

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

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Максимова Юлия Геннадьевна

Пермь – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Биопленки как естественная форма существования микроорганизмов.....	16
1.2. Особенности развития и существования биопленочных культур....	19
1.2.1. Этапы формирования и развития биопленки	22
1.2.1.1. Начальная адгезия к поверхности	23
1.2.1.2. Рост и созревание	27
1.2.1.3. Дисперсия и отмирание.....	29
1.2.2. Устойчивость биопленок к неблагоприятным факторам окружающей среды.....	33
1.3. Нитрилгидролизующие бактерии.....	36
1.4. Применение биопленок в промышленности	40
1.4.1. Иммуобилизация нитрилгидролизующих бактерий	42
1.4.2. Реакторы на основе биопленок.....	46
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
2.1. Объекты исследования	50
2.2. Среды и субстраты для культивирования	50
2.3. Условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик	50
2.4. Рост бактерий в биопленках	51
2.5. Оценка биопленкообразования	52
2.6. Окраска полисахаридного каркаса матрикса	52
2.7. Определение концентрации АТФ в бактериальных клетках биолюминесцентным методом	53
2.8. Получение бесклеточной культуральной жидкости.....	54
2.9. Конструирование реактора погружного типа и трансформация нитрилов в реакторе.	54

2.10. Синтез концентрированных растворов акриламида и акриловой кислоты	56
2.11. Газовая хроматография	56
2.12. Микроскопия	57
2.13. Метагеномный анализ	58
2.14. Статистический анализ.....	59
ГЛАВА 3. ФИЗИОЛОГИЯ БИОПЛЕНОК НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ	
БАКТЕРИЙ ШТАММОВ <i>R. ruber</i> gt 1 И <i>Al. faecalis</i> 2	60
3.1. Динамика роста биопленок <i>R. ruber</i> gt 1 и <i>Al. faecalis</i> 2	60
3.1.1. Биоупленкообразование клеток <i>R. ruber</i> gt 1 и <i>Al. faecalis</i> 2.....	61
3.1.2. Энергетический статус клеток биопленок.....	62
3.1.3. Синтез внеклеточного полисахаридного матрикса.....	63
3.2. Влияние клеток нитрилгидролизующих бактерий на рост друга.....	65
3.3. Жизнеспособность клеток биопленок в условиях стресса.....	71
3.3.1. Влияние ацетонитрила на жизнеспособность клеток.....	71
3.3.2. Влияние неблагоприятных факторов окружающей среды на жизнеспособность клеток.....	76
3.4. Миграция клеток из биопленок.....	85
ГЛАВА 4. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ АКРИЛАМИДА, АКРИЛОНИТРИЛА И АЦЕТОНИТРИЛА БИОПЛЕНКАМИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ	
БАКТЕРИЙ	91
4.1. Динамика трансформации акриламида клетками <i>Al. faecalis</i> 2.....	91
4.2. Динамика трансформации акрило- и ацетонитрила клетками <i>R. ruber</i> gt 1	96
4.3. Трансформация акрило- и ацетонитрила двувидовыми биопленками <i>R. ruber</i> gt 1 и <i>Al. faecalis</i> 2 в системе реактора погружного типа	100
4.3.1. Трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками, выращенными на базальтовом волокне диаметром 22 мкм	100

4.3.2. Трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками, выращенными на базальтовом волокне диаметром 4-12 мкм.....	104
4.3.3. Трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками, выращенными на углеродном волокне.....	106
4.3.4. Трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками, выращенными на базальтовом и углеродном волокне в реакторе типа «сэндвич»	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

ВВЕДЕНИЕ

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 (Reisner *et al.*, 2006; Vejvoda *et al.*, 2006; Yeom *et al.*, 2007). 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 очистки требуется разработка способов 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 объемы 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 загрязненных 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*, *Gordona*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и др. (Martínková *et al.*, 2009; Velankar *et al.*, 2010; Asano, Kaul, 2012; Rapheeha *et al.*, 2017; Martínková, 2019). 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 нитрилутилизирующих бактерий в процессах деградации нитрильных и амидных соединений представляется актуальным.

Состояние вопроса

В течение нескольких десятилетий нитрилгидролизующие микроорганизмы привлекают повышенное внимание со стороны исследователей благодаря высокому потенциалу использования их ферментативных систем в процессах трансформации нитрильных соединений в соответствующие амиды и карбоновые кислоты, которые имеют большое значение в промышленности (Дебабов, Яненко, 2011; Martin, Nerenberg, 2012). С момента открытия микроорганизмов, обладающих ферментами гидролиза нитрилов, опубликовано множество работ, касающихся биохимических и генетических основ процесса трансформации нитрилов и амидов, изучения структуры нитрилгидролизующих ферментов, а также метаболических путей гидролиза нитрилов и амидов. Возрастание интереса к изучению свойств нитрилутилизирующих бактерий вызвано возможностью их применения в биотехнологических процессах.

Конверсия нитрилов представляет большой практический интерес благодаря получению промышленно значимых органических веществ. Так, например, акриламид является одним из важнейших продуктов химической промышленности и используется в различных областях народного хозяйства, молекулярной биологии и медицине. Акриловая кислота и ее соли являются самыми востребованными акриловыми мономерами химической промышленности. Акриловые полимеры используются для производства флокулянтов для очистки сточных вод и в водоподготовке, для производства эмульгаторов для лакокрасочных материалов, пропитки тканей и кожи, производства синтетического каучука, акриловых клеев и др. Никотинамид и никотиновая кислота находят широкое применение в медицине и фармакологической промышленности, так как являются необходимыми элементами питания.

На данный момент существует много работ, посвященных использованию ферментов или целых клеток нитрилгидролизующих бактерий в биокаталитических процессах (Badoei-Dalfard *et al.*, 2016; Martínková, 2019). Ряд работ касается получения акрилата аммония из акрилонитрила суспензией клеток *Alcaligenes* (Глинский и др., 2010), никотиновой кислоты и 3-цианопиридина в мембранном реакторе на основе *Microbacterium* (Cantarella *et al.*, 2008, 2010, 2012), синтеза п-метоксифенилуксусной кислоты иммобилизованными клетками *Bacillus subtilis* (Chen *et al.*, 2008), получения D-фенилглицина иммобилизованными клетками *Pseudomonas aeruginosa* (Alonso *et al.*, 2007). Для энантиоселективного синтеза миндальной кислоты используются иммобилизованные клетки *Pseudomonas putida* или рекомбинантный штамм *E. coli*, содержащий ген нитрилазы, выделенный из *Pseudomonas putida* (Banerjee *et al.*, 2006; 2009). Также показана возможность деградации нитрилов с целью получения биофлокулянтов в реакторе на основе иммобилизованных клеток *Klebsiella oxytoca* (Yu *et al.*, 2019).

Показан потенциал использования ферментов и целых клеток культуры *Rhodococcus rhodochrous* как с целью получения коммерчески значимых никотиламида и акриламида, так и с целью простого гидролиза полиакрилонитрилов и энантиоселективного гидролиза β -гидроксинитрилов (Tauber *et al.*, 2000; Raj *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2007; Kinfе *et al.*, 2009). Ряд работ касался деградации газообразного акрилонитрила иммобилизованными клетками *Rhodococcus ruber* (Roach *et al.*, 2004), а также трансформации акрилонитрила иммобилизованными клетками *P. fluorescens* C2 (Максимова и др., 2011) и *R. pyridinivorans* NIT-36 (Jyoti *et al.*, 2017), трансформации ряда нитрилов иммобилизованными клетками *Rhodococcus equi* (Kubáč *et al.*, 2006) и рекомбинантным штаммом *E. coli* (Rustler *et al.*, 2007), трансформации бензонитрила клетками *Rhodococcus* sp. MTB5 (Mukram *et al.*, 2015, 2016), деградации акриламида клетками *Enterobacter aerogenes* в реакторе периодического действия (Madmanang *et al.*, 2019).

Однако все эти работы посвящены использованию иммобилизованных ферментов, свободных клеток в суспензии или искусственно иммобилизованных клеток нитрилгидролизующих бактерий. Использованию биопленок нитрилгидролизующих бактерий в процессах биосинтеза или биологической очистки уделяется мало внимания, хотя потенциал применения биопленок в промышленности давно известен (Berlanga *et al.*, 2016). Много работ посвящено получению биоводорода в анаэробных биореакторах различной конфигурации (Wu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010; Show *et al.*, 2011). Показано эффективное получение янтарной кислоты с помощью биопленок *Actinobacillus succinogenes* (Urbance *et al.*, 2004) и производство биоэтанола биопленками *Saccharomyces cerevisiae* (Mathew *et al.*, 2013). Также потенциал использования биопленок изучен для процессов очистки некоторых пищевых продуктов (в частности пальмового масла) и сточных вод (Basu, Gupta, 2010; Latif *et al.*, 2011; Puyol *et al.*, 2011; Martin, Nerenberg, 2012; Singh *et al.*, 2013; Вдовина и др., 2020).

Что касается использования биопленок нитрилгидролизующих бактерий, то им посвящено немного работ. Ряд исследователей показали, что биофильтры на основе микробных клеток можно использовать для разложения нитрильных соединений до безвредных промежуточных соединений или, в конечном итоге, диоксида углерода и воды. Была показана эффективность разложения пропионитрила в биореакторе на основе клеток *Klebsiella oxytoca* (Chen *et al.*, 2010). С целью удаления ацетонитрила, акрилонитрила, цис- и транс-кродонитрила из сточных вод была использована рекомбинантная бактерия *B. subtilis* N4 / pHTnha-ami со способностью к разрушению органонитрилов и биопленкообразующей способностью (Li *et al.*, 2010). Показана эффективная очистка нитрилсодержащих подземных вод в реакторе на основе смешанных биопленок *Rhodococcus rhodochrous* BX2 в качестве нитрилгидролизующего

штамма и *Bacillus mojavensis* M1 в качестве микроорганизма-продуцента стабильной биопленки (An *et al.*, 2018).

Тем не менее, в литературе практически не содержится сведений о физиологических особенностях клеток биопленок нитрилгидролизующих бактерий, и более того, нет работ, посвященных взаимному влиянию штаммов нитрилгидролизующих бактерий в смешанных биопленках в процессах деструкции нитрильных и амидных соединений.

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 грам-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.

Личный вклад автора состоял в планировании и проведении экспериментов, включая бактериологические и биохимические исследования, анализ образцов методом газовой хроматографии, флюоресцентную микроскопию, конструирование модельного реактора погружного типа и исследования, связанные с его работой. Автор осуществлял критический анализ полученных данных и их интерпретацию. Автор участвовал в подготовке результатов работы к публикации и их представлении на научных конференциях. 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.

Список принятых сокращений: АТФ – аденозинтрифосфат; ГХ – газовая хроматография; ДМСО – диметилсульфоксид; КОЕ – колониобразующие единицы; ОП – оптическая плотность; МАТН – Microbial Adhesion to Hydrocarbons (микробная адгезия к углеводородам).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биопленки как естественная форма существования микроорганизмов

Со времени становления микробиологии как науки микроорганизмы, в частности бактерии, изучали в основном в планктонном состоянии. Как следствие этого основные физиологические параметры бактерий, такие как питание, энергетический обмен, рост и взаимодействие с окружающей средой, описаны именно для суспензионных культур. Однако уже в конце XX века сформировалось представление о двух формах существования бактерий в процессе роста и размножения. В одной форме бактерии существуют как отдельные независимые планктонные клетки, в другой – организованы в агрегаты, называемые биопленкой (Vjarnsholt, 2013). Как правило, в природных условиях планктонные формы являются временным явлением, основная часть бактериальных популяций существует в виде прикрепленных к различным поверхностям биопленок, образование которых представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс (Hassanpourfard *et al.*, 2014; Нетрусов, Котова, 2006). В связи с этим прямая экстраполяция результатов экспериментов с планктонными бактериями на сложные природные процессы не будет точной.

Бактериальная биопленка как прикрепленная форма жизни в природе является доминирующим фенотипом над свободно плавающей планктонной формой и представляет собой успешную стратегию защиты бактерий от неблагоприятных факторов окружающей среды (Marić, Vraneš, 2007; Muruzović *et al.*, 2018; Sheldon *et al.*, 2012). Биопленки – это адгезированные на поверхности раздела фаз сообщества бактериальных клеток, встроенные во внеклеточный полимерный матрикс собственного производства, состоящий преимущественно из экзополисахаридов, белков и нуклеиновых кислот (Sheldon *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2010; Stewart, Franklin, 2008; Vu *et al.*, 2009). Внеклеточный полисахаридный матрикс, функционирующий в

качестве диффузионного барьера, защищает клетки биопленок от различных неблагоприятных условий окружающей среды. Поэтому биопленкообразование рассматривается как незаменимый механизм адаптации микроорганизмов к неблагоприятным условиям окружающей среды. Биопленки и одиночные планктонные клетки имеют различные фенотипы и отличные друг от друга параметры роста и экспрессии специфических генов (Abdallah *et al.*, 2014).

Биопленки существуют в основном на поверхности раздела фаз: жидкость – твердая поверхность, жидкость – воздух, две несмешивающиеся жидкости и твердая поверхность – воздух. Существуют также биопленки, состоящие из адгезированных друг к другу бактерий, которые образуют гранулы. Поскольку многие вещества имеют свойство накапливаться у границы раздела фаз, прикрепленные бактерии лучше снабжаются субстратами, чем планктонные клетки в жидкой среде. Наиболее распространены в природе и, соответственно, наиболее исследованы биопленки, развивающиеся на границе жидкой и твердой сред.

В местах естественного обитания микроорганизмы существуют, как правило, в виде мультивидовых сообществ, что отражено в исследованиях физиологических особенностей клеток в составе смешанных биопленок (Rosche *et al.*, 2009; Ножевникова и др., 2015). В мультивидовые сообщества могут входить не только несколько видов бактерий, но также грибы, водоросли и простейшие (Burmølle *et al.*, 2014). Зрелые биопленки часто содержат также покоящиеся или некультивируемые формы бактерий.

Мультивидовые биопленки имеют преимущества как перед планктонными клетками, так и перед моновидовыми биопленками. Отмечается, что в ряде случаев взаимодействие микроорганизмов в многовидовой ассоциации влияет на ее общую функциональность и/или окружающую среду, что приводит к увеличению биопленкообразования, усилению устойчивости к антибактериальным агентам, вирулентности или способности к деградации загрязняющих веществ (Burmølle *et al.*, 2014; Chen

et al., 2015; Røder *et al.*, 2015; Серебренникова и др., 2017). При наличии нескольких видов в биопленке усиливаются ее защитные эффекты. Более того, благодаря физико-химическим свойствам матрикса и его функционированию в качестве диффузионного барьера, в биопленке могут сосуществовать различающиеся по метаболизму бактерии, в том числе аэробы и анаэробы, нитрификаторы и денитрификаторы, что делает мультивидовые биопленки перспективными для использования в многостадийной конверсии веществ и очистке сточных вод (Кирилина и др., 2012). В связи с этим нужно отметить, что прямая экстраполяция результатов лабораторных экспериментов с моновидовыми биопленками на сложные природные биопленки будет неточной (Burmølle *et al.*, 2014).

Изучение биопленок вызывает огромный интерес исследователей в последние годы, главным образом потому, что этот способ существования бактерий создает большие проблемы в медицине и различных отраслях хозяйственной деятельности. Способность бактерий формировать биопленки рассматривается в настоящее время как фактор колонизации, патогенности, вирулентности и защиты от повреждающих факторов окружающей среды (Марданова и др., 2016). Биопленки вызывают биокоррозию трубопроводов и систем коммуникации, обрастания различного технологического оборудования, колонизацию медицинского оборудования, имплантов и катетеров, сокращают сроки хранения пищевых продуктов, в природных условиях могут вызывать ухудшение экологической обстановки (Oh *et al.*, 2009; Skoneczny, Cioch, 2018; Kamjunke Oh *et al.*, 2012; Abdallah *et al.*, 2014; Flemming, Wingender, 2010; Abdel-Nour *et al.*, 2013; Wingender, Flemming, 2011). Все вышеперечисленные проблемы осложняются тем, что бактерии в составе биопленок проявляют значительно более высокую устойчивость к антимикробным препаратам, что крайне затрудняет борьбу с ними.

Однако следует отметить, что рост бактерий в виде биопленок наряду с проблемами в медицине и других отраслях может также обеспечивать преимущества при биологической очистке. Устойчивость к антимикробным

препаратам и высоким концентрациям токсичных соединений, способность образования сообществ, деградирующих поллютанты, позволяют эффективно использовать биопленки в различных промышленных процессах, направленных на биосинтез экономически значимых соединений и деградацию токсичных веществ. Так, например, биопленки монокультур могут использоваться в процессах получения органических веществ, так как в этом случае возможен контроль протекания реакции и максимальный выход продукта, а многовидовые биопленки прекрасно подходят для выполнения многошаговых реакций в синтезе сложных соединений или очистке сточных вод, загрязненных почв и отходящих газов (Winn *et al.*, 2012; Qureshi *et al.*, 2005).

Все вышесказанное обуславливает необходимость исследований биопленок микроорганизмов, особенностей их роста и развития, механизмов регуляции и генетического контроля их образования.

1.2. Особенности развития и существования биопленочных культур

Биопленки имеют сложный состав и архитектуру, которые обеспечивают возможность метаболической кооперации клеток, а также создают условия, благоприятствующие установлению симбиотических взаимоотношений между бактериями разных видов, передаче сигналов, влияющих на экспрессию генов в популяции бактерий. В связи с этим биопленки бактерий часто сравниваются с многоклеточным организмом.

Биопленки могут представлять собой суспендированные клеточные агрегаты, определяемые как плавающие биопленки (например, хлопья или гранулы), которые не прикреплены к поверхности, но обладают свойствами биопленки. Однако биопленочные организмы часто развиваются на поверхностях раздела фаз и внедряются в самопродуцируемые внеклеточные полимерные вещества, в которых они живут координированным образом, тем самым извлекая выгоду из экологических ниш, образующихся в биопленке.

Свойства этих микробных сообществ частично регулируются структурой, диффузией и физиологической активностью сообщества. Биопленки являются самовосстанавливающимися, пространственно и метаболически хорошо организованными сообществами и, как правило, менее подвержены воздействию токсичных субстратов и/или продуктов (Halan *et al.*, 2012). Мультивидовая биопленка может формировать стабильную микроконсорцию, в ней устанавливаются физико-химические градиенты питательных веществ, метаболитов и кислорода, наблюдается горизонтальный перенос генов и сложная межклеточная коммуникация (D'Acunto *et al.*, 2018). Организация этих многообразных сообществ, связанных с поверхностью, позволяет входящим в них микроорганизмам осуществлять скоординированные и эффективные стратегии выживания.

Физиология клеток в составе биопленок значительно отличается от их планктонного состояния. Показано, что микроорганизмы в составе биопленки в 100–1000 раз более устойчивы к противомикробным агентам (Desmond *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Abdallah *et al.*, 2014; Wall *et al.*, 2019; Narimawan, Ting, 2016). При переходе к биопленочному типу существования в клетках бактерий изменяется экспрессия ряда генов. По сравнению с планктонными клетками у клеток в составе биопленок могут работать до 10% от общего числа генов или более половины белков, связанных с адсорбцией и системой кворума (Zhang *et al.*, 2013). Фенотипические различия между биопленочными культурами и планктонно существующими бактериями могут проявляться неодинаково. Например, биопленочный рост патогенных бактерий часто приводит к инфекциям, которые имеют повышенную толерантность к противомикробным препаратам и иммунному ответу хозяина. В биореакторах же рост биопленки влияет на скорость реакции, включая биodeградацию токсичных химических веществ и синтез продуктов во время процессов биосинтеза.

Примечательно, что большинство микроорганизмов способны совершать переход к жизни на поверхности независимо от их

физиологических возможностей. Бактериальные поверхности неоднородны, и, что наиболее важно, они могут резко измениться в ответ на изменения в окружающей среде. Основываясь на исследованиях разных годов, формирование биопленки можно рассматривать как хорошо регулируемый процесс развития, который приводит к образованию сложного сообщества организмов. Чтобы сформировать эти сообщества, микроорганизмы должны объединять внешние и внутренние сигналы, оценивать своих соседей, определяя их плотность и тип, и координировать многоклеточное поведение, которое может быть связано с морфологическими изменениями (O'Toole *et al.*, 2000).

Экзополисахариды (ЭПС) иммобилизуют клетки биопленки и удерживают их в непосредственной близости, тем самым обеспечивая интенсивное взаимодействие, в том числе межклеточное общение, и формирование синергетической микрoконсорции. Благодаря концентрации внеклеточных ферментов образуется универсальная "внешняя пищеварительная система", которая извлекает растворенные и взвешенные питательные вещества из водной фазы и позволяет использовать их в качестве источников питательных веществ и энергии. Входящая в состав матрикса внеклеточная ДНК участвует в горизонтальном переносе генов. Полисахаридный матрикс защищает организмы от высыхания, окисления, действия биоцидов, некоторых антибиотиков и катионов металлов, ультрафиолетового излучения, многих хищников и иммунной системы организма. Экологическая конкуренция и сотрудничество в замкнутом пространстве матрицы приводят к постоянной адаптации бактерий.

С увеличением толщины биопленки в ней возникает неоднородность по некоторым параметрам. Клетки, находящиеся на периферии, относительно лучше снабжаются субстратом и кислородом, тогда как в нижних слоях микроорганизмы больше подвержены воздействию продуктов метаболизма и голоданию, в результате чего они могут отмирать, что приводит к структурной нестабильности биопленки. В результате лимитированной

диффузии кислорода в толщу биопленки в нижних ее слоях доминирующим типом метаболизма является анаэробный. При этом продукты метаболизма бактерий, находящихся в нижних слоях биопленки, диффундируют к поверхности и могут служить субстратами для аэробных бактерий.

Кроме того, могут формироваться и сложные сообщества, состоящие из бактерий разных видов, включая грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы, а также простейших. В итоге образуется сообщество, где ряд функций все типы клеток выполняют вместе, и в то же время происходит распределение обязанностей.

1.2.1. Этапы формирования и развития биопленки

Формирование биопленки является сложным и динамичным процессом, состоящим из нескольких этапов: поверхностной адгезии бактерий и перераспределения клеточной массы, образования прикрепленного монослоя и пролиферации клеток (микроколоний), развития зрелой биопленки и, наконец, рассеивания и перехода клеток в планктонное состояние (D'Acunto *et al.*, 2018).

Считается, что формирование биопленки происходит в ответ на сигналы окружающей среды, которые запускают переход к жизни в прикрепленном состоянии. Эти сигналы окружающей среды варьируются среди организмов. Так важным фактором, определяющим переход клеток к биопленочному существованию, является наличие или присутствие в среде питательных веществ и других специфичных молекул. В дополнение к составу питательной среды существуют другие факторы, которые могут влиять на переход клеток в биопленочное существование: температура, осмолярность, рН, наличие в среде железа и кислорода, тип поверхности (O'Toole *et al.*, 2000).

1.2.1.1. Начальная адгезия к поверхности

Формирование биопленки начинается с прикрепления к поверхности нескольких планктонных свободно плавающих бактерий, что происходит в два этапа – обратимое и необратимое прикрепление (Petrova, Sauer, 2016). Первоначальное обратимое прикрепление клеток к поверхности зачастую является следствием их направленного движения, обусловленного хемотаксисом. Первичный контакт поверхности среды и мутантов, дефектных по подвижности, происходит случайно, например, при пассивной миграции клеток с током жидкости. Притяжение к поверхности осуществляется за счёт действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Ваальса и является полностью небиологическим, ему подвергаются и живые, и мертвые клетки. Стадия первичной адгезии занимает несколько секунд и является обратимой. Во время этой стадии бактериальные клетки могут быть легко удалены с поверхности с помощью небольших сил сдвига, таких как силы, возникающие при полоскании или естественном потоке жидкости в окружающей среде.

Вторым этапом прикрепления клеток к поверхности является окончательное прикрепление, которое характеризуется необратимым связыванием бактериальных клеток с поверхностью. На этом этапе важную роль при взаимодействии с биотической или абиотической поверхностью играют поверхностные структуры клетки, а именно, белки адгезины, лектины фимбрий экзоплазматического компартмента, жгутики и липополисахариды. После специфической адгезии требуются большие силы для удаления прикрепленных бактерий или биопленок, такие как обработка ультразвуком, соскабливание или действие химических агентов.

Бактериальная адгезия к различным поверхностям определяется поверхностными свойствами бактериальной клетки, самой поверхности и среды, в которой находятся клетки. Среди таких свойств выделяют гидрофобность поверхности клеток и поверхности прикрепления, свободную энергию поверхности, шероховатость поверхности, электростатический заряд

или дзета-потенциал (Bruinsma *et al.*, 2001; Kanematsu, Barry, 2015; Renner, Weibel, 2011; Elbourne *et al.*, 2019).

В природе большинство поверхностей и бактерий несут отрицательный заряд, и считается, что адгезия между бактерией и поверхностью будет увеличиваться с увеличением ионной силы раствора (Moriarty *et al.*, 2017). Поскольку электростатическая сила уменьшается экспоненциально в зависимости от ионной силы в жидкостях с высоким содержанием ионов, во влиянии на адгезию клеток преобладают другие присутствующие силы.

Различные исследования с помощью световой и электронной микроскопии показали, что неровности поверхности служат предпочтительной отправной точкой для прикрепления клеток бактерий, обеспечивая ниши, в которых микроорганизмы защищены от сил сдвига (O'Toole *et al.*, 2000). Считается, что это позволяет микробной клетке необратимо прикрепляться к поверхности. В ходе большого количества исследований было показано, что уменьшение шероховатости поверхности значительно снижает бактериальную адгезию, вследствие изменения состояния поверхности от гидрофобного до гидрофильного, и уменьшения количества точек прикрепления бактериальных клеток (Lu *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2017; Vohinc *et al.*, 2016; Annunziata *et al.*, 2017; Derchi *et al.*, 2017; Shaikh *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019; Elbourne *et al.*, 2019).

Еще одним параметром, который часто связывают с бактериальной адгезией на различных поверхностях, является смачиваемость поверхности. Многие исследования показывают положительную корреляцию между гидрофобностью поверхности клетки и поверхности прикрепления (Shaikh *et al.*, 2018; Busscher *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2017). Силы гидрофобного взаимодействия зависят от окружающей среды, свойств клеточной стенки бактерий и поверхности. Гидрофобность / гидрофильность клеточной стенки зависит от поверхностных структур клетки. Для грамположительных бактерий такими структурами являются нейтральные и кислые полисахариды, белки клеточной стенки и тейхоевые кислоты; для

грамотрицательных основной определяющей структурой являются липополисахариды.

Бактериальные поверхности покрыты биомакромолекулами, природа которых определяет поведение бактерий в отношении прикрепления. Многие бактерии имеют поверхностные структуры, которые способствуют адгезии. Эти структуры могут нарушить энергетический барьер, который отделяет бактерии от поверхности, а также способствовать адгезии через подвижность (Moriarty *et al.*, 2017; Vissers *et al.*, 2018; Verne *et al.*, 2018). Кроме того, поверхностные структуры, участвующие в прикреплении, отличаются от общего характера поверхности микроорганизма. Каждая структура поверхности может быть специфичной для поверхности прикрепления с определенными свойствами (O'Toole *et al.*, 2000). Ранние исследования, в основном сфокусированные на начальных этапах развития биопленки, выявили поверхностные адгезины, отвечающие за взаимодействие как с биотическими, так и с абиотическими поверхностями (Solano *et al.*, 2014). Большое количество адгезинов было идентифицировано у многих видов бактерий. Эти образования могут распознавать простые или сложные углеводные структуры, мембранные белки или компоненты внеклеточного матрикса хозяина. Конкретный набор адгезинов, которым обладает отдельная бактерия, зависит в значительной степени от вида, но также может варьировать в пределах штаммов одного и того же вида (Moriarty *et al.*, 2017).

Например, помимо активного продвижения бактерий по поверхности, жгутик играет важную роль в адгезии, обеспечивая физический контакт с поверхностью и функционируя как адгезин (Palmer *et al.*, 2007). В этом случае бактерии могут использовать свои жгутики, чтобы исследовать местную топографию поверхности или получить доступ к среде, недоступной для относительно большого тела клетки, в качестве способа повышения эффективности прикрепления. Адгезия кишечной палочки, имеющей жгутики, улучшается на поверхностях с грубой микротопографией по сравнению с плоскими поверхностями, вероятно, потому, что жгутики

могут получить доступ к расщелинам и инициировать адгезию на большей поверхности (Friedlander *et al.*, 2013). Помимо жгутиков, другие тонкие белковые структуры на поверхности клетки, включая фимбрии, курли и пили, участвуют в неспецифической начальной адгезии к абиотическим поверхностям. Хотя некоторые пили, в том числе пили типа I у *E. coli*, имеют специфические рецепторы, которые связываются с конкретными субстратами, большинство пилей могут связывать широкий спектр неспецифических субстратов через неизученный механизм (Verne *et al.*, 2018).

Укрепление связи после первоначального контакта в основном определяется перестройками как бактериальных, так и поверхностных компонентов. Например, считается, что адгезины испытывают внутримолекулярную перегруппировку при контакте с поверхностью, которая увеличивает количество связей с поверхностью и способствует тесному контакту между бактерией и поверхностью (Verne *et al.*, 2018). Кроме того, в укреплении связей между клеткой и поверхностью важную роль играет выработка ЭПС. Для *Caulobacter crescentus* было описано, что адгезия стимулирует продукцию ЭПС, тогда как у *Pseudomonas aeruginosa* силы адгезии, действующие на пили, вызывают изменения экспрессии генов и продукцию ЭПС в течение 1-2 ч после контакта с поверхностью (Ellison *et al.*, 2017; Crouzet *et al.*, 2017; Rodesney *et al.*, 2017). В то время как первоначальное укрепление связи между клеткой и поверхностью является чисто физико-химическим процессом, происходящим как в бактериях, так и в абиотических коллоидных частицах, образование экзополисахаридного матрикса, наряду с взаимодействием клеточных придатков с поверхностью, является биологическим процессом, который способствует укреплению связи между бактериями и субстратом (Carniello *et al.*, 2018).

1.2.1.2. Рост и созревание

Третьим этапом формирования биопленки является рост и созревание. На стадии созревания образуются микроколонии, в которых клетки объединены внеклеточным полимерным матриксом. По мере размножения бактерий микроколонии увеличиваются в размерах и объединяются с образованием пленки, которая характеризуется не только толщиной и формированием специфических структур, таких как выросты, поры, каналы, но также дифференцировкой клеток и обменом генами, что обеспечивает выживаемость клеток внутри биопленки. Таким образом, на этом этапе образуется зрелая биопленка, в которой клетки заключены во внеклеточный матрикс в сочетании со сложной архитектурой. Такая матрица выступает в качестве основы для стабилизации трехмерной структуры биопленки.

Как только микроорганизмы обосновываются на субстрате, они начинают подвергаться ряду изменений, которые адаптируют их к жизни на поверхности. Обычные адаптации включают экспрессию большого количества экзополисахаридов, которые могут защищать биопленку и приводить к устойчивости к антибактериальным агентам. Кроме того, зрелые биопленки могут иметь сложные архитектурные особенности. Каналы и поры, образуемые в зрелой биопленке, обеспечивают поток питательных веществ, ферментов, метаболитов, продуктов жизнедеятельности и других растворенных веществ по всей структуре (O'Toole *et al.*, 2000). Образующаяся в результате биопленка может быть гладкой и плоской, шероховатой, ворсистой или нитевидной, различаться по степени пористости, имея грибоподобные макроколонии, окруженные заполненными водой пустотами (Flemming, Wingender, 2010).

Основой зрелой биопленки является полимерный матрикс (до 90% от всего объема биопленки), состоящий преимущественно из экзополисахаридов, которые могут быть связаны с клеткой (капсульные ЭПС) или секретироваться вне клетки (Bala Subramanian *et al.*, 2010; Abdallah *et al.*, 2014). Большинство бактерий используют циклические нуклеотиды для

индукции синтеза экзополисахаридов матрицы биопленки (Solano *et al.*, 2014). Помимо экзополисахаридов матрикс содержит белки (до 60%), липиды (до 40%) и нуклеиновые кислоты (до 20%), а также в незначительных количествах гуминовые и уроновые кислоты (Winn *et al.*, 2012; Halan *et al.*, 2012; Flemming, Wingender, 2010). Состав матрикса различен у бактерий разных таксономических групп и может различаться у одного штамма в зависимости от времени и состояния клеток. Кроме того, состав матрикса биопленки зависит также от доступности питательных веществ и ее возраста (Abdallah *et al.*, 2014; Flemming, Wingender, 2010). Помимо микробных клеток и секретируемых полимеров в состав матрикса также входят поглощенные питательные вещества и метаболиты, продукты лизиса клеток и даже твердые частицы из окружающей среды.

Экзополисахаридный матрикс обеспечивает механическую стабильность и каркас, который позволяет клеткам биопленки создавать синергетическую микроконсорцию, улучшает удержание воды и сорбцию питательных веществ, обеспечивает защиту от вирусов, хищников, антимикробных и дезинфицирующих средств и, в конечном счете, действует как площадка для повторного использования питательных веществ (Seviour *et al.*, 2018). Экзополисахаридный матрикс в некоторых случаях также может служить источником питательных веществ, хотя некоторые компоненты ЭПС могут медленно подвергаться биологическому разложению. Молекулы полисахаридов могут взаимодействовать друг с другом или с гетерологичными молекулами с образованием гелей, а также с белками и молекулами гликопротеина как в виде растворенных веществ, так и в виде прикрепленных к поверхности микробных клеток.

Молекулярная масса ЭПС варьирует в пределах от нескольких тысяч до нескольких миллионов, а компоненты содержат различные функциональные группы, включая карбоксильные, amino- и фосфатные группы. Присутствие анионных групп в составе ЭПС позволяет ассоциировать

двухвалентные катионы такие как кальций, которые увеличивают силы связывания в развитой биопленке (Abdallah *et al.*, 2014).

Рост биопленки лимитируется факторами окружающей среды, среди которых наиболее значимыми являются доступность питательных веществ и кислорода, проникновение их в толщу биопленки, а также эффективностью удаления продуктов метаболизма. В ходе созревания биопленки создается сложная трехмерная архитектура с каналами и порами. Эти каналы в матриксе создают своеобразную проводящую систему, которая позволяет воде и питательным веществам диффундировать через глубокие слои биопленки, а также выводить ненужные вещества (Halan *et al.*, 2012). Кроме того, по каналам также могут мигрировать бактерии.

1.2.1.3. Дисперсия и отмирание

Последним этапом жизненного цикла биопленки является дисперсия. В определенный момент времени достигается критическая масса, при этом от наружных слоев биопленки начинают открепляться клетки, способные покинуть биопленку и колонизировать другие поверхности, чтобы повторить цикл.

По мере того, как биопленка увеличивается в размерах, некоторые клетки будут все больше отделяться от поверхности раздела жидкость-жидкость и основных источников энергии или питательных веществ. Накопление отходов и токсинов может представлять дополнительную проблему для клеток, входящих в состав биопленки. Таким образом, биопленочные клетки выработали механизмы, позволяющие избежать "сидячего" режима роста и способствующие распространению клеток с целью колонизации новых мест обитания (Petrova, Sauer, 2016).

Начало фазы дисперсии совпадает с образованием зон некроза, где биомасса, состоящая из активных клеток, гидролизует, что приводит к образованию дисперсных клеток, которые выделяются в биопленку, а затем в основную массу жидкости (D'Acunto *et al.*, 2018). Высвобождение

дисперсных клеток вызывает образование пустот, что приводит к увеличению пористости биопленки. Однако дисперсия редко охватывает всю биопленку. Как правило, только отдельные микроколонии или области внутри биопленки будут подвергаться воздействию дисперсии в любое конкретное время, что часто зависит от диаметра микроколонии (Petrova, Sauer, 2016).

Известно, что миграция клеток и отрыв целых фрагментов от биопленки является критическим моментом в развитии биопленочных систем. Этот процесс приводит к распространению микроорганизмов, оказывает вредное воздействие на производственные системы и качество получаемого продукта, а также степень биообрастания и производительность (Derlon *et al.*, 2013). Существует как минимум три способа выхода бактерий из состава биопленки: десорбция, отслоение и дисперсия.

Десорбция не может рассматриваться как этап разрушения биопленки, поскольку это явление наблюдается на ранних этапах развития биопленки и влияет на первоначальную адгезию клеток к поверхности.

Вторым способом выхода клеток из биопленки является отслоение, которое зависит главным образом от влияния движущейся жидкости, контактирующей с поверхностью биопленки. К отслоению относят два процесса: эрозию и истирание. Эрозия – это обусловленный физическими силами непрерывный процесс потери отдельных клеток или их небольших скоплений, который затрагивает всю поверхность биопленки (Derlon *et al.*, 2013; Petrova, Sauer, 2016; Walter *et al.*, 2013). Истирание – это высвобождение клеток в результате столкновений с частицами на поверхности биопленки (Petrova, Sauer, 2016; Walter *et al.*, 2013). Таким образом, отслоению подвержены клетки, находящиеся ближе всего к поверхности биопленки. Физические свойства биопленки, такие как шероховатость, пористость, плотность, площадь поверхности, могут сильно влиять на ее механическую прочность и, следовательно, на отслаивание (Paul *et al.*, 2012). Данный способ выхода клеток из биопленки не является

регулируемым процессом, однако вносит существенный вклад в ее рассеяние.

Процесс дисперсии – третий способ высвобождения клеток из биопленки – характеризуется не только миграцией клеток в результате влияния факторов окружающей среды, но и активным фенотипическим переключением, которое обеспечивает физиологические изменения, способствующие высвобождению клеток из сообществ биопленок (Petrova, Sauer, 2016). При активном росте биопленки увеличивается ее толщина и плотность, и как следствие питательные вещества и другие, необходимые для жизни бактериальных клеток компоненты, поступают в толщу биопленки в недостаточном количестве. В результате чего клетки в слоях биопленки, которые находятся далеко от границы раздела фаз, могут испытывать голод, а также стресс при синтезе токсичных продуктов. Чувство кворума дает бактериям способность распознавать плотность биопленки и регулировать ее благодаря синтезу разрушающих матрикс ферментов. В отличие от пассивного отслоения, вызванного воздействием внешних сил, процесс дисперсии на заключительной стадии жизненного цикла биопленки является активным и строго регулируемым ответом. Индуцированная дисперсия включает активное высвобождение бактерий из биопленки как физиологически регулируемый ответ на внутренние или внешние раздражители, при этом диспергирующие клетки испытывают изменения в своем поведении. Дисперсные клетки отличаются от планктонных клеток в отношении экспрессии генов, посттрансляционной модификации, высвобождения ферментов, разрушающих матрикс, и патогенности, причем дисперсные клетки обладают высокой вирулентностью в отношении макрофагов (Petrova, Sauer, 2016; Hindre *et al.*, 2008; Barraud *et al.*, 2006; Petrova, Sauer, 2012). Для дисперсии требуется непосредственное производство биопленочными бактериями разрушающих матрикс ферментов, таких как альгинат-лиаза, гликозилгидролаза PslG или bN-ацетилглюкозаминидаза, которые могут катализировать разложение

специфических компонентов в ЭПС биопленки и способствовать отслоению биопленки и десорбции микробных клеток (Li *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018).

Чувство кворума дает бактериям способность распознавать плотность популяции путем измерения накопления определенных сигнальных молекул, часто аутоиндукторов, которые выделяют члены сообщества (Solano *et al.*, 2014). Аутоиндукторы накапливаются в окружающей среде по мере увеличения плотности популяций бактерий, и бактерии воспринимают эту информацию, чтобы отслеживать изменения в количестве своих клеток и совместно изменять экспрессию генов (Rutherford, Bassler, 2012). Существуют разные стратегии для достижения дисперсии биопленки: прекращение синтеза соединений матрицы биопленки, разрушение матрицы, а также нарушение нековалентных взаимодействий между компонентами матрицы.

На миграцию клеток из зрелой биопленки влияет множество параметров. Одним из возможных сигналов отсоединения может быть голодание (O'Toole *et al.*, 2000). Стрессорный ответ на голодание позволяет клеткам искать новый источник питательных веществ, и обусловлен хорошо изученными адаптациями, которые испытывают бактерии, когда питательных веществ становится мало. Помимо ответа на голодание, вторым наиболее распространенным объяснением эволюции дисперсной фазы в биопленке является конкуренция клеток за пространство (D'Acunto *et al.*, 2018). Дисперсия биопленки необходима для того, чтобы бактерии могли колонизировать новые ниши, когда питательные вещества и другие ресурсы становятся ограниченными, а отходы накапливаются.

Некоторыми авторами отмечается, что условия роста биопленок и, как следствие, физическая структура, например, наличие поверхностных неоднородностей биопленки, сильно влияют на процесс отслоения (Derlon *et al.*, 2013; Walter *et al.*, 2013). Также отмечается, что на миграцию клеток из биопленки влияют собственные поверхностно-активные вещества клетки и

действие ферментов, локализованных в экзополисахаридном матриксе; деградация матрицы биопленки химическими средствами и внешние физические воздействия окружающей среды (Desmond *et al.*, 2018; Solano *et al.*, 2014; Walter *et al.*, 2013). Все эти факторы запускают механизм дисперсии для перемещения бактерий в места с благоприятными условиями окружающей среды и их колонизации.

Дисперсия биопленки может оказывать как негативное влияние на процессы, основанные на биопленочных системах, так и являться важным фактором регулирования старения биопленки, от которого зависит эффективность всей системы.

1.2.2. Устойчивость биопленок к неблагоприятным факторам окружающей среды

Повышенная устойчивость клеток биопленки к различным воздействиям окружающей среды объясняется пятью потенциальными взаимодействующими факторами: медленное или неполное проникновение антимикробных агентов вглубь матрикса, снижение метаболизма из-за недостатка питательных веществ во внутренней части биопленки, гетерогенность популяции, вызванная изменяющимися условиями в биопленке, производство персистирующих клеток и перекрестная защита через действие общего механизма реакции на стресс (Sheldon *et al.*, 2012). Синтезируемые бактериями ЭПС помимо создания трехмерной структуры биопленки создают также защитную среду. Таким образом, противомикробные агенты и хищники должны сталкиваться с этим физическим барьером, который не позволяет им достичь более глубоких слоев биопленки.

Доказано, что клетки в биопленке более устойчивы к биоцидам, чем их планктонные аналоги. Многочисленные сообщения указывают на то, что антимикробная эффективность различных водных дезинфицирующих средств ниже для связанных с биопленкой видов, чем для планктонных

видов. То, какое дезинфицирующее средство является наиболее эффективным в конкретной ситуации, зависит от множества факторов, включая природу поверхности прикрепления, температуру, время воздействия, концентрацию, pH и устойчивость бактерий (Van Houdt, Michiels, 2010). Устойчивость объясняется различными механизмами: измененной физиологией клеток биопленки, медленным или неполным проникновением биоцида в биопленку, экспрессией адаптивного стрессового ответа некоторыми клетками или дифференцированием небольшой субпопуляции клеток в персистирующие клетки. По оценкам, эта субпопуляция составляет около 0,1–10% от общего количества клеток биопленки и имеет бактериальный фенотип, который очень устойчив к противомикробным препаратам (Abdallah *et al.*, 2014). Персистирующие клетки биопленки защищены полисахаридной матрицей, так что небольшая часть персистеров ответственна за высокую устойчивость биопленок к разрушению, а именно когда концентрация антибактериальных препаратов снижается, персистеры восстанавливают биопленку, которая затем начинает выделять новые планктонные клетки (Marić, Vraneš, 2007).

Диффузионный барьер, образованный матриксом биопленки, обеспечивает резистентность клеток к крупным белковым молекулам (Abdallah *et al.*, 2014). Но в первую очередь медленное или неполное проникновение биоцида вглубь биопленки происходит за счет нейтрализации активного соединения во внешних областях матрицы в результате реакции с органическим веществом или электростатических взаимодействий (Van Houdt, Michiels, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Tseng *et al.*, 2013; Epstein *et al.*, 2010).

Клетки биопленки, особенно те, которые находятся в нижних слоях биопленки, демонстрируют пониженную скорость роста из-за градиентов кислорода и питательных веществ. Это приводит к такому состоянию клеток, которое вызывает повышенную устойчивость к биоцидам (Abdallah *et al.*, 2014; Cherchi, Gu, 2010). В соответствии с этими наблюдениями более старые

био пленки, по-видимому, более устойчивы к различным дезинфицирующим средствам, чем более молодые био пленки. Кроме того, замедление или прекращение роста бактерий в более глубоком слое био пленки из-за недостатка субстрата и кислорода может снизить поглощение противомикробных препаратов. Другой возможный механизм устойчивости к биоцидам основан на том, что некоторые из био пленочных клеток способны воспринимать наличие биоцида в среде и активно реагировать, используя защитные стрессовые реакции, которые являются более эффективными, чем у планктонных клеток, или вообще отсутствуют у них (Beloin *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2004; Szomolay *et al.*, 2005). К некоторым реакциям можно отнести повышенную экспрессию каталазы (*katB*) во время обработки перекисью водорода или усиление синтеза ЭПС, что приводит к формированию более массивной матрицы био пленки (Van Houdt, Michiels, 2010). Таким образом, бактерии, обнаруженные в био пленках, часто гораздо более устойчивы к антибиотикам, чем их планктонные аналоги (Desmond *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Abdallah *et al.*, 2014).

Как уже отмечалось ранее, все молекулы накапливаются у границы с поверхностью, в результате чего прикрепленные к поверхности бактерии лучше снабжаются субстратами, чем свободные клетки в жидкой среде. Таким образом, переход к био пленочной форме существования увеличивает устойчивость бактерий в условиях низкой концентрации субстрата в окружающей среде. Кроме того, био пленки хорошо удерживают воду, защищая таким образом клетки от высыхания. Бактерии в составе био пленок имеют большие возможности для обмена плазмидами и могут также развивать другие свойства, в том числе повышенную устойчивость к ультрафиолетовому излучению, повышенный уровень обмена генетическим материалом, измененные биодеградирующие способности и повышенную выработку вторичных метаболитов (O'Toole *et al.*, 2000).

1.3. Нитрилгидролизующие бактерии

В последние годы значительно возрос интерес к нитрилгидролизующим бактериям, что обусловлено успешным опытом применения их каталитической активности в производстве акриламида и других полезных химических продуктов, в частности, акриловой кислоты. Нитрилами называются органические соединения, содержащие одну или несколько цианогрупп $C\equiv N$, связанных с органическим радикалом. Нитрилы являются естественными, широко распространенными соединениями живой природы, которые синтезируются растениями в качестве предшественников гормонов, запасных веществ и др. (Дебабов, Яненко, 2011). Известно также, что в растениях нитрилазы играют различные физиологические роли, такие как защита, детоксикация и утилизация азота (Asano, Kaul, 2012). Микроорганизмы, вероятно, могут использовать нитрилазы для детоксикации нитрила, особенно в промышленных сточных водах и в окружающей среде растений, синтезирующих различные нитрилы (Asano, Kaul, 2012; Eckardt, 2001).

В литературе описан целый ряд микроорганизмов, обладающих ферментом нитрилазой (КФ. 3.5.5.1). Первые исследования нитрилаз были опубликованы в 1960-х годах. В одной из ранних работ сообщается о способности ряда грибов из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gibberella* и *Fusarium* превращать 3-индолацетонитрил в 3-индолуксусную кислоту (Martínková *et al.*, 2009). Исследования нитрилаз были возобновлены в конце 1970-х годов в контексте растущего интереса к биотехнологическим применениям ферментов. Новые нитрилазы были очищены и охарактеризованы как из прокариотических, так и из эукариотических организмов. Ферментативная активность, связанная с метаболизмом нитрилов, распространена у актиномицетов, нокардий, различных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Среди бактерий, обладающих ферментами гидролиза нитрилов, выделяют рода *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*,

Brevibacterium, *Comamonas*, *Gordona*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и др. (Martínková *et al.*, 2009; Asano, Kaul, 2012; Velankar *et al.*, 2010; Rapheeha *et al.*, 2017).

В настоящее время известно множество штаммов микроорганизмов, способных осуществлять гидролиз нитрилов в одну или две стадии (рис. 1) (Singh *et al.*, 2006). Прямой гидролиз нитрила до кислоты катализирует фермент нитрилаза. Последовательный гидролиз нитрила до амида и далее до карбоновой кислоты осуществляется нитрилгидратазой (КФ 4.2.1.84) и амидазой (КФ 3.5.1.4), гены которых чаще всего экспрессируются в одном опероне (Gupta *et al.*, 2010; Prasad, Bhalla, 2010).

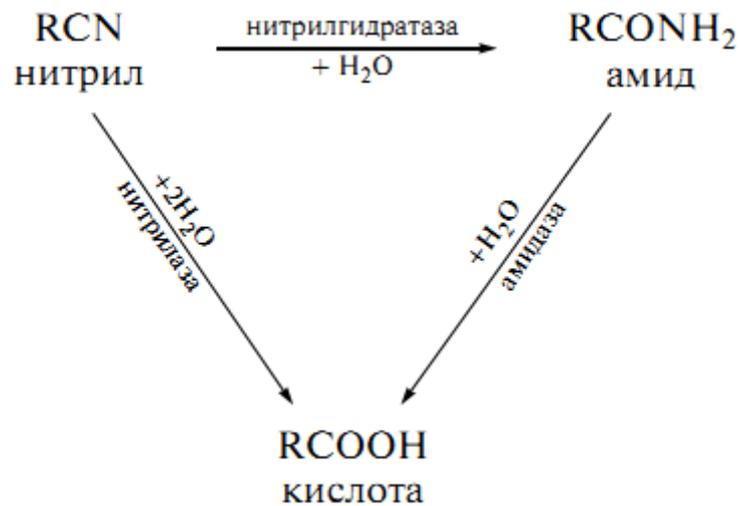


Рисунок 1 – Два пути ферментативного гидролиза нитрилов до карбоновых кислот.

Нитрилгидратазы состоят из двух субъединиц α и β , которые имеют молекулярные массы между 22 и 29 кДа, и содержат ионы металлов, расположенные между двумя субъединицами: ион железа (Fe) и ионы кобальта (Co) (Heidari, Asoodeh, 2019). Этот фермент является внутриклеточным, поэтому его очистка требует нарушения целостности бактериальной клетки.

Нитрилазы входят в суперсемейство тиоловых ферментов, которое состоит из 13 ветвей (Singh *et al.*, 2006). Многие нитрилазы образуются из

одного полипептида с молекулярной массой 40 кДа и имеют мультимерную α - β - β - α –сэндвич структуру, которая имеет консервативную каталитическую триаду, состоящую из глутаминовой кислоты, лизина и цистеина (Gln(E)-Lys(K)-Cys(C)) ответственную за ковалентный катализ и имеющую решающее значение для взаимодействия лигандов, а также некоторое количество консервативных остатков (Kumari, Poddar, 2019).

Амидазы входят в одно суперсемейство с нитрилазами, занимая 8 из 13 ветвей, и в растворе существуют в виде гомотетрамерных или гомогексамерных структур (Liu *et al.*, 2019).

Типичные примеры синтетических нитрилов включают ацетонитрил и акрилонитрил, которые широко используются в химической промышленности в качестве растворителей и экстрактов или используются в качестве ингредиентов в фармацевтических препаратах, пластмассах, синтетических каучуках, гербицидах и пестицидах (Zhan *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016; Robles, 2014; Achanzar, Mangipudy, 2014; Caito *et al.*, 2014; Zhai, St-Pierre, 2019; Zheng *et al.*, 2018). Большие объемы производства, связанные с получением и использованием акрило- и ацетонитрила, влияют на присутствие этих соединений в сточных водах.

Широко известно, что нитрильные и амидные поллютанты токсичны. Например, местное действие акриламида выражается в раздражении кожи, образовании волдырей и шелушении, при отравлении вызывает чрезмерную утомляемость, сонливость, потерю памяти, головокружение, потерю ориентации и галлюцинации; также акриламид относится к эндокринным дизрапторам, мутагенам и канцерогенам, оказывает негативное влияние на репродуктивную и нервную системы, печень и почки (Matoso *et al.*, 2019; Lee, Руо, 2018; Грушко, 1982; Wei *et al.*, 2014). Воздействие низких доз ацетонитрила вызывает тошноту, слюноотделение, рвоту, головную боль и вялость; и более высокие дозы - могут вызывать крайнюю слабость, летаргию, угнетение дыхания, метаболический ацидоз, тахикардию, шок, кому, судороги и может приводить к летальному исходу (Robles, 2014).

Воздействие акрилонитрила на организм человека вызывает раздражение слизистой оболочки, тошноту, головные боли, головокружение и нарушение суждения, чувство тревоги, нервную раздражительность, слабость конечностей, низкую анемию, лейкоцитоз, раздражение почек, затрудненное и нерегулярное дыхание, цианоз, судороги и может приводить к летальному исходу (Achanzar, Mangipudy, 2014; Caito *et al.*, 2014). Кроме того, акрилонитрил был классифицирован как вероятный канцероген для человека. Поэтому в настоящее время вопрос очистки сточных вод от акрило- и ацетонитрила стоит особенно остро.

Ферментативный гидролиз нитрилов в отличие от химического протекает в более мягких условиях, а ферменты, катализирующие этот процесс, способны трансформировать широкий диапазон сложных субстратов и обладают большим потенциалом для химического, энантио- и региоселективного синтеза (Chen *et al.*, 2009). Важной особенностью биodeградации амидов и нитрилов является то, что продукты их конверсии могут быть легко выделены из гетерогенного процесса и использованы далее в коммерческих целях. Ферментативный гидролиз нитрилов широко применяется в промышленности для получения акриламида и никотиновой кислоты (Chen *et al.*, 2009; Дебабов, Яненко, 2011). Акриловая кислота и ее соли являются самыми востребованными акриловыми мономерами химической промышленности. Никотиновая кислота находит широкое применение в медицине и фармакологической промышленности, так как является необходимым элементом питания и лекарственным препаратом. Нитрилазная активность в норме невысока, а нитрилгидролизующие бактерии, способные к двустадийному гидролизу нитрилов, обычно бывают селекционированы в направлении увеличения либо нитрилгидратазной, либо амидазной активности. Гены, кодирующие эти ферменты, обычно экспрессируются в одном и том же опероне (Gupta *et al.*, 2010; Prasad, Bhalla, 2010). Поэтому смешанные суспензионные культуры таких бактерий используются для превращения нитрила в карбоновую кислоту без

загрязнения системы остаточным амидом и для удаления нитрильных загрязнителей из окружающей среды (Kohtama *et al.*, 2007; Kohtama *et al.*, 2006). Нитрилгидролизующие бактерии обладают способностью образовывать биопленки, которые потенциально пригодны для использования в качестве биокатализаторов в процессах локальной очистки стоков, жидких и твердых промышленных отходов.

Ряд исследователей показали, что биофильтры на основе микробных клеток можно использовать для разложения нитрильных соединений до безвредных промежуточных соединений или, в конечном итоге, диоксида углерода и воды. В работе (Chen *et al.*, 2010) показана эффективность разложения пропионитрила в биореакторе на основе иммобилизованных клеток *Klebsiella oxytoca*. В другой работе авторы (Li *et al.*, 2010) использовали рекомбинантную бактерию *B. subtilis* N4 / pHTnha-ami со способностью к разрушению органонитрилов и образованию биопленок для удаления ацетонитрила, акрилонитрила, цис- и транс-кротонитрила. В работе (An *et al.*, 2018) показана эффективная очистка нитрилсодержащих подземных вод (удаление до 99,8% CN⁻) в реакторе с псевдоожиженным слоем на основе смешанных биопленок. An с соавторами использовали *Rhodococcus rhodochrous* BX2 в качестве нитрилгидролизующего штамма, а для наращивания стабильной биопленки – штамм *Bacillus mojavensis* M1 с высокой биопленкообразующей способностью.

1.4. Применение биопленок в промышленности

Биопленки, образованные естественной иммобилизацией клеток, имеют большое значение в инженерных процессах, поскольку являются простыми, надежными и стабильными катализаторами. Применение цельных клеток как биокатализаторов в коммерческих целях хорошо известно и часто предпочтительнее, чем использование выделенных ферментов. Основная причина заключается в том, что при использовании выделенных ферментов часто требуются дорогие кофакторы или реакции, включающие

многокомпонентную сборку мембраносвязанных белков, чтобы катализатор стабильно функционировал. Кроме того, очистка фермента часто значительно увеличивает общие производственные затраты, что является веским аргументом в пользу использования цельных клеточных катализаторов. Поэтому микробные биопленки представляют собой решение для непрерывных биологических процессов. Это эффективный и дешевый метод иммобилизации клеток без необходимости добавления каких-либо полимеров или химикатов.

Биопленки давно используются в биокатализе и биологической очистке. Они могут быть полезны как биокатализаторы и в органическом синтезе, и в биотехнологиях, направленных на поддержание экологической безопасности окружающей среды. Примеры использования биопленок микроорганизмов включают: производство этанола и уксусной кислоты, применение в технологиях очистки сточных вод, биоремедиации загрязненных почв и создание возобновляемых ресурсов, в том числе для производства топлива и электроэнергии; все эти примеры открывают новую главу в исследовании биопленок (Halan *et al.*, 2012; Carrel *et al.*, 2018; Dufour *et al.*, 2012; Rittmann, 2018; Thornhill, Kumar, 2018; Максимова, 2013).

Многие микроорганизмы способны образовывать одновидовые биопленки, которые потенциально пригодны для использования в качестве биокатализаторов (Rosche *et al.*, 2009). Такие биокатализаторы применяются в основном на стадиях микробиологического производства и специфичных стадиях химического катализа. Например, одновидовые биопленки *Zyotomonas mobilis* и *Saccharomyces cerevisiae* используются для получения этанола (Winn *et al.*, 2012). Однако в природе наиболее распространены многовидовые биопленки (Белобородова, Байрамов, 2009). Их повышенная надежность по сравнению с планктонными клетками и одновидовыми биопленками позволила применять их в очистке сточных вод, а также в технологии биоремедиации почв, загрязненных углеводородами и тяжелыми металлами (Halan *et al.*, 2012).

В области биотехнологического применения интерес к конструированию смешанных микробных биопленок связан с возможностью создания биокаталитических систем, осуществляющих многоступенчатые превращения веществ и обладающих большой устойчивостью. Однако при получении таких биопленок с "распределением ролей" составляющих их микроорганизмов, обладающих определенными биотехнологически значимыми свойствами, исследователи сталкиваются с рядом проблем. Во-первых, питательная среда должна быть адаптирована для всех видов микроорганизмов, входящих в состав биопленки. Во-вторых, микроорганизмы в биопленке могут различаться как скоростью роста, так и требованиями к носителю вследствие различных гидрофобно/гидрофильных свойств поверхности клеток. В-третьих, возможен антагонизм между различными видами микроорганизмов, образующих биопленки. В связи с этим при конструировании бинарной или мультивидовой биопленки для биотехнологических целей необходимы экспериментальный подбор штаммов, условий роста, носителей и сред культивирования.

1.4.1. Иммобилизация нитрилгидролизующих бактерий

Иммобилизация – физическое разделение биообъекта и жидкой фазы. То есть иммобилизация заключается в прикреплении клеток микроорганизмов, ферментов или других белковых структур внутри или на поверхности носителя таким образом, чтобы сохранялась их каталитическая активность (Stasiak-Róžańska *et al.*, 2011). Использование иммобилизованных клеток микроорганизмов в качестве биокатализаторов дает те же преимущества, что и использование биопленок.

На сегодняшний день разработанные способы иммобилизации, позволяющие в течение длительного времени сохранять жизнеспособность клеток, нашли широкое применение не только в области биотехнологии, но и в фармацевтической промышленности, охране окружающей среды, пищевой промышленности и производстве биосенсоров (Бирюков, 2004; Martins *et al.*,

2013). Выбор метода иммобилизации зависит от реакции или процессов, которые будут осуществлять клетки. В целом для иммобилизации клеток микроорганизмов используют те же методы, что и для иммобилизации ферментов. Распространенные методы иммобилизации клеток можно разделить на три группы: связывание на твердом носителе; включение в пространственную структуру носителя и иммобилизация с использованием мембранной технологии.

Иммобилизация микроорганизмов путем включения в структуру гелей позволяет достичь высокой плотности клеток в биореакторе, что увеличивает продуктивность биотехнологических процессов. Суть метода состоит в том, что фермент (клетку) погружают в матрицу геля, отделяющего его от субстрата полупроницаемой оболочкой. Для этих целей используют такие гели, как агар, агароза, к-каррагинан, альгинат, хитозан, полиакриламид и другие. Наиболее распространенным носителем в данном типе иммобилизации является альгинат кальция (Максимова, Демаков, 2018). Примеры использования гетерогенных биокатализаторов на основе включенных в гель клеток представлены: гидролизом 2-фенил-2-аминоацетонитрила клетками *Pseudomonas aeruginosa* 10145 (Alonso *et al.*, 2007); гидролизом транс-2-метил-3-фенилоксиранкарбонитрила клетками *Rhodococcus* sp. AJ270 (Guo *et al.*, 2006); биосинтезом *p*-метоксифенилуксусной кислоты из *p*-метоксифенилацетонитрила клетками *Bacillus subtilis* ZJB-063 (Chen *et al.*, 2008); биodeградацией пропионитрила клетками *Klebsiella oxytoca* (Chen *et al.*, 2010); трансформацией акрилонитрила клетками *P. fluorescens* C2 и *R. ruber* gt1 (Максимов и др., 2009); трансформацией ацетамида в ацетогидроксамовую кислоту клетками *B. megaterium* F-8 (Sogani *et al.*, 2012); трансформацией широкого спектра нитрилов клетками *R. equi* A4 (Kubáč *et al.*, 2006); трансформацией (R,S)-2,2-диметилциклопропан карбоксамида клетками *Delftia tsuruhatensis* CCTCC M 205114 (Wang *et al.*, 2010). Данный тип иммобилизации обладает также определенными недостатками: гель с включенными в него клетками может

быть механически непрочным; кроме того, на клетки оказывают влияние ограничения массопереноса. Так клетки *P. putida* МТСС 5110, включенные в структуру альгината кальция, показали меньшую удельную активность в процессе энантиоселективного гидролиза нитрила миндальной кислоты по сравнению со свободными клетками, несмотря на то, что иммобилизация обеспечила клетки повышенной термостабильностью (Banerjee *et al.*, 2006). Те же проблемы, обусловленные диффузионными затруднениями, были показаны для клеток *Bacillus spp.* и *Pseudomonas aeruginosa* (Graham *et al.*, 2000; Prabu, Thatheyus, 2007).

При использовании для иммобилизации клеток мембранной технологии распространению микроорганизмов по всему объему реактора препятствуют специальные полупроницаемые мембраны, локализирующие биомассу в определенной части системы. Именно в этом смысле микробиологические процессы в мембранных реакторах относят к процессам с использованием иммобилизованных клеток, хотя в данном случае микроорганизмы не связаны с каким-либо носителем (Демаков и др., 2008). Однако к мембранной иммобилизации также можно отнести методы мицеллообразования и инкапсуляции клеток, которые были применены для получения гетерогенных биокатализаторов на основе клеток *Pseudomonas aeruginosa* и *Alcaligenes faecalis* ZJUTBX11, обладающих амидазной и нитрилазной активностями соответственно (Bernardo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

Иммобилизация с использованием ковалентного присоединения состоит в том, что ограничение свободы перемещения биокатализатора в объеме реактора достигается за счет его связывания с жестким носителем. Преимуществом такого метода является то, что он позволяет использовать высокомолекулярные субстраты, применение которых невозможно при использовании систем с ограниченным размером пор. Однако пример ковалентной сшивки клеток *R. ruber* gtl показал снижение

нитрилгидратазной активности штамма по сравнению с клетками в суспензии (Максимова, 2008).

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из всех существующих в настоящее время способов иммобилизации. Носителями при данном способе иммобилизации могут быть как органические, так и неорганические вещества, которые применяются в различном виде. Процесс заключается в контакте суспензии клеток с носителем, инкубации и отмывке неадсорбировавшегося биокатализатора. Адсорбция зависит от ионной силы раствора, температуры, удельной поверхности и пористости носителя, концентрации клеток в иммобилизуемом растворе, рН раствора и других факторов. Преимуществами иммобилизации путем адсорбции являются простота методики, доступность и дешевизна сорбентов, возможность придания сорбенту любой формы. Для клеток *R. ruber* gt1 с высокой нитрилгидратазной активностью было показано не только сохранение, но и в ряде случаев даже увеличение ферментативной активности при иммобилизации на углеродных активированных адсорбентах: БАУ (уголь активный березовый дробленый), ФТД (уголь активный гранулированный), ФАС (углеродный материал на основе фуриловой смолы), NORIT РК 1–3 (уголь активный дробленый), на угле-сырце (Максимов и др., 2007; Максимова и др., 2013); углеродных волокнах: Карбопон, Урал ТМ–4 (карбонизированная углеродная вискозная ткань), Карбопон–В–актив (активированный вискозные углеродные волокна) (Максимова и др., 2010, 2012; Васильев и др., 2011); носителях семейства «Сапропелей» (карбонизированные илистые отложения озер) и Сибуните (Максимова и др., 2008). Эффективность использования иммобилизованных посредством адгезии клеток показана также для трансформации акрилонитрила клетками *P. fluorescens* C2 (Максимова и др., 2011) и для клеток *R. pyridinivorans* NIT-36 (Jyoti *et al.*, 2017). Показана также возможность использования углеродных нанотрубок для иммобилизации нитрилгидролизующих бактерий, однако при этом наблюдается агрегация клеток и связанное с ней

снижение каталитической активности по сравнению со свободными клетками (Максимова и др., 2017). Недостатком данного метода служит десорбция и ее последствия. Кроме того, показаны примеры снижения стереоселективности реакции гидролиза рацемического лактамида с использованием клеток *R. erythropolis* 6–2 и *R. rhodochrous* 4–1 и гидролиза рацемического фенилглициннитрила клетками *P. fluorescens* C2 (Максимова, Горбунова и др., 2015; Максимова, Горбунова и др., 2017).

Метод адсорбционной иммобилизации является мягким способом и интересен тем, что бактерии возвращаются в свое естественное прикрепленное состояние, изучение которого позволяет приблизиться к пониманию процессов, происходящих в природе (Максимова и др., 2011). Именно поэтому данный метод связывания биокатализатора с носителем является наиболее предпочтительным при проведении иммобилизации.

Описанные способы иммобилизации касались искусственно иммобилизованных клеток выращенной культуры, ряд работ был посвящен получению монопленок нитрилгидролизующих бактерий, но потенциал смешанных биопленок для этого процесса не был изучен. Однако в природе микроорганизмы существуют, как правило, в смешанных ассоциациях, что дает им неоспоримые преимущества при адаптации к часто неблагоприятным факторам окружающей среды и при колонизации новых экологических ниш. Преимущества, которыми обладают биопленки смешанных культур, также могут быть полезны в процессах биокатализа и, особенно, в процессах биологической очистки сточных вод. В связи с чем изучение смешанных биопленок представляется актуальным.

1.4.2. Реакторы на основе биопленок

Микробиологическая очистка занимает одно из ведущих мест в очистке сточных вод от органических соединений. Реакторы на основе биопленок уже давно используются в коммерческой очистке сточных вод и отходящих газов (Rosche *et al.*, 2009). В настоящее время биофильтры относят к числу

наиболее распространенных систем биологической очистки сточных вод (Кузнецов и др., 2012). В биофильтрах очищаемая вода фильтруется через твердый носитель, покрытый микробной биопленкой, способной удалять поллютанты из фильтруемой воды (Плакунов, Николаев, 2008).

В большинстве случаев биопленочные реакторы обладают высокой объемной производительностью. Время пребывания клеток не зависит от скорости потока жидкой фазы, и биомасса не вымывается. Биопленки могут применяться в различных реакторах, к которым относятся реакторы с уплотненным слоем, включая капельные реакторы и погружные реакторы, реакторы с псевдооживленным слоем, аэрифтные реакторы, реакторы с анаэробным слоем с восходящим потоком и реакторы со слоем гранулированного ила, а также мембранные реакторы (Nalan *et al.*, 2012).

Самым простым биореактором для биотрансформации является проточный аппарат с мешалкой, заполненный гранулами биокатализатора. На выходе из аппарата должны стоять фильтры, удерживающие гранулы биокатализатора. Такой аппарат имеет простую конструкцию, но его существенным недостатком является проблема снабжения гранул биокатализатора кислородом при аэробных процессах трансформации.

Мембранные реакторы достаточно распространены и применяются для удаления загрязняющих веществ, в том числе представляющих собой фармацевтические препараты, стероидные гормоны, фитоэстрогены, пестициды и сероводород, а также для получения полезных веществ, таких как метан или фосфор (Kelly, He, 2014; Zuthi *et al.*, 2013; Wijekoon *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014; Robles *et al.*, 2014). Кроме того, мембранные биофильтры применяются также в качестве опреснительного устройства (Subramani, Jacangelo, 2015). Мембранные реакторы имеют некоторые преимущества, которые включают хорошую степень очистки сточных вод, получение значительно меньшего количества ила, меньшую площадь и простоту автоматизации процесса. В основном примеры конфигурации мембранных реакторов могут быть разделены на две большие группы:

погружные мембранные модули и внешние мембранные модули. В погружных модулях мембрана размещена в биореакторе, что делает реактор очень компактным, менее энергоемким и простым в управлении. Основным недостатком таких модулей является то, что работа биореактора должна быть полностью остановлена, когда требуется ремонт, техническое обслуживание или замена мембранного модуля. Во внешнем модуле мембрана помещается во внешний контур, и оставшаяся биомасса возвращается обратно в реактор. Такой модуль легко обслуживать и чистить, не влияя на работу реактора. Мембранный реактор имеет тот же недостаток, что и проточный аппарат с мешалкой. Однако этот недостаток можно частично исправить, разделив загрузку биофильтра на несколько секций.

В процессах аэробной и анаэробной биологической очистки часто используются биопленочные реакторы с подвижным слоем (иначе называемые реакторами с восходящим потоком), с использованием взвешенных носителей, такие как эрлифтные реакторы и реакторы с псевдооживленным слоем (Barwal, Chaudhary, 2014; Biswas *et al.*, 2013; Calderón *et al.*, 2012). В режиме псевдооживления биокатализатор поддерживается во взвешенном состоянии турбулентным восходящим потоком, при этом наблюдается равновесие между скоростью восходящего потока и скоростью оседания частиц, зависящее от плотности самих частиц катализатора. Использование аппарата с псевдооживленным слоем позволяет решить проблему снабжения кислородом биокатализатора. Частицы биокатализатора, на поверхности которых прикреплена биопленка, находятся во взвешенном состоянии, при этом наблюдается интенсивное перемешивание, которое приводит к большой поверхности контакта фаз и, следовательно, более высокой производительности реактора по сравнению с другими конфигурациями. Самым значимым недостатком такого биореактора будет механическое истирание гранул биокатализатора в результате их соударений. Реакторы с восходящим потоком успешно применяются в процессах биосинтеза водорода и очистки сточных вод от

различных поллютантов (Singh *et al.*, 2013; Latif *et al.*, 2011; Basu, Gupta, 2010; Puyol *et al.*, 2011).

Таким образом, актуальность использования биопленок в продуктивном биокатализе и очистке окружающей среды не вызывает сомнений. Однако все более ужесточающиеся требования к очистке производственных стоков требуют разработки новых, более эффективных решений в области очистки. Необходима разработка эффективных биокатализаторов гидролиза нитрилов на основе биопленок, сочетающих такие качества, как высокая удельная активность; устойчивость к высоким концентрациям субстрата и продукта реакции; стабильная работа на протяжении длительного времени и др. Необходимы знания о физиологических особенностях клеток, входящих в состав биопленок, как для разработки эффективных биокатализаторов, так и для целей управления процессами биологической очистки. Кроме того, в связи с высоким потенциалом использования смешанных биопленок также необходимы знания о физиологических особенностях смешанных биопленок и их кооперативной работе в процессе трансформации токсичных нитрильных соединений для применения их в очистке сточных вод на основе биофильтрующих систем.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. 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.

2.2. Среда 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 $7,2 \pm 0,2$. 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.

2.3. 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.

2.4. 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 (КЖ) 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 носителях осуществляли в 100 мл среды N в конических колбах объемом 250 мл. Среду N предварительно автоклавировали с 1 г углеродного адсорбента или с 3,5–7 г базальтовых волокон. 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.

2.5. 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).

2.6. 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.

2.7. 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 (АТР 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 акрилонитрил до конечной концентрации 1,3 М. Ту же концентрацию субстрата 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 .

Чтобы определить концентрацию АТФ по уровню свечения образца, строили калибровочный график, используя данные свечения образцов с известной концентрацией АТФ (рис. 2). Концентрацию АТФ в образце определяли, умножая условные единицы свечения образца на коэффициент, полученный из калибровочного графика: $k = \text{ctg}\alpha$, где α – угол наклона прямой к оси X.

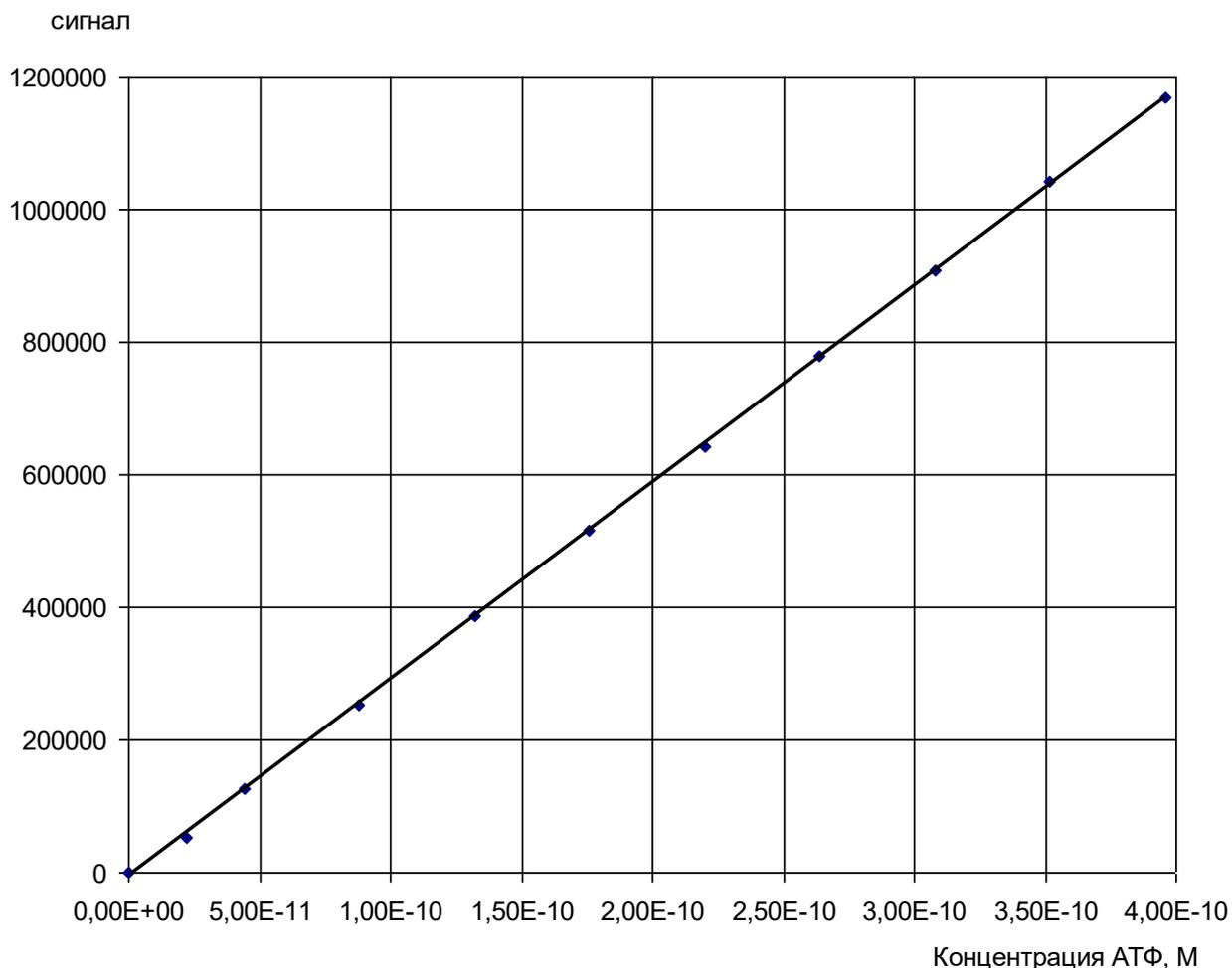


Рисунок 2 – Калибровочная кривая соотношения условных единиц свечения образца и концентрации АТФ

2.8. 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.

2.9. 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 (рис. 3). Циркулирующая жидкость подавалась через реактор с помощью перистальтического насоса LS 301 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург, Россия).

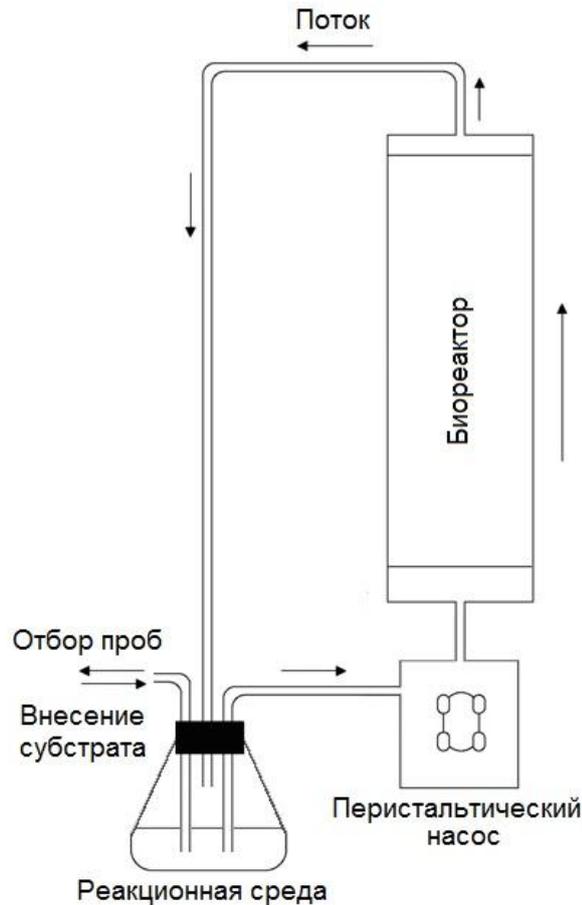


Рисунок 3 – Принципиальная схема погружного реактора с уплотненным слоем

Биопленки нитрилгидролизующих бактерий на носителях 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 (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).

2.10. Синтез концентрированных растворов акриламида и акриловой кислоты

Синтез акриламида и акриловой кислоты катализировали био пленками *R. ruber* gt 1 и *A. faecalis* 2, внося акрилонитрил / акриламид до концентрации 2% / 100 мМ с периодичностью 30 мин / 24 ч соответственно в 100 мл калий-фосфатного буфера (рН 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.

2.11. Газовая хроматография

Концентрацию уксусной кислоты и ацетамида, образующихся при трансформации ацетонитрила клетками, и акриловой кислоты и акриламида, образующихся при трансформации акрилонитрила клетками, 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.

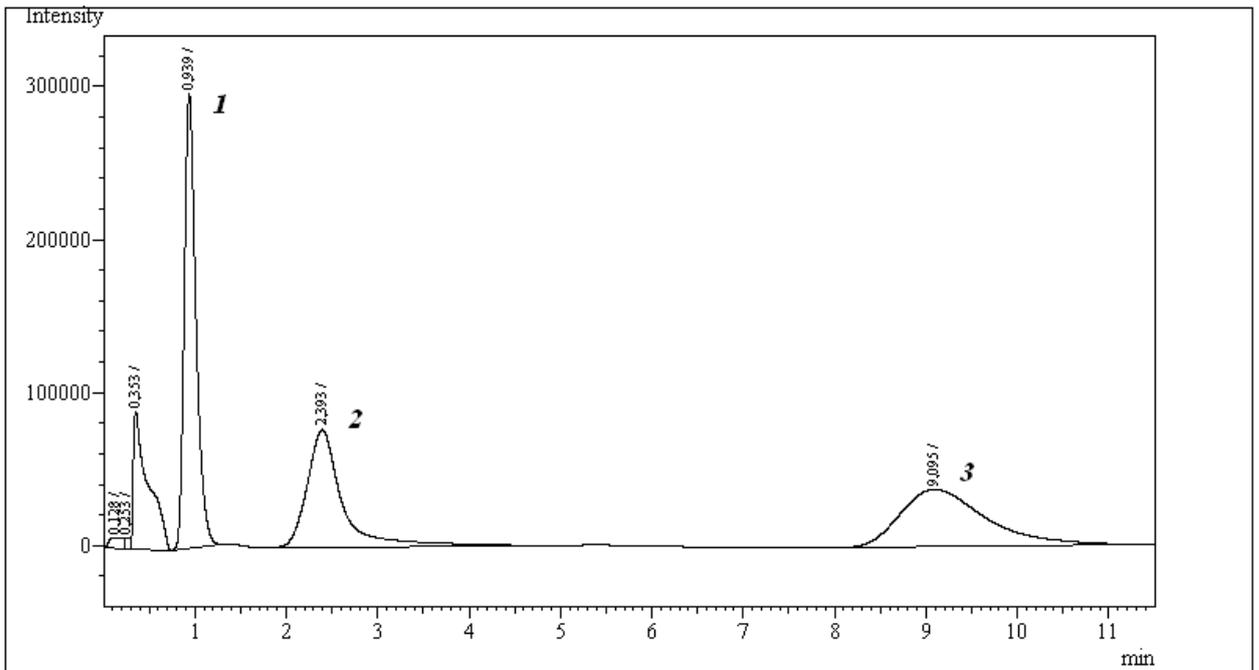


Рисунок 4 – Разделение акрилонитрила (1), акриловой кислоты (2), акриламида (3) на колонке Полисорб-1

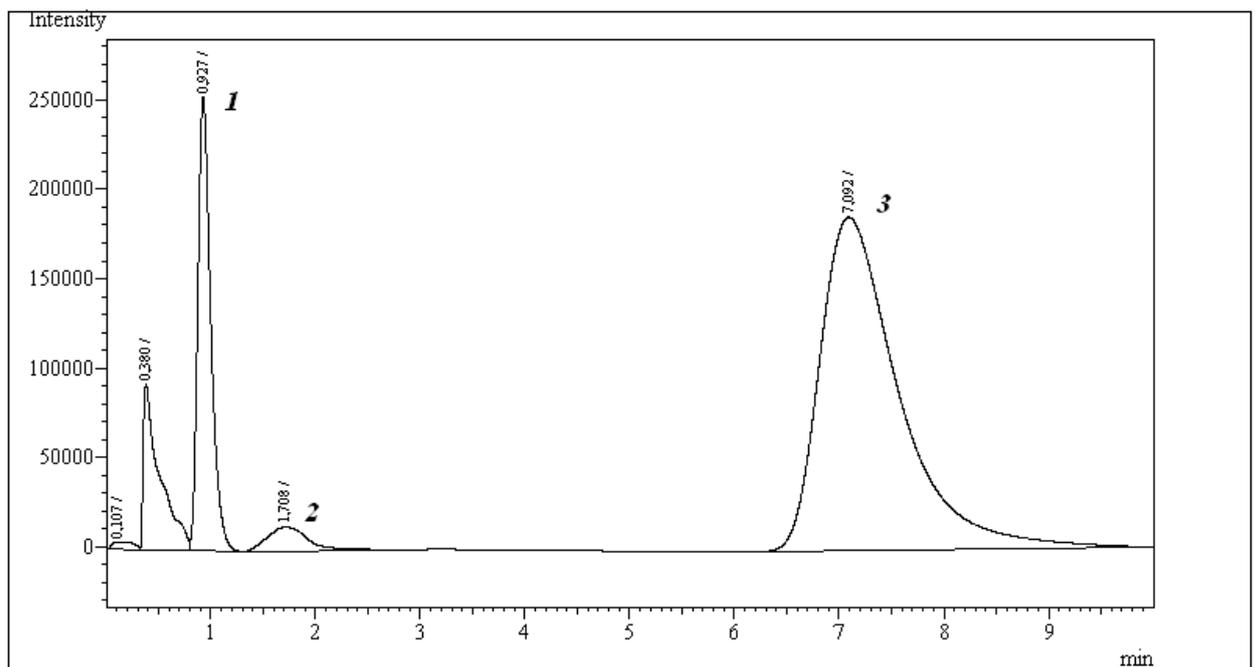


Рисунок 5 – Разделение ацетонитрила (1), уксусной кислоты (2), ацетамида (3) на колонке Полисорб-1

2.12. Микроскопия

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

Флюоресцентная микроскопия. Биопленки выращивали в чашках Петри на предметных стеклах (25×75 мм), погруженных в синтетическую минеральную среду N, инокулированную 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) с целью оценки жизнеспособности клеток и отдельно конА-тетраметилпроламином (“Invitrogen”, Life Technologies, США) (500 мкг/мл) для визуализации полисахаридного каркаса матрикса. После добавления красителя к биопленкам, инкубировали в темноте в течение 20 и 40 мин соответственно и просматривали в световом микроскопе Leica DM LS с флюоресценцией. 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. Биопленки на углеродном и базальтовом волокне визуализировали в 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.

2.13. 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).

2.14. Статистический анализ

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.

ГЛАВА 3. ФИЗИОЛОГИЯ БИОПЛЕНОК НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ШТАММОВ *R. ruber* gt 1 И *Al. faecalis* 2

3.1. 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-тетраметилпродаминол; и 3) общему содержанию АТФ в клетках. Так как подсчет числа колониеобразующих единиц в биопленке имеет большую погрешность, связанную со сложностью механического отделения клеток от носителя и разрушения агрегатов клеток в биопленке без нарушения их жизнеспособности, предложена комплексная оценка других ее параметров. 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-тетраметилпродаминол 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 вследствие индуцибельного характера амидазы этого штамма (Максимова и др., 2017), но не растет на глюкозе. Родококк может потреблять и глюкозу, и ацетамид, но за счет разницы в скоростях роста алкалигенес в периодической культуре накапливает биомассу ранее, чем родококк. На использованной нами среде возможно нарастить биомассу обоих штаммов.

3.1.1. Биопленкообразование клеток *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2

Динамику биопленкообразования монокультур *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2, а также их смешанной культуры оценивали методом окраски 0,1% кристаллическим фиолетовым с 1 по 7 сутки роста по изменению оптической плотности, измеренной при длине волны $\lambda=540$ нм. На основании этих данных построили кривые роста монокультур и смешанной культуры двух штаммов (рис. 6).

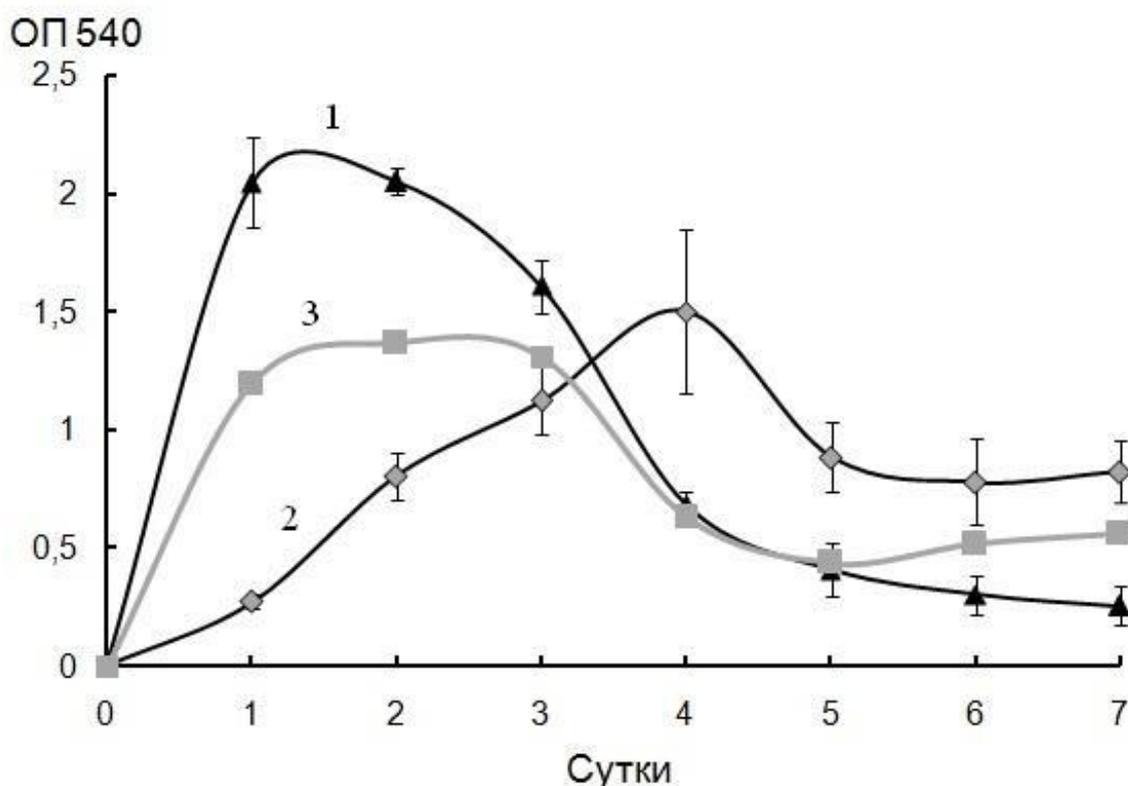


Рисунок 6 – Динамика роста биопленок *Al. faecalis* 2 (1), *R. ruber* gt 1 (2) и биопленок смешанной культуры *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 (3).

Было обнаружено, что максимальное биопленкообразование *Al. faecalis* 2 приходится на 1–2 сутки. 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.

На начальном этапе роста в смешанной культуре алкалигенес конкурирует с родококком за субстрат – ацетамид, что выражается в снижении биопленкообразования смешанной культурой, по сравнению с монокультурой *Al. faecalis* 2. По мере исчерпания количества ацетамида в среде объем биопленки снижается, что связано с естественным процессом отмирания и разрушения биопленки.

3.1.2. Энергетический статус клеток биопленок

Энергетический статус клеток монопленок *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2, а также биопленки их смешанной культуры оценивали по общему содержанию АТФ в клетках с 1 по 7 сутки культивирования по интенсивности свечения, измеренной на планшетном ридере TECAN (рис. 7). При использовании этого метода наблюдалось сходство графика роста с таковым, полученным при оценке оптической плотности экстрагированного красителя кристаллического фиолетового.

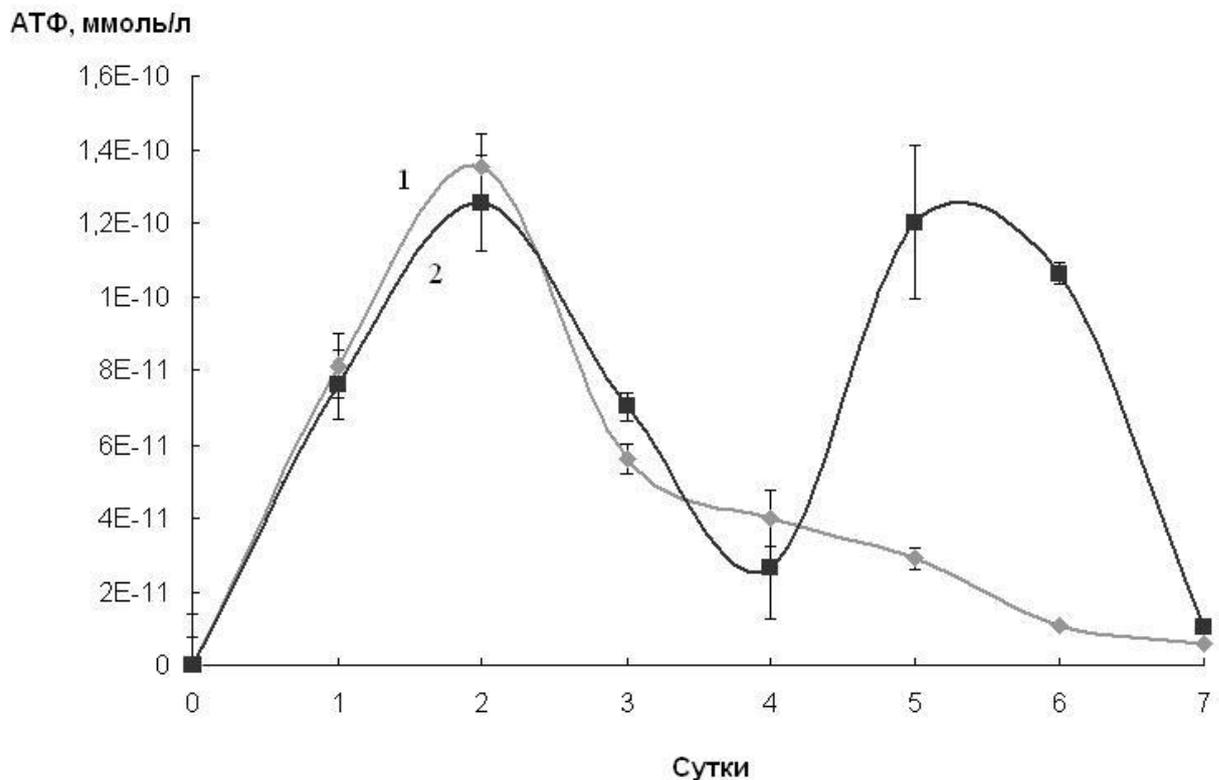


Рисунок 7 – Энергетический статус клеток биопленок *Al. faecalis* 2 (1) и биопленок смешанной культуры *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 (2).

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

К 5–6 суткам количество АТФ в двувидовой биопленке увеличилось более резко, чем оптическая плотность экстрагированного раствора красителя. Возможно, к 5–6 суткам количество жизнеспособных клеток *R. ruber* gt 1 увеличивается, тогда как общая биомасса биопленки остается почти неизменной ввиду низкого уровня образования полисахаридного каркаса матрикса родококком. В этом случае оценка динамики роста биопленок по определению общего количества АТФ более адекватно отражает количество жизнеспособных клеток, согласно методикам оценки количества живых клеток на основании определения содержания АТФ в образцах (Ефременко и др., 2005). В связи с тем, что энергетический статус клетки связан с адаптивным ответом на стресс, не существует абсолютной зависимости между количеством жизнеспособных клеток и общей концентрацией АТФ. Исходя из полученных данных, можно предположить, что вклад в общее количество АТФ на 5–6 сутки культивирования вносит также *Al. faecalis* 2.

3.1.3 Синтез внеклеточного полисахаридного каркаса матрикса

Массивность полисахаридного каркаса матрикса моно- и бинарных биопленок *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2 оценивали по интенсивности флюоресценции биопленки, окрашенной водным раствором копА-

тетраметилпродамина, связавшимся с α -маннопиранозильными и α -глюкопиранозильными мономерами полисахаридов (рис. 8).

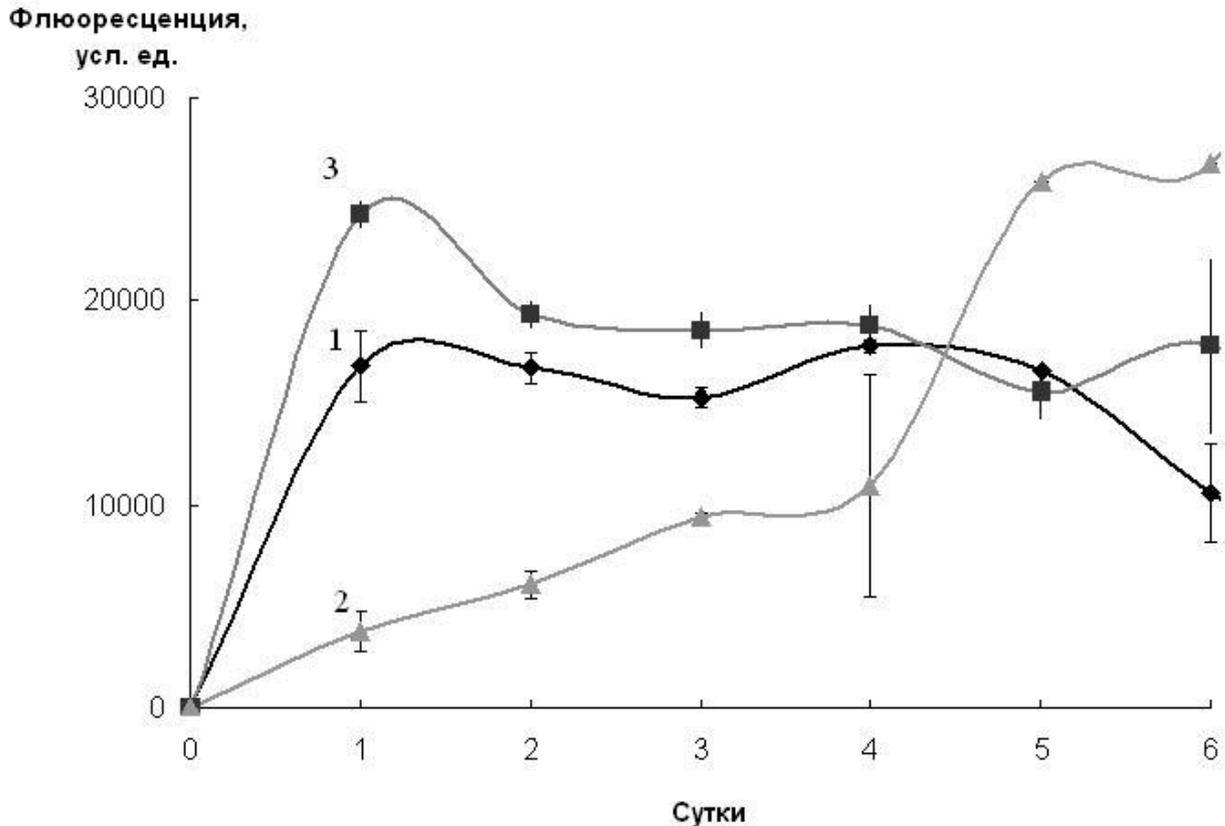


Рисунок 8 – Массивность полисахаридного каркаса матрикса клеток биопленок *Al. faecalis* 2 (1), *R. ruber* gt 1 (2) и биопленок смешанной культуры (3).

Максимальное значение флюоресценции при окраске красителем, связывающимся с полисахаридами матрикса, в двувидовой биопленке наблюдали на первые сутки культивирования. Оно составляло 24233 усл.ед., что на 36% больше максимального значения, наблюдаемого в моновидовой биопленке *Al. faecalis* 2. Увеличение значений флюоресценции, коррелирующих с количеством полисахаридов, в двувидовой биопленке может быть связано как с влиянием *R. ruber* gt 1 на биопленкообразующую способность *Al. faecalis* 2, так и с окраской самих клеток родококка. *R. ruber* gt 1 образует капсулы, которые так же, как и матрикс биопленок, состоят из экзополисахаридов, с которыми связывается копА-тетраметилпродамин (Нестеренко и др., 1985).

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 биоупленкообразование смешанной культуры, содержание АТФ в клетках и массивность полисахаридного каркаса матрикса при росте смешанной биоупленки.

3.2. Влияние клеток нитрилгидролизующих бактерий на рост друга друга

Для изучения влияния *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 на ростовые характеристики друг друга биоупленки данных штаммов выращивали в 96 луночном полистирольном планшете с добавлением культуральной жидкости выращенных штаммов в объеме 25% от общего засеваемого объема.

Биоупленки *Al. faecalis* 2 выращивали с добавлением культуральной жидкости четырехсуточного и семисуточного *R. ruber* gt 1. В качестве контроля использовали биоупленку *Al. faecalis* 2, выращенную без дополнительных добавок. Оценка влияния бактерий *R. ruber* gt 1 на биоупленкообразование *Al. faecalis* 2 показала, что энергетический статус клеток *Al. faecalis* 2 при добавлении культуральной жидкости родококка достоверно не изменялся (рис. 9). Однако оптическая плотность экстрагированного красителя кристаллического фиолетового при окраске клеток биоупленок *Al. faecalis* 2 на 3–7 сут роста была существенно выше при добавлении культуральной жидкости *R. ruber* gt 1 (рис. 10). В среднем оптическая плотность биоупленок *Al. faecalis* 2 среде с добавлением культуральной жидкости *R. ruber* gt 1 была выше на 44% по сравнению с оптической плотностью клеток биоупленок без влияния родококка.

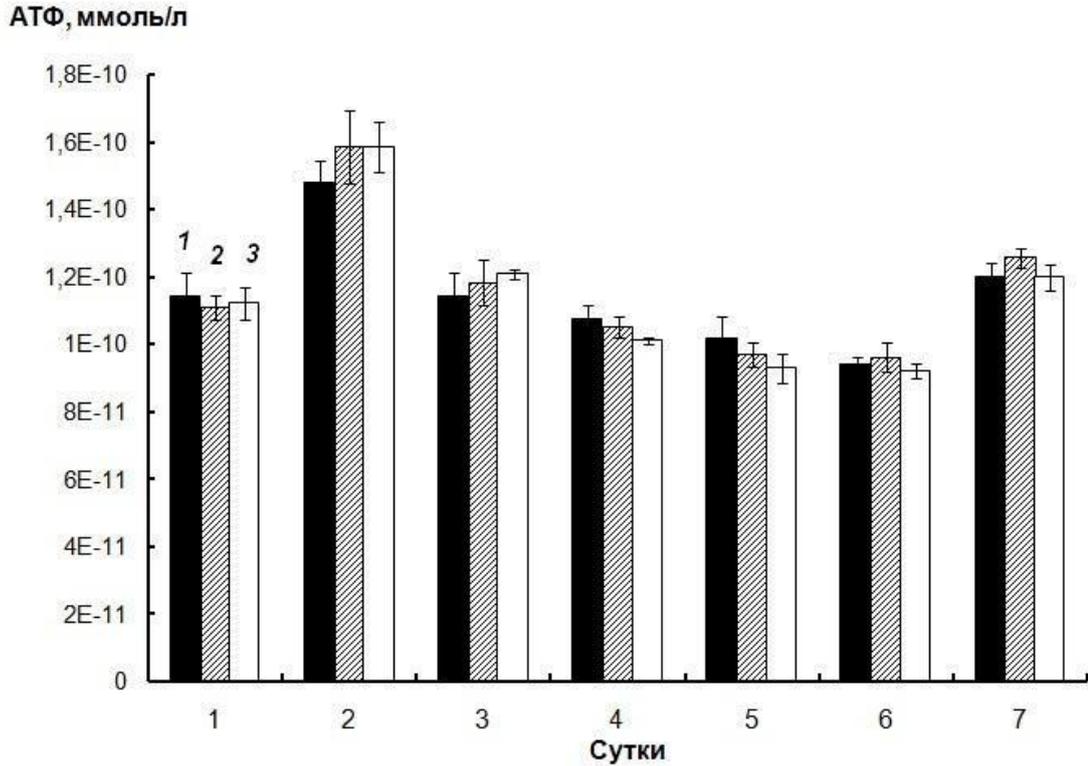


Рисунок 9 – Энергетический статус клеток биопленок *Al. faecalis* 2 с добавлением культуральной среды четырехсуточного (1) и семисуточного (2) *R. ruber* gt 1, и без дополнительных добавок (3).

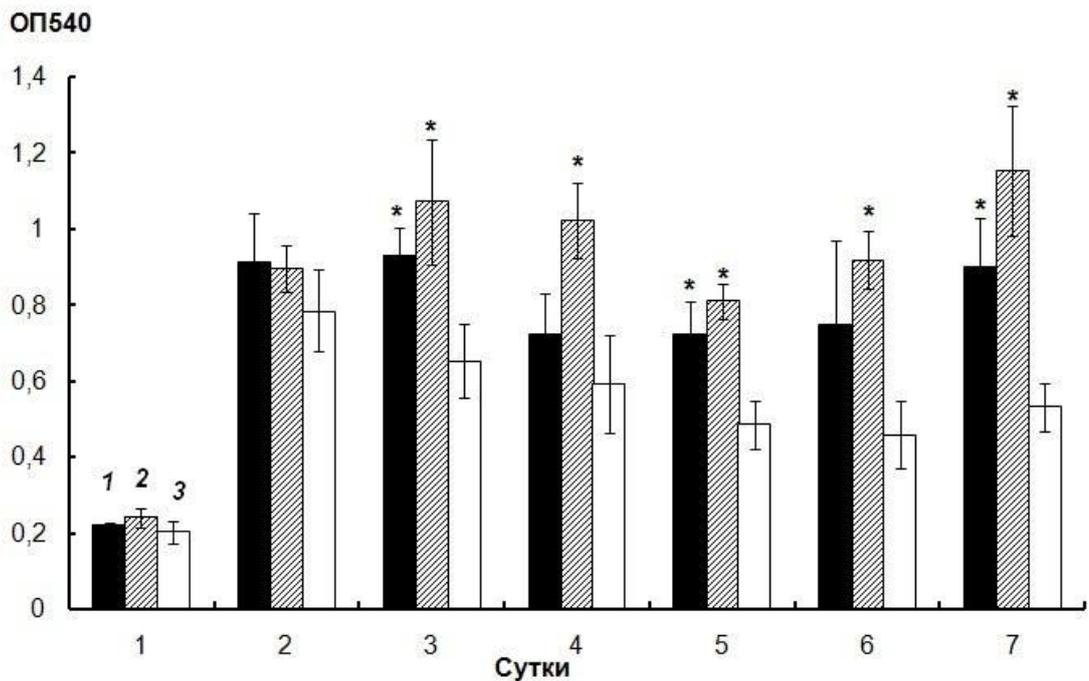


Рисунок 10 – Динамика роста биопленок *Al. faecalis* 2 с добавлением культуральной среды четырехсуточного (1) и семисуточного (2) *R. ruber* gt 1 и без дополнительных добавок (3).

Биопленки *R. ruber* gt 1 выращивали с добавлением культуральной жидкости двухсуточного и четырехсуточного *Al. faecalis* 2. В качестве контроля также использовали биопленку *R. ruber* gt 1, выращенную без дополнительных добавок. 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. 11). 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 (рис. 12).

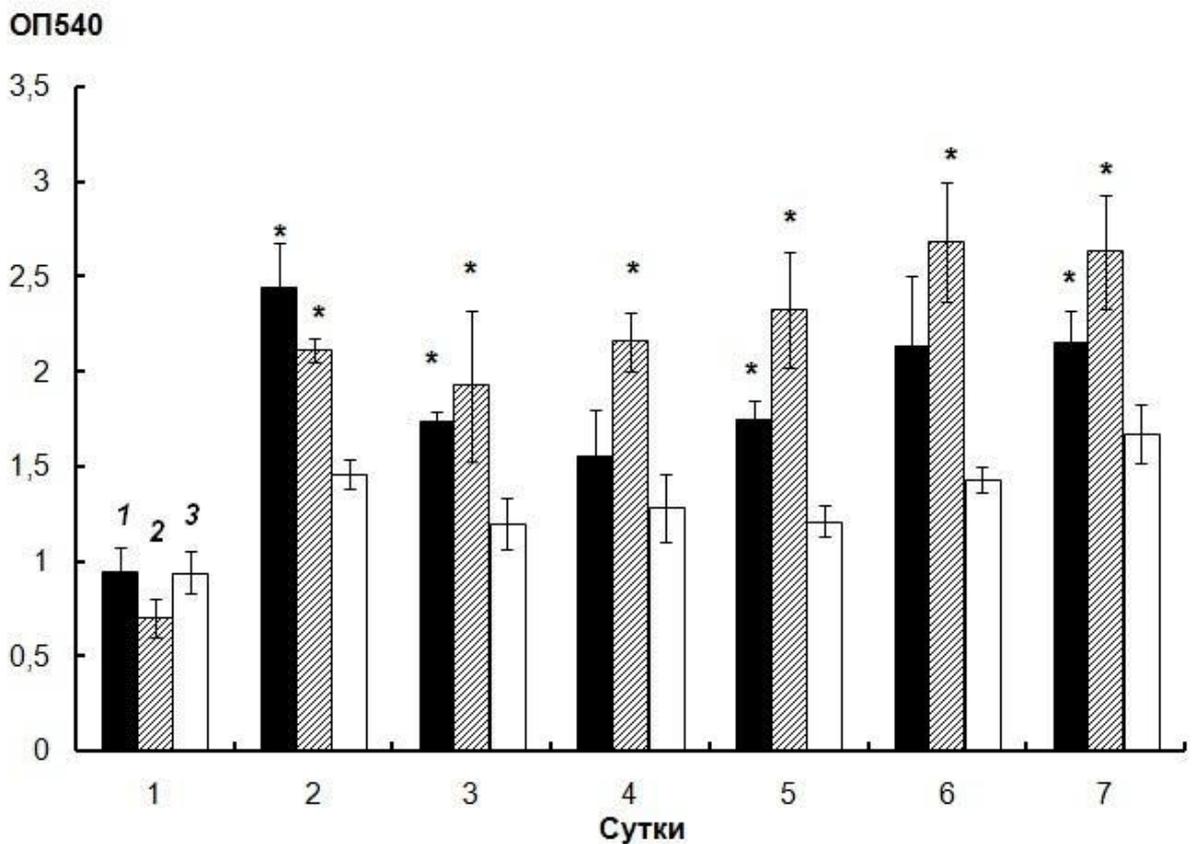


Рисунок 11 – Динамика роста биопленок *R. ruber* gt 1 с добавлением культуральной среды двухсуточного (1) и четырехсуточного (2) *Al. faecalis* 2 и без дополнительных добавок (3).

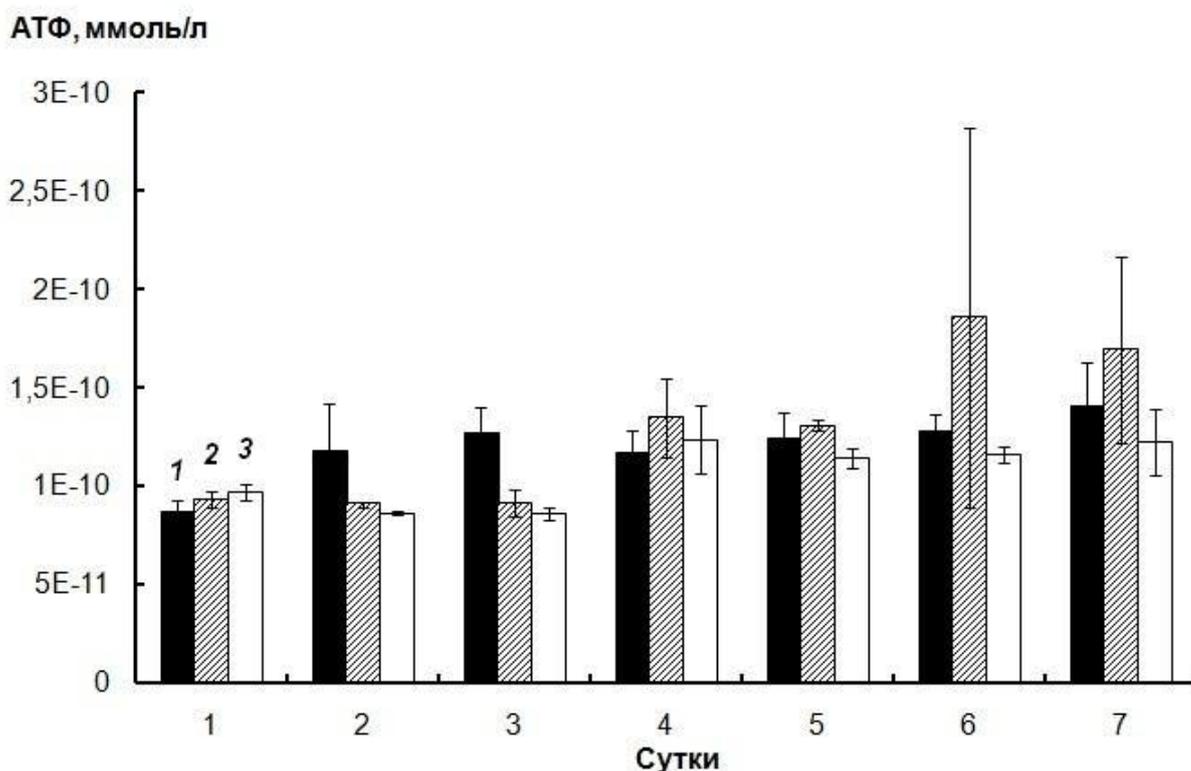


Рисунок 12 – Энергетический статус клеток биопленок *R. ruber* gt 1 с добавлением культуральной среды двухсуточного (1) и четырехсуточного (2) *Al. faecalis* 2 и без дополнительных добавок (3).

В связи с полученными данными возникает предположение, что увеличение биопленкообразования как *Al. faecalis* 2, так и *R. ruber* gt 1 при внесении культуральной жидкости штамма-партнера связано не с увеличением количества жизнеспособных клеток в биопленке, а с усиленной выработкой полисахаридного матрикса. Для подтверждения выдвинутого предположения оценили массивность полисахаридного каркаса матрикса 4-х 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. 13). Массивность полисахаридного каркаса матрикса

био пленки *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. 13).

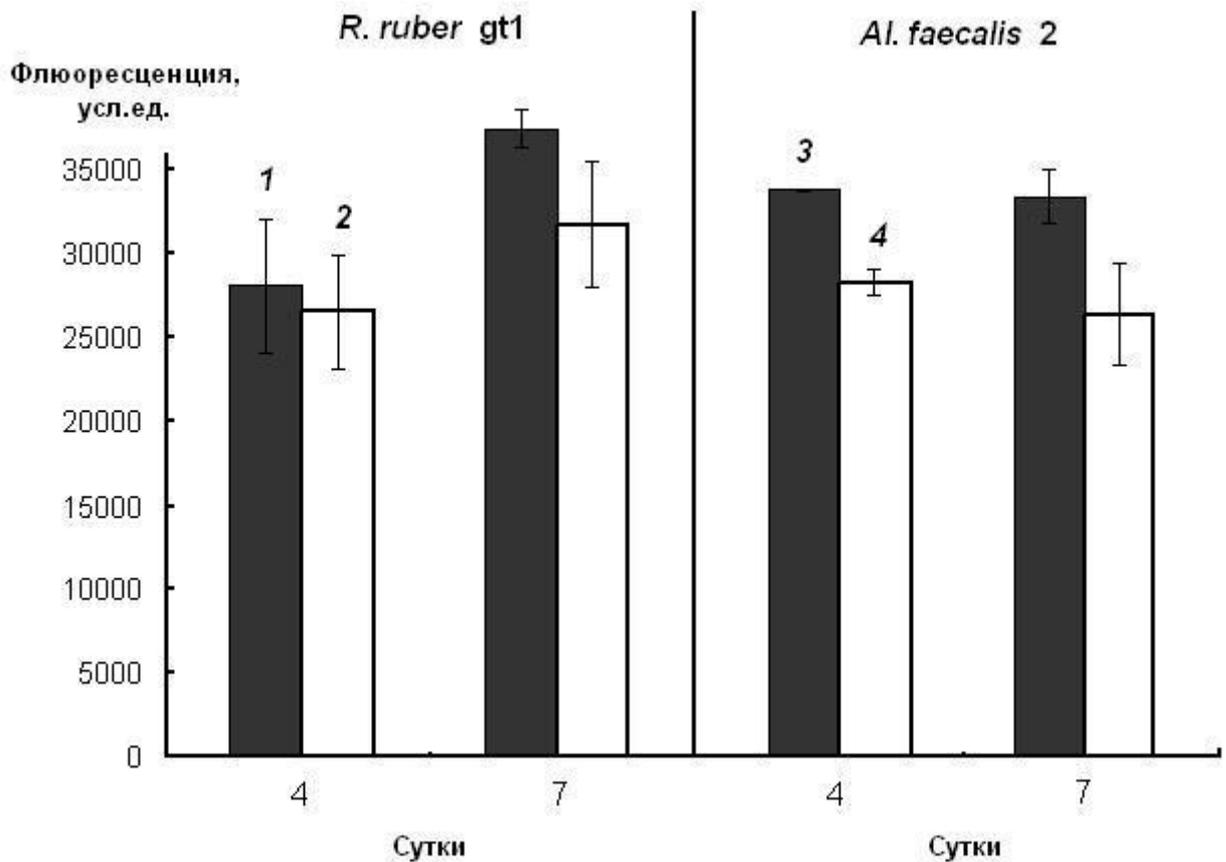


Рисунок 13 – Массивность полисахаридного каркаса матрикса клеток био пленок *R. ruber* gt 1 с добавлением культуральной жидкости четырехсуточного (1) *Al. faecalis* 2 и без дополнительных добавок (2); и клеток био пленок *Al. faecalis* 2 с добавлением культуральной жидкости семисуточного (3) *R. ruber* 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 био пленкообразование штамма-партнера, связанное не с увеличением количества жизнеспособных клеток в био пленке за счет их более быстрого деления или более эффективной адгезии на начальном этапе формирования

био пленки, а с усиленной выработкой полисахаридного матрикса, приводящей к увеличению общего объема био пленки.

Увеличение уровня био пленкообразования у обоих штаммов под воздействием метаболитов штамма-партнера можно объяснить их антагонистической активностью. Эти вещества вызывают стрессорный ответ – био пленкообразование, либо выполняя функции универсальных аутоиндукторов био пленкообразования, либо влияя на экспрессию генов ферментов, участвующих в синтезе полисахаридного матрикса. Есть сведения, что антибиотики в субингибиторных концентрациях стимулируют синтез полисахаридных компонентов внеклеточного полимерного матрикса (Плакунов и др., 2017). Также известно, что *Al. faecalis* 2 продуцирует антибиотики, ингибирующие рост как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий (Zahir *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Bahadou *et al.*, 2018).

В то же время, об антагонистической активности родококков информации нет. Сигнальные молекулы системы кворум-сенсинга, обозначаемые как аутоиндуктор 2, являются универсальным связующим звеном между грамположительными и грамотрицательными бактериями. Они также важны для формирования структурированных био пленок, особенно в мультивидовых сообществах природной среды (Li, Tian, 2012). Кроме того, диффундирующий сигнальный фактор (diffusible signal factor, DSF), являющийся жирной кислотой, идентифицируется у множества видов и, по-видимому, также может опосредовать межвидовые взаимодействия в мультивидовых био пленках. Механизмы, лежащие в основе кооперации, разнообразны, и включают изменения состава внеклеточного матрикса (Elias, Vanin, 2012). Увеличение экскреции внеклеточных полимеров может быть конкурентным ответом на сосуществование видов в мультивидовой био пленке (Ren, 2014). Однако при изучении антагонистической активности методом перпендикулярных штрихов было показано, что *Al. faecalis* 2 не оказывает антимикробного действия как в отношении *R. ruber* gt 1, так и в

отношении других культур (рис. 14). Поэтому образование более массивного матрикса в данном случае может быть следствием синергических отношений.

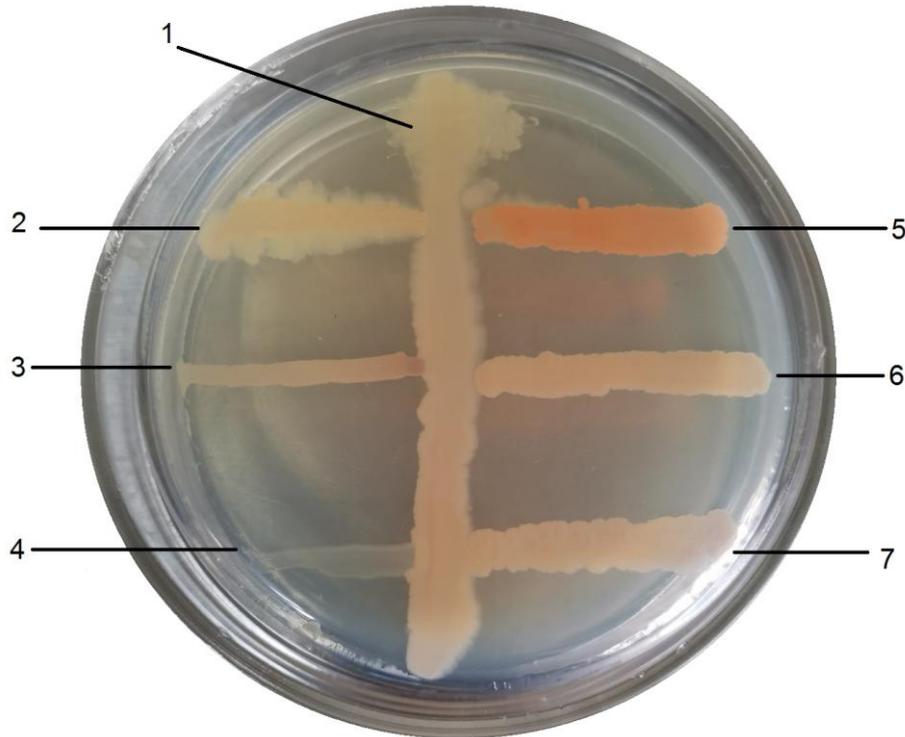


Рисунок 14 – Определение антагонистической активности *Al. faecalis* 2 (1) на культуры *Rhodococcus erythropolis* ИЛБио (2), *Acinetobacter guillouiae* 11h (3), *E. coli* П (4), *R. ruber* gt 1 (5), *R. erythropolis* 11-2 (6), *R. rhodochrous* 4-1 (7).

3.3. Жизнеспособность клеток биопленок в условиях стресса

3.3.1. Влияние ацетонитрила на жизнеспособность клеток

Ацетонитрил широко используется в качестве растворителя и является распространенным загрязнителем окружающей среды, поэтому он был выбран в качестве токсичного субстрата для изучения его влияния на нитрилгидролизующие бактерии. Пороги токсичности для простейших, бактерий и зеленых водорослей находятся в диапазоне от 520 мг/л для *Microcystis aeruginosa* (водоросли) до 7300 мг/л для *Scenedesmus quadricauda* (зеленые водоросли) (Robles, 2014). Энергетический статус планктонных клеток и клеток биопленки в монокультуре *Al. faecalis* 2 и смешанной культуре *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 был определен при внесении

ацетонитрила в их культуры через каждые 10 минут или 1 раз в сутки до конечной концентрации 1527 г/л (таблица 1). После десятикратного внесения ацетонитрила его конечный объем в два раза превысил объем планктонной культуры и объем среды, в которой развивались биопленки. Снижение количества АТФ наблюдалось также в двувидовой биопленке при воздействии ацетонитрила, что в данных условиях может указывать на снижение количества жизнеспособных клеток.

При многократном внесении ацетонитрила каждые 10 минут наблюдается падение количества АТФ на порядок в суспензии *Al. faecalis* 2 и на два порядка в суспензии смешанной культуры по сравнению с соответствующим количеством в суспензии без воздействия ацетонитрила.

По содержанию уксусной кислоты в смешанной культуре (66 г/л в планктонной культуре и 17 г/л в биопленочной культуре) можно предположить, что *R. ruber* gt 1 некоторое время после первых циклов внесения ацетонитрила сохранял жизнеспособность и нитрилгидратазную активность и трансформировал ацетонитрил в ацетамид. Далее ацетамид полностью трансформировался клетками *Al. faecalis* 2, обладающими более высокой амидазной активностью, чем *R. ruber* gt 1, в уксусную кислоту до тех пор, пока концентрация вносимого ацетонитрила не увеличилась до максимально допустимой для сохранения жизнеспособности и каталитической активности бактерий. Очевидно, часть клеток не успевает адаптироваться к высокой концентрации токсичного субстрата. Биопленки как моно-, так и смешанной культур более устойчивы к воздействию ацетонитрила, вносимого каждые 10 минут, по сравнению с суспензией, что подтверждается менее выраженным снижением содержания АТФ в клетках – в 3 раза для монокультуры и на порядок для двувидовой биопленки.

При проведении аналогичного эксперимента с частотой внесения ацетонитрила 1 раз в сутки было показано, что большинство суспендированных клеток и клеток в составе биопленок выживают.

Таблица 1. Влияние ацетонитрила на энергетический статус клеток монокультур *Al. faecalis* 2 и смешанных культур *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 в условиях их планктонного и биопленочного роста

Вариант опыта		Содержание АТФ, ммоль/л	
		Биопленка	Суспензия
Внесение ацетонитрила каждые 10 минут 10 раз			
Контроль без воздействия ацетонитрила	<i>Al. faecalis</i> 2	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-10}$	$(3,8 \pm 1,0) \times 10^{-9}$
	<i>Al. faecalis</i> 2 + <i>R. ruber</i> gt 1	$(4,5 \pm 1) \times 10^{-9}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-8}$
При воздействии ацетонитрила	<i>Al. faecalis</i> 2	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-10}$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-10}$
	<i>Al. faecalis</i> 2 + <i>R. ruber</i> gt 1	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-10}$	$(3,8 \pm 0,5) \times 10^{-10}$
Внесение ацетонитрила 1 раз в сутки 10 раз			
Контроль без воздействия ацетонитрила	<i>Al. faecalis</i> 2	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-11}$	$(8,2 \pm 0,8) \times 10^{-12}$
	<i>Al. faecalis</i> 2 + <i>R. ruber</i> gt 1	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^{-11}$	$(2,4 \pm 0,4) \times 10^{-10}$
При воздействии ацетонитрила	<i>Al. faecalis</i> 2	$(6,5 \pm 0,4) \times 10^{-12}$	$(6,4 \pm 0,5) \times 10^{-12}$
	<i>Al. faecalis</i> 2 + <i>R. ruber</i> gt 1	$(9,0 \pm 0,7) \times 10^{-11}$	$(3,1 \pm 0,9) \times 10^{-10}$

Количество АТФ в клетках *Al. faecalis* 2 снижалось и в планктонной культуре, и в биопленках, но оставалось достаточно высоким, чтобы судить о жизнеспособности *Al. faecalis* 2. В смешанной культуре при внесении ацетонитрила наблюдалось некоторое увеличение количества АТФ, что может быть следствием разобщения энергетического и конструктивного метаболизма в результате стрессового состояния микробных клеток (табл. 1). Меньшее повреждающее действие ацетонитрила на смешанную культуру может быть связано с нитрилгидратазной активностью *R. ruber* gt 1. Родококк

трансформирует часть токсичного субстрата до ацетамида, снижая тем самым его негативное влияние на всю ассоциацию в целом.

Аналогичный эксперимент провели для оценки жизнеспособности клеток и массивности полисахаридного каркаса матрикса моно- и двувиговых биопленок нитрилгидролизующих бактерий в условиях воздействия ацетонитрила. Для этого биопленки бактерий *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 выращивали на предметных стеклах в чашках Петри в течение 5 суток, отмывали от планктонных клеток и добавляли ацетонитрил 1 раз в сутки до конечной концентрации 1527 г/л.

Из микрофотографий видно, что большая часть клеток как в составе монопленок, так и в двувиговой биопленке жизнеспособны (рис. 15–17).

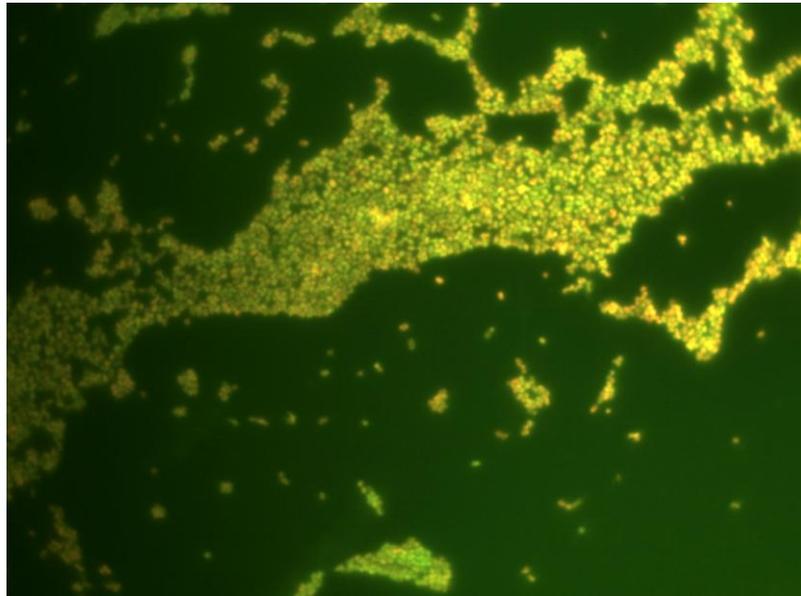


Рисунок 15 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток монопленки *Al. faecalis* 2 при внесении ацетонитрила каждые сутки в течение 10 суток; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

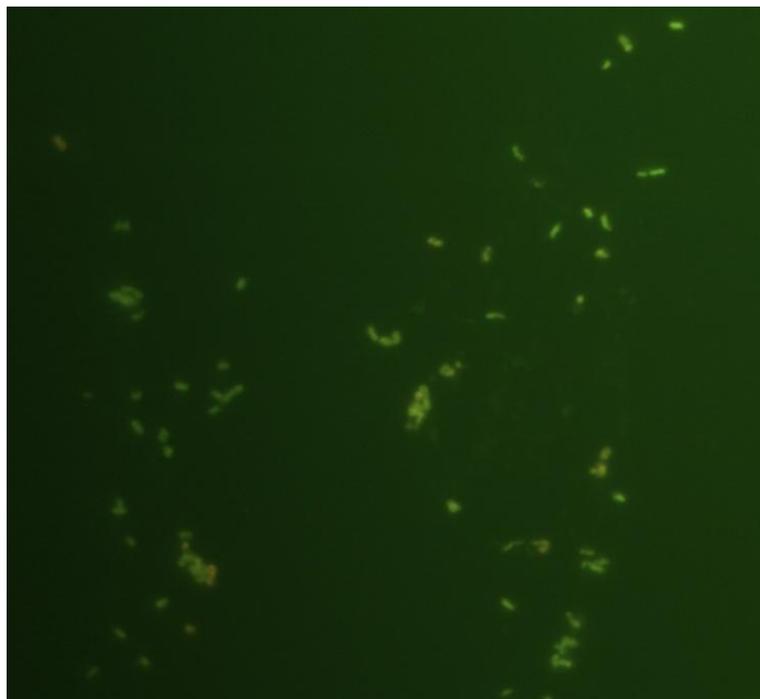


Рисунок 16 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток моноплёнки *R. ruber* gt 1 при внесении ацетонитрила каждые сутки в течение 10 суток; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

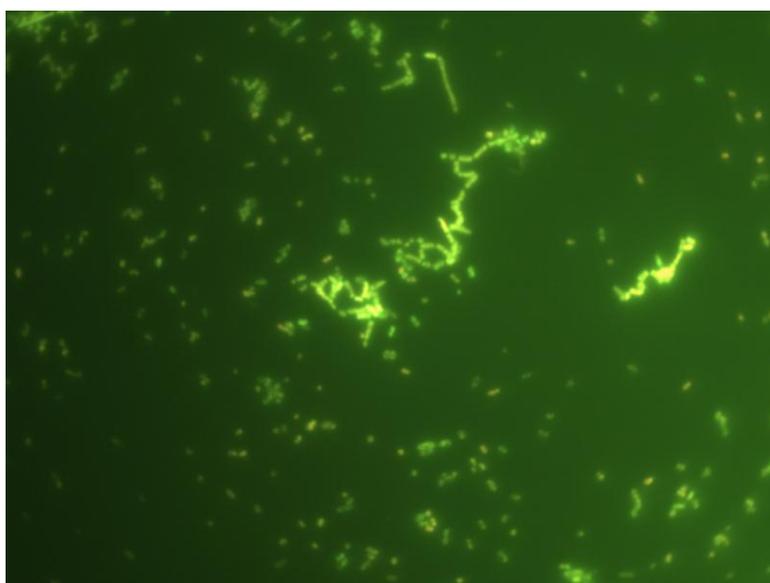


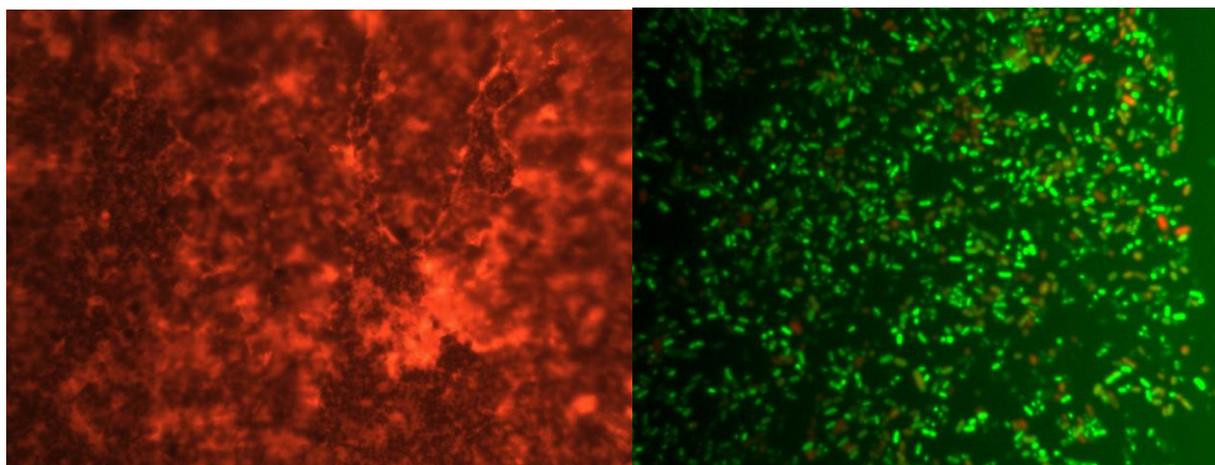
Рисунок 17 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток двувидовой биоплёнки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 при внесении ацетонитрила каждые сутки в течение 10 суток; зеленое окрашивание –

жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание
– нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

3.3.2. Влияние неблагоприятных факторов окружающей среды на жизнеспособность клеток

Для оценки жизнеспособности клеток, а также массивности полисахаридного каркаса матрикса моно- и двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий в нормальных условиях и при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды биопленки бактерий *A. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 выращивали на предметных стеклах в течение 5 суток и подвергали воздействию неблагоприятных факторов. Далее биопленки окрашивали отдельно красителями LIVE/DEAD (Syto 9/пропидиум иодид) и конканавалин А-тетраметилпродаминол в течение 20 и 40 мин соответственно и просматривали в световом микроскопе Leica DM LS с флюоресценцией.

Результаты выполненных исследований показали, что монопенка *A. faecalis* 2 имеет массивный, многослойный полисахаридный матрикс, в котором прослеживается рельефность поверхности, включая каналы и поры, а также клетки бактерий (рис. 18, а). Биопленка образована большим скоплением клеток, около 90% из которых являются живыми (рис. 18, б). Появление мертвых клеток в составе биопленки в оптимальных условиях роста является естественным процессом многослойного роста бактерий. Мертвые клетки обнаруживаются, как правило, в толще биопленки вследствие того, что клетки, удаленные от поверхности, хуже снабжаются кислородом и питательными веществами.

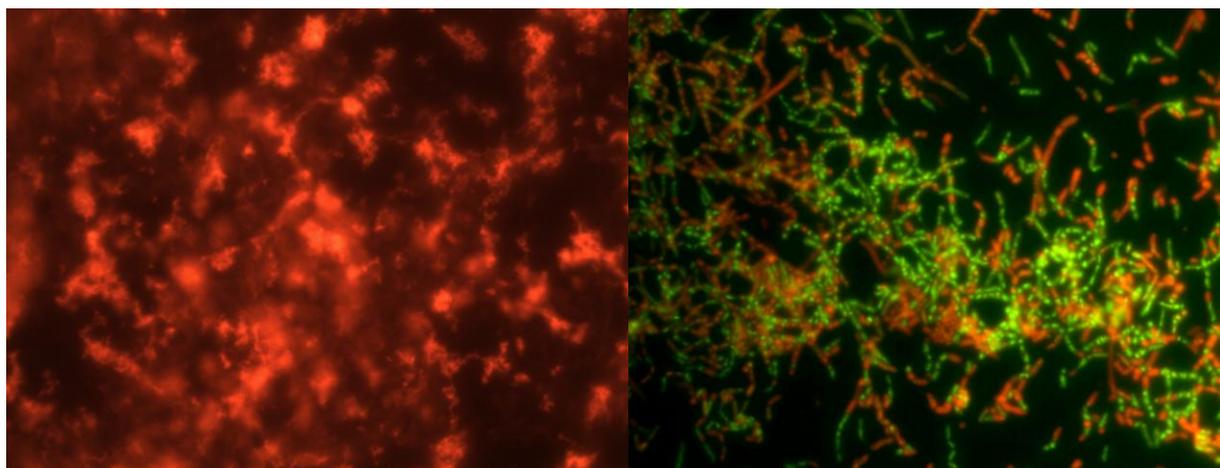


а

б

Рисунок 18 – Микрофотография полисахаридного каркаса матрикса (а) и соотношения живых/мертвых клеток (б) моноплёнки *Al. faecalis* 2 в оптимальных условиях роста; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

Моноплёнка *R. ruber* gt 1 образована большим количеством клеток, подавляющее большинство которых жизнеспособно, также имеет хорошо обнаруживаемый полисахаридный матрикс, визуально, однако, менее объемный по сравнению с матриксом моноплёнки алкалигенеса (рис. 19).



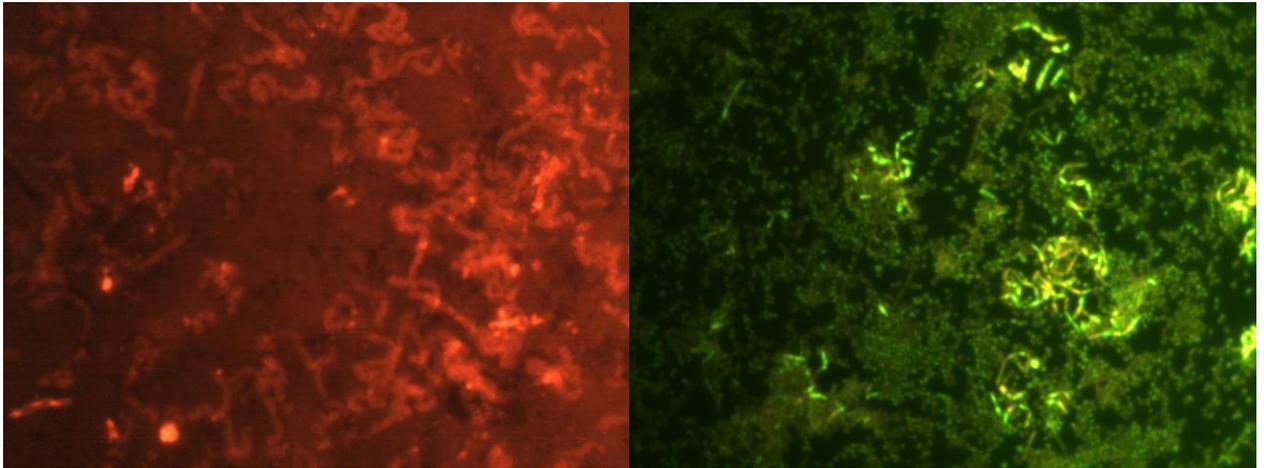
а

б

Рисунок 19 – Микрофотография полисахаридного каркаса матрикса (а) и соотношения живых/мертвых клеток (б) в моноплёнке *R. ruber* gt 1 в оптимальных условиях роста; зеленое окрашивание – жизнеспособные

клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

Двувидовая биопленка также образована большим количеством жизнеспособных клеток, количество которых визуально превышает количество жизнеспособных клеток в монопленках *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 (рис. 20, а). Двувидовая биопленка имеет полисахаридный каркас матрикса, по массивности и многослойности сопоставимый с матриксом монопленки *Al. faecalis* 2 (рис. 20, б). Так как алкалигенес является первичным колонизатором в смешанной культуре с родококком, то большую часть матрикса, если не весь его объем, образуют клетки *Al. faecalis* 2. Примечательно, что на фотографии помимо основного объема матрикса, образованного по большей части клетками алкалигенеса, хорошо различимы клетки родококка, которые находятся на поверхности двувидовой биопленки.



a

б

Рисунок 20 – Микрофотография полисахаридного каркаса матрикса (*a*) и соотношения живых/мертвых клеток (*б*) в двувидовой биопленке *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 в оптимальных условиях роста; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

При нагревании в течение 2 часов при 50°C количество жизнеспособных клеток в моноплёнке *Al. faecalis* 2 значительно снижается (рис. 21).

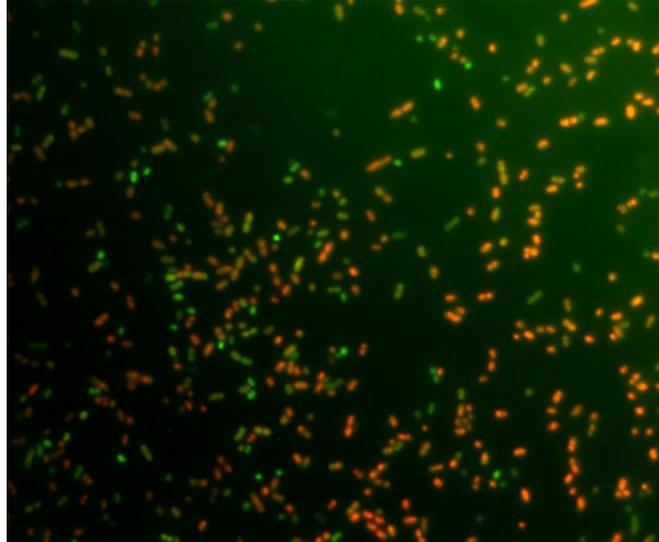


Рисунок 21 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в моноплёнке *Al. faecalis* 2 при нагревании до 50°C в течение 2 часов; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

Отклонение температуры от оптимума не влияет на жизнеспособность клеток *R. ruber* gt 1 в моноплёнке, что визуально подтверждается микрофотографиями, где подавляющее большинство клеток имеют зеленую окраску, следовательно, остаются живыми (рис. 22). Из-за способности образовывать капсулы и многослойный пептидогликан родококки являются более устойчивыми к неблагоприятным факторам окружающей среды, чем бактерии рода *Alcaligenes* (Нестеренко и др., 1985; Krivoruchko *et al.*, 2019).

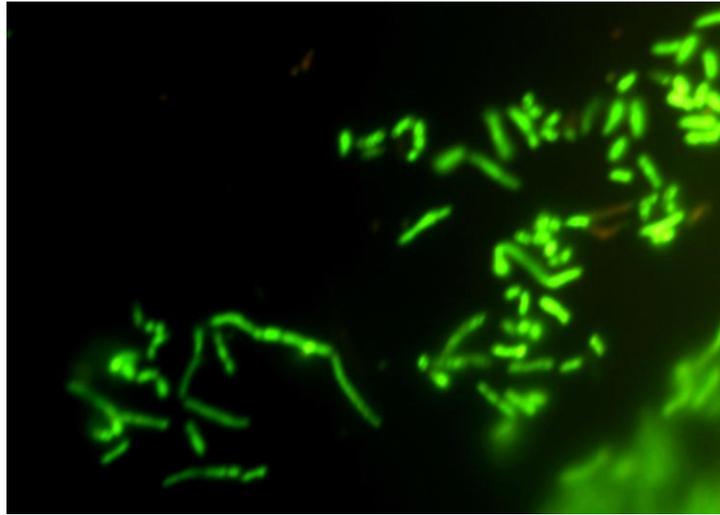


Рисунок 22 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в моноплёнке *R. ruber* gt 1 при нагревании до 50°C в течение 2 часов; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

В двувидовой биопленке количество жизнеспособных клеток *Al. faecalis* 2 больше, чем в моноплёнке, хотя оно снижается по сравнению с количеством жизнеспособных клеток в бинарной биопленке без воздействия повышенной температуры (рис. 23).

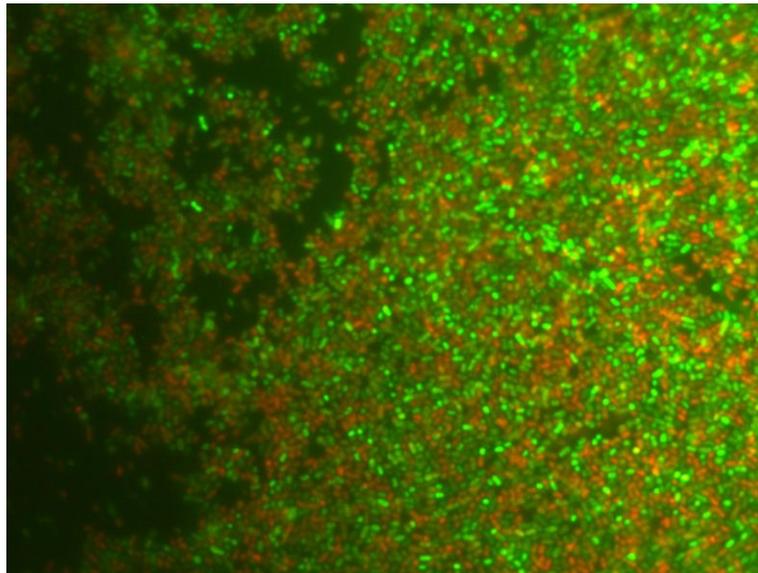
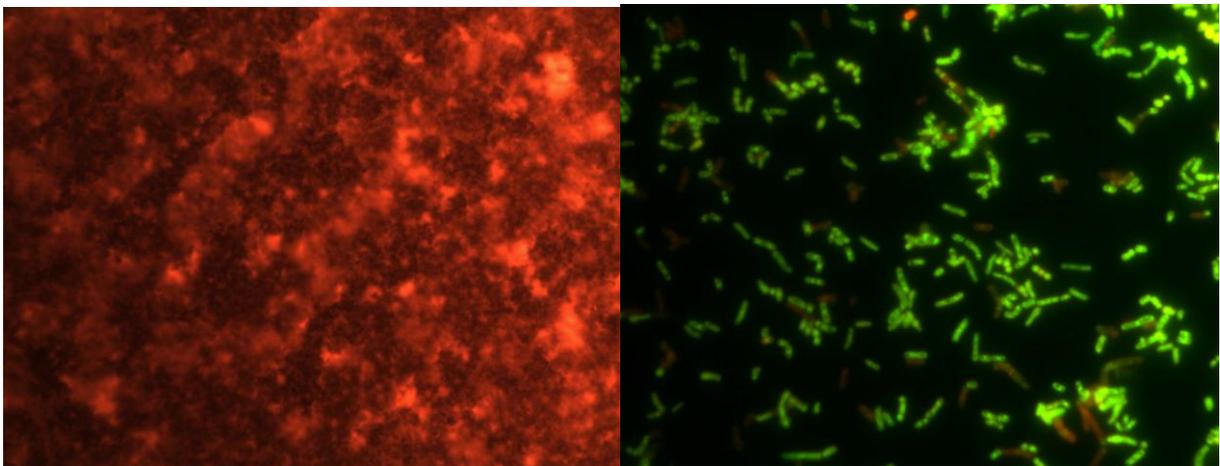


Рисунок 23 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в двувидовой биопленке *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 при нагревании до 50°C в

течение 2 часов; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

Увеличение количества жизнеспособных клеток *Al. faecalis* 2 в двувидовой биопленке по сравнению с таковым в моноплёнке может быть связано с увеличением синтеза полисахаридного матрикса клетками *Al. faecalis* 2 под воздействием вторичного колонизатора *R. ruber* gt 1, которое было рассмотрено в разделе 3.2.

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 биопленками в нормальных условиях (рис. 24).

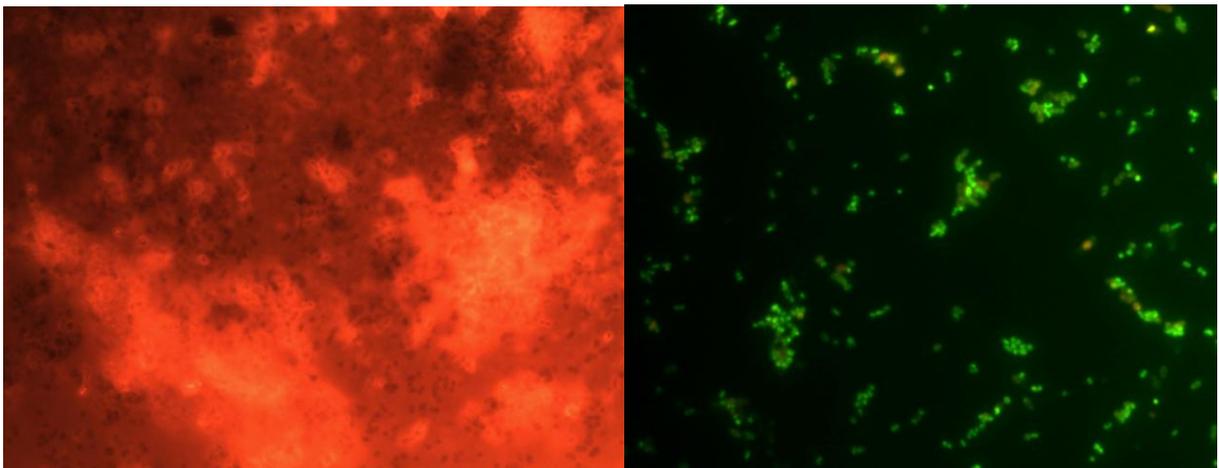


a

б

Рисунок 24 – Микрофотография полисахаридного каркаса матрикса (*a*) и соотношения живых/мертвых клеток (*б*) в моноплёнке *R. ruber* gt 1 в условиях голодания; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

Что касается культуры *Al. faecalis* 2, то в условиях длительного хранения как таковой биопленки не обнаруживается (рис. 25). Большая часть клеток переходит в планктонное состояние, а на поверхности стекла остаются небольшие части биопленки с жизнеспособными клетками и большая часть полисахаридного каркаса матрикса. Следовательно, условия голодания усиливают дисперсию биопленки алкалигенесов, но не приводят к гибели клеток биопленки.



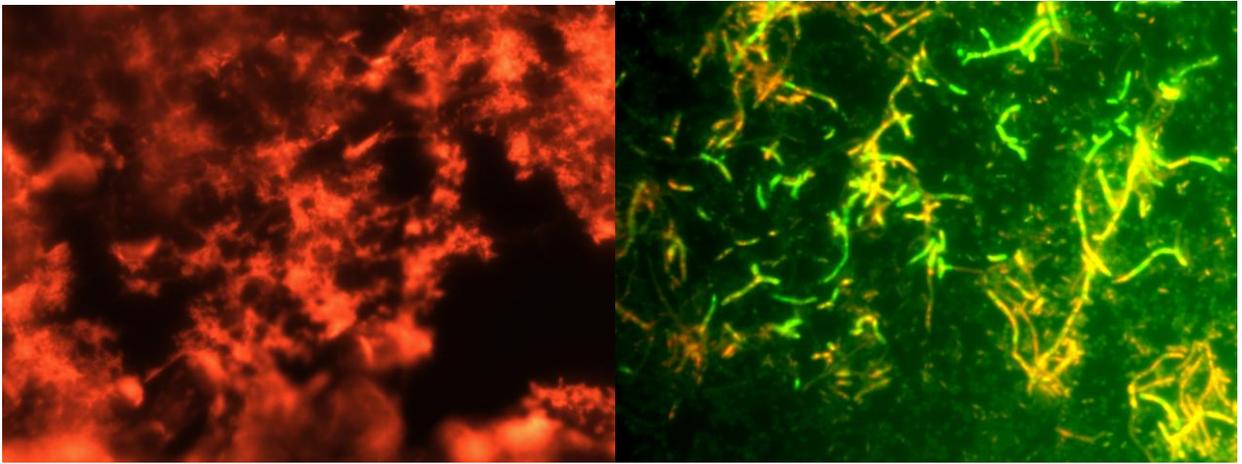
a

б

Рисунок 25 – Микрофотография полисахаридного каркаса матрикса (*a*) и соотношения живых/мертвых клеток (*б*) в моноплёнке *Al. faecalis* 2 в условиях голодания; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

В смешанной культуре наблюдалось снижение общего количества жизнеспособных клеток и массивности полисахаридного каркаса матрикса, что связано с дисперсией клеток биопленки *Al. faecalis* 2 (рис. 26). В смешанной культуре в условиях длительного хранения при отсутствии питательного субстрата наблюдается разрушение биопленки, как и в случае с монокультурой *Al. faecalis* 2, так как в смешанной культуре алкалигенес является первичным колонизатором и образует большую часть биопленки. Дисперсия первичного колонизатора в свою очередь влияет на общее

количество клеток и объем полисахаридного матрикса двувидовой биопленки. Однако бинарная биопленка оказывается более стабильной, чем монопенка алкалигенеса. Снижение количества жизнеспособных клеток при этом не наблюдается.

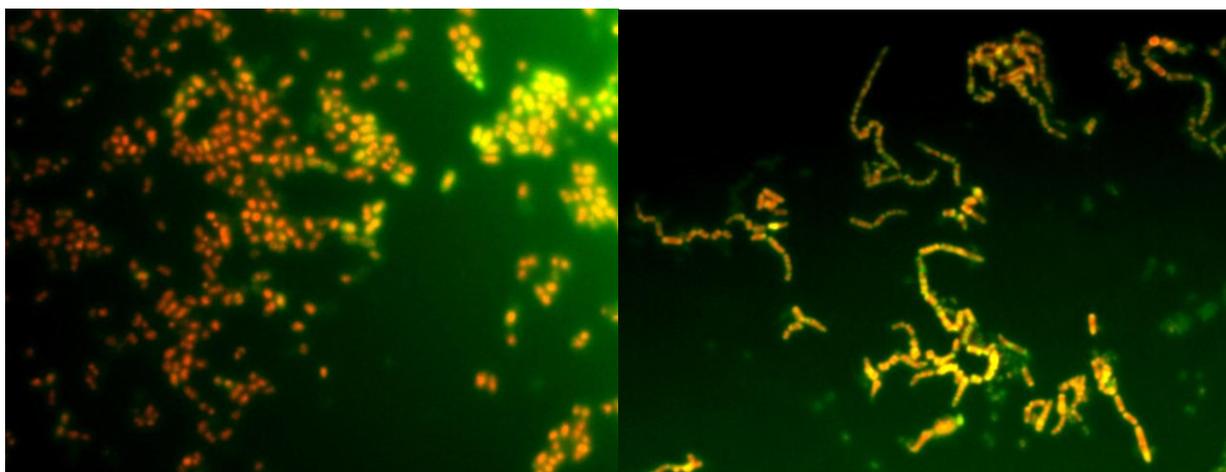


a

б

Рисунок 26 – Микрофотография полисахаридного каркаса матрикса (*a*) и соотношения живых/мертвых клеток (*б*) в двувидовой биопленке *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 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 монопенках *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 значительно снижается (рис. 27). Полисахаридный матрикс биопленок в оптимальных условиях находится в гидратированном состоянии, что защищает биопленки от высушивания. Однако чтобы поддерживать уровень влажности, достаточный для сохранения жизнеспособности клеток в течение продолжительного времени, полисахаридный матрикс монопенки изученных культур оказался недостаточно массивным.



a

б

Рисунок 27 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в монопленках *Al. faecalis* 2 (*a*) и *R. ruber* gt 1 (*б*) при высушивании в течение 2 суток; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

В двувидовой биопленке количество жизнеспособных клеток при высушивании снижается по сравнению с количеством жизнеспособных клеток в оптимальных условиях (рис. 28). Однако при этом остается большее количество жизнеспособных клеток по сравнению с таковым, оставшимся в монопленках *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1. Также как и в случае с нагреванием, это может быть связано с увеличением синтеза полисахаридного матрикса клетками первичного колонизатора *Al. faecalis* 2 под воздействием вторичного колонизатора *R. ruber* gt 1, которое было рассмотрено в разделе 3.2.

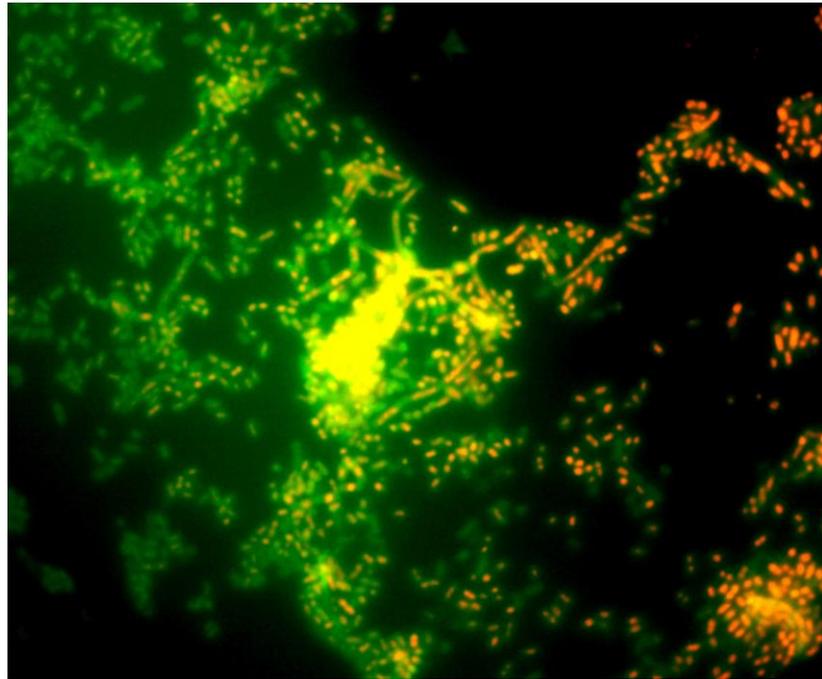


Рисунок 28 – Микрофотография соотношения живых/мертвых клеток в двувидовой биопленке *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 при высушивании в течение 2 суток; зеленое окрашивание – жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание – нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной

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.

3.4. 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. Для этого биопленки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 выращивали на планшетах в течение 1–7 суток, после чего планктонные клетки удаляли из лунок декантацией, биопленку

отмывали от среды культивирования 200 мкл калий-фосфатного буфера дважды и добавляли 200 мкл 0,9% NaCl. Высев клеток проводили сразу (0 день), чтобы учесть количество оставшихся планктонных клеток в среде, и через определенное количество суток.

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 и составляет в среднем $5,94 \times 10^7$ КОЕ/мл (рис. 29). На второй и пятый дни в физиологическом растворе планктонных клеток в среде становится меньше. Это связано с процессами сорбции/десорбции клеток, кроме того, так как учитывались только жизнеспособные клетки, это также может быть связано с гибелью клеток в отсутствие питательного субстрата. Клетки *Al. faecalis* 2 подвижны и на первоначальном этапе формирования биопленки активно переходят из планктонного состояния в биопленку и обратно. Наибольшее количество мигрировавших клеток из 4-суточной биопленки наблюдается во второй день в среде без питательных веществ.

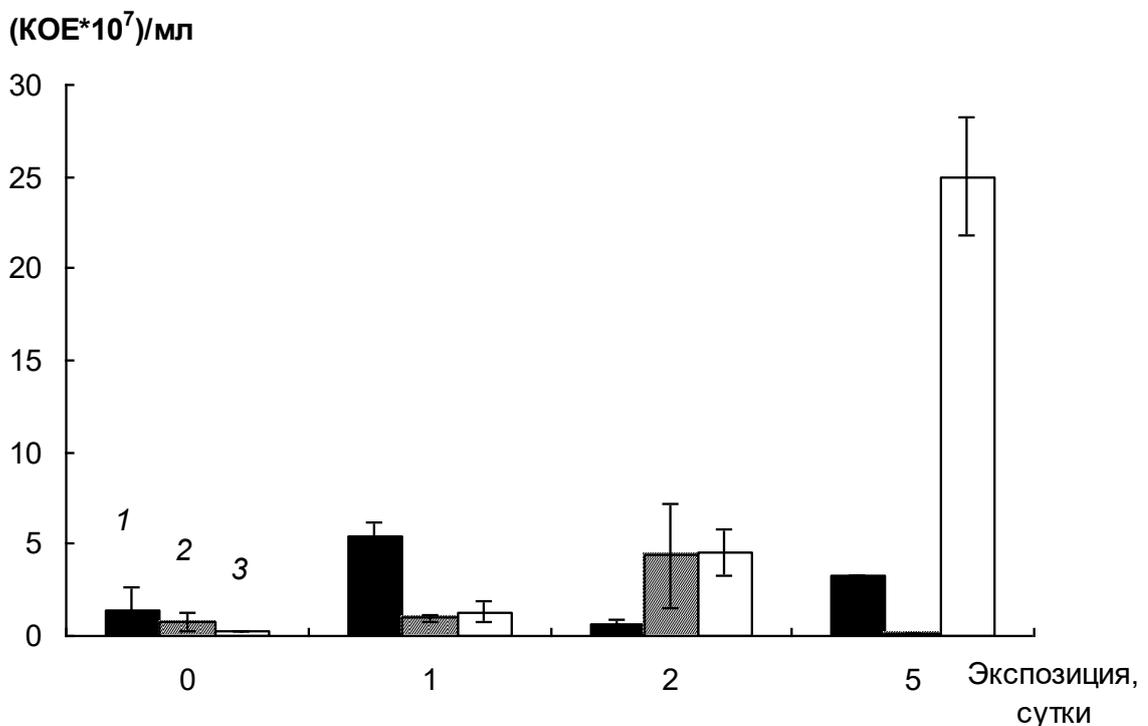


Рисунок 29 – Дисперсия клеток из моновидовой биопленки *Al. faecalis* 2: 1 – 1-суточная биопленка, 2 – 4-суточная биопленка, 3 – 7-суточная биопленка

Количество мигрировавших клеток из 7-суточной моновидовой биопленки *Al. faecalis* 2 в среде без питательных веществ каждый день увеличивается, и наибольшее количество мигрировавших клеток наблюдается в пятый день хранения и составляет в среднем $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. При этом количество мигрировавших клеток на 5 сутки в 4,3 и 3,9 раза больше клеток, мигрировавших на 1 день экспозиции 1-суточной биопленки и на 2 день экспозиции 4-суточной биопленки в физиологическом растворе соответственно. Это может свидетельствовать как о разной массивности биопленки, так и о том, что с началом дисперсии в биопленке запускаются процессы, в результате которых клетки переходят в планктонное состояние более интенсивно. Таким образом, наименее устойчивой среди изученных является 7-суточная монопланка алкалигенеса, дисперсия клеток из которой максимальна на 5-е сутки.

Анализ дисперсии клеток из моновидовой биопленки *R. ruber* gt 1 показал, что для 1-суточной биопленки ярко выраженной зависимости количества мигрировавших клеток от времени экспозиции в физиологическом растворе не наблюдается (рис. 30). Наибольшее количество мигрировавших клеток из 4-суточной биопленки наблюдается на пятые сутки в физиологическом растворе и составляет $2,80 \times 10^6$ КОЕ/мл. По-видимому, на 4 сутки культивирования клетки успевают образовать достаточно прочную биопленку, которая подвергается дисперсии только на 5 сутки.

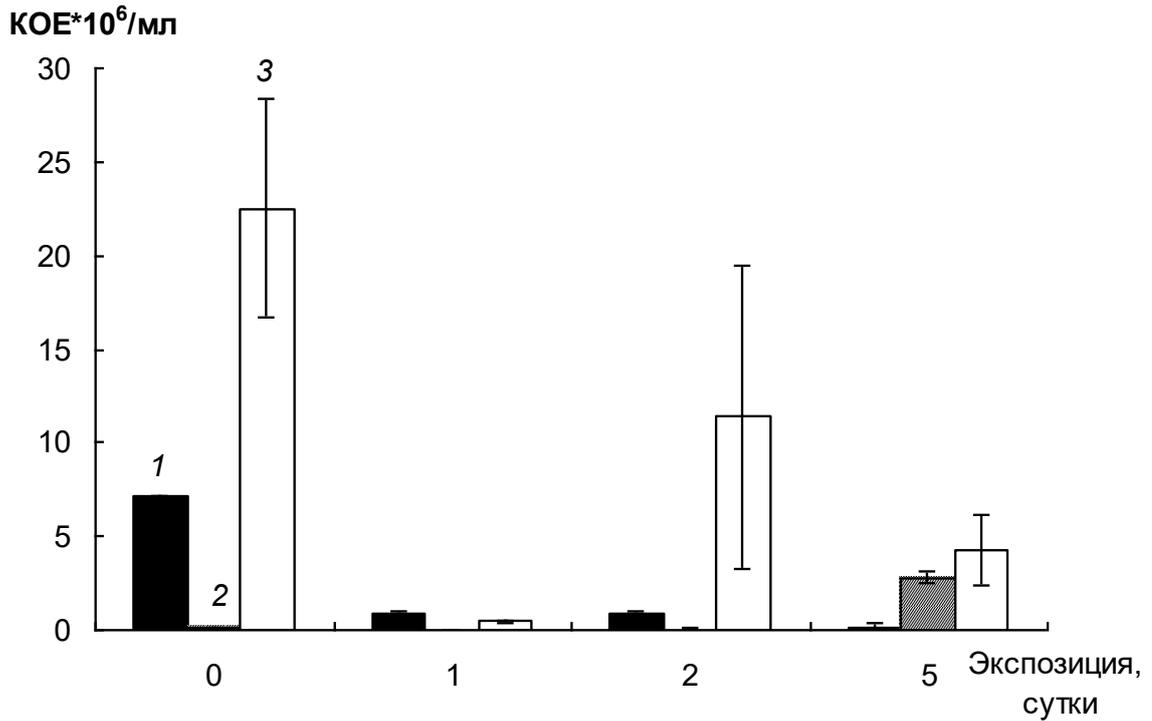


Рисунок 30 – Дисперсия клеток из моновидовой биопленки *R. ruber* gt 1: 1 – 1-суточная биопленка, 2 – 4-суточная биопленка, 3 – 7-суточная биопленка

Анализ дисперсии клеток *Al. faecalis* 2 (рис. 31) и *R. ruber* gt 1 (рис. 32) из двувидовой биопленки показал, что количество мигрировавших клеток и алкалингенеса, и родококка в 1-суточной и 4-суточной бинарной биопленке возрастает с каждым последующим днем в среде без питательных веществ и максимально на 5 день.

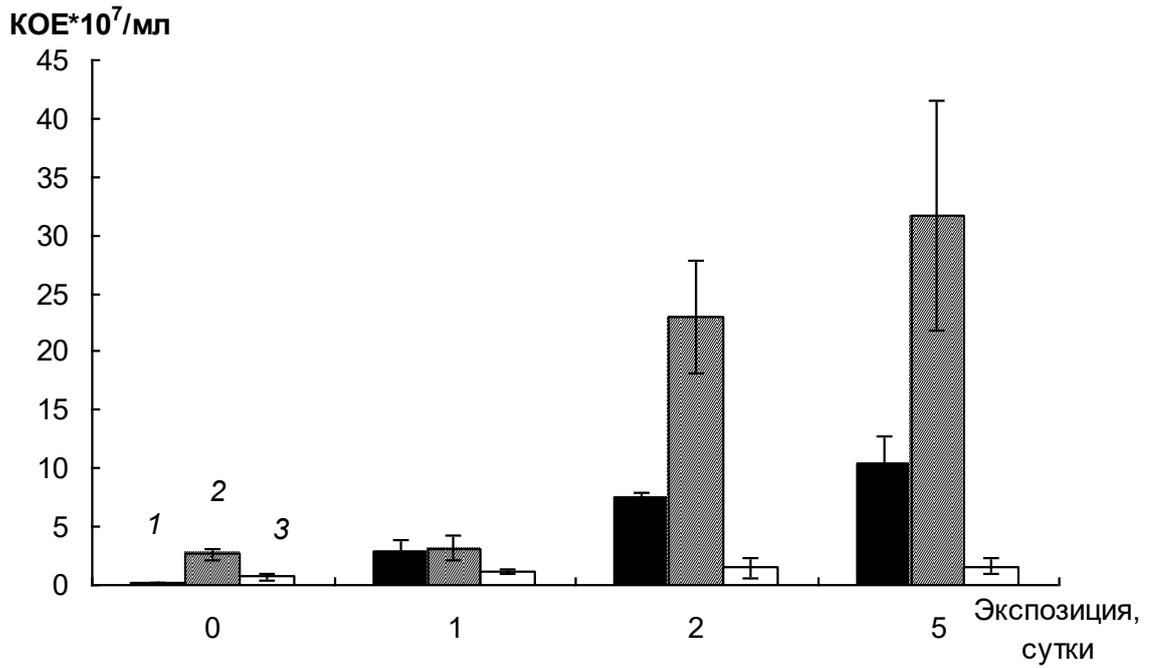


Рисунок 31 – Дисперсия клеток *Al. faecalis* 2 из двувидовой биопленки: 1 – 1-суточная биопленка, 2 – 4-суточная биопленка, 3 – 7-суточная биопленка

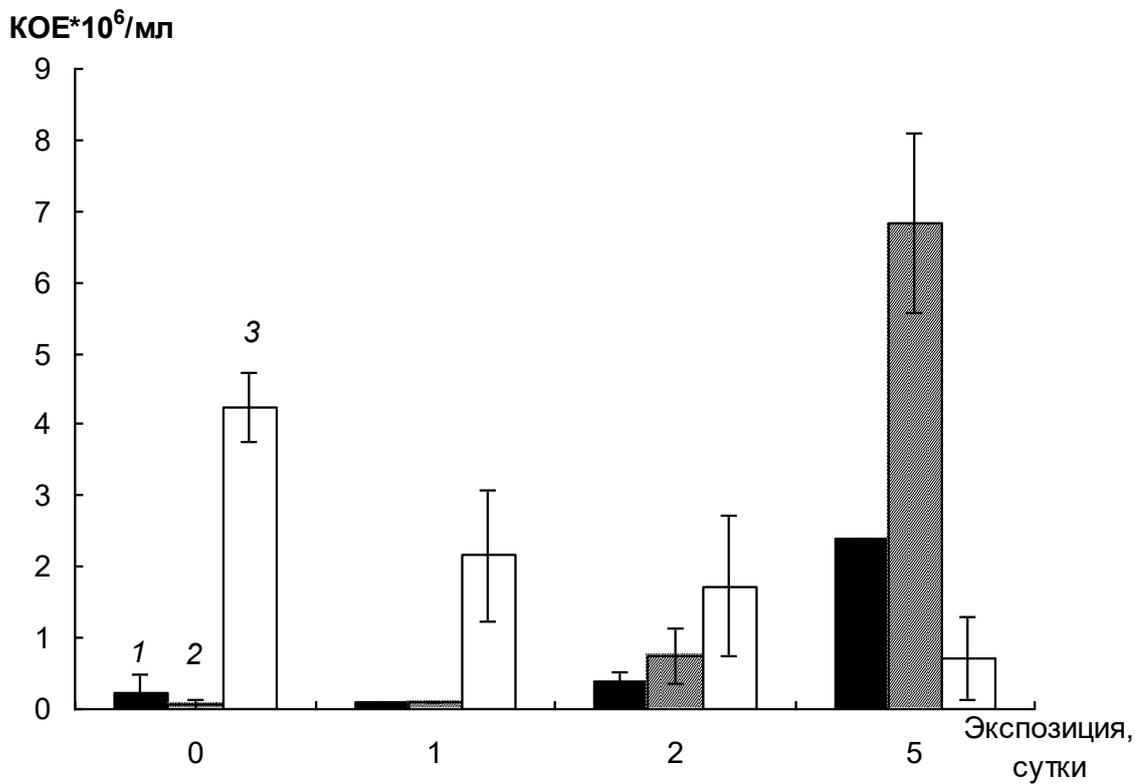


Рисунок 32 – Дисперсия клеток *R. ruber* gt 1 из двувидовой биопленки: 1 – 1-суточная биопленка, 2 – 4-суточная биопленка, 3 – 7-суточная биопленка

Для штамма *Al. faecalis* 2 эти данные соответствуют дисперсии клеток в 7-суточной монокультуре. 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 бинарной 7-суточной биопленки уменьшается со временем экспозиции в физиологическом растворе.

Таким образом, наименее устойчивыми среди изученных моновидовых биопленок являются 7-суточные моноплёнки. Однако в смешанной культуре наиболее подвержены диспергированию 4-суточные биопленки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1. Эксперименты, проведенные ранее, показали, что именно на 4-е сутки формирования двувидовой биопленки родококк присоединяется к первичному колонизатору – алкалигенесу, что связано с максимумом роста биопленки родококка. Можно предположить, что в момент наиболее интенсивной адгезии клеток второго штамма дисперсия биопленки первичного колонизатора возрастает. Интересно, что в условиях голодания по субстрату 7-суточная двувидовая биопленка гораздо более стабильна, чем биопленки монокультур. В целом, дисперсия *R. ruber* gt 1 из моноплёнки более выражена и превышает таковую из бинарной биопленки на порядок и более. Внеклеточный полисахаридный 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.

ГЛАВА 4. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ АКРИЛАМИДА, АКРИЛОНИТРИЛА И АЦЕТОНИТРИЛА БИОПЛЕНКАМИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

4.1. Динамика трансформации акриламида клетками *Al. faecalis* 2

Реакцию трансформации акриламида в концентрации 100 мМ проводили в течение 0,5–72 ч с перемешиванием на шейкере (скорость оборотов 140 об/мин), при температуре 22°C, реакцию останавливали добавлением концентрированной HCl в конечной концентрации 5 %.

Анализ динамики трансформации субстрата показал, что и биопленки *Al. faecalis* 2, и клетки в суспензии почти полностью трансформируют акриламид в среднем за 24 часа реакции (рис. 33, 34). Разница в скорости трансформации наблюдается на 4 час реакции, что выражается в снижении количества амида в среде в 2, 3 и 7 раз для волокна 22 мкм, суспензии и волокна 4–12 мкм соответственно (рис. 33). Различия в скорости трансформации могут быть следствием разного количества клеток, выросших в суспензии и на волокне разного диаметра.

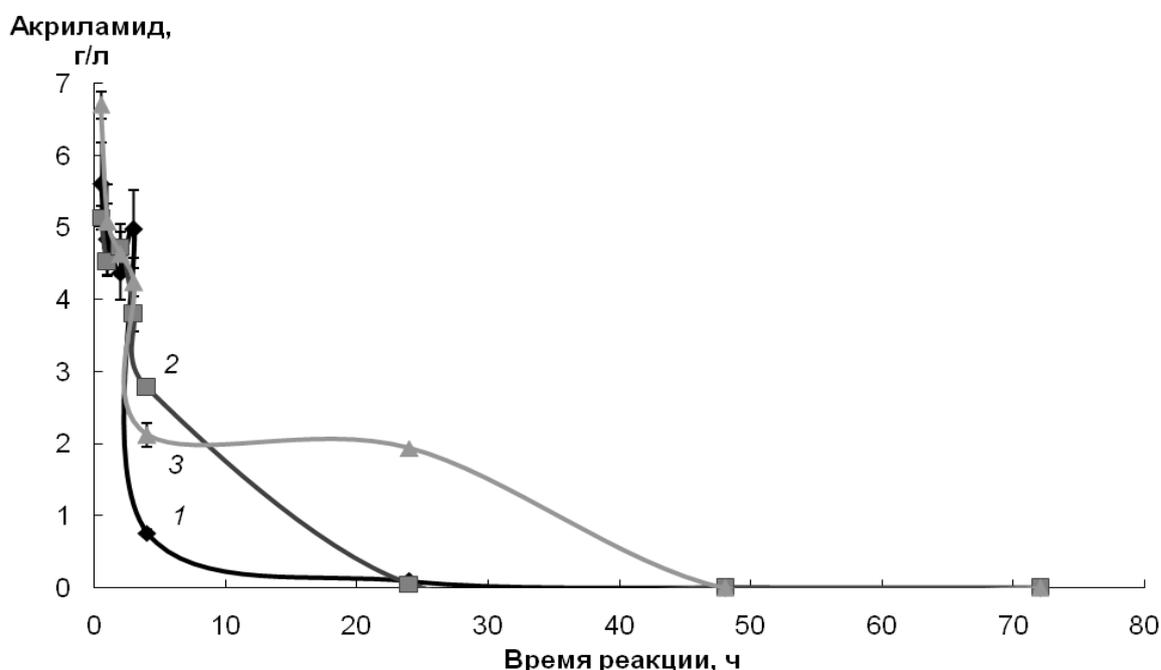


Рисунок 33 – Динамика трансформации акриламида биопленкой *Al. faecalis* 2, выращенной на базальтовом волокне со средним диаметром 4–12 мкм (1), на

базальтовом волокне диаметром 22 мкм (2), а также суспендированными клетками (3).

Значительной разницы во времени трансформации акриламида биопленками *Al. faecalis* 2, выращенными на базальтовом волокне и Карбопоне-Б-актив, не наблюдается (рис. 34). Трансформация почти всего субстрата биопленками, выращенными как на минеральном, так и на углеродном носителе, протекает за 24 часа реакции. В среднем к 6 часам реакции биопленки трансформируют 95% всего субстрата, тогда как планктонные клетки в суспензии – 78%.

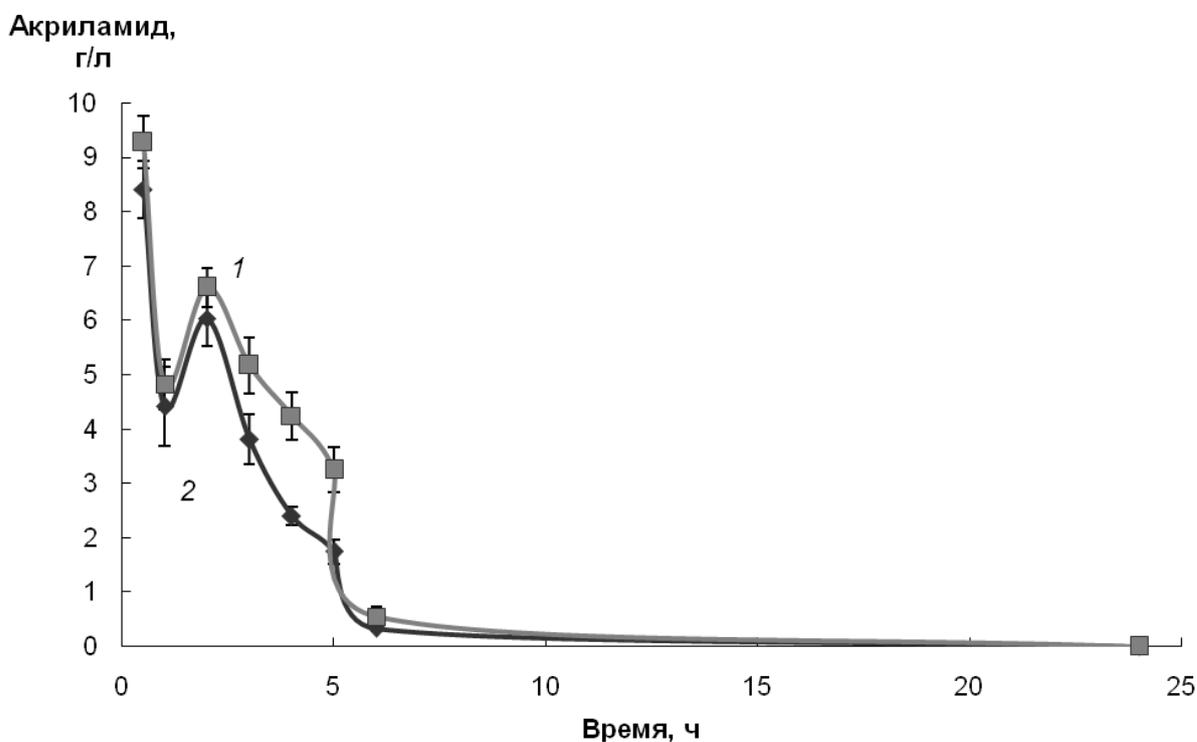


Рисунок 34 – Динамика трансформации акриламида биопленкой *Al. faecalis* 2, выращенной на углеродном волокне Карбопон-В-актив (1), а также суспендированными клетками (2).

Из графиков, отражающих 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. 35, 36). Свободные клетки в суспензии *Al. faecalis* 2 накапливают большее количество кислоты и в меньшей степени ее утилизируют, чем биопленки этой же культуры. Причем наименьшее количество кислоты в реакционной среде наблюдалось у биопленок, выращенных на Карбопоне-В-актив (рис. 36).

Акриловая
кислота, г/л

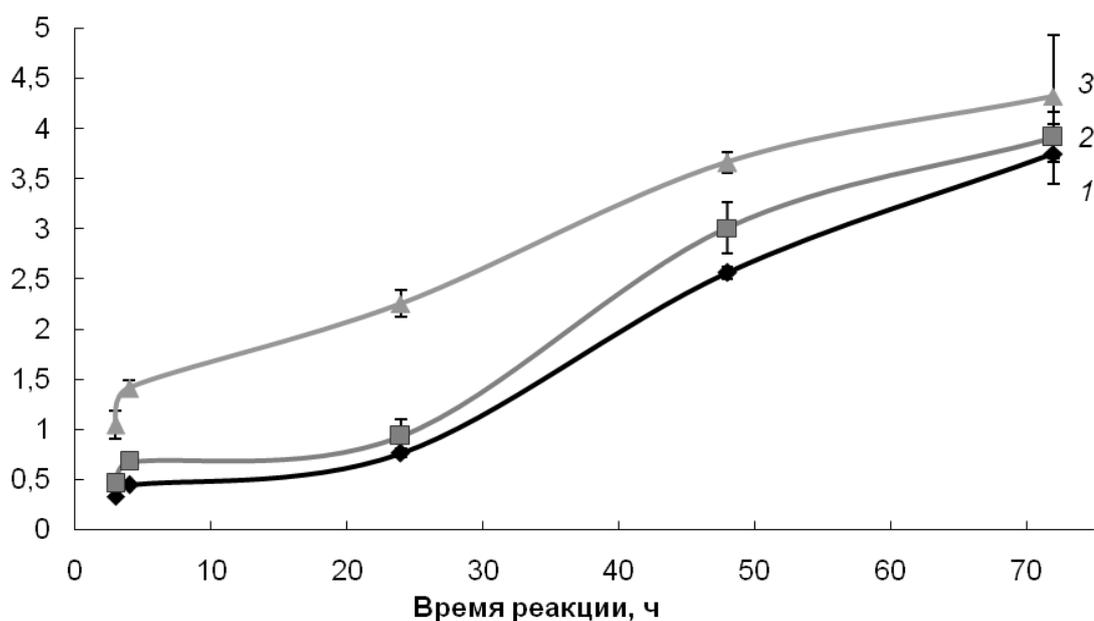


Рисунок 35 – Динамика накопления акриловой кислоты в реакционной среде биопленкой *Al. faecalis* 2, выращенной на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм (1), на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (2), а также суспендированными клетками (3).

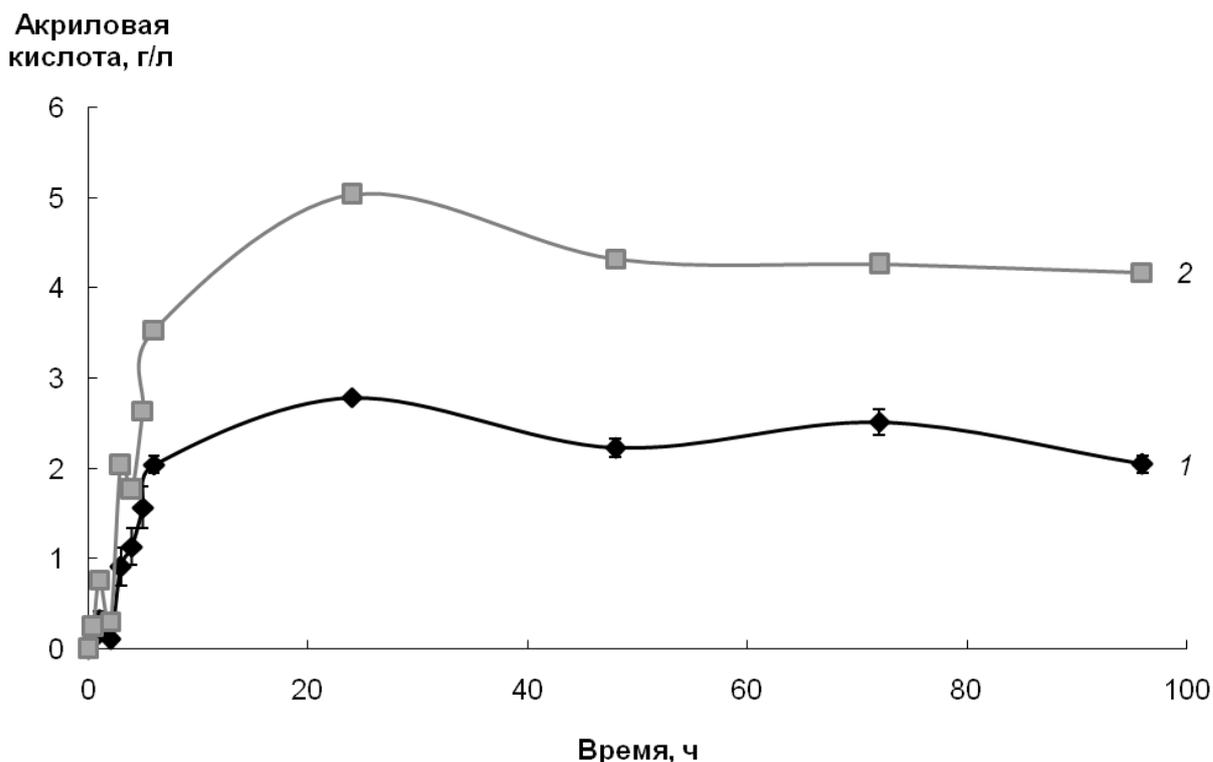


Рисунок 36 – Динамика накопления акриловой кислоты в реакционной среде биопленкой *Al. faecalis* 2, выращенной на углеродном волокне Карбопон-В-актив (1), а также суспендированными клетками (2).

В процессе синтеза раствора акриловой кислоты биопленками *Al. faecalis* 2, выращенными на базальтовом волокне диаметром 22 мкм, установлено, что первые 14 суток биопленка практически полностью трансформирует вносимый ежедневно амид в кислоту с накоплением последней в реакционной среде (рис. 37). После 14 циклов биопленки начинают трансформировать часть вносимого ежедневно акриламида и часть накопленной в реакционной среде кислоты. При этом концентрация непереработанного амида в среде растет, а концентрация акриловой кислоты меняется незначительно.

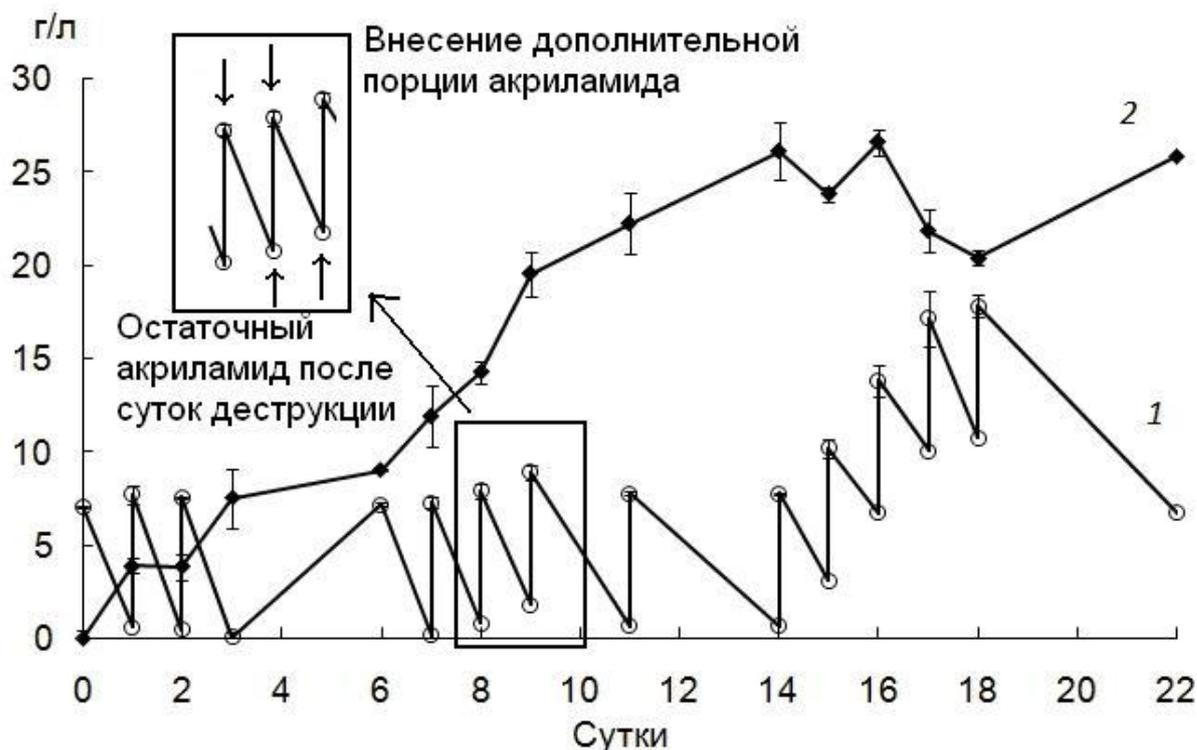


Рисунок 37 – Динамика трансформации акриламида (1) и накопления акриловой кислоты (2) в реакционной среде биопленкой *Al. faecalis* 2, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм.

Таким образом, показана возможность использования биопленок *Al. faecalis* 2 с целью синтеза карбоновых кислот. Так за 16 суток трансформации получен раствор акриловой кислоты концентрацией 26 г/л. Дальнейшее увеличение времени синтеза не приводило к возрастанию концентрации акриловой кислоты, что связано с включением кислоты в дальнейшие метаболические пути клеток *Al. faecalis* 2. 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.

4.2. Динамика трансформации акрило- и ацетонитрила клетками *R. ruber gt 1*

Реакцию трансформации ацетонитрила в концентрации 130 мМ проводили в течение 20–120 мин с перемешиванием на шейкере (скорость оборотов 140 об/мин), при температуре 22°C, реакцию останавливали добавлением концентрированной HCl в конечной концентрации 5 %.

Анализ динамики трансформации субстрата показал, что и биопленки *R. ruber gt 1*, и клетки в суспензии почти полностью трансформируют ацетонитрил за 40 минут реакции (рис. 38). Небольшая разница в скорости трансформации субстрата наблюдается на 20 мин реакции и возрастает в ряду: 1) биопленки, выращенные на базальтовом волокне диаметром 22 мкм; 2) биопленки, выращенные на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм; 3) биопленки, выращенные на углеродном волокне Карбопон-В-актив; 4) свободные клетки в суспензии. Это может быть связано с общим количеством клеток, выросших на поверхности разных носителей, и клеток в суспензии. Штамм *R. ruber gt 1* имеет гидрофобную поверхность клеточной стенки и, соответственно, лучше адгезируется на гидрофобных носителях. Таким образом, для выращивания биопленок родококка предпочтительным носителем будет углеродное волокно, на котором образуется более массивная биопленка, чем на базальтовом волокне. Разница в скорости трансформации субстрата биопленками, выращенными на базальтовом волокне 22 и 4–12 мкм, может объясняться расстоянием между волокнами в носителе. Чем меньше диаметр волокон, тем более плотно упакованы волокна в занимаемом объеме, и тем легче клеткам бактерий закрепиться между ними.

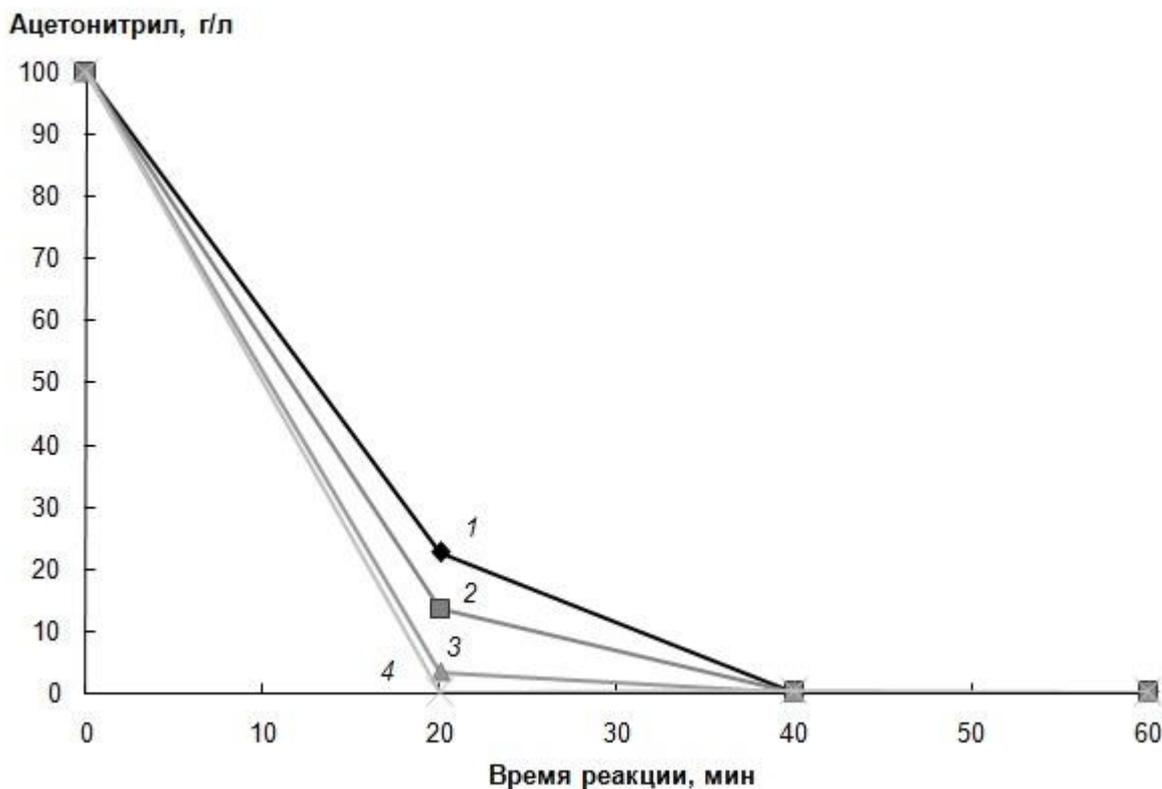


Рисунок 38 – Динамика трансформации ацетонитрила биопленкой *R. ruber* gt 1, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (1), на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм (2), на углеродном волокне Карбопон-В-актив (3), а также суспендированными клетками (4).

Накопление продукта реакции (ацетамида) к 20 мин соответствует динамике трансформации субстрата (рис. 39). Ацетамид накапливается в среде в течение 60 мин экспозиции, после чего происходит снижение его количества в реакционной среде. Однако, к 40 мин реакции в среде со свободными клетками в суспензии и биопленками, выращенными на Карбопоне-В-актив, наблюдается снижение количества ацетамида, тогда как в среде с биопленками, выращенными на базальтовом волокне, снижение количества ацетамида происходит только после 60 мин реакции. Это также может быть связано с количеством клеток, число которых больше в суспензии и в биопленке, выращенной на углеродном носителе.

Снижение количества ацетамида в реакционной среде объясняется функционированием амидазы родококка, трансформирующей ацетамид в

уксусную кислоту. Ген, кодирующий амидазу, как известно, экспрессируется в одном опероне с таковым нитрилгидратазы (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. Если предположить, что количество свободных клеток в суспензии больше количества клеток в составе биопленок, то справедливо будет отметить, что клетки в биопленках имеют более высокую активность амидазы, чем свободные клетки в суспензии.

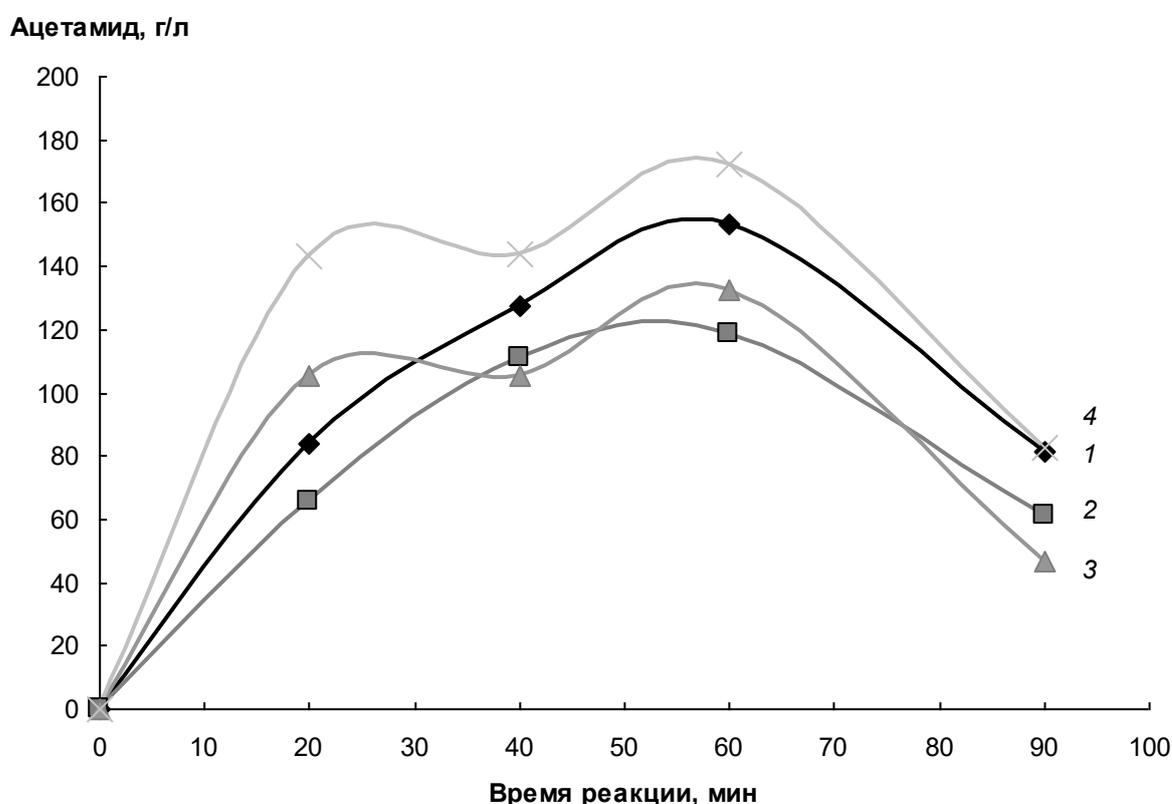


Рисунок 39 – Динамика накопления в реакционной среде и трансформации ацетамида биопленкой *R. ruber* gt 1, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (1), на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм (2), на углеродном волокне Карбопон-В-актив (3), а также суспендированными клетками (4).

При проведении эксперимента по синтезу концентрированного раствора акриламида биопленками *R. ruber* gt 1 отмечена полная

трансформация субстрата, вносимого ежедневно, в течение всего эксперимента (рис. 40). 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, чем биокатализатор на основе биопленок алкалигенеса.

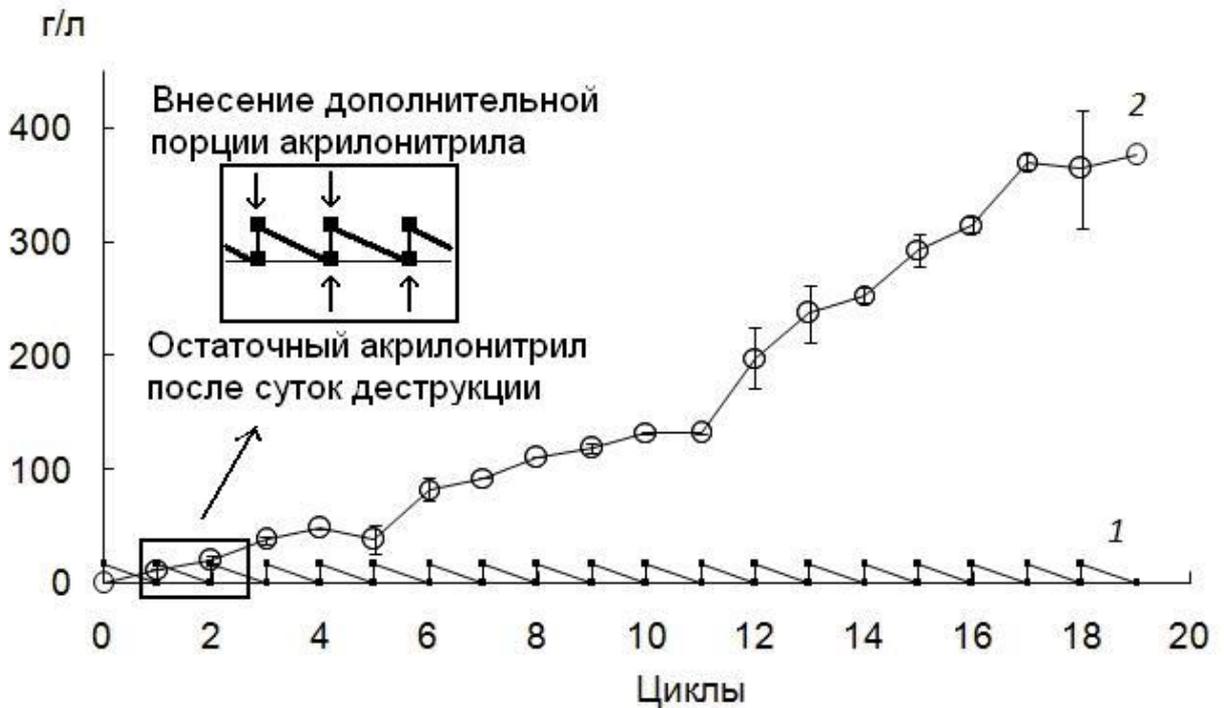


Рисунок 40 – Динамика трансформации акрилонитрила (1) и накопления акриламида (2) в реакционной среде биопленкой *R. ruber* gt 1, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм.

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.

4.3. Трансформация акрило- и ацетонитрила двувидами биопленками *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2 в системе реактора погружного типа

Деградацию акрило- и ацетонитрила осуществляли в реакторе с биопленками нитрилгидролизующих бактерий, выращенными на базальтовом волокне диаметром 22 мкм, базальтовом волокне со средним диаметром 4–12 мкм и углеродном волокне Карбопон-В-актив. Эксперименты также включали использование смешанного биокатализатора (биофильтр типа «сэндвич»): для штамма *Al. faecalis* 2 в качестве носителя использовали базальтовое волокно со средним диаметром волокна 4–12 мкм, для штамма *R. ruber* gt 1 – углеродное волокно. В начале работы биофильтр заполняли 200 мл калий-фосфатного буфера, а затем добавляли 4 мл ацетонитрила. Пробы на определение концентрации субстрата и продуктов реакции отбирали в течение дня и через 24 часа после введения акрило- или ацетонитрила. На следующий день процедуру повторяли: снова добавляли 4 мл субстрата и отбирали пробы. Эксперимент в зависимости от используемого носителя продолжали от 650 до 3000 часов.

4.3.1. Трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками, выращенными на базальтовом волокне диаметром 22 мкм

На протяжении всего эксперимента клетки *R. ruber* gt 1 трансформировали большую часть ацетонитрила в ацетамид (накопление ацетонитрила в реакционной среде в среднем составляло 25 г/л после 300 ч работы биофильтра) (рис. 41). Накопление ацетамида в небольших количествах наблюдалось до 250 ч работы, после чего концентрация амида в среде снижалась до уровня ниже предела обнаружения, поскольку клетки *Al. faecalis* 2 начали трансформировать ацетамид. Наряду с этим уксусная кислота накапливалась в среде до максимальной концентрации 345 г/л.

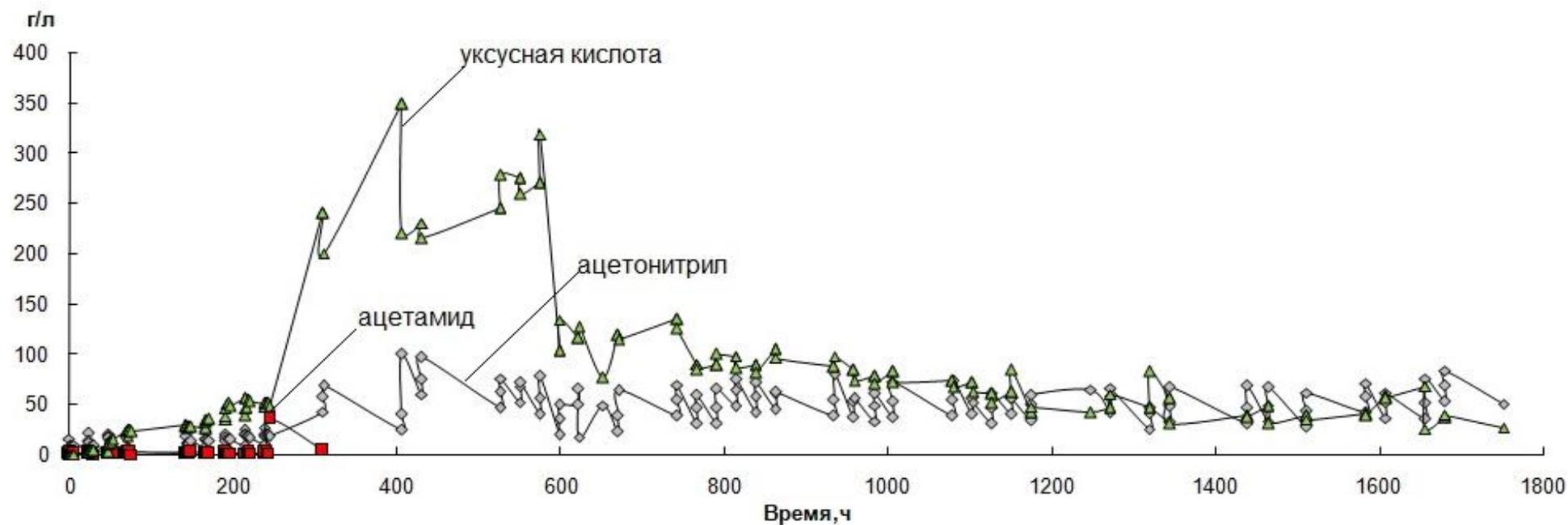


Рисунок 41 – Трансформация ацетонитрила биопленкой смешанной культуры, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм, в системе реактора погружного типа с накоплением ацетамида и уксусной кислоты.

К 600 ч работы биофильтра произошла адаптация системы, что выразилось в снижении примерно в 3 раза содержания уксусной кислоты в реакционной среде. Клетки в биопленке активно размножались, к 600 часам работы образовалась довольно массивная биопленка, которая начала активно потреблять не только субстрат, но и продукты реакции, и система стабилизировалась.

Таким образом, было показано, что высокая скорость разложения ацетонитрила сохраняется в течение длительного времени. Это связано как с высокой каталитической активностью *R. ruber* gt 1, так и с массивностью выращенной биопленки, которая образуется в основном клетками *Al. faecalis* 2.

На микрофотографии базальтового волокна, снятого после окончания работы биофильтра, можно видеть массивную биопленку толщиной до 5 мкм, которая покрывает большую часть поверхности волокна (рис. 42). Двувидовая биопленка образована, главным образом, полисахаридным матриксом *Al. faecalis* 2. Как было показано в Главе 3, этот штамм синтезирует массивный полисахаридный матрикс и, соответственно, обладает высокой способностью к формированию биопленки.

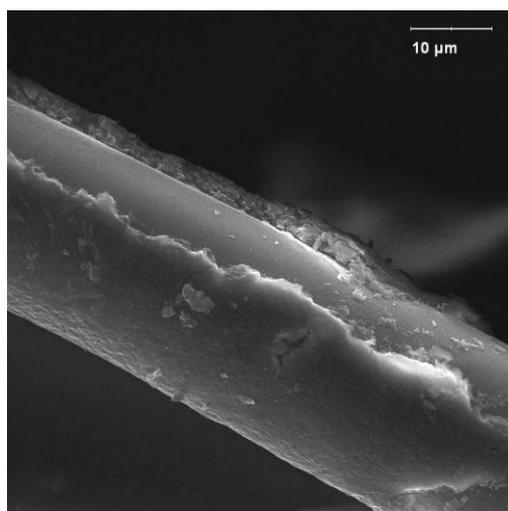


Рисунок 42 – Микрофотография двувидовой биопленки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм.

В аналогичном эксперименте по трансформации акрилонитрила биопленками, выращенными на базальтовом волокне диаметром 22 мкм, продукты реакции (акриламид и акриловая кислота) в реакционной среде не обнаружены (рис. 43). Это может быть связано с быстрым потреблением получаемого акриламида за счет штамма *Al. faecalis* 2, клетки которого преобладают в биопленке. В то же время двувидовая биопленка эффективно трансформировала акрилонитрил в течение 1144 часов работы (среднее содержание акрилонитрила до увеличения концентрации составляло 39,4 г/л), после чего концентрация акрилонитрила в системе начала увеличиваться (до 262 г/л). Биокатализатор перестал справляться с количеством акрилонитрила, поступающего в реакционную среду.

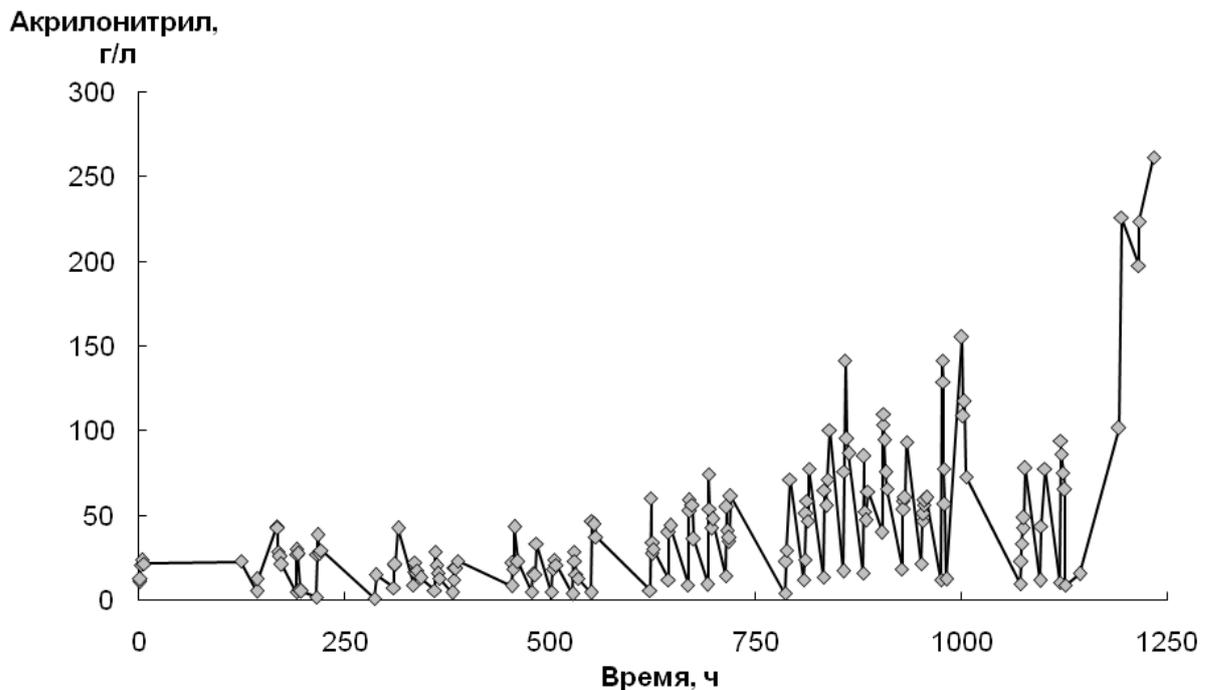


Рисунок 43 – Трансформация акрилонитрила биопленкой двувидовой культуры, выращенной на базальтовом волокне диаметром 22 мкм, в системе реактора погружного типа.

4.3.2. Трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками, выращенными на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм

При использовании базальтовых волокон меньшего диаметра (4–12 мкм) в качестве носителя трансформация ацетонитрила биопленками нитрилгидролизующих бактерий осуществлялась аналогично. В течение всего эксперимента (2527 часов) сохранялась высокая скорость трансформации ацетонитрила в ацетамид (рис. 44). Более того, ацетамид не накапливался в среде (концентрация ацетамида в среднем составляла 3 г/л в течение всего эксперимента), а сразу превращался в уксусную кислоту.

Также во время эксперимента наблюдался рост не только концентрации уксусной кислоты в реакционной среде, как в предыдущем эксперименте, но и ацетонитрила до 651 г/л и 639 г/л соответственно. В то же время наблюдалось небольшое увеличение содержания ацетамида в среде до концентрации 19 г/л. За 200 часов работы биофильтра биокатализатор справился с высокими концентрациями нитрила и кислоты, как и в предыдущем эксперименте. Подобная адаптация может быть связана с размножением клеток биопленки и накоплением достаточной биомассы, способной переработать поступающий субстрат.

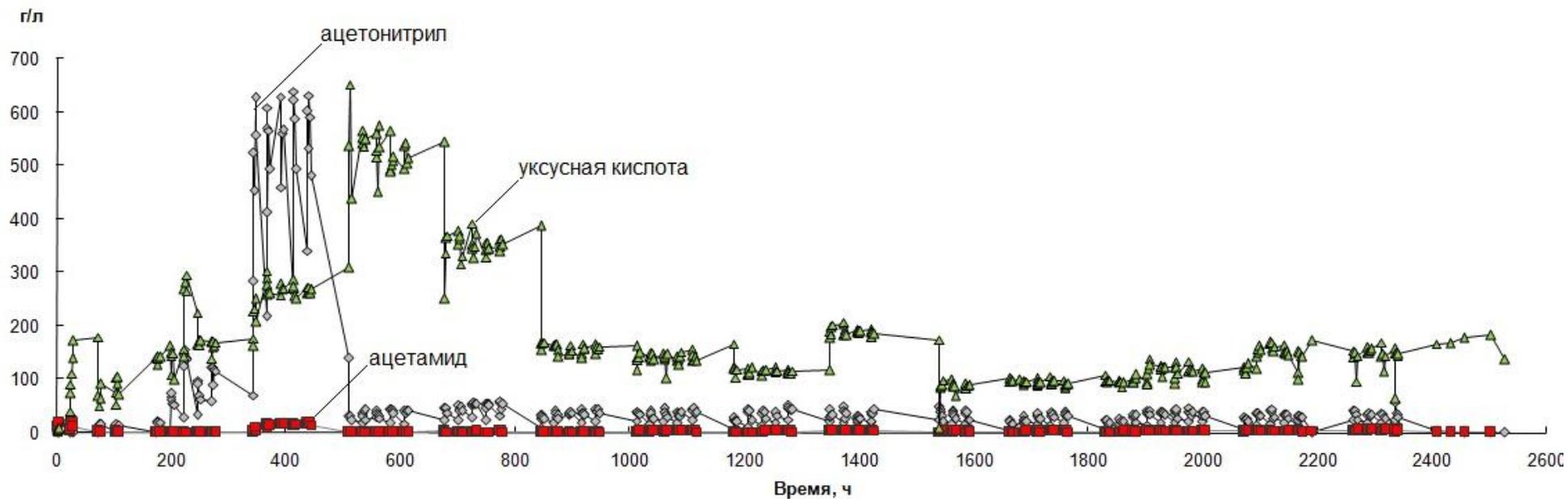


Рисунок 44 – Трансформация ацетонитрила биопленкой смешанной культуры, выращенной на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм, в системе реактора погружного типа с накоплением ацетамида и уксусной кислоты.

В случае трансформации акрилонитрила четкой картины, как при трансформации ацетонитрила, не наблюдается. Биофильтр работал в течение 968 ч и все это время поддерживал концентрацию акрилонитрила на довольно низком уровне (от 0 до 35 г/л, среднее значение 13,7 г/л) (рис. 45). Продукты реакции, как и при использовании базальтового волокна диаметром 22 мкм, не обнаружены.

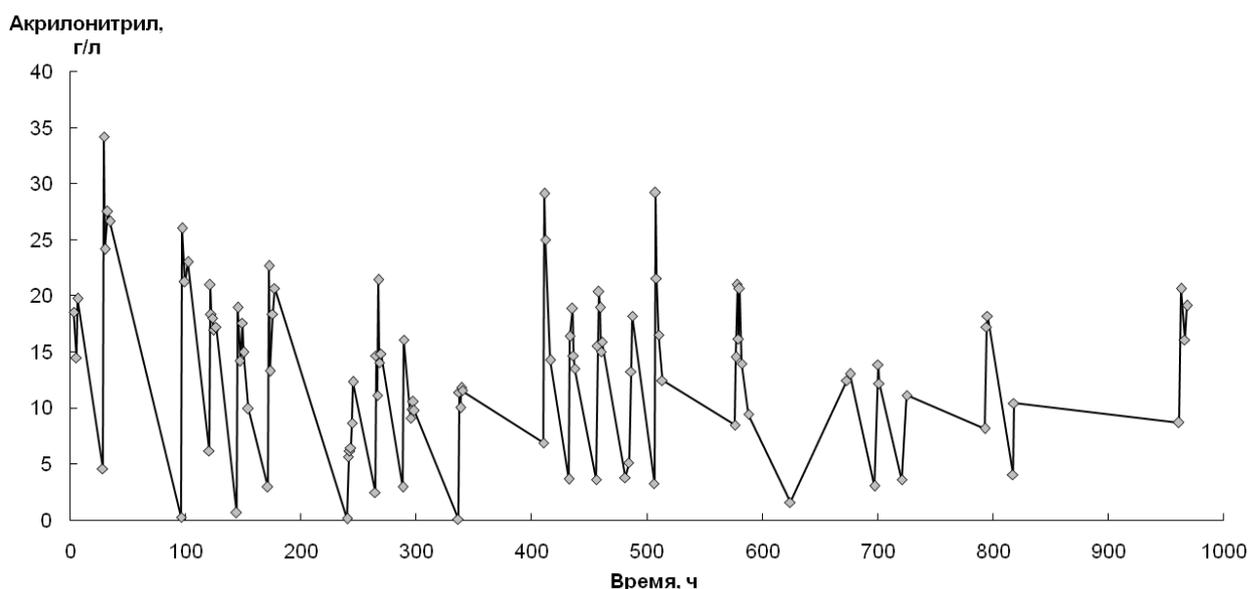


Рисунок 45 – Трансформация акрилонитрила био пленкой смешанной культуры, выращенной на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм, в системе реактора погружного типа.

Трансформация акрилонитрила двувидовой био пленкой на волокне диаметром 4–12 мкм была более эффективной, чем на волокне 22 мкм, что может быть связано с большей площадью поверхности волокон в равном объеме биореактора и, следовательно, с большим объемом биомассы.

4.3.3. Трансформация акрило- и ацетонитрила био пленками, выращенными на углеродном волокне

Клетки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 имеют разные значения гидрофобности поверхности клетки и, соответственно, разные адгезионные способности к различным носителям. *Al. faecalis* 2 хорошо образует

био пленку на любых носителях, в том числе на базальтовых волокнах различного диаметра (рис. 46), *R. ruber* gt 1 – на углеродных. Углеродное волокно имеет более высокую степень гидрофобности поверхности, чем базальтовое волокно, и, следовательно, является более предпочтительным для образования био пленок родококка, имеющего гидрофобную клеточную стенку.

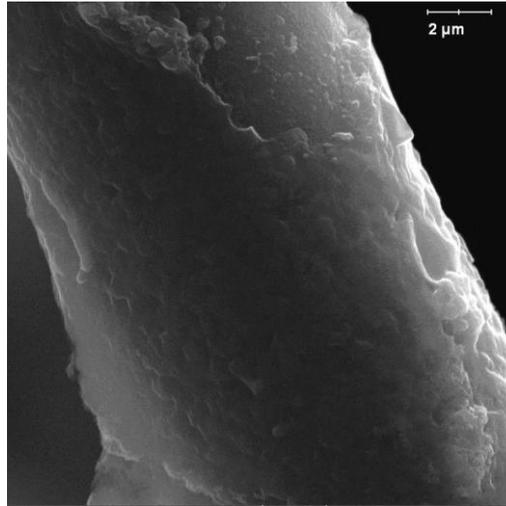


Рисунок 46– Микрофотографии базальтового волокна диаметром 4–12 мкм с двувидовой био пленкой *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 на поверхности.

Метагеномный анализ образцов двувидовых био пленок, выращенных на разных носителях, показал присутствие 81,69% *Al. faecalis* 2 и 0,36% *R. ruber* gt 1 на базальтовом волокне диаметром 22 мкм, 40,90% *R. ruber* gt 1 и 43,64% *Al. faecalis* 2 на базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм, и 73,71% *R. ruber* gt 1 и 25,67% *Al. faecalis* 2 на углеродном волокне Карбопон-В-актив (рис. 47). На микрофотографиях видно, что *R. ruber* gt 1 образует монослойную био пленку на углеродном волокне, в которой отчетливо видны отдельные клетки (рис. 48).

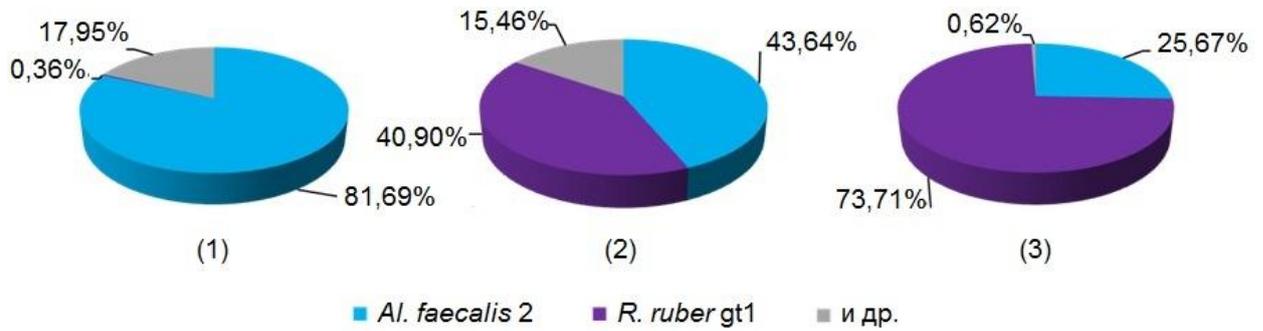


Рисунок 47 – Метагеномный анализ двувидовых биопленок, выращенных на базальтовом волокне диаметром 22 мкм (1), базальтовом волокне диаметром 4–12 мкм (2) и углеродном волокне Карбопон-В-актив (3).

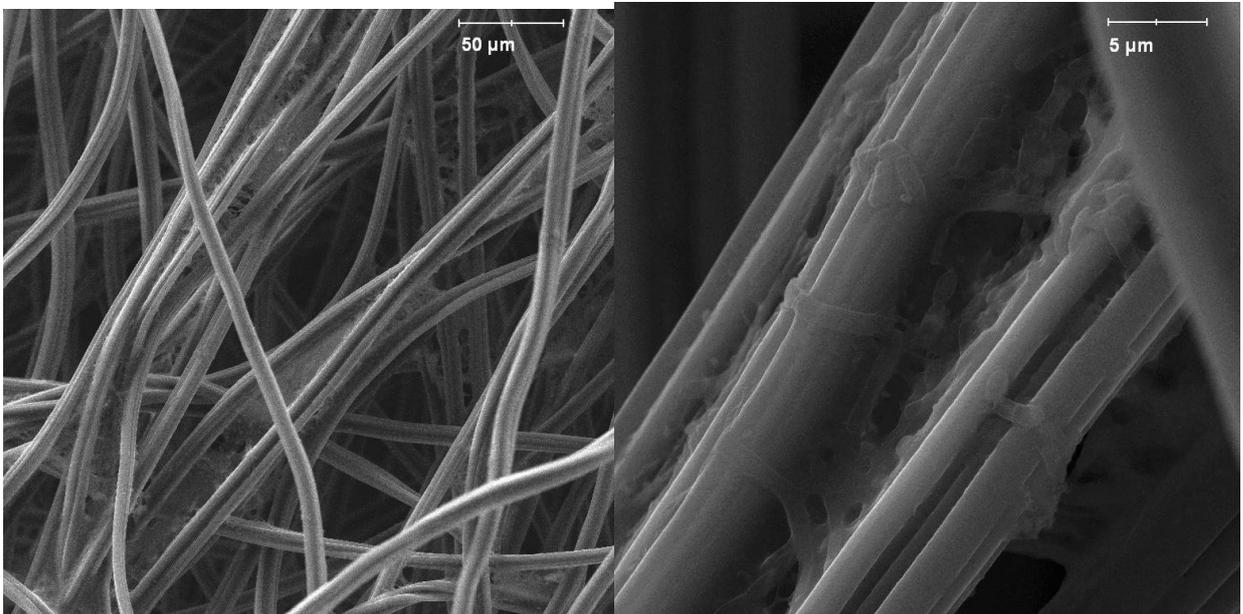


Рисунок 48 – Микрофотографии углеродного волокна с биопленкой *R. ruber gt 1* на поверхности.

Анализ данных показал, что концентрация как нитрила, так и амида на протяжении всего эксперимента с использованием биопленок, выращенных на Карбопоне-В-актив, не превышает 60 г/л (рис. 49). Уксусная кислота накапливается в среде до максимальной концентрации 326 г/л за 500–600 ч работы биофильтра, что соответствует данным, полученным в первом эксперименте при использовании в качестве носителя базальтового волокна диаметром 22 мкм. Можно предположить, что кислота будет накапливаться

до определенного момента, а затем ее концентрация начнет уменьшаться, как в предыдущих экспериментах с базальтовым волокном, поскольку по степени потребления субстрата можно сделать вывод, что биокатализатор будет эффективно работать в течение длительного времени.

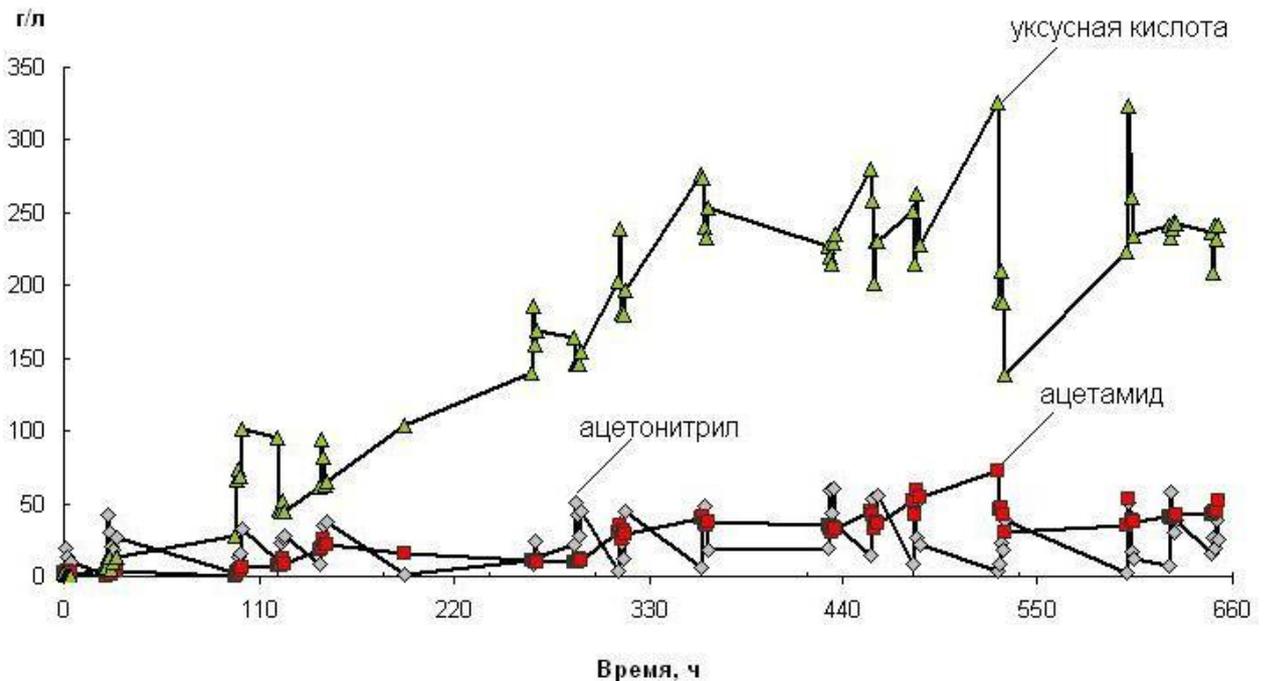


Рисунок 49 – Трансформация ацетонитрила (1) биопленкой смешанной культуры, выращенной на углеродном волокне Карбопон-В-актив, в системе реактора погружного типа с накоплением ацетамида (2) и уксусной кислоты (3).

При внесении в систему биофильтра акрилонитрила биокатализатор на основе двувидовой биопленки, выращенной на углеродном носителе, также трансформировал субстрат до амида с довольно высокой скоростью течение длительного времени (1010 ч) (рис. 50). При этом 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.

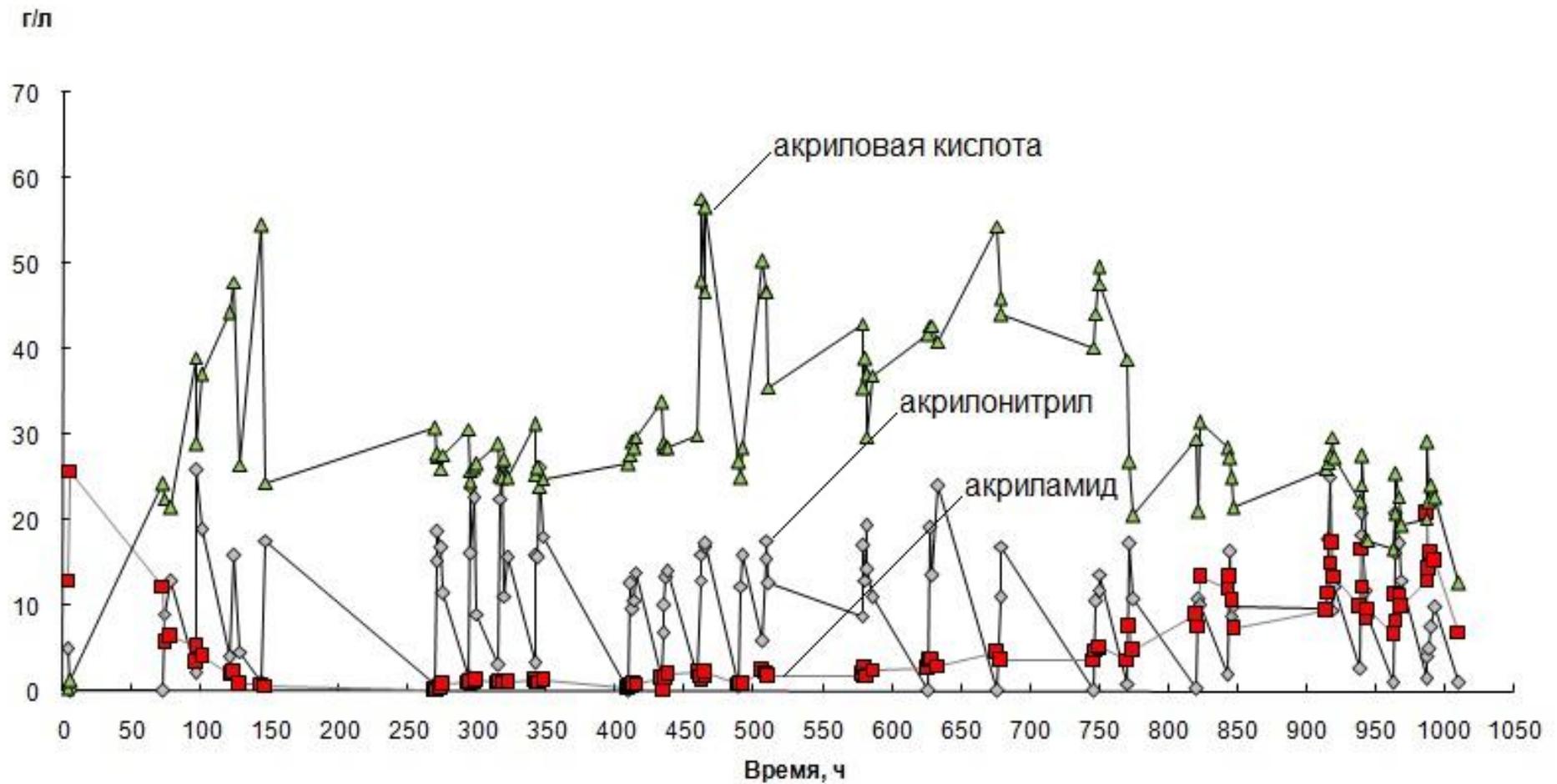


Рисунок 50 – Трансформация акрилонитрила биопленкой смешанной культуры, выращенной на углеродном волокне Карбопон-В-актив, в системе реактора погружного типа с накоплением акриламида и акриловой кислоты.

Низкое содержание субстрата в реакционной среде может быть связано с высокой адсорбционной способностью углеродного волокна. Определенное количество акрилонитрила адсорбируется на поверхности носителя без биопленки и постепенно трансформируется бактериями без накопления в реакционной среде до высоких концентраций. Содержание продуктов реакции также поддерживается на достаточно низком уровне.

4.3.4. Трансформация акрило- и ацетонитрила биопленками, выращенными на базальтовом и углеродном волокне в реакторе типа «сэндвич»

Штамм *Al. faecalis* 2 образует массивную биопленку практически на любых носителях, поскольку имеет промежуточное значение гидрофобности поверхности клеточной стенки, которое составляет 18,5% по МАН-тесту (Максимова и др., 2019). На фотографии биопленки *Al. faecalis* 2 на базальтовом волокне диаметром 22 мкм можно наблюдать массивную полимерную матрицу, в которую включены клетки биопленки, образованной между волокнами носителя (рис. 51).

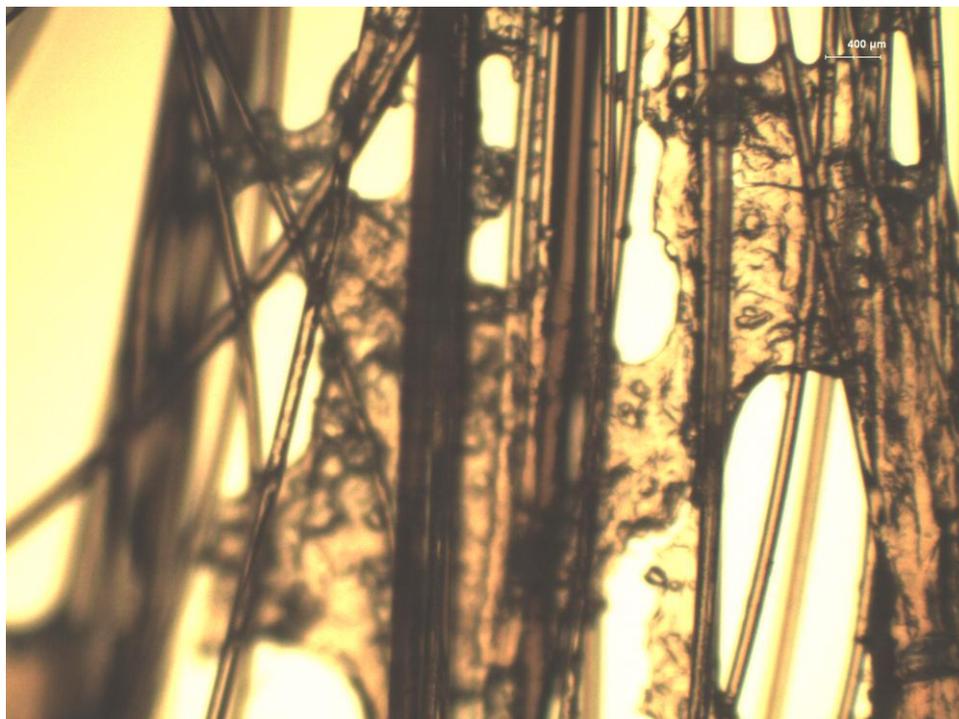


Рисунок 51 – Микрофотография биопленки *Al. faecalis* 2 на поверхности базальтового волокна диаметром 22 мкм.

R. ruber gt 1, как отмечалось ранее, имеет более гидрофобную поверхность клеточной стенки (52,5% по МАН-тесту) и лучше растет на гидрофобных поверхностях, в частности на углеродных носителях (Максимова и др., 2019). Поэтому целью следующей серии экспериментов явилось превращение акрило- и ацетонитрила в системе биофильтра на основе уложенных слоями гетерогенных биокатализаторов двух типов: монопленок *Al. faecalis* 2, выращенных на 4–12 мкм базальтовом волокне, и монопленок *R. ruber* gt 1, выращенных на углеродных волокнах.

В предыдущих экспериментах большая часть биопленки была образована клетками *Al. faecalis* 2, а *R. ruber* gt 1 присутствовал в системе как вторичный колонизатор. Однако это не оказало существенного влияния на общую работу биофильтра, поскольку *R. ruber* gt 1 проявляет высокую нитрилгидратазную активность, которая выражается в высокой скорости трансформации субстрата, и даже небольшого количества клеток этого штамма было достаточно для трансформации введенного количества нитрила. В случае смешанных носителей с монопленками *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 общее количество биопленки *Al. faecalis* 2 в процентном соотношении от общего объема двувидовых биопленок меньше, чем в предыдущих экспериментах, что влияет на превращение амида и кислоты и, как следствие, на общую стабильность биофильтра.

Анализ данных показал, что ацетамид присутствует в среде в среднем в концентрации 78 г/л, что значительно превышает значения, полученные в экспериментах с использованием базальтового волокна в качестве носителя (рис. 52).

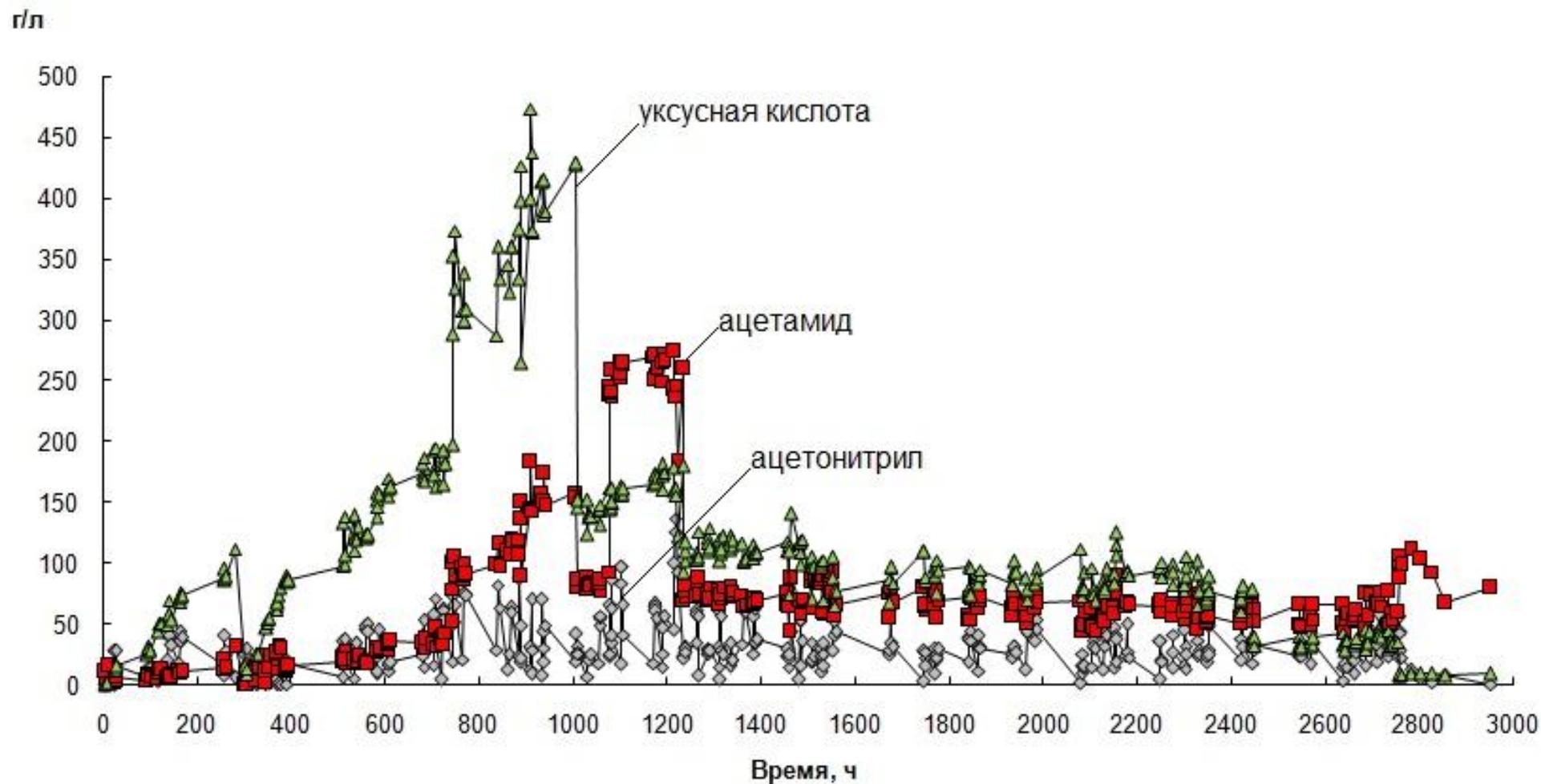


Рисунок 52 – Трансформация ацетонитрила биопленкой смешанной культуры, выращенной на базальтовом и углеродном волокне, в биофильтре типа «сэндвич» с накоплением ацетамида и уксусной кислоты.

В опытах с базальтовым волокном концентрация накопленной кислоты (351–651 г/л) резко снижалась в среднем в 3–7 раз. В эксперименте с использованием смешанного носителя уксусная кислота, накопленная до концентрации 325 г/л, постепенно уменьшается, но, тем не менее, достаточное ее количество остается в реакторе. Однако относительно высокая концентрация уксусной кислоты на выходе из биофильтра не представляет серьезной угрозы, поскольку уксусная кислота является распространенным субстратом для микроорганизмов и будет использоваться представителями нативной микрофлоры водоема или микроорганизмами активного ила, в случае если подобный биофильтр будет сконструирован для очистки стоков специализированных предприятий и объединен с системой аэротенка.

Трансформация акрилонитрила в системе биофильтра на основе смешанного носителя также эффективна в течение всего срока службы биофильтра (рис. 53). Однако в реакционной среде накапливался акриламид, а не кислота, как во всех предыдущих экспериментах, что могло быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, общий процент биопленки *Al. faecalis* 2 уменьшился по сравнению с экспериментами, в которых использовались другие носители, и этого количества клеток оказалось недостаточно для трансформации всего объема акриламида, продуцируемого клетками *R. ruber* gt 1. Во-вторых, *R. ruber* gt 1 трансформирует акрилонитрил также эффективно, как ацетонитрил, но акриламид является более сложным субстратом, чем ацетамид для *Al. faecalis* 2 (Максимова и др., 2018). Поэтому клетки *Al. faecalis* 2 немедленно используют акриловую кислоту, трансформированную из акриламида, для дальнейшего роста, и прекращают трансформировать оставшийся в среде амид.

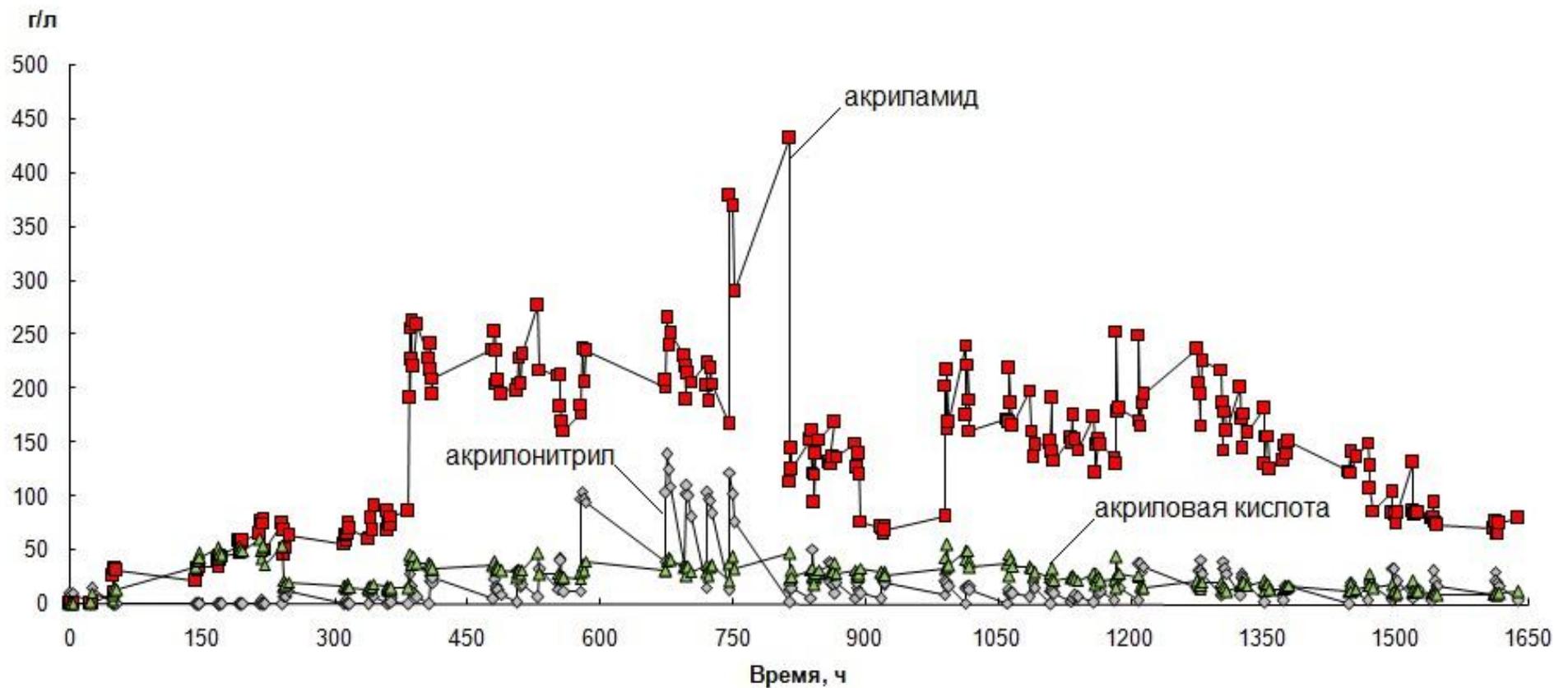


Рисунок 53 – Трансформация акрилонитрила биопленкой смешанной культуры, выращенной на базальтовом и углеродном волокне, в биофилтре типа «сэндвич» с накоплением акриламида и акриловой кислоты.

Таким образом, анализ данных показал, что в начале работы биофильтра 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 непереработанного субстрата наблюдается адаптация системы к 600–1000 часам работы биофильтра, что выражается в полной минерализации субстрата, вносимого ежедневно, а также в снижении количества кислоты. При использовании базальтового волокна в качестве носителя во время трансформации акрилонитрила в среде практически отсутствовали продукты трансформации (акриламид и акриловая кислота). Данные метагеномного анализа показали устойчивость двувидовых биопленок *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 к вымыванию из биофильтра и к конкурентному росту в открытой системе. 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. 2). Эффективность деградации акрилонитрила биопленками, выращенными на углеродном волокне, связана с его высокой адсорбционной емкостью. Как было отмечено ранее, акрилонитрил способен адсорбироваться на поверхности носителя без биопленки и будет постепенно трансформироваться бактериями без накопления в реакционной среде до высоких концентраций. Эффективность деградации ацетонитрила биопленками, выращенными на базальтовом волокне 4–12 мкм, объясняется большой площадью поверхности волокон в объеме биореактора и, следовательно, большим объемом биомассы.

Таблица 2. Эффективность деградации нитрила в биопленочном реакторе погружного типа

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы большое внимание уделяется нитрилутилизующим бактериям, поскольку они обладают ферментами гидролиза нитрилов, характеризующимися высокой удельной активностью, стабильностью, хемо- и энантиоселективностью. При использовании этих бактерий в качестве биокатализаторов возможно получать ценные вещества. К примерам применения в промышленности микробных клеток, обладающих ферментами метаболизма нитрилов, относится получение таких коммерчески значимых соединений, как акриловая, никотиновая и изоникотиновая, миндальная кислоты, 3-цианопиридин, акриламид, никотинамид и изоникотинамид (Глинский и др., 2010; Cantarella *et al.*, 2008, 2010, 2012; Banerjee *et al.*, 2006, 2009; Prasad *et al.*, 2007; Raj *et al.*, 2006; Полтавская и др., 2004; Malandra *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011, 2012; Дебабов, Яненко, 2011; Asano, 2002). Помимо получения полезных веществ нитрилгидролизующие бактерии используются также для трансформации соединений, к которым можно отнести различные нитрилы, в том числе акрилонитрил, бензонитрил и 3-цианопиридин (Kubáč *et al.*, 2006; Rustler *et al.*, 2007; Roach *et al.*, 2004; Максимова и др., 2011; Jyoti *et al.*, 2017; Mustacchi *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2007; Cantarella *et al.*, 2006).

Примеры использования биопленок нитрилгидролизующих бактерий не так обширны, как примеры использования суспензий, иммобилизованных ферментов и клеток. Однако ряд работ посвящен биофильтрам на основе микробных клеток, которые использовали для разложения нитрильных соединений до безвредных промежуточных соединений или, в конечном итоге, диоксида углерода и воды. Была показана эффективность разложения пропионитрила, ацетонитрила, акрилонитрила, цис- и транс-кродонитрила и других нитрилов из сточных вод в реакторах различной конфигурации (Chen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; An *et al.*, 2018). Изучению свойств и биокаталитического потенциала поливидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий посвящено мало работ.

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 *konA*-тетраметилпродаминол, 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. Эксперименты, проведенные ранее (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 полисахаридный каркас матрикса *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. В литературе встречаются сведения, что антибиотики в субингибиторных концентрациях стимулируют синтез полисахаридных компонентов внеклеточного полимерного матрикса (Плакунов и др., 2017). Известно, что *Al. faecalis* 2 продуцирует антибиотики, ингибирующие рост как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий (Zahir et al., 2013; Xu et al., 2015; Bahadou et al., 2018). Сигнальные молекулы системы кворум-сенсинга, обозначаемые как аутоиндуктор 2, также важны для формирования структурированной биопленки, особенно в мультивидовых сообществах природной среды (Li et al., 2012). Кроме того, диффундируемый сигнальный фактор идентифицируется у множества видов и, по-видимому, также опосредует межвидовые взаимодействия в мультивидовых биопленках. Механизмы, лежащие в основе кооперации, разнообразны, и включают изменение состава внеклеточного матрикса (Elias et al., 2012). Увеличение экскреции внеклеточных полимеров может быть конкурентным ответом на сосуществование видов в мультивидовой биопленке (Ren, 2014). Однако 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 длительное хранение в условиях отсутствия питательного

субстрата, отклонение температуры от оптимума, высушивание и длительное воздействие токсичного субстрата, а сама биопленка смешанной культуры более стабильна, чем моноплёнки соответствующих культур. Выяснено, что клетки в смешанной культуре *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 более жизнеспособны и выживают в присутствии токсичного субстрата (ацетонитрила) в концентрации 497,8 г/л. При этом в смешанной культуре наблюдалось увеличение количества АТФ, что, возможно, связано с нитрилгидратазной активностью *R. ruber* gt 1. При нагревании в течение 2 часов при 50°C количество жизнеспособных клеток в моноплёнках *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 значительно снижается. В двувидовой биопленке также обнаруживается снижение количества жизнеспособных клеток, которое, однако, остается больше, чем в моноплёнках. Оценка биопленок моно- и смешанной культур при хранении в физиологическом растворе в течение 5 дней в условиях отсутствия питательного субстрата показала, что общее количество клеток, доля жизнеспособных клеток и массивность полисахаридного каркаса матрикса в биопленках *R. ruber* gt 1 и смешанной культуры визуально не изменилась по сравнению с соответствующими биопленками в благоприятных условиях. Что касается культуры *Al. faecalis* 2, то в условиях голодания как таковой биопленки не обнаруживается. Большая часть клеток переходит в планктонное состояние, а на поверхности стекла остаются небольшие части биопленки с жизнеспособными клетками и большая часть полисахаридного каркаса матрикса. Из литературных данных известно, что на миграцию клеток из зрелой биопленки влияют различные параметры: как внутренние взаимодействия (типа чувства кворума), так и внешние воздействия окружающей среды, в том числе отсутствие питательного субстрата (Paul *et al.*, 2012; Desmond *et al.*, 2018; Solano *et al.*, 2014; Walter *et al.*, 2013). Все эти факторы запускают механизм дисперсии для перемещения бактерий в места с благоприятными условиями окружающей среды и их колонизации. Следовательно, условия голодания усиливают дисперсию биопленки алкалигенесов, но не приводят к гибели

клеток биопленки. При высушивании на открытом воздухе в течение двух суток количество жизнеспособных клеток в монопленках *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 и в двувидовой биопленке снижается по сравнению с количеством жизнеспособных клеток в оптимальных условиях. Однако при этом в двувидовой биопленке, в отличие от монопленок, остается большее количество жизнеспособных клеток.

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 мкм, базальтовом волокне 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 укладывали 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 непереработанного 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 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 ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Белобородова, Н.В. Микробные биопленки / Н.В. Белобородова, И.Т. Байрамов // Пятая ежегодная Московская конференция «Гнойно-септические заболевания у детей», тезисы докладов. – Москва: Изд-во ДГКБ №13 им. Н.Ф. Филатова, 2009. – С. 7–39.
- 2.Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков – М.: КолосС, 2004. – 227 с.
- 3.Васильев, Д.М. Динамика трансформации 3-цианопиридина иммобилизованными и свободными клетками *Rhodococcus ruber* GT1 / Д.М. Васильев, Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – №4/1 (38). – С. 191–192.
4. Вдовина, Т.В. Биоаугментация нитрифицирующих микроорганизмов для повышения эффективности окисления соединений азота в процессе биофльтрации сточных вод / Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин, Й.В. Кобелева, Е.С. Горшкова // Биотехнология. – 2020. – Т. 36. – № 2. – С. 99–107.
- 5.Глинский, С.А. Сравнительный анализ штаммов, используемых в процессе получения акрилата аммония / С.А. Глинский, С.В. Козулин, Т.Н. Козулина, С.В. Полтавская, А.С. Яненко, Т.Е. Леонова // Биотехнология. – 2010. – № 1. – С. 17–24.
- 6.Грушко, Я.М. Вредные органические соединения в промышленных сточных водах: справочник. – 2-е изд., перераб. и доп. / Я.М. Грушко – Л.: Химия, 1982. –216 с.
- 7.Дебабов, В.Г. Биокаталитический гидролиз нитрилов / В.Г. Дебабов, А.С. Яненко // Обзорный журнал по химии. – 2011. – Т. 1. – № 4. – С. 376–394.
- 8.Демаков, В.А. Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот / В.А. Демаков, Д.М. Васильев, Ю.Г.

- Максимова, Ю.А. Павлова, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 3. – С. 369–378.
9. Демаков, В.А. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты / В.А. Демаков, Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов // Биотехнология. – 2008. – №2. – С. 30–45.
10. Ефременко, Е.Н. Определение билюминесцентным методом минимальных ингибирующих концентраций веществ по отношению к бактериям, участвующим в биокоррозии / Е.Н. Ефременко, Р.Э. Азизов, Т.А. Махлис, В.М. Аббасов, С.Д. Варфоломеев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41 – № 4. – С. 429–434.
11. Зорина, А.С. Биопленкообразование моно- и смешанных культур штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 / А.С. Зорина, Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 2. – С. 164–171.
12. Кирилина, Т.В. Пространственное распределение азоттрансформирующих микроорганизмов в процессе биофильтрации сточных вод / Т.В. Кирилина, А.С. Сироткин, М. Денеке // Вода: химия и экология. – 2012. – № 5. – С. 60–65.
13. Кузнецов, А.Е. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие. – 2-е изд. / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова, С.В. Лушников, М. Энгельхарт, Т. Вайссер, М.В. Чеботаева – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. Т.1. 2012. – 629 с.
14. Максимов, А.Ю. Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus sp.* gt 1 / А.Ю. Максимов, М.В. Кузнецова, Г.В. Овечкина, С.В. Козлов, Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39. – №1. – С. 63–68.
15. Максимов, А.Ю. Иммобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью / А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова, М.В. Кузнецова, В.Ф.

- Олонцев, В.А. Демаков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – №43 (2). – С. 193–198.
16. Максимов, А.Ю. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилутилизирующих бактерий *Rhodococcus ruber* gt1 и *Pseudomonas fluorescens* C2, иммобилизованными в структуре геля агарозы / А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». – 2009. – №10 (36). – С. 115–118.
17. Максимова, Ю.Г. Трансформация нитрилов иммобилизованными клетками актинобактерий рода *Rhodococcus* / Ю.Г. Максимова // Приложение к журналу «Известия национальной академии наук Белоруссии», часть 1. Серия биологических наук, серия медицинских наук. – 2008. – С. 170–173.
18. Максимова, Ю.Г. Иммобилизованные нерастущие клетки *Rhodococcus ruber* как гетерогенные биокатализаторы для процесса гидратации акрилонитрила в акриламид / Ю.Г. Максимова, Г.А. Коваленко, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков, Т.В. Чуенко, Н.А. Рудина // Катализ в промышленности. – 2008. – № 1. – С. 44–50.
19. Максимова, Ю.Г. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах / Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков, С.В. Козлов, Г.В. Овечкина, В.Ф. Олонцев // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 51–58.
20. Максимова, Ю.Г. Биокаталитический синтез акриловой кислоты клетками *Pseudomonas fluorescens* C2, иммобилизованными на каолине / Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков, Г.В. Овечкина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2011. – Т.7. – №2. С. 5–10.
21. Максимова, Ю.Г. Биокаталитическая трансформация 3-цианопиридина иммобилизованными и суспендированными клетками нитрилутилизирующих бактерий / Ю.Г. Максимова, Д.М. Васильев,

- Г.В. Овечкина, В.А. Демаков // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2012. – № 8 (2). – С. 54–58.
22. Максимова, Ю.Г. Трансформация 2- и 4-цианопиридинов свободными и иммобилизованными клетками нитрилгидролизующих бактерий / Ю.Г. Максимова, Д.М. Васильев, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – № 49 (4). – С. 358–363.
23. Максимова, Ю.Г. Микробные биопленки в биотехнологических процессах / Ю.Г. Максимова // Биотехнология. – 2013. – № 4. – С. 9–23.
24. Максимова, Ю.Г. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью / Ю.Г. Максимова, А.Н. Горбунова, А.С. Зорина, А.Ю. Максимов, Г.В. Овечкина, В.А. Демаков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – № 51 (1). – С. 53–58.
25. Максимова, Ю.Г. Биопленки нитрилгидролизующих бактерий: динамика роста, устойчивость к токсичным веществам и биотехнологический потенциал / Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков // Биотехнология. – 2016. – № 4. – С. 39–51.
26. Максимова, Ю.Г. Гетерогенный биокатализатор на основе клеток нитрилгидролизующих бактерий и многослойных углеродных нанотрубок для трансформации нитрилов и амидов / Ю.Г. Максимова, С.М. Никулин, Б.М. Осовецкий, В.А. Демаков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – № 53 (5). – С. 462–469.
27. Максимова, Ю.Г. Стереоселективная биотрансформация фенилглициннитрила гетерогенным биокатализатором на основе иммобилизованных бактериальных клеток и ферментного препарата / Ю.Г. Максимова, А.Н. Горбунова, В.А. Демаков // Доклады академии наук. – 2017. – № 474 (2). – С. 248–250.

28. Максимова, Ю.Г. Биодegradация акриламида и акриловой кислоты планктонными клетками и биопленками *Alcaligenes faecalis* 2 / Ю.Г. Максимова, Д.М. Васильев, А.С. Зорина, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – № 2. – С. 117–124.
29. Максимова, Ю.Г. Имобилизованные клетки микроорганизмов в процессах трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот / Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков – Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. Под ред. д-ра биол. наук, профессора Ефременко Е.Н. – М.: РИОР, 2018. – С. 385–402.
30. Максимова, Ю.Г. Адгезия бактериальных клеток на углеродных носителях: характеристики процесса и применение в биотехнологии / Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков // Вестник ПФИЦ. – 2019. – № 3. – С. 86–93.
31. Марданова, А.М. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие / А.М. Марданова с соавт. – Казань: К(П)ФУ, 2016. – 42 с.
32. Нестеренко, О.А. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии / О.А. Нестеренко, Е.И. Квасников, Т.М. Ногина. – Киев: Наукова думка, 1985. – 336 с.
33. Нетрусов, А.И. Микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 352 с.
34. Ножевникова, А. Н. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии / А.Н. Ножевникова, Е.А. Бочкова, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 6. – С. 623–644.
35. Полтавская, С.В. Разработка и внедрение биокаталитического способа получения акриловой кислоты. I выделение штамма *Alcaligenes denitrificans*, трансформирующего акрилонитрил в акрилат аммония. Оптимизация среды культивирования. / С.В. Полтавская, Т.Н.

- Козулина, И.Н. Сингирцев, С.В. Козулин // Биотехнология. – 2004. – № 1. – С. 62–70.
36. Плаунов, В.К. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод / В.К. Плаунов, Ю.А. Николаев // Вода: химия и экология. – 2008. – №2. – С. 11–13.
37. Плаунов, В.К. Управление формированием микробных биопленок: Анти- и пробиопленочные агенты / В.К. Плаунов, С.В. Мартьянов, Н.А. Тетенева, М.В. Журина // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 4. – С. 402–420.
38. Серебренникова, М.К. Консорциум иммобилизованных родококков для очистки нефтепромысловой воды в колоночном биореакторе / М.К. Серебренникова, Е.Э. Головина, М.С. Куюкина, И.Б. Ившина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 4. – С. 380–386.
39. Abdallah, M. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments / M. Abdallah, C. Benoliel, D. Drider, P. Dhulster, N.E. Chihib // Archives of Microbiology. – 2014. – V. 196. – № 7. – P. 453–472.
40. Abdel-Nour, M. Biofilms: The stronghold of *Legionella pneumophila* / M. Abdel-Nour, C. Duncan, D. Low, C. Guyard // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – V. 14. – № 11. – P. 21660–21675.
41. Achanzar, W.E. Acrylonitrile / W.E. Achanzar, R.S. Mangipudy. – In: Wexler P. (Eds.), Encyclopedia of Toxicology. 3rd ed. Vol 1, Elsevier Inc., Academic Press, 2014. – P. 76–78.
42. Alonso, F.O.M. Enantiomerically pure D-phenylglycine production using immobilized *Pseudomonas aeruginosa* 10145 in calcium alginate beads / F.O.M. Alonso, O.A.C. Antunes, E.G. Oestreicher // Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2007. – 18 (3). P. 566–571.
43. An, X. Treating organic cyanide-containing groundwater by immobilization of a nitrile-degrading bacterium with a biofilm-forming bacterium using

- fluidized bed reactors / X. An, Y. Cheng, M. Huang, Y. Sun, H. Wang, X. Chen, J. Wang, D. Li, C. Li // *Environmental Pollution*. – 2018. – V. 237. – P. 908–916.
44. Annunziata, M. Bacterial adhesion to direct laser metal formed and mildly acid etched implant surfaces / M. Annunziata, A. Rizzo, C. Leone, C. Mangano, N. Mazzola, L. Natri, F. Papale, F. Rullo, L. Guida // *Surface & coatings technology*. – 2017. – № 328. – P. 390–397.
45. Asano, Y. Hydrolysis and reverse hydrolysis: selective nitrile hydrolysis using, nitrilase and its related enzymes / Y. Asano, P. Kaul // *Comprehensive Chirality*. – 2012. – V. 7. – P. 122–142.
46. Asano, Y. Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis – selection and optimization of biocatalysts / Y. Asano // *Journal of Biotechnology*. – 2002. – V. 94. – P. 65–72.
47. Badoei-Dalfard, A. Production and characterization of a nitrilase from *Pseudomonas aeruginosa* RZ44 and its potential for nitrile biotransformation / A. Badoei-Dalfard, N. Ramezani-pour, Z. Karami // *Iran J. Biotech*. 2016. V. 14(3): e1179.
48. Bala Subramanian, S. Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering / S. Bala Subramanian, S. Yan, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli // *Water research*. – 2010. – V. 44. – P. 2253–2266.
49. Bahadou, S.A. New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco / S.A. Bahadou, A. Oujija, A. Karfach, A. Tahiri, R. Lahlali // *Microbial Pathogenesis*. – 2018. – №. 117. – P. 7–15.
50. Banerjee, A. Enhancing the catalytic potential of nitrilase from *Pseudomonas putida* for stereoselective nitrile hydrolysis / A. Banerjee, P. Kaul, U.C. Banerjee // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – №. 72. – P. 77–87.

51. Banerjee, A. Enantioselective nitrilase from *Pseudomonas putida*: cloning, heterologous expression, and bioreactor studies / A. Banerjee, S. Dubey, P. Kaul, B. Barse, M. Piotrowski, U.C. Banerjee // *Molecular Biotechnology*. – 2008. – V. 41. – P. 35–41.
52. Barraud, N. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* / N. Barraud, D.J. Hassett, S.H. Hwang, S.A. Rice, S. Kjelleberg, J.S. Webb // *Journal of bacteriology*. – 2006. – V. 188. – № 21. – P. 7344–7353.
53. Barwal, A. To study the performance of biocarriers in moving bed biofilm reactor (MBBR) technology and kinetics of biofilm for retrofitting the existing aerobic treatment systems: a review / A. Barwal, R. Chaudhary // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2014. – V. 13. – № 3. – P. 285–299.
54. Basu, D. Biodegradation of 1,1,2,2-tetrachloroethane in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor / D. Basu, S.K. Gupta // *Bioresource Technology*. – 2010. – V. 101. – № 1. – P. 21–25.
55. Beloin, C. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression / C. Beloin, J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J.A.J. Haagensen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille, J.-M. Ghigo // *Molecular Microbiology*. – 2004. – V. 51. – № 3. – P. 659–674.
56. Berlanga, M. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications / M. Berlanga, R. Guerrero // *Microbial Cell Factories*. – 2016. – V. 15. № 1. – 27716327.
57. Bernardo, M. Production of hydroxamic acids by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: Kinetic analysis in reverse micelles / M. Bernardo, R. Pacheco, M.L.M. Serralheiro, A. Karmali // *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. – 2013. – № 93. – P. 28–33.

58. Berne, C. Bacterial adhesion at the single-cell level / C. Berne, C.K. Ellison, A. Ducret, Y.V. Brun // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – № 10. – P. 616–627.
59. Biswas, K. Successional development of biofilms in moving bed biofilm reactor (MBBR) systems treating municipal wastewater / K. Biswas, M.W. Taylor, S.J. Turner // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 98. – № 3. – P. 1429–1440.
60. Bjarnsholt, T. The role of bacterial biofilm / T. Bjarnsholt // *APMIS*. — 2013. — V. 121 – № 136. – P. 1–51.
61. Bohinc, K. Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity / K. Bohinc, G. Dražić, A. Abram, M. Jevšnik, B. Jeršek, D. Nipič, M. Kurinčič, P. Raspor // *International Journal of Adhesion & Adhesives*. – 2016. – № 68. – P. 39–46.
62. Bruinsma, G.M. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses / G.M. Bruinsma, H.C. Van der Mei, H.J. Busscher // *Biomaterials*. – 2001. – № 22. – P. 3217–3224.
63. Burmølle, M. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter / M. Burmølle, D. Ren, T. Bjarnshølt, S.J. Sorensen // *Trends in Microbiology*. – 2014. – V. 22. – № 2. – P. 84–91.
64. Busscher, H.J. Biofilm formation on dental restorative and implant materials / H.J. Busscher, M. Rinastiti, W. Siswomihardjo, H.C. van der Mei // *Journal of Dental Research*. – 2010. – V. 89. – № 7. – P. 657–665.
65. Caito, S. Acrylonitrile / S. Caito, L.G. Costa, L. Rongzhu, M. Aschner – In: M.J. Aminoff and R.B. Daroff (Eds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. 2nd ed. Vol 1, Elsevier Inc., Academic Press, 2014. – P. 33–35.
66. Calderón, K. Comparative analysis of the bacterial diversity in a lab-scale moving bed biofilm reactor (MBBR) applied to treat urban wastewater under different operational conditions / K. Calderón, J. Martín-Pascual, J.M. Poyatos, B. Rodelas, A. González-Martínez, J. González-López // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 121. – P. 119–126.

67. Cantarella, L. Application of continuous stirred membrane reactor to 3-cyanopyridine bioconversion using the nitrile hydratase–amidase cascade system of *M. imperiale* CBS 498-74 / L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Malandra, L. Martinkova, F. Pasquarelli, A. Spera, M. Cantarella // *Enzyme and Microbial Technology* – 2010. – V. 47. – P. 64–70.
68. Cantarella, M. Amidase-catalyzed production of nicotinic acid in batch and continuous stirred membrane reactors / M. Cantarella, L. Cantarella, A. Gallifuoco, R. Intellini, O. Kaplan, A. Spera, L. Martinkova // *Enzyme and Microbial Technology* – 2008. – V. 42. – P. 222–229.
69. Cantarella, M. Nicotinic acid bio-production by *Microbacterium imperiale* CBS 489-74: effect of 3-cyanopyridine and temperature on amidase activity / M. Cantarella, L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera, L. Martinkova // *Process Biochemistry*. – 2012. – V. 47. – P. 1192–1196.
70. Cantarella, M. Use of a UF-membrane reactor for controlling selectively the nitrile hydratase – amidase system in *Microbacterium imperial* CBS 498-74 resting cells Case study: Benzonitrile conversion / M. Cantarella, L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – V. 38. – P. 126–134.
71. Carniello, V. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth / V. Carniello, B.W. Peterson, H.C. van der Mei, H.J. Busscher // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2018. – 42 p.
72. Carrel, M. Biofilms in 3D porous media: Delineating the influence of the pore network geometry, flow and mass transfer on biofilm development / M. Carrel, V. L. Morales, M.A. Beltran, N. Derlon, R. Kaufmann, E. Morgenroth, M. Holzner // *Water Research*. – 2018. – V. 134. – P. 280–291.
73. Chen, C.Y. Biodegradation of propionitrile by *Klebsiella oxytoca* immobilized in alginate and cellulose triacetate gel / C.Y. Chen, S.C. Chen, M. Fingas, C.M. Kao // *Journal of Hazardous Materials*. – 2010. – V. 177. – P. 856–863.

74. Chen, D. Single- and mixed-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella, and their sensitivity to levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate / D. Chen, T. Zhao, M. P. Doyle // *Food Control*. – 2015. – № 57. – P. 48–53.
75. Chen, J. Biosynthesis of p-methoxyphenylacetic acid from p-methoxyphenylacetonitrile by immobilized *Bacillus subtilis* ZJB-063 / J. Chen, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen // *Process Biochemistry*. – 2008. – № 43. – P. 978–983.
76. Chen, J. Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides / J. Chen, R.C. Zheng, Y.G. Zheng, Y.C. Shen // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2009. – № 113. – P. 33–77.
77. Cherchi, C. Effect of growth stage on bacterial resistance to chlorine disinfection / C. Cherchi, A.Z. Gu // *Proceedings of the Water Environment Federation*. – 2010. – V. 11. – P. 5640–5649.
78. Crouzet, M. *Pseudomonas aeruginosa* cells attached to a surface display a typical proteome early as 20 minutes of incubation / M. Crouzet, S. Claverol, A.-M. Lomenech, C. Le Sénéchal, P. Costaglioli, C. Barthe, B. Garbay, M. Bonneu, S. Vilain // *PLOS ONE*. – 2017. – V. 12. – № 7. – e0180341.
79. D'Acunto, B. Mathematical modeling of dispersal phenomenon in biofilms / B. D'Acunto, L. Frunzo, I. Klapper, M.R. Mattei, P. Stoodley // *Mathematical biosciences*. – 2018. – P. 1–34.
80. Derchi, G. Bacterial adhesion on direct and indirect dental restorative composite resins: An in vitro study on a natural biofilm / G. Derchi, M. Vano, A. Barone, U. Covani, A. Diaspro, M. Salerno // *The Journal of Prosthetic Dentistry*. – 2017. – V. 117. – № 5. – P. 669–676.
81. Derlon, N. Growth limiting conditions and denitrification govern extent and frequency of volume detachment of biofilms / N. Derlon, C. Coufort-Saudejaud, I. Queinnec, E. Paul // *Chemical Engineering Journal*. – 2013. – V. 218. – P. 368–375.

- 82.Desmond, P. Stratification in the physical structure and cohesion of membrane biofilms — Implications for hydraulic resistance / P. Desmond, L. Bönic, P. Fischer, E. Morgenroth, N. Derlon // *Journal of Membrane Science*. – 2018. – V. 564 – P. 897–904.
- 83.Dufour, D. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance / D. Dufour, V. Leung, C.M. Levesque // *Endodontic Topics*. – 2012. – V. 22. – P. 2–16.
- 84.Eckardt, N.A. Some like it with nitriles: A nitrile-specifying protein linked to herbivore feeding behavior in *Arabidopsis* / N.A. Eckardt // *The Plant Cell*. – 2001. – V. 13. – P. 2565–2568.
- 85.Elbourne, A. Bacterial-nanostructure interactions: the role of cell elasticity and adhesion forces / A. Elbourne, J. Chapman, A. Gelmi, D. Cozzolino, R.J. Crawford, V. Khanh Truong // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2019. – V. 546. – P. 192–210.
- 86.Elias, S. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors / S. Elias, E. Banin // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2012. – №. 36. – P. 990–1004.
- 87.Ellison, C.K. Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing / C.K. Ellison, J. Kan, R.S. Dillard, D.T. Kysela, A. Ducret, C. Berne, C.M. Hampton, Z. Ke, E.R. Wright, N. Biais, A.B. Dalia, Y.V. Brun // *Science*. – 2017. – № 358. – P. 535–538.
- 88.Kinfe, H.H. Enantioselective hydrolysis of β -hydroxy nitriles using the whole cell biocatalyst *Rhodococcus rhodochrous* ATCC BAA-870 / H.H. Kinfe, V. Chhiba, J. Frederick, M.L. Bode, K. Mathiba, P.A. Steenkamp, D. Brady // *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. – 2009. – V. 59. – P. 231–236.
- 89.Krivoruchko, A. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies / A. Krivoruchko, M. Kuyukina, I. Ivshina // *Catalysts*. – 2019. – V. 9. – № 236. – 9030236.
- 90.Epstein, A.K. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration / A.K. Epstein, B. Pokroy, A. Seminara, J. Aizenberg //

- Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – V. 108. – № 3. – P. 995–1000.
91. Flemming, H.C. The biofilm matrix / H.C. Flemming, J. Wingender // Nature Reviews Microbiology. – 2010. – V. 8. – № 9. – P. 623–633.
92. Friedlander, R.S. Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion / R.S. Friedlander, H. Vlamakis, P. Kim, M. Khan, R. Kolter, J. Aizenberg // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – V. 110. – № 14. – P. 5624–5629.
93. Gao, D.W. Treatment of domestic wastewater by an integrated anaerobic fluidized-bed membrane bioreactor under moderate to low temperature conditions / D.W. Gao, Q. Hu, C. Yao, N.Q. Ren // Bioresource Technology. – 2014. – V. 159. – P. 193–198.
94. Graham, D. Nitrile biotransformations using free and immobilized cells of a thermophilic *Bacillus* spp. / D. Graham, R. Pereira, D. Barfield, D. Cowan // Enzyme and Microbial Technology. – 2000. – V. 26. – P. 368–373.
95. Guo, W.Q. Accelerated startup of biological hydrogen production process by addition of *Ethanoligenens harbinense* B49 in a biofilm-based column reactor / W.Q. Guo, N.Q. Ren, X.J. Wang, W.S. Xiang // International journal of hydrogen energy. – 2010. – V.35. – P. 13407–13412.
96. Guo, X.L. Immobilization of *Rhodococcus* sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of *trans*-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide / X.L. Guo, G. Deng, J. Xu, M.X. Wang // Enzyme and Microbial Technology. – 2006. – V. 39. – P. 1–5.
97. Gupta, N. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review / N. Gupta, Ch. Balomajumber, V.K. Agarwal // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – V. 176. – P. 1–13.
98. Halan, B. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses / B. Halan, K. Buehler, A. Schmid // Trends in Biotechnology. – 2012. – V. 30. – № 9. – P. 453–465.

99. Harimawan, A. Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) properties of *P. aeruginosa* and *B. subtilis* and their role in bacterial adhesion / A. Harimawan, Y.P. Ting // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2016. – V. 146. – P. 459–461.
100. Hassanpourfard, M. Protocol for biofilm streamer formation in a microfluidic device with micro-pillars / M. Hassanpourfard, X. Sun, A. Valiei, P.P. Mukherjee, T. Thundat, Y. Liu, A. Kumar // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014. – № 90. – 51732.
101. Heidari, A. A novel nitrile-degrading enzyme (nitrile hydratase) from *Ralstonia* sp. ZA96 isolated from oil-contaminated soils / A. Heidari, A. Asoodeh // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2019. – V. 21. – 101285.
102. Hindre, T. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation / T. Hindre, H. Bruggemann, C. Buchrieser, Y. Hechard // *Microbiology*. – 2008. – V. 154. – P. 30–41.
103. Huang, H. Towards physicochemical and biological effects on detachment and activity recovery of aging biofilm by enzyme and surfactant treatments / H. Huang, Q. Yu, H. Ren, J. Geng, K. Xu, Y. Zhang, L. Ding // *Bioresource technology*. – 2018. – V. 247. – P. 319–326.
104. Jiang, Y. Wettability regulated gram-negative bacterial adhesion on biomimetic hierarchical structures / Y. Jiang, Y.J. Yin, X.C. Zha, X.Q. Dou, C.L. Feng // *Chinese Chemical Letters*. – 2017. – V. 28. – № 4. – P. 813–817.
105. Jyoti. Improving stability and reusability of *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36 nitrilase by whole cell immobilization using chitosan / Jyoti, K. Bhatia, K. Chauhan, C. Attri, A. Seth // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – V. 103. – P. 8–15.
106. Kamjunke, N. Use of confocal laser scanning microscopy for biofilm investigation on paints under field conditions / N. Kamjunke, U. Spohn, M.

- Futing, G. Wagner, E.M. Scharf, S. Sandrock, B. Zippel // International biodeterioration & biodegradation. – 2012. – V. 69. – P. 17–22.
107. Kanematsu, H. Biofilm and Materials Science / H. Kanematsu, D.M. Barry – Springer, New York (NY), 2015. – 191 p.
108. Kang, D.H. Effect of polishing method on surface roughness and bacterial adhesion of zirconia-porcelain veneer / D.H. Kang, H. Choi, Y.J. Yoo, J.H. Kim, Y.B. Park, H.S Moon // Ceramics international. – 2017. – V. 43. – № 7. – P. 5382–5387.
109. Kelly, P.T. Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review / P.T. Kelly, Z. He // Bioresource Technology. – 2014. – V. 153. – P. 351–360.
110. Kohyama, E. Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms / E. Kohyama, A. Yoshimura, D. Aoshima, T. Yoshida, H. Kawamoto, T. Nagasawa // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – № 72. – P. 600–606.
111. Kohyama, E. Remaining acetamide in acetonitrile degradation using nitrile hydratase- and amidase-producing microorganisms / E. Kohyama, M. Dohi, A. Yoshimura, T. Yoshida, T. Nagasawa // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – № 74. – P. 829–835.
112. Kubáč, D. Biotransformation of nitriles by *Rhodococcus equi* A4 immobilized in LentiKats® / D. Kubáč, A. Čejková, J. Masák, V. Jirků, M. Lemaire, E. Gallienne, J. Bolte, R. Stloukal, L. Martínková // Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic. – 2006. – V. 39. – P. 59–61.
113. Kumar, S.S. Effect of surface finish on wettability and bacterial adhesion of micromachined biomaterials / S.S. Kumar, S.S. Hiremath, B. Ramachandran, V. Muthuvijayan // Biotribology. – 2019. – V. 18. – 100095.

114. Kumari, P. A comparative multivariate analysis of nitrilase enzymes: an ensemble based computational approach / P. Kumari, R. Poddar // *Computational Biology and Chemistry*. – 2019. – V. 83. – 107095.
115. Latif, M.A. Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters / M.A. Latif, R. Ghufuran, Z.A. Wahid, A. Ahmad // *Water Research*. – 2011. – V. 45. – № 16. – P. 4683–4699.
116. Lee, H.W. Acrylamide induces adipocyte differentiation and obesity in mice / H.W. Lee, S. Pyo // *Chemico-Biological Interactions*. – 2018. – V. 298. – P. 24–34.
117. Lee, S.W. Sensitizing bacterial cells to antibiotics by shape recovery triggered biofilm dispersion / S.W. Lee, H. Gu, J.B. Kilberg, D. Ren // *Acta biomaterialia*. – 2018. – V. 81. – P. 93–102.
118. Li, C. Combination of a recombinant bacterium with organonitrile-degrading and biofilm-forming capability and a positively charged carrier for organonitriles removal / C. Li, Y. Sun, Z. Yue, M. Huang, J. Wang, X. Chen, X. An, H. Zang, D. Li, N. Hou // *Journal of Hazardous Materials*. – 2018. – V. 353. – P. 372–380.
119. Li, Y. BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Li, O.E. Petrova, S. Su, G.W. Lau, W. Panmanee, R. Na, D.J. Hassett, D.G. Davies, K. Sauer // *PLOS Pathogenes*. – 2014. – V. 10. – № 6. – e1004168.
120. Li, Y.H. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms / Y.H. Li, X. Tian // *Sensors*. – 2012. – №. 12. – P. 2519–2538.
121. Liu, J. Amidase, a novel detoxifying enzyme, is involved in cyflumetofen resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) / J. Liu, Y. Zhang, K. Feng, X. Liu, J. Li, C. Li, P. Zhang, Q. Yu, J. Liu, G. Shen, L. He // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2019. – V. 163. – P. 31–38.
122. Liu, Q. Direct synthesis of nitriles from cleavage of C=C double bond with nitrotrite as the nitrogen source and oxidant / Q. Liu, B. Fang, X. Bai, Y.

- Liu, Y. Wu, G. Xu, C. Guo // *Tetrahedron letters*. – 2016. – V. 57 – №. 24. – P. 2620–2623.
123. Lu, A. Effects of surface roughness and texture on the bacterial adhesion on the bearing surface of bio-ceramic joint implants: An in vitro study / A. Lu, Y. Gao, T. Jin, X. Luo, Q. Zeng, Z. Shang // *Ceramics international*. – 2019. – V. 46(5). – P. 6550–6559.
124. Madmanang, R. Kinetics of nitrification and acrylamide biodegradation by *Enterobacter aerogenes* and mixed culture bacteria in sequencing batch reactor wastewater treatment systems / R. Madmanang, S. Jangkorn, J. Charoenpanich, T. Sriwiriyarat // *Environmental engineering research*. – 2019. V. 24(2). – P. 309–317.
125. Malandra, A. Continuous hydrolysis of 4-cyanopyridine by nitrilases from *Fusarium solani* O1 and *Aspergillus niger* K10 / A. Malandra, M. Cantarella, O. Kaplan, V. Vejvoda, B. Uhnakova, B. Stepankova, D. Kubac, L. Martinkova // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2009. – V. 85(2). – P. 277–284.
126. Marić, S. Characteristics and significance of microbial biofilm formation / S. Marić, J. Vraneš // *Periodicum Biologorum*. – 2007. – V. 109. – № 2. – P. 1–7.
127. Martínková, L. Fungal nitrilases as biocatalysts: Recent developments / L. Martínková, V. Vejvoda, O. Kaplan, D. Kubáč, A. Malandra, M. Cantarella, K. Bezouska, V. Křen // *Biotechnology Advances*. – 2009. – V. 27. – № 6. – P. 661–670.
128. Martínková, L. Nitrile metabolism in fungi: A review of its key enzymes nitrilases with focus on their biotechnological impact / L. Martínková // *Fungal Biology Reviews*. – 2019. – V. 33. – P. 149–157.
129. Martin, K.J. The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments / K.J. Martin, R. Nerenberg // *Bioresource Technol.* – 2012. – V. 122. – P. 83–94.

130. Martins, C.S. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater / C.S. Martins, C.M. Martins, L.M. Cidrão, G. Fiúza, S.T. Santaella // *African Journal of Biotechnology*. – 2013. – №12 (28). – P. 4412–4418.
131. Mathew, A.K. Comparison of entrapment and biofilm mode of immobilisation for bioethanol production from oilseed rape straw using *Saccharomyces cerevisiae* cells / A.K. Mathew, M. Crook, K. Chaney, A.C. Humphries // *Biomass and Bioenergy*. – 2013. – V. 52. – P. 1–7.
132. Matoso, V. Acrylamide: a review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept / V. Matoso, P. Bargi-Souza, F. Ivanski, M.A. Romano, R.M. Romano // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 283. – P. 422–430.
133. Moriarty, T.F. Bacterial adhesion and biomaterial surfaces / T.F. Moriarty, A.H.C. Poulsson, E.T.J. Rochford, R.G. Richards // *Comprehensive Biomaterials II*, 2017. – P. 101–129.
134. Mukram, I. Isolation and identification of a nitrile hydrolyzing bacterium and simultaneous utilization of aromatic and aliphatic nitriles / I. Mukram, A.S. Nayak, B. Kirankumar, T.R. Monisha, P.V. Reddy, T.B. Karegoudar // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2015. № 100. P. 165–171.
135. Mukram, I. Biodegradation of butyronitrile and demonstration of its mineralization by *Rhodococcus* sp. MTB5 / I. Mukram, M. Ramesh, T.R. Monisha, A.S. Nayak // *3 Biotech*. – 2016. V. 6 (2). – № 141. – 28330213.
136. Muruzović, M. Ž. In vitro evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia / M. Ž. Muruzović, K.G. Mladenović, L.R. Čomić // *Food Bioscience*. – 2018. – № 23. – P. 54–59.
137. Mustacchi, R. The effect of whole cell immobilisation on the biotransformation of benzonitrile and the use of direct electric current for enhanced product removal / R. Mustacchi, C.J. Knowles, H. Li, I.

- Dalrymple, G. Sunderland, W. Skibar, S.A. Jackman // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2005. – V. 91 (4). – P. 436–440.
138. Oh, Y.J. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy / Y.J. Oh, N.R. Lee, W. Jo, W.K. Jung, J.S. Lim // *Ultramicroscopy*. – 2009. – V. 109. – P. 874–880.
139. O’Toole, G. Biofilm formation as microbial development / G. O’Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Annual Review of Microbiology*. – 2000. – V. 54. – P. 49–79.
140. Palmer, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm / J. Palmer, S. Flint, J. Brooks // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. – 2007. – V. 34. – № 9. – P. 577–588.
141. Paul, E. Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms / E. Paul, J.C. Ochoa, Y. Pechaud, Y. Liu, A Line // *Water Research*. – 2012. – V.46. – P. 5499–5508.
142. Petrova, O.E. Dispersion by *Pseudomonas aeruginosa* requires an unusual posttranslational modification of BdIA / O.E. Petrova, K. Sauer // *PNAS*. – 2012. – V. 109. – № 41. – P. 16690–16695.
143. Petrova, O.E. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion / O.E. Petrova, K. Sauer // *Current Opinion in Microbiology*. – 2016. – V.30. – P. 67–78.
144. Prabu, C.S. Biodegradation of acrylamide employing free and immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa* / C.S. Prabu, A.J. Thatheyus // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2007. – V. 60. – P. 69–73.
145. Prasad, S. Bench scale conversion of 3-cyanopyridine to nicotinamide using resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. / S. Prasad, J. Raj, T.C. Bhalla // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2007. – V. 47. – P. 34–41.

146. Prasad, S. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry / S. Prasad, T.C. Bhalla // *Biotechnology Advances*. – 2010. – V. 28. – P. 725–741.
147. Puyol, D. Cosmetic wastewater treatment by upflow anaerobic sludge blanket reactor / D. Puyol, V.M. Monsalvo, A.F. Mohedano, J.L. Sanz, J.J. Rodriguez // *Journal of Hazardous Materials*. – 2011. – V. 185. – № 2–3. – P. 1059–1065.
148. Qureshi, N. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates / N. Qureshi, B.A. Annous, T.C. Ezeji, P. Karcher, I.S. Maddox // *Microbial Cell Factories*. – 2005. – V. 4(24). – P. 1612–1639.
149. Raj, J. *Rhodococcus rhodochrous* PA-34: A potential biocatalyst for acrylamide synthesis / J. Raj, S. Prasad, T.C. Bhalla // *Process Biochemistry*. – 2006. – V. 41. – P. 1359–1363.
150. Rapheeha, O.K.L. Hydrolysis of nitriles by soil bacteria: variation with soil origin / O.K.L. Rapheeha, M.P. Roux-van der Merwe, J. Badenhors, V. Chhiba, M.L. Bode, K. Mathiba, D. Brady // *Journal of Applied Microbiology*. – 2017. – V. 122. – № 3. – P. 686–697.
151. Reisner, A. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors / A. Reisner, K.A. Krogfelt, B.M. Klein, E.L. Zechner, S. Molin // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – V. 188(10). – P. 3572–3581.
152. Ren, D. Synergistic interactions in multispecies biofilms: PhD thesis / Dawei Ren. – Copenhagen, 2014. – 100 p.
153. Ren, D. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms / D. Ren, L.A. Bedzyk, S.M. Thomas, R.W. Ye, T.K. Wood // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – V. 64. – № 4. – P. 515–524.
154. Renner, L.D. Physicochemical regulation of biofilm formation / L.D. Renner, D.B. Weibel // *MRS Bulletin*. – 2011. – V. 36. – P. 347–355.

155. Rittmann, B.E. Biofilms, active substrata, and me / B.E. Rittmann // Water Research. – 2018. – V. 132. – P. 135–145.
156. Roach, P.C.J. Biocatalytic scrubbing of gaseous acrylonitrile using *Rhodococcus ruber* immobilized in synthetic silicone polymer (ImmobaSil™) rings / P.C.J. Roach, D.K. Ramsden, J. Hughes, P. Williams // Biotechnology and Bioengineering. – 2004. – V. 85. – № 4. – P. 450–455.
157. Robles, A. Global sensitivity analysis of a filtration model for submerged anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) / A. Robles, M.V. Ruano, J. Ribes, A. Seco, J. Ferrer // Bioresource Technology. – 2014. – V. 158. – P. 365–373.
158. Robles, H. Acetonitrile / H. Robles – In: P. Wexler (Eds.), Encyclopedia of Toxicology. 3rd ed. Vol 1, Elsevier Inc., Academic Press, 2014. – P. 40–42.
159. Røder, H. L. Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment / H.L. Røder, P.K. Raghupathi, J. Herschend, A. Brejnrod, S. Knøchel, S.J. Sørensen, M. Burmølle // Food Microbiology. – 2015. – № 51. – P. 18–24.
160. Rodesney, C.A. Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development / C.A. Rodesney, B. Roman, N. Dhamani, B.J. Cooley, A. Touhami, V.D. Gordon // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – V. 114. – № 23. – P. 5906–5911.
161. Rosche, B. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis / B. Rosche, X.Z. Li, B. Hauer, A. Schmid, K. Buehler // Trends in Biotechnology. – 2009. – P. 636–643.
162. Rustler, S. Conversion of mandelonitrile and phenylglycinenitrile by recombinant *E. coli* cells synthesizing a nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191 / S. Rustler, A. Müller, V. Windeisen, A. Chmura,

- B.C.M. Fernandes, C. Kiziak, A. Stolz // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. – V. 40. – P. 598–606.
163. Rutherford, S.T. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control / S.T. Rutherford, B.L. Bassler // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2012. – V. 2(11). – a012427.
164. Seviour, T. Extracellular polymeric substances of biofilms: suffering from an identity crisis / T. Seviour, N. Derlon, M.S. Dueholm, H.C. Flemming, E. Girbal-Neuhauser, H. Horn, S. Kjelleberg, M.C.M. Van Loosdrecht, T. Lotti, M.F. Malpei, R. Nerenberg, T.R. Neu, E. Paul, H. Yu, Y. Lin // *Water Research*. – 2018. – V. 151. – P. 1–7.
165. Singh, L. Application of polyethylene glycol immobilized *Clostridium* sp. LS2 for continuous hydrogen production from palm oil mill effluent in upflow anaerobic sludge blanket reactor / L. Singh, M.F. Siddiqui, A. Ahmad, M.H.A. Rahim, M. Sakinah, Z.A. Wahid // *Biochemical Engineering Journal*. – 2013. – V. 70. – P. 158–165.
166. Singh, R. Nitrilase and its application as a «Green» catalyst / R. Singh, R. Sharma, N. Tewari, G.S. Rawat, D.S. Rawat // *Chemistry & Biodiversity*. – 2006. – №3. – P. 1279–1287.
167. Shaikh, S. Femtosecond laser induced surface modification for prevention of bacterial adhesion on 45S5 bioactive glass / S. Shaikh, D. Singh, M. Subramanian, S. Kedia, A.K. Singh, K. Singh, N. Gupta, S. Sinha // *Journal of Non-Crystalline Solids*. – 2018. – № 482. – P. 63–72.
168. Sharma, N.N. An improved nitrilase-mediated bioprocess for synthesis of nicotinic acid from 3-cyanopyridine with hyperinduced *Nocardia globerula* NHB-2 / N.N. Sharma, M. Sharma, T.C. Bhalla // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* – 2011 – V. 38(9). – P. 1235–1243.
169. Sharma, N.N. *Nocardia globerula* NHB-2 nitrilase catalysed biotransformation of 4-cyanopyridine to isonicotinic acid / N.N. Sharma, M. Sharma, T.C. Bhalla // *AMB Express*. – 2012. – V. 2(1) – P. 25.

170. Sheldon, J.R. Role of *rpoS* in *Escherichia coli* O157:H7 strain H32 biofilm development and survival / J.R. Sheldon, M.S. Yim, J.H. Saliba, W.H. Chung, K.Y. Wong, K.T. Leung // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. – V. 78. – № 23. – P. 8331–8339.
171. Show, K.Y. Bioreactor and process design for biohydrogen production / K.Y. Show, D.J. Lee, J.S. Chang // *Bioresource Technology*. – 2011. – V. 102. – № 18. – P. 8524–8533.
172. Skoneczny, S. Determination of steady-states in a tubular biofilm bioreactor with axial dispersion / S. Skoneczny, M. Cioch // *Chemical engineering research and design*. – 2018. – V. 136. – P. 468–476.
173. Sogani, M. Biotransformation of amide using *Bacillus* sp.: isolation strategy, strain characteristics and enzyme immobilization / M. Sogani, N. Mathur, P. Bhatnagar, P. Sharma // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2012. – V. 9. – P. 119–127.
174. Solano, C. Biofilm dispersion and quorum sensing / C. Solano, M. Echeverz, I. Lasa // *Current Opinion in Microbiology*. – 2014. – V.18 – P. 96–104.
175. Stasiak-Róžańska, L. Application of immobilized cell preparation obtained from biomass of *Gluconacetobacter Xylinus* bacteria in biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone / L. Stasiak-Róžańska, S. Błażej, A. Miklaszewska // *Acta Scientiarum Polonorum, Technology Aliment*. – 2011. – №10(1). – P. 35–49.
176. Stewart, P.S. Physiological heterogeneity in biofilms / P.S. Stewart, M.J. Franklin // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008 – V. 6. – № 3. – P. 199–210.
177. Subramani, A. Emerging desalination technologies for water treatment: A critical review / A. Subramani, J.G. Jacangelo // *Water Research*. – 2015. – V. 75. – P. 164–187.

178. Szomolay, B. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms / B. Szomolay, I. Klapper, J. Dockery, P.S. Stewart // *Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 7. – № 8. – P. 1186–1191.
179. Tauber, M.M. Nitrile hydratase and amidase from *Rhodococcus rhodochromus* hydrolyze acrylic fibers and granular polyacrylonitriles / M.M. Tauber, A. Cavaco-Paulo, K.H. Robra, G.M. Gübitz // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66. – № 4. – P. 1634–1638.
180. Thornhill, S.G. Biological filters and their use in potable water filtration systems in spaceflight conditions / S.G. Thornhill, M. Kumar // *Life Sciences in Space Research*. – 2018. – V. 17. – P. 40–43.
181. Tseng, B.S. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin / B.S. Tseng, W. Zhang, J.J. Harrison, T.P. Quach, J.L. Song, J. Penterman, P.K. Singh, D.L. Chopp, A.I. Packman, M.R. Parsek // *Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 15. – № 10. – P. 2865–2878.
182. Urbance, S.E. Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors / S.E. Urbance, A.L. Pometto, A.A. DiSpirito, Y. Denli // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – V. 65. – P. 664–670.
183. Van Houdt, R. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface / R. Van Houdt, C.W. Michiels // *Journal of applied microbiology*. – 2010. – V. 109. – № 4. – P. 1117–1131.
184. Vejvoda, V. Immobilization of fungal nitrilase and bacterial amidase – two enzymes working in accord / V. Vejvoda, O. Kaplan, D. Kubáč, V. Křen, L. Martínková // *Biocatalysis and Biotransformation*. – 2006. – V. 24(6). – P. 414–418.
185. Velankar, H. Developments in nitrile and amide biotransformation processes / H. Velankar, K.G. Clarke, R. Preez, D.A. Cowan, S.G. Burton // *Trends in Biotechnology*. – 2010. – V. 28. – № 11. – P. 561–569.

186. Vissers, T. Bacteria as living patchy colloids: Phenotypic heterogeneity in surface adhesion / T. Vissers, A.T. Brown, N. Koumakis, A. Dawson, M. Hermes, J. Schwarz-Linek, A.B. Schofield, J.M. French, V. Koutsos, J. Arlt, V.A. Martinez, W.C.K. Poon // *Science Advances*. – 2018. – V. 4. – № 4. – 29719861.
187. Vu, B. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu, M. Chen, R. Crawford, E. Ivanova // *Molecules*. – 2009. – V. 14. – № 7. – P. 2535–2554.
188. Wall, G. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis / G. Wall, D. Montelongo-Jauregui, B. Vidal Bonifacio, J.L. Lopez-Ribot, P. Uppuluri // *Current Opinion in Microbiology*. – 2019. – V. 52. – P. 1–6.
189. Walter, M. Detachment characteristics of a mixed culture biofilm using particle size analysis / M. Walter, A. Safari, A. Ivankovic, E. Casey // *Chemical Engineering Journal*. – 2013. – V. 228. – P. 1140–1147.
190. Wang, Y.S. Enantioselective hydrolysis of (*R*)-2,2-dimethylcyclopropane carboxamide by immobilized cells of an *R*-amidase-producing bacterium, *Delftia tsuruhatensis* CCTCC M 205114, on an alginate capsule carrier / Y.S. Wang, R.C. Zheng, J.M. Xu, Z.Q. Liu, F. Cheng, Z.H. Feng, L.L. Liu, Y.G. Zheng, Y.C. Shen // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 37. – P. 503–510.
191. Wei, Q. Reproductive toxicity in acrylamide-treated female mice / Q. Wei, J. Li, X. Li, L. Zhang, F. Shi // *Reproductive Toxicology*. – 2014. – V. 46. – P. 121–128.
192. Wijekoon, K.C. The fate of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters and pesticides during MBR treatment / K.C. Wijekoon, F.I. Hai, J. Kang, W.E. Price, W. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem // *Bioresource Technology*. – 2013. – V. 144. – P. 247–254.

193. Wingender, J. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens / J. Wingender, H.C. Flemming // *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. – 2011. – V. 214. – № 6. – P. 417–423.
194. Winn, M. Biofilms and their engineered counterparts: A new generation of immobilised biocatalysts / M. Winn, J.M. Foulkes, S. Perni, M.J.H. Simmons, T.W. Overton, R.J.M. Goss // *Catalysis Science & Technology*. – 2012. – №2. – P. 1544–1547.
195. Wu, K.J. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge / K.J. Wu, C.F. Chang, J.S. Chang // *Process Biochemistry*. – 2007. – V. 42. № 7. – P. 1165–1171.
196. Xie, B. Surface properties of bacteria from activated sludge in relation to bioflocculation / B. Xie, J. Gu, J. Lu // *Journal of Environmental Sciences*. – 2010. – V. 22. – № 12. – P. 1840–1845.
197. Xie, Z. An anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for landfill leachate treatment: Performance and microbial community identification / Z. Xie, Z. Wang, Q. Wang, C. Zhu, Z. Wu // *Bioresource Technology*. – 2014. – V. 161. – P. 29–39.
198. Xu, Y.Y. Bioactive constituents from the bacterium *Alcaligenes faecalis* YMF 3.175 / Y.Y. Xu, X. Wang, K.Q. Zhang, G.H. Li // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2015. – V. 51. – №. 1. – P. 52–57.
199. Yeom, S.J. Enantioselective production of 2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid from 2,2-dimethylcyclopropane carbonitrile using the nitrile hydratase and amidase of *Rhodococcus erythropolis* ATCC 25544 / S.J. Yeom, H.J. Kim, D.K. Oh // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. – № 41(6-7). – P. 842–848.
200. Yu, L. Simultaneous nitriles degradation and bioflocculant production by immobilized *K. oxytoca* strain in a continuous flow reactor / L. Yu, J. Hua, H. Fan, O. George, Y. Lu // *Journal of Hazardous Materials*. – 2019. – 121697.

201. Yu, S. PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix / S. Yu, T. Su, H. Wu, S. Liu, D. Wang, T. Zhao, Z. Jin, W. Du, M.J. Zhu, S.L. Chua, L. Yang, D. Zhu, L. Gu, L.Z. Ma // *Cell research*. – 2015. – V. 25. – P. 1352–1367.
202. Zahir, I. A novel *Alcaligenes faecalis* antibacterial-producing strain isolated from a Moroccan tannery waste / I. Zahir, A. Houari, W. Bahafid, M. Iraqui, S. Ibnsouda // *African Journal of Microbiology Research*. – 2013. – V. 7. – № 47. – P. 5314–5323.
203. Zhai, Y. Acetonitrile contamination in the cathode of proton exchange membrane fuel cells and cell performance recovery / Y. Zhai, J. St-Pierre // *Applied Energy*. – 2019. – V. 242. – P. 239–247.
204. Zhan, W. Continuous-flow synthesis of nitriles from aldehydes via Schmidt reaction / W. Zhan, M. Tong, L. Ji, H. Zhang, Z. Ge, X. Wang, R. Li // *Chinese Chemical Letters*. – 2019. – V. 30. – № 5. – P. 973–976.
205. Zhang, J.F. Biotransformation of iminodiacetonitrile to iminodiacetic acid by *Alcaligenes faecalis* cells immobilized in ACA-membrane liquid-core capsules / J.F. Zhang, Z.Q. Liu, X.H. Zhang, Y.G. Zheng // *Chemical Papers*. – 2014. – V. 68. № 1. – P. 53–64.
206. Zhang, X. PotD protein stimulates biofilm formation by *Escherichia coli* / X. Zhang, Y. Zhang, J. Liu, H. Liu // *Biotechnol letters*. – 2013. – V. 35. – P. 1099–1106.
207. Zhang, Z. Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans* / Z. Zhang, E. Nadezhina, K.J. Wilkinson // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – V. 55. – № 3. – P. 1075–1081.
208. Zhang, Z. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors—A comparison of biofilm-based and granule-based systems / Z. Zhang, K. Show, J. Tay, D. Liang, D. Lee // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2008. – V. – № 5. – P. 1559–1564.
209. Zhang, Z. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor / Z. Zhang, K. Show, J. Tay, R. Yan, D.

- Teeliang, W. Jiang, D. // *Lee International Journal of Hydrogen Energy*. – 2007. – V. 32– № 2. – P. 185–191.
210. Zhao, Q.B. Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values / Q.B. Zhao, H.Q. Yu // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – P. 1353–1358.
211. Zheng, L. Application of a series of biomarkers in *Scallop Chlamys farreri* to assess the toxic effects after exposure to a priority hazardous and noxious substance (HNS) – Acrylonitrile / L. Zheng, L. Pan, J. Miao, Y. Lin, J. Wu // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2018. – V. 64. – P. 122–130.
212. Zuthi, M.F.R. Enhanced biological phosphorus removal and its modeling for the activated sludge and membrane bioreactor processes / M.F.R. Zuthi, W.S. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem, F.I. Hai // *Bioresource Technology*. – 2013. – V. 139. – P. 363–374.