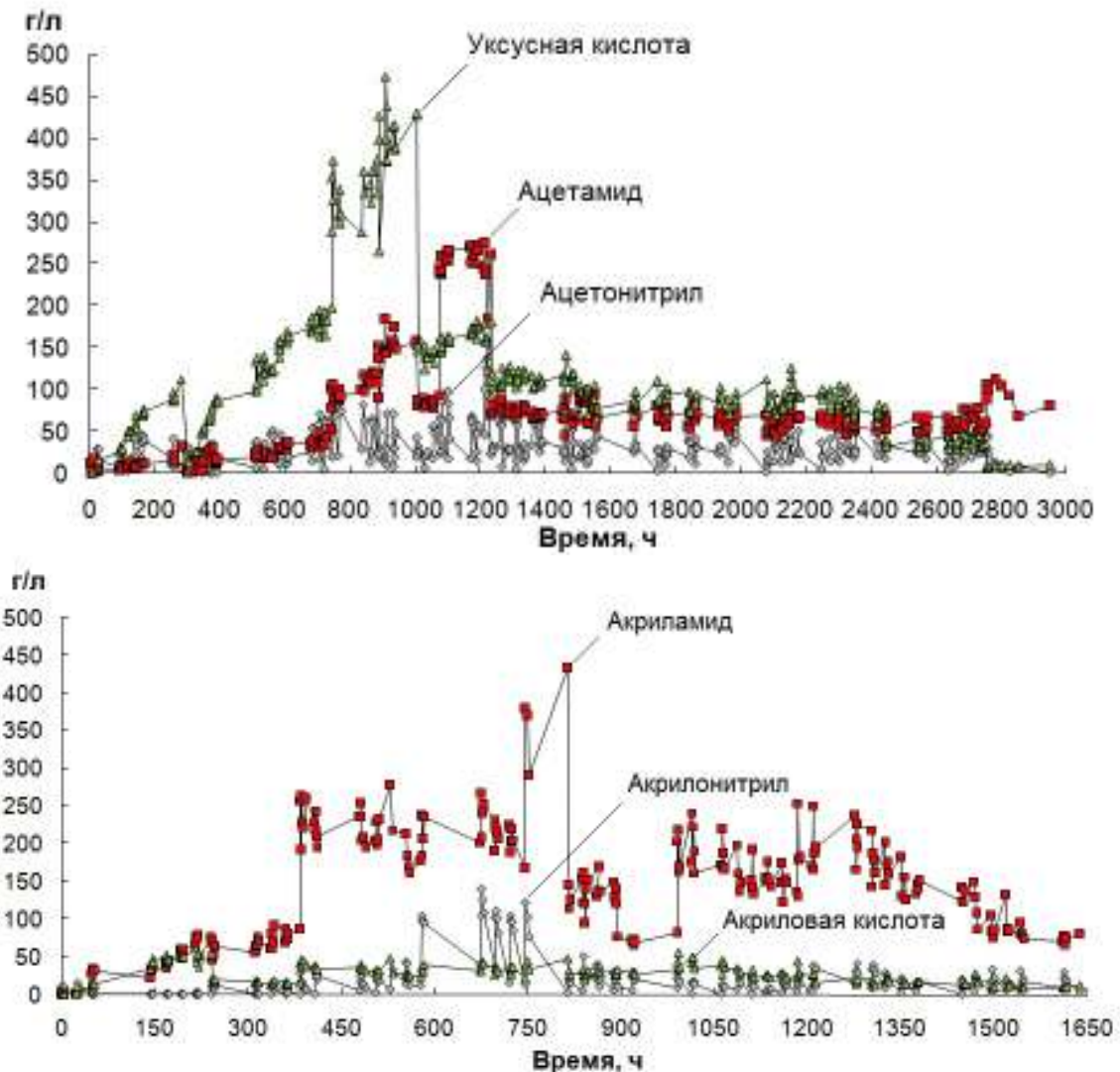


Рисунок 18 – Трансформация ацетонитрила (сверху) и акрилонитрила (снизу) биопленками нитрилгидролизующих бактерий, выращенными на смешанном носителе, в системе реактора погружного типа

Таким образом, анализ данных показал, что в начале работы биофильтра основная масса нитрила трансформируется биопленкой в амид в течение нескольких часов. Далее амид трансформируется до кислоты. После накопления кислоты и части переработанного субстрата наблюдается адаптация системы к 600–1000 часам работы биофильтра, что выражается в полной минерализации субстрата, вносимого ежедневно, а также в снижении количества кислоты. В среднем биофильтр на основе биопленок из смешанной культуры нитрилгидролизующих бактерий может работать в нормальном режиме без снижения каталитической активности до 3000 часов. Наибольшая эффективность деградации акрило- и ацетонитрила показана при использовании в качестве носителя биопленок углеродного волокна Карбопон-В-актив и базальтового волокна 4–12 мкм соответственно (табл. 1).

Таблица 1 – Эффективность деградации нитрила в биопленочном реакторе погружного типа

Носитель	Субстрат	Время работы, ч	Суммарное количество утилизированного нитрила, г	Эффективность деградации, г/ч
БВ, диаметр 22 мкм	Ацетонитрил	1752	138	0,079
	Акрилонитрил	1234	48	0,039
БВ, диаметр 4–12 мкм	Ацетонитрил	2527	217	0,086
	Акрилонитрил	968	66	0,068
УВ Карбопон-В-актив	Ацетонитрил	652	47	0,072
	Акрилонитрил	1010	217	0,215
БВ и УВ, упакованные по типу «сэндвич»	Ацетонитрил	2955	236	0,080
	Акрилонитрил	1639	156	0,095

Примечание: БВ – базальтовое волокно; УВ – углеродное волокно

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Нами были изучены физиологические особенности клеток нитрилгидролизующих бактерий в составе моно- и двувидовых биопленок. Была охарактеризована динамика роста двувидовой биопленки по 3-м параметрам: общему биопленкообразованию, оцененному по оптической плотности экстрагированного красителя кристаллического фиолетового, массивности полисахаридного каркаса матрикса, определенному по уровню флюоресценции после окраски конА-тетраметилпроламином, и общему содержанию АТФ в клетках. Скорость роста *Al. faecalis* 2 в периодической культуре выше, чем *R. ruber* gt 1, максимум роста биопленок *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 составляет 2 и 5–6 суток соответственно. В результате различной скорости роста при образовании двувидовой биопленки *Al. faecalis* 2 выступает в качестве первичного колонизатора, а *R. ruber* gt 1 – вторичного колонизатора.

Показано, что наименее устойчивыми среди изученных моновидовых биопленок являются 7-суточные монопленки. Однако в смешанной культуре наиболее подвержены разрушению 4-суточные биопленки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1. Проведенные эксперименты (Зорина и др., 2019) показали, что именно на 4-е сутки формирования двувидовой биопленки родококк присоединяется к первичному колонизатору – алкалигенесу, что связано с максимумом роста биопленки родококка (Максимова и др., 2015). Можно предположить, что в момент наиболее интенсивной адгезии клеток второго штамма дисперсия биопленки первичного колонизатора возрастает. При дальнейшем

совместном росте наступает фаза адаптации, которая выражается в формировании прочной двувидовой биопленки. Отмечено, что разрушение двувидовой биопленки менее выражено. Внеклеточный полимерный матрикс *Al. faecalis* 2 способствует формированию более прочной биопленки *R. ruber* gt 1, а биопленка *Al. faecalis* 2 оказывается более стабильной, когда формируется в присутствии *R. ruber* gt 1.

Установлено, что штаммы *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 оказывают положительное взаимное влияние на биопленкообразование как при совместном росте в смешанной культуре, так и при росте в монокультуре при внесении культуральной жидкости другого штамма-партнера. Причем увеличение общего объема биопленки связано не с увеличением количества жизнеспособных клеток или более эффективной адгезией на начальном этапе формирования биопленки, а с усиленной выработкой полисахаридного матрикса. Проведенные эксперименты показали, что *Al. faecalis* 2 не обладает антагонистической активностью в отношении *R. ruber* gt 1, поэтому образование более массивного матрикса может являться следствием синергических отношений.

Оценены энергетический статус, жизнеспособность и массивность полисахаридного каркаса матрикса биопленок нитрилгидролизующих бактерий в условиях воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Установлено, что клетки в составе двувидовой биопленки менее подвержены воздействию таких неблагоприятных факторов окружающей среды, как отклонение температуры от оптимума, высушивание, длительное воздействие токсичного субстрата и голодание, а сама биопленка смешанной культуры более стабильна, чем монопенки соответствующих культур.

Сконструировали реактор погружного типа на основе двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на базальтовом волокне и активированных углеродных волокнах. Изучена трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками смешанной культуры *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1, выращенными на базальтовом волокне 22 диаметром мкм, базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм, углеродном волокне Карбопон-В-актив и на смешанном носителе. Клетки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 имеют разные значения гидрофобности поверхности клеток и, соответственно, разные адгезионные способности к различным носителям. Поэтому был также разработан вариант, основанный на использовании смешанного носителя, когда клетки *Al. faecalis* 2 выращивали на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм, а клетки *R. ruber* gt 1 – на углеродном волокне. Затем эти носители укладывались слоями в биофильтр. Определено, что основную массу нитрила *R. ruber* gt 1 трансформирует в амид в течение нескольких часов. В дальнейшем родококку требуется больше времени для трансформации того же количества субстрата. Первые несколько часов работы амид накапливается в среде, после чего идет его трансформация клетками *Al. faecalis* 2 до кислоты. После накопления кислоты и части переработанного субстрата наблюдается адаптация системы к 600–1000 часам работы биофильтра, что выражается в полной минерализации субстрата, вносимого ежедневно, а также в снижении количества кислоты.

Таким образом, на основании изученных физиологических особенностей биопленок *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 в совокупности с их амидазной и нитрилгидратазной активностью сделан вывод о том, что биопленки данных культур могут служить основой для создания биокатализатора, используемого для получения акриловой кислоты, или в очистке сточных вод от соединений нитрилов. Показана эффективность использования биокатализаторов на основе биопленок нитрилгидролизующих бактерий в процессе деструкции нитрильных и амидных соединений. Установлено, что использование смешанных биопленок в биотехнологических процессах (биокатализе и очистке окружающей среды) более эффективно не только для выполнения многошаговых ферментативных реакций, но и для повышения прочности биопленки-биокатализатора.

Перспективы дальнейших исследований могут быть направлены на изучение устойчивости смешанных биопленок нитрилгидролизующих бактерий к внешним физическим факторам окружающей среды, которые являются частой причиной эрозии биопленки внутри биокаталитических реакторов. Остается перспективным изучение

деградации других соединений нитрилов смешанной биопленкой нитрилгидролизующих бактерий. С целью получения промышленно значимого биокатализатора перспективным также являются исследования, направленные на подбор оптимального носителя для смешанных биопленок других видов нитрилгидролизующих бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в двувидовой биопленке *Al. faecalis* 2, максимум роста которого приходится на 2 сутки культивирования, выступает в качестве первичного колонизатора, а *R. ruber* gt 1, максимум роста которого наблюдается на 5–6 сутки культивирования, – вторичного колонизатора.

2. Показано, что двувидовые биопленки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 характеризуются меньшей степенью диспергирования и высокой устойчивостью к воздействию таких неблагоприятных факторов, как высокая концентрация токсичного субстрата, отсутствие питательного субстрата, отклонение температуры от оптимума и высушивание, по сравнению с биопленками монокультур.

3. Определено, что штаммы *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 оказывают положительное взаимное влияние на биопленкообразование как при совместном росте в смешанной культуре, так и при росте в монокультуре при внесении культуральной жидкости другого штамма-партнера. Увеличение общего объема биопленки при этом связано с усиленной выработкой полисахаридного матрикса.

4. Установлено, что 1 г биокатализатора в виде биопленки *Al. faecalis* 2 на базальтовом и углеродном волокне полностью трансформирует 100 мМ акриламид в акриловую кислоту в среднем за 24 часа реакции, синтезируя 26 г/л акриловой кислоты при дробном внесении субстрата. Биопленки *R. ruber* gt 1 на 1 г базальтового волокна при дробном внесении 2% акрилонитрила за 17 циклов трансформации синтезируют 376 г/л акриламида.

5. Разработан способ очистки воды от нитрилов карбоновых кислот в реакторе погружного типа на основе биопленок *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1. Наибольшая эффективность деградации акрилонитрила (0,215 г/ч) и ацетонитрила (0,086 г/ч) биопленками показана при использовании в качестве носителя углеродного волокна Карбопон-В-актив и базальтового волокна диаметром 4–12 мкм соответственно. Установлено, что после 600–1000 ч работы реактора наступает фаза адаптации, в которую накопленные продукты трансформации утилизируются биопленками одновременно с конверсией новых порций субстрата. В среднем биофильтр на основе двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий работает без снижения каталитической активности до 3000 часов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Максимова Ю.Г., Горбунова А.Н., Зорина А.С., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Демаков В.А. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью / Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – №1. – С. 53–58. (Scopus / Web of Science)
2. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Имобилизованные нитрилгидролизующие бактерии для систем биофильтрации / Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9. – №1 – С. 733–735.
3. Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Зорина А.С., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. Биodeградация акриламида и акриловой кислоты планктонными клетками и биопленками *Alcaligenes faecalis* 2 / Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54 – № 2. – С. 158–164. (Scopus / Web of Science)

4. Зорина А.С., Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Биопленкообразование моно- и смешанных культур штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 / Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 2. – С. 175–183. (Scopus / Web of Science)
5. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Дисперсия моно- и смешанных биопленок *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 / Вестник ПГУ. Серия биология. – 2019. – № 2. – С. 153–158.

Публикации в других журналах и сборниках

6. Зорина А.С. Разработка биофильтра для удаления амидов и нитрилов из сточных вод предприятий органического синтеза // X Студенческий региональный конкурс научных проектов по программе УМНИК, тезисы докладов. Пермь: ПНЦ УрО РАН, 2014. С. 171–173.
7. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Гетерогенные биокатализаторы на основе адгезированных бактериальных клеток для биodeградации поллютантов и синтеза органических веществ // XVII Региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология – 2015», тезисы докладов. Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2015. С. 114–117.
8. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Имобилизованные нитрилгидролизующие бактерии для биотрансформации поллютантов и синтеза органических веществ // V международная молодежная научная конференция «Экология – 2015», тезисы докладов. Архангельск: Изд-во ИЭПС УрО РАН, 2015. С. 19–20.
9. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Гетерогенные биокатализаторы на основе адгезированных бактериальных клеток для синтеза органических веществ и биотрансформации поллютантов в сточной воде // XVIII Региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология – 2016», тезисы докладов. Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2016. С. 117–118.
10. Maksimova Y., Zorina A., Ovechkina G., Demakov V. Biofilms of nitrile hydrolyzing bacteria on the fiber materials for the treatment of amide- and nitrile-containing wastes // Biofilms7 – Microbial works of art. 2016. №410452/16.
11. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Динамика роста бинарных и моновидовых биопленок нитрилутилизующих бактерий // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 21-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, тезисы докладов. Пушино. Изд-во: Пушинский научный центр РАН 2017. – С. 21–22.
12. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Изучение некоторых физиологических особенностей биопленок нитрилгидролизующих бактерий – перспективных объектов очистки сточных вод // II-ая Международная научная конференция «биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», тезисы докладов. Красноярск, 2017. – С. 139–141.
13. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Биотрансформация амидов карбоновых кислот биопленками нитрилгидролизующих бактерий // Симбиоз – Россия – 2017. X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов. Сборник тезисов под общ. ред. Т.В. Балтиной, Г.Г.Яфаровой. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – С. 309–311.
14. Максимова Ю.Г., Зорина А.С., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Микробные биопленки для продуктивного биокатализа и очистки окружающей среды // Материалы I-го Российского Микробиологического конгресса. Пушино, 2017. – С. 160–161.
15. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Влияние ацетонитрила на клетки нитрилгидролизующих бактерий в биопленке и суспензии в составе моно- и смешанной культуры // 22-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», тезисы докладов. Пушино, 2018. – С. 77–78.
16. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Минеральные и углеродные волокна как носители бактериальных биопленок для биокатализа и биологической очистки // Материалы II-ой Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни». Пермь, 2018. – С. 64–67.
17. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Биопленки *Rhodococcus ruber* gt 1 и *Alcaligenes faecalis* 2: физиология и биотехнологическое применение // Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии: Всероссийская конференция с международным участием, тезисы докладов, отв. редактор Н.Н. Колотилова. – Москва: МАКС Пресс, 2019. – 152 с.

Зорина Анастасия Сергеевна

**БИОПЛЕНКИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ
ALCALIGENES FAECALIS 2 И *RHODOCOCCLUS RUBER* GT 1
В ПРОЦЕССАХ ТРАНСФОРМАЦИИ
НИТРИЛОВ И АМИДОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ**

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 "Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук"- филиале Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского
отделения Российской академии наук
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13