

На правах рукописи

Криворучко Анастасия Владимировна

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
АДГЕЗИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ**

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Пермь – 2021

Работа выполнена на базе лаборатории алканотрофных микроорганизмов “Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН” – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, г. Пермь

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор,
академик РАН **Ившина Ирина Борисовна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, доцент кафедры генетики, руководитель лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета **Каюмов Айрат Рашитович**

доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала АО “НПО “Микроген” в г. Пермь “Пермское НПО “Биомед” **Несчисляев Валерий Александрович**

доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии, старший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета **Холявка Марина Геннадьевна**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук” (ИБФРМ РАН) (410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, 13).

Защита диссертации состоится _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке “ИЭГМ УрО РАН” и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permisc.ru>).

Автореферат разослан “___” _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Напряженная экологическая ситуация обуславливает необходимость расширения и интенсификации исследований особенностей микроорганизмов загрязненных сред, так называемых стресс-толерантов, играющих роль первичной системы реагирования на неблагоприятные или потенциально опасные изменения среды и инициирующие адаптивные реакции на самых ранних стадиях (Pátek *et al.*, 2021). Среди экстремотолерантных микроорганизмов особое место занимают актинобактерии рода *Rhodococcus* Zopf 1891 (филум *Actinobacteria*, класс *Actinomycetia*, порядок *Corynebacteriales*, семейство *Nocardiaceae*) (<https://lpsn.dsmz.de/class/actinomycetia>), обладающие способностью синтезировать компоненты клеток за счет газообразных и жидких *n*-алканов, высокой нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра ксенобиотиков и участвующие в процессах естественного восстановления загрязненных экосистем (Martínková *et al.*, 2009; de Carvalho *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Laczi *et al.*, 2015; Viggor *et al.*, 2015; Ceniceros *et al.*, 2017; Ivshina *et al.*, 2017; Cappelletti *et al.*, 2019a,b; Zampolli *et al.*, 2019; Garrido-Sanz *et al.*, 2020). Основной причиной, побуждающей исследователей концентрировать свое внимание на изучении занимающих доминирующее положение в антропогенно нарушенных биотопах родококков и адаптационных механизмов их выживания в неблагоприятных условиях окружающей среды, является реальная возможность их применения в современных экобиотехнологиях, включающих биоремедиацию, обезвреживание токсичных отходов, получение ценных химических соединений в промышленных масштабах (Ившина, 2012; Martínková *et al.*, 2009; Hamed, Mohammadipanath, 2015; Röttig *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018; Kuyukina, Ivshina, 2019a,b; Cappelletti *et al.*, 2020). Несмотря на то, что в настоящий момент неуклонно растет число публикаций и разработок на основе *Rhodococcus*, до сих пор остается ряд нерешенных фундаментальных вопросов, связанных с раскрытием сложных механизмов адаптации родококков к условиям антропогенно загрязненных биотопов, более детальной расшифровкой их ответных реакций и сигнально-регуляторных путей, приводящих к адаптивным клеточным модификациям под воздействием экополлютантов и других экзогенных факторов.

Основным механизмом адаптации бактерий к неблагоприятным условиям существования является прикрепленный образ жизни, сопровождающийся образованием микробных агрегатов, флоков, гранул, биопленок, матов. В составе клеточных скоплений бактерии образуют синергические сообщества, аккумулируют и активно используют питательные вещества, легко обмениваются сигнальными молекулами и генами, оказываются защищены от воздействия стрессорных факторов (Заварзин, 2003; Николаев, Плакунов, 2007; Сироткин и др., 2007; Ефременко, 2018; *Microbial biofilms*, 2003; Junter, Jouenne, 2004; *Biofilms..*, 2016; James *et al.*, 2017; Cai, 2020). Необходимым этапом первичного контакта бактериальных клеток с поверхностью раздела фаз, сигналом к образованию биопленок, микробных гранул и флоков является адгезия (Hori, Matsumoto, 2010; James *et al.*, 2017; Carniello *et al.*, 2018). Однако биологическая роль, механизмы адгезии и факторы, регулирующие этот процесс, наиболее детально исследованы у патогенных и условно-патогенных бактерий (Серегина и др., 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Słotwińska, 2013; Han *et al.*, 2016; James *et al.*, 2017; Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Shokeen *et al.*, 2021) и гораздо меньше изучены у непатогенных прокариотов (наиболее исследованными в этом плане можно считать представителей микробиоты человека и бактерии активного ила) (Сироткин и др., 2007; Moissl *et al.*, 2003; Henneberger *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Altamimi *et al.*, 2016; *Biofilms..*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

Известно, что бактериальная адгезия происходит за счет специфических и неспецифических взаимодействий. Специфические адгезионные взаимодействия

обуславливают контакт патогенных и симбиотических бактерий с биотическими поверхностями и связаны со стереоспецифическим узнаванием особыми молекулами на поверхности бактериальных клеток, называемых адгезинами или молекулами адгезии, рецепторов на поверхности клеток хозяина (обычно это углеводы, состоящие из остатков галактозы и маннозы, или гликопротеины – лектины) или отдельных компонентов экстрацеллюлярного матрикса – коллагена, ламинина, фибронектина, белков слюны, белков крови (фибриногена, фибрина, тромбина), муцинов. Адгезины могут иметь фимбриальное или афимбриальное расположение в клеточной стенке. Досконально изучены фимбриальные адгезины патогенных бактерий: известны их состав, строение, биосинтез, этапы сборки, механизмы действия и регуляции, взаимодействие с другими белками в клетке, кодирующие их гены. Неспецифические молекулярные взаимодействия обуславливают адгезию патогенных и непатогенных бактерий к абиотическим (в этом плане наиболее изучены поверхности медицинского оборудования, катетеры, протезы) и к некоторым биотическим (зубная эмаль) поверхностям и связаны с действием межмолекулярных сил притяжения (силы ван дер Ваальса, диполь-дипольные взаимодействия), электростатическим притяжением/отталкиванием, образованием между взаимодействующими поверхностями слабых водородных и координационных связей. Молекулярными факторами, регулирующими адгезионный процесс, в этом случае являются внеклеточные полимерные вещества, ауотранспортерные адгезины, липополисахарид наружной мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий и полисахаридный межклеточный адгезин грамположительных бактерий (Сироткин и др., 2007; Серегина и др., 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Słotwińska, 2013; Altamimi *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2016; James *et al.*, 2017; Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Следует отметить, что не всегда представляется возможным определить тип адгезионного взаимодействия, поэтому выделение специфической и неспецифической адгезии достаточно условно. Теории, описывающие физико-химические основы адгезионного процесса, часто не позволяют достоверно спрогнозировать результаты адгезии и требуют уточнения. Единичны сведения об участии в адгезии продуцируемых многими бактериями биосурфактантов. Не исследована зависимость бактериальной адгезии от рельефа клеточной поверхности, при этом достаточно много работ посвящено изучению влияния рельефа подложки на эффективность адгезионного процесса (Омарова и др., 2012; Коваленко и др., 2018; Chen *et al.*, 2003; Preedy *et al.*, 2014; Oder *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018). Пока еще мало сведений о диапазоне значений силы адгезии бактерий и бактериальных адгезинов, хотя современные методы инструментального анализа (атомно-силовая микроскопия) позволяют проводить подобные исследования.

На настоящий момент практически отсутствуют систематизированные исследования адгезивных свойств родококков, сведения о механизмах адгезии *Rhodococcus* фрагментарны даже в отношении патогенных и фитопатогенных представителей данного рода. Известно лишь, что родококки способны необратимо прикрепляться к твердым поверхностям (Masák *et al.*, 2005; Lehocký *et al.*, 2009). Отмечено усиление способности родококков к клеточной агрегации, адгезии к твердым поверхностям и био пленкообразованию в присутствии токсичных органических соединений (Соляникова и др., 2017; de Carvalho *et al.*, 2004; de Carvalho, da Fonseca, 2007; Corno *et al.*, 2014; Weathers *et al.*, 2015; Pátek *et al.*, 2021). Этих сведений недостаточно для понимания универсальности данных ответных реакций родококков. Не изучена роль адгезии в окислении родококками поллютантов, хотя в литературе отмечается, что адгезия к гидрофобным питательным субстратам является необходимым этапом их усвоения (Bastiaens *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2010). Лишь частично исследованными можно считать био пленки *Rhodococcus* (Омарова и др., 2012; Gilan, Sivan, 2013; Zheng *et al.*, 2013; Rodrigues, de Carvalho, 2015). Единичные работы посвящены изучению неспецифической

адгезии родококков: участию внеклеточных полимерных веществ (Iwabuchi *et al.*, 2003; Sivan *et al.*, 2012; Pen *et al.*, 2015), влиянию на адгезионный процесс электрокинетического потенциала (de Mesquita *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2015) и степени гидрофобности клеток (Iwabuchi *et al.*, 2003; Lehocký *et al.*, 2009; Schreiberová *et al.*, 2012). Из специфических факторов адгезии родококков описан поверхностный белок TiBP – гомолог дигидролипоамиддегидрогеназы, участвующий в адгезии выделенного на территории угольной электростанции непатогенного штамма *R. ruber* GIN1 (NCIMB 40340) к диоксиду титана (Gertler *et al.*, 2003; Siegmann *et al.*, 2009; Dayan *et al.*, 2017). Знания о биофизических и молекулярно-клеточных механизмах адгезии и факторах, регулирующих данный процесс у родококков, позволят глубже понять причины высокой приспособляемости родококков к жестким условиям антропогенно нарушенных биотопов и получить биокатализаторы на основе иммобилизованных родококков с гарантированной функциональной активностью.

Проведение интенсивного исследования бактериальной адгезии существенно затруднено из-за отсутствия доступных и точных методов количественного анализа самого процесса. Обычно для этого используют методы прямого и косвенного определения числа прикрепленных клеток (Huber *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2011; Kinnby, Chávez de Paz 2016; Ye *et al.*, 2017) и методы термодинамики (Hauser-Gerspach *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2017; Carniello *et al.*, 2018). Распространенным методом является определение изменения свободной энергии адгезии ($\Delta G_{\text{адг}}$, Дж/м²) через значения краевых углов смачивания подложки и бактериального газона жидкостями с известными значениями отдельных компонентов свободной поверхностной энергии. Однако этот метод дает сведения о физико-химическом средстве клеток и подложки при условии идеально гладких взаимодействующих поверхностей (Hori, Matsumoto, 2010; Qu *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2017; Carniello *et al.*, 2018). Требуется поиск более точных методов прямого мониторинга процесса бактериальной адгезии. Перспективными в этом плане являются методы, основанные на измерении температурных показателей, такие как инфракрасная термография (Salaimh *et al.*, 2011; Chizzotti *et al.*, 2013; Kluge *et al.*, 2013; Usamentiaga *et al.*, 2014), изотермическая микрокалориметрия (Hauser-Gerspach *et al.*, 2008; Braissant *et al.*, 2010; Astasov-Frauenhoffer *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2011) и прецизионная контактная термометрия (Zhong *et al.*, 2009; Kwak *et al.*, 2010, 2012; Morimoto *et al.*, 2013).

Цель настоящей работы – углубленное исследование механизмов адгезии актинобактерий рода *Rhodococcus* и оценка роли адгезии в формировании их общей приспособляемости к выживанию в условиях антропогенного загрязнения среды.

Основные задачи исследования

1. Определить роль адгезии и степень влияния углеводов на адгезивную активность родококков.
2. Исследовать биофизические особенности адгезии родококков экологически значимых видов.
3. Изучить молекулярные факторы, регулирующие адгезионный процесс, и определить клеточную локализацию молекул адгезии у родококков.
4. Разработать эффективный метод прямой количественной оценки бактериальной адгезии и получить работающие прототипы биокатализаторов на основе углеводородокисляющих родококков.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное систематизированное исследование адгезивных свойств актинобактерий рода *Rhodococcus*, направленное на оценку роли адгезии в приспособлении родококков экологически значимых видов к изменяющимся условиям внешней среды. С использованием массива свежесделанных и коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. экспериментально обосновано, что адгезия является одним из основных механизмов, обеспечивающих биodeградацию углеводов,

и универсальной адаптивной реакцией родококков в ответ на повреждающее воздействие углеводов.

Получены новые сведения о биофизических, молекулярных и клеточных механизмах адгезии углеводородокисляющих родококков. Впервые показано, что гликолипидные биосурфактанты, продуцируемые родококками в ответ на присутствие в среде жидких углеводов, выполняют функцию адгезивных молекул, определена сила адгезии *Rhodococcus*-биосурфактантов, установлена их важная роль в адгезии родококков, выявлены особенности расположения молекул биосурфактантов на абиотических поверхностях в зависимости от их концентрации в среде. Принципиально новым результатом является выявленная прямая зависимость адгезивной активности родококков от степени шероховатости (особенности рельефа поверхности) клеток. Впервые показана локализация адгезинов липидной природы в специфических придаточных структурах, обнаруживаемых на поверхности клеток, и их определяющая роль в адгезии *Rhodococcus*. Способ закрепления родококков за счет характерных выростов клеточной стенки, содержащих молекулы адгезии, отнесен нами к новому ранее не описанному клеточному механизму адгезии *Rhodococcus*.

Впервые с использованием метода высокочувствительной инфракрасной термографии исследована динамика адгезии непатогенных бактерий, документирована возможность использования данного метода детекции тепла для регистрации температурных показателей, изменяющихся в процессе адгезии родококков, и на их основе разработан алгоритм количественной оценки бактериальной адгезии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты исследований расширяют представление о механизмах выживания родококков в антропогенно загрязненных биотопах. Детально изучены биофизические особенности адгезии углеводородокисляющих родококков и выявлены основные механизмы адгезионного процесса. Получены сведения о природе адгезинов родококков и их локализации на поверхности клеток. Разработан научно-практический подход к созданию эффективных биокатализаторов на основе углеводородокисляющих родококков с учетом способности к продукции гликолипидных биосурфактантов, количественных показателей адгезивной активности и особенностей клеточного рельефа штаммов-биодеструкторов. Определены условия формирования кондиционирующей пленки на поверхности адсорбентов, наличие которой приводит к выравниванию микрорельефа поверхности и обеспечивает равномерное и практически монослойное распределение родококков и их высокую метаболическую активность. С использованием высокочувствительной инфракрасной термографии разработан простой, бесконтактный, экспрессный метод определения характера расположения бактериальных клеток на твердых абиотических поверхностях. Подобраны оптимальные адсорбенты углеводородокисляющих родококков и получена серия работающих прототипов биокатализаторов, сохраняющих активность в течение 8 мес и пригодных для использования в процессах биodeградации углеводов и их производных. Получены два патента на изобретение РФ 2475542 “Способ и установка для определения эффективности адсорбционной иммобилизации микроорганизмов и мониторинга функционального состояния биокатализаторов на основе иммобилизованных микробных клеток” и 2525934 “Способ видовой дифференциации жизнеспособных родококков, иммобилизованных в гелевом носителе”. Результаты исследования используются в разработанных лекционных курсах “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков”, “Нефтяная микробиология”, “Биобезопасность в биотехнологии”, читаемых для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация об адгезивной активности использованных в работе штаммов родококков внесена в базу данных Региональной профилированной

коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет (<http://www.iegmc.ru>).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Адгезия является необходимым пусковым фактором процесса биодegradации углеводов родококками и сопровождается формированием обособленных многоклеточных агрегатов, усилением адгезивной активности клеток, изменением микрорельефа клеточной поверхности, а также повышенной продукцией гликолипидных биосурфактантов. Существует прямая пропорциональная зависимость между адгезивной и углеводородокисляющей активностями родококков. Прикрепленные клетки *Rhodococcus* сохраняют жизнеспособность и высокую метаболическую активность в течение длительного времени.

2. Существует строгая корреляция между количеством прикрепленных клеток и степенью шероховатости поверхности клеток и подложки. Специфические придаточные структуры клеточной стенки родококков являются местом локализации адгезинов. Способ закрепления клеток за счет характерных выростов, содержащих молекулы адгезии, относится к новому, ранее не описанному механизму адгезии родококков. Микрорельеф поверхности подложки и присутствие на ней модифицирующих агентов влияют на характер распределения клеток. Агрегация *Rhodococcus* как частный случай адгезии зависит от степени гидрофобности и электрокинетического потенциала клеток, тогда как адгезия родококков к твердым поверхностям практически не зависит от данных показателей. Особенностью адгезии родококков является выраженный экзотермический эффект.

3. Основными молекулярными факторами, регулирующими адгезию родококков, являются поверхностно-активные комплексы на основе *Rhodococcus*-биосурфактантов, а также поверхностные белки и липидные компоненты клеточной стенки родококков. Штаммы *Rhodococcus* с высокой продукцией биосурфактантов, как правило, обладают повышенной адгезивной активностью. На твердых поверхностях *Rhodococcus*-биосурфактанты образуют кондиционирующую пленку, усиливающую адгезию родококков.

4. Изменения температурных показателей, регистрируемые с помощью метода высокочувствительной инфракрасной термографии, могут быть использованы для количественной оценки адгезии родококков. Данный метод позволяет в режиме реального времени и в условиях свободного теплообмена клеток с окружающей средой определять количество прикрепленных клеток, характер их распределения на твердой поверхности и динамику адгезии родококков на начальных этапах прикрепления клеток, пригоден при разработке эффективных биокатализаторов на основе углеводородокисляющих *Rhodococcus*.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe “SymBioSE 2009” “Biology: Expansion of borders”, Kazan, Russia, 2009; the 11th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Melbourne, Australia, 2010; ERA.Net RUS Brokerage Event, Ekaterinburg, Russia, 2011; the 4th FEMS Microbiology Congress, Geneva, Switzerland, 2011; the 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, Denmark, 2012; the World Biotechnology Congress WBC13, Boston, USA, 2013; Hannover Messe 2014, Hannover, Germany, 2014; International Convention BIO 2014, San Diego, USA, 2014; the 6th FEMS Microbiology Congress 2015, Maastricht, Netherlands, 2015; II Российском микробиологическом съезде, Саранск, 2019. По теме диссертации опубликовано 55 печатных работ, в том числе 14 статей в журналах, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и Web of Science (Прикладная биохимия и микробиология, AMB Express, Applied Microbiology and Biotechnology, Applied Sciences,

Bioresource Technology, Catalysts, Environmental Science: Processes and Impacts, Genome Announcements, International Biodeterioration & Biodegradation, Journal of Biotechnology, Journal of Environmental Chemical Engineering, Journal of Hazardous Materials, Journal of Microbiological Methods, Microbiology Australia), 7 статей в других журналах, 1 учебное пособие, 1 коллективная монография, 1 глава в книге, 8 материалов конференций, 5 публикаций в научных трудах, 16 тезисов докладов, 2 патента.

Объем и структура научно-квалификационной работы. Работа изложена на 223 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы и 45 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 295 наименований работы, в том числе 48 отечественных и 247 зарубежных авторов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР “ИЭГМ УрО РАН” – филиал ПФИЦ УрО РАН и является частью исследований, проводимых по темам “Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для экоценозов и практической деятельности человека” (ГР № АААА-А19-119112290008-4), “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды” (ГР № АААА-А19-119112290009-1), “Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии” (ГР № АААА-А19-119112290010-7), а также НИОКТР “Многомасштабная динамика механобиологических процессов в живых системах” (ГР № АААА-А19-119031890083-9). Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ (№ 18-14-00140) и РФФИ (№ 18-29-05006, № 20-44-596001). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов” и “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН. Автору принадлежит выбор проблемы, постановка целей и задач проведенных исследований, планирование экспериментов, 80% личное участие в лабораторных экспериментах, научное руководство студентами, анализ, обобщение и интерпретация результатов, подготовка научных публикаций.

Благодарности. Автор выражает благодарность зав. лаб. физических основ прочности “ИМСС УрО РАН” – филиал ПФИЦ УрО РАН, д.ф.-м.н., профессору Наймарку Олегу Борисовичу, д.ф.-м.н. Плехову Олегу Анатольевичу и к.ф.-м.н. Изюмовой Анастасии Юрьевне за помощь в совместных экспериментах по интерференционной микроскопии, инфракрасной термографии и прецизионной термометрии; вед. науч. сотр. лаб. алканотрофных микроорганизмов “ИЭГМ УрО РАН” – филиал ПФИЦ УрО РАН, д.б.н. Куюкиной Марии Станиславовне за помощь в организации работ по атомно-силовой/конфокальной лазерной сканирующей микроскопии; доктору Cécile Fischer из лаборатории геномики и метаболомики Национального центра секвенирования Франции “Genoscope” университета Эври (Эври, Франция) за консультации по биоинформатическому анализу бактериальных геномов.

Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту, зав. лаб. алканотрофных микроорганизмов “ИЭГМ УрО РАН” – филиал ПФИЦ УрО РАН, академику РАН, д.б.н., профессору Ившиной Ирине Борисовне за многолетнюю поддержку и постоянное внимание к настоящей работе.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты. В работе использовали минеральные соли, глюкозу, углеводороды, органические растворители, кислоты и щелочи со степенью чистоты $\geq 95\%$ производства Sigma-Aldrich (США), “Диаэм” (Москва), ООО “АО Реахим” (Москва), ЗАО “Экос-1”

(Москва), ЗАО “Химреактив” (Нижний Новгород), ЗАО “База № 1 химреактивов” (Старая Купавна), ЗАО “РФК” (Верхняя Любовша), АО “Вектон” (Санкт-Петербург), ООО “Спектр-хим СПб” (Санкт-Петербург), “Криохром” (Санкт-Петербург), Alfa Aesar (США) или Merck (Германия). Использовали следующие углеводороды: газообразные (пропан), жидкие (*n*-додекан, *n*-гексадекан) и твердые (*n*-докозан, *n*-гексакозан, *n*-октакозан, *n*-нонакозан, *n*-гентриаконтан) *n*-алканы, ПАУ с 2–5 конденсированными бензольными кольцами (нафталин, антрацен, фенантрен, пирен, хризен, бензантрацен, бензпирен). *Rhodococcus*-биосурфактанты выделяли из родококков, выращенных в присутствии *n*-додекана или *n*-гексадекана, как описано ранее (Kuyukina *et al.*, 2001).

Рабочая коллекция бактериальных культур, условия их выращивания. В работе использовали 84 свежевыделенных и коллекционных штамма *Rhodococcus* spp. из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, реестровый номер УНУ 73559, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, ЦКП № 480868, www.iegmcoll.ru), принадлежащих к видам *R. erythropolis* (14 штаммов), *R. cerastii* (1 штамм), *R. fascians* (4 штамма), *R. jostii* (7 штаммов), *R. opacus* (9 штаммов), *R. qingshengii* (2 штамма), *R. rhodochrous* (11 штаммов), *R. ruber* (32 штамма) и *Rhodococcus* sp. (4 штамма), а также 118 Tn5-мутантов, полученных методом неспецифического *in vivo* Tn5-мутагенеза. Выбор штаммов обусловлен источником их выделения и известной катаболической активностью по отношению к гидрофобным соединениям.

Родококки выращивали в колбах Эрленмейера или 96-луночных полистироловых культуральных микропланшетах (“Медполимер”, Санкт-Петербург) в питательных средах LB (Sigma-Aldrich), “К” (Каталог штаммов., 1994) или “*Rhodococcus*-surfactant” (Ivshina *et al.*, 1998) при перемешивании (160 об/мин для колб, 600 об/мин для микропланшетов) и при температуре 28 °С в течение 1–9 сут. В качестве источника углерода и энергии в минеральные среды вносили D-глюкозу (1 или 5 г/л), *n*-алканы C₁₂ или C₁₆ (3 об. %), индивидуальные *n*-алканы C₂₂–C₃₁ или ПАУ (2 г/л). Культивирование родококков в атмосфере пропана проводили на агаризованной минерально-солевой среде “К” в эксикаторах с газовой-воздушной смесью пропан : воздух 1 : 5 при температуре 28 °С в течение 5 сут. В отдельных экспериментах клетки выращивали на среде LBA (Sigma-Aldrich) или агаризованной среде “К” в парах *n*-гексадекана.

В качестве подложек для адгезии клеток использовали 96-луночные полистироловые культуральные микропланшеты, древесные (сосновые) опилки размером 1–3 мм, деревянные бруски размером 2×2×2 см, отходы кукурузных початков Loss Trol XTF с размером частиц ≤0,2 мм и Loss Trol XTC с размером частиц 2–8 мм (“Hodmarket”, Венгрия), куриные перья и кожевенные отходы (Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН, Москва), каталитический волокнистый углерод и керамзит (Институт катализа имени Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск), твердые углеводороды – *n*-алканы C₂₂–C₃₁ и ПАУ. Углеводороды растворяли в ацетонитриле и вносили в 96-луночные полистироловые микропланшеты для получения углеводородного слоя на поверхности лунок после высыхания растворителя. В отдельных экспериментах использовали предметные стекла (ООО “МиниЛаб”, Дятьково). Для модификации физико-химических свойств поверхности использованных органических материалов их обрабатывали *n*-гексадеканом, парафином, силиконовой эмульсией (марка КЭ-30-04) производства ООМП “Ксеросил” (Москва), натуральной олифой на основе подсолнечного (ОАО “Обушки”, Москва) и льняного (АОЗТ “Оливеста”, Москва) масел или *Rhodococcus*-биосурфактантами в избыточных (соотношение материала подложки и модифицирующего агента 1 : 1,5 или 1 : 2,0), умеренных (5–20 вес. %) и низких (0,01–1000 мг/л) количествах.

Определение адгезивной активности родококков. Эксперименты по адгезии проводили в 96-луночных полистироловых культуральных микропланшетах и колбах Эрленмейера. Использовали растущие и нерастущие (отмытые от питательной среды) клетки. Микропланшеты инкубировали при температуре 28 °С, частоте перемешивания 600 об/мин или стационарно в течение 0,3–72,0 ч. Прикрепленные клетки окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового (хч, ООО “АО Реахим”, Москва) при комнатной температуре в течение 20 мин, затем планшеты промывали, краситель экстрагировали смесью ацетон : этанол 1 : 4 по объему (Huber *et al.*, 2001). Интенсивность окрашивания определяли при 630 нм с помощью микропланшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия). Уровень адгезивной активности вычисляли по формулам:

$$C_a(\%) = \frac{C_{\text{кф}}}{C_{\text{общ}}} \cdot 100 \quad (1),$$

$$C_a(\text{КОЕ}/\text{см}^2) = \frac{C_{\text{кф}} \cdot v}{S} \quad (2),$$

где $C_{\text{кф}}$ – концентрация клеток, определенная по калибровочным графикам после окрашивания кристаллическим фиолетовым, КОЕ/мл; $C_{\text{общ}}$ – общее число клеток, КОЕ/мл; v – объем внесенной в лунку жидкости, мл; S – площадь контакта жидкости с лункой, см^2 .

Адгезию родококков в колбах проводили при соотношении подложки и клеточной суспензии 1 : 50 по объему при температуре 28 °С, 130 об/мин либо стационарно в течение 3–10 сут. Процесс адгезии контролировали с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 600 нм. Уровень адгезивной активности вычисляли по формулам:

$$C_a = (C_{\text{исх}} - C_{\text{равн}}) \cdot V / m \quad (3),$$

где C_a – адгезивная активность клеток, мг сухих клеток/г; $C_{\text{исх}}$ – исходная концентрация клеток в суспензии, мг сухих клеток/мл; $C_{\text{равн}}$ – концентрация клеток в суспензии в конце адгезионного процесса, мг сухих клеток/мл; V – объем суспензии, мл; m – масса подложки, г (Медведева и др., 2001);

$$C_a = (\text{ОП}_{600 \text{ исх}} - \text{ОП}_{600 \text{ равн}}) \cdot 100\% / \text{ОП}_{600 \text{ исх}} \quad (4),$$

где $\text{ОП}_{600 \text{ исх}}$ – исходная оптическая плотность суспензии; $\text{ОП}_{600 \text{ равн}}$ – оптическая плотность суспензии в конце адгезионного процесса (Ившина и др., 2002).

Физико-химические методы. Степень гидрофобности и относительный заряд бактериальных клеток определяли с использованием методов микробной адгезии к растворителям (Microbial Adhesion to Solvents – MATS), микробной адгезии к углеводородам (Microbial Adhesion to Hydrocarbons – MATH) и солевой агрегации (Salt Aggregation Test – SAT). Дзета-потенциал измеряли методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Для оценки степени шероховатости подложек определяли показатель сорбционной влажности – количество адсорбированных паров воды при 100% влажности, комнатной температуре в течение 7 сут (Подорожко и др., 2007). Гидрофобные свойства подложек оценивали по показателю водопоглощающей способности, степени адсорбции *n*-гексадекана и расположению подложки в двухфазной системе *n*-гексадекан/вода.

Биохимические методы. Количество общих липидов в бактериальных клетках определяли гравиметрическим (весовым) методом (Ившина, 2014). Количество свободных миколовых кислот оценивали с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 495 нм после разрушения клеток смесью метанол : толуол : концентрированная серная кислота 25 : 25 : 1 по объему, экстракции *n*-гексаном и окрашивания карболовым фуксином Циля (Khanuja *et al.*, 2004). О продукции гликолипидных биосурфактантов судили по показателю эмульгирующей активности клеток (Коронелли, Юферова, 1990). Для определения количественного содержания

биосурфактантов в культуральной жидкости использовали гравиметрический метод анализа. О степени вовлеченности поверхностных белков в адгезионный процесс судили по изменению адгезивной активности родококков после их инкубации в присутствии 0,2 мкг/мл протеиназы К в течение 3 ч (Николаев, Паников, 2002) и в экспериментах с ингибиторами синтеза белка – эритромицином и олеандомицином, которые вносили в среду LB в концентрации 0,4–12,5 мкг/мл.

Световая и электронная микроскопия. Морфологические особенности родококков исследовали при помощи светового тринокулярного микроскопа AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия) и лицензионного программного обеспечения “Видео Тест-Размер 5.0” (ВидеоТест, Санкт-Петербург). Наблюдения проводили в режиме фазового контраста при увеличении $\times 1000$. Электронно-микроскопические исследования проводили на базе университета Напиер (Эдинбург, Великобритания). С помощью напылителя Polaron E5100 Series 2 (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) на образцы подложек с закрепленными клетками наносили тонкий слой золота и затем сканировали с помощью микроскопа Cambridge S90 (Cambridge Instruments, Великобритания) в вакууме при напряжении 10 кВ.

Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Особенности микрорельефа клеточной поверхности родококков исследовали с помощью атомно-силового микроскопа MFP-3D-BIO™ (Asylum Research, США). Клетки закрепляли на покровных стеклах, предварительно обработанных 0,2% р-ром полилизина (Sigma-Aldrich). АСМ-сканирование проводили в водной среде в режиме постоянного контакта зонда кантилевера с образцом. Использовали кантилеверы TR400PB (Olympus Corporation, Япония) с техническими характеристиками: материал – силиконнитрид, покрытие золотом, коэффициент жесткости 0,09 Н/м, радиус кривизны иглы 42 нм, резонансная частота 32 кГц, форма зонда пирамидальная. В отдельных экспериментах кантилевер модифицировали путем погружения в препарат *Rhodococcus*-биосурфактантов. При сканировании выбирали площадь 10×10 мкм, затем выделяли область с одиночной клеткой и сканировали с максимальным разрешением 32×32 пикселя. После получения топографической карты выбранную одиночную клетку сканировали в режиме силовых измерений для получения карт распределения сил адгезии и модуля упругости на клеточной поверхности. На каждом микропрепарате анализировали не менее 6 одиночных клеток. Для обработки АСМ-изображений и совмещения топографических и силовых карт клеточной поверхности родококков использовали пакет программ IgorPro 6.22A (WaveMetrics, США).

Для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) клетки обрабатывали красителем LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и сканировали с помощью микроскопа Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Япония) с использованием 100 х иммерсионного объектива (числовая апертура 1,4). Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). Живые клетки флуоресцировали зеленым цветом, мертвые клетки имели ярко-красную флуоресценцию.

Для совмещения АСМ- и КЛСМ-изображений последние импортировали в программное обеспечение АСМ и проводили сканирование нужной области препарата на воздухе в полуконтактном режиме с частотой 0,2 Гц. Использовали кремниевые кантилеверы AC240TS (Olympus Corporation, Япония) без покрытия с резонансной частотой 50–90 кГц, константой жесткости 0,5–4,4 Н/м и радиусом кривизны зонда 9 нм.

Интерференционная микроскопия. Расположение бактериальных клеток и профили поверхности подложек исследовали с помощью профилометра-интерферометра высокого разрешения New View 5000 (Zygo, США) на базе лаборатории физических основ прочности “Института механики сплошных сред Уральского отделения РАН” – филиала

Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН (зав. лаб., д.ф.-м.н., профессор О.Б. Наймарк). Данный метод требует использования гладких поверхностей с низким перепадом высот. В связи с этим в качестве подложек использовали тщательно отшлифованные деревянные бруски и предметные стекла. Образцы помещали на предметный столик микроскопа и проводили сканирование путем последовательного вертикального перемещения объектива микроскопа с шагом 75 нм. В качестве источника света использовали галогеновую лампу белого света на 50 Вт. Увеличение при сканировании с применением цифрового зума составляло $\times 2000$ – $\times 4000$. Изображения обрабатывали с помощью программы MetroPro (Zygo, США).

Метод краевых углов смачивания. Компоненты свободной поверхностной энергии γ^{AB} и γ^{LW} и изменение свободной энергии адгезии $\Delta G_{адг}$ определяли по значениям краевых углов смачивания бактериального газона и поверхности подложек дистиллированной водой или *n*-гексадеканом. Углы измеряли методом неподвижной капли (Carniello *et al.*, 2018).

Инфракрасная термография и прецизионная термометрия с платиновыми термометрами сопротивления. Эксперименты по измерению температурных показателей в процессе адгезии родококков проводили совместно с коллегами из лаборатории физических основ прочности “Института механики сплошных сред Уральского отделения РАН” – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН (зав. лаборатории, д.ф.-м.н., профессор О.Б. Наймарк) с использованием высокочувствительной инфракрасной камеры FLIR[®] SC5000 (FLIR[®] Systems, Inc., США) со следующими характеристиками: спектр детектируемых длин волн 3–5 мкм, разрешение 320×256 пикселей, пространственное разрешение 10^{-4} м, чувствительность 0,025 °С при температуре окружающей среды 25 °С. С помощью камеры определяли температуру на поверхности подложек с прикрепленными клетками и без них. Динамику адгезии родококков изучали методом совмещенной инфракрасной термографии и прецизионной термометрии в 96-луночных полистироловых микропланшетах. Микропланшеты с клетками и погруженными в клеточную суспензию платиновыми термометрами сопротивления PR100 (размер 1,2×1,7 мм, сопротивление 100 Ом при 0 °С, диапазон измеряемых температур 0–150 °С) помещали под объектив инфракрасной камеры, съемку осуществляли в течение 80 мин, время экспозиции составляло 2000–2100 мкс, частота 25–380 Гц. Для устранения влияния тепловых эффектов, вызванных метаболическими процессами, использовали нерастущие клетки.

Сигналы с инфракрасной камеры и платиновых термометров сопротивления PR100 обрабатывали с помощью программ Altair (FLIR Systems, Нидерланды) и MathCad 15.0 (Parametric Technology Corporation, США) и пакета программ LabVIEW (National Instruments, США). Тепловую мощность рассчитывали по следующей формуле:

$$Q(t) = mc \frac{\partial \theta(t)}{\partial t} + \beta V \theta(t) \quad (5),$$

где $Q(t)$ – тепловая мощность, Вт; t – время, с; m – вес жидкости, внесенной в лунку, $1 \cdot 10^{-4}$ кг; c – удельная теплоемкость воды, 4183 Дж/(кг·К); θ – средняя температура, К; V – объем жидкости в лунке, $1 \cdot 10^{-7}$ м³; β – удельный коэффициент теплопередачи, Вт/(м³·К), который определяли экспериментально по остыванию лунок планшетов (фоновые потери тепла). Тепловую мощность адгезии считали, как разницу между показателями Q в лунках с клетками и в лунках без них. Работу адгезии $Q_{прод}$, Дж, в момент времени t считали, как $Q_{прод} = Q \times t$. Суммарное количество продуцируемого тепла $Q_{общ}$, Дж, вычисляли по площади под графиком изменения $Q_{прод}$ от времени.

Эксперименты проводили в условиях свободного теплообмена клеток с внешней средой. Для оценки степени влияния внешних источников тепла на показатели температуры процесс адгезии родококков моделировали в программной среде ANSYS 12.1

(ANSYS, США, лицензия ANSYS Academic Research Mechanical and CFD № 1064623) в соответствии со следующими уравнениями:

$$\left\{ \begin{array}{l} \rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \lambda \Delta T + Q_{\text{уд}}(x, y, t), \quad 0 < x < x_0, \quad 0 < y < y_0, \quad t > 0, \\ \frac{\partial T}{\partial x} \Big|_{x=x_0} = -\beta(T - T_0), \\ \frac{\partial T}{\partial x} \Big|_{x=0} = -\beta(T - T_0), \\ \frac{\partial T}{\partial y} \Big|_{y=y_0} = -\beta(T - T_0), \\ \frac{\partial T}{\partial y} \Big|_{y=0} = -\beta(T - T_0), \\ T(x, y, 0) = T_0 \end{array} \right. \quad (6),$$

где ρ – плотность воды, 1000 кг/м^3 ; T – экспериментальная температура, К; ΔT – разница между максимальным и минимальным значениями температур на микропланшете, К; $Q_{\text{уд}}$ – удельная тепловая мощность, Дж/м^3 ; x, y – прямоугольные координаты; x_0, y_0 – длина и ширина 96-луночного полистиролового микропланшета соответственно, м; T_0 – температура пустых лунок планшета, К.

Жизнеспособность планктонных и прикрепленных бактериальных клеток определяли специфическим окрашиванием йоднитротетразолием фиолетовым (Sigma-Aldrich) и красителем LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit, а также с помощью высева на твердые питательные среды. Для сравнения резистентности планктонных и прикрепленных клеток к воздействию стрессорных факторов определяли минимальные ингибирующие концентрации солей тяжелых металлов $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, K_2CrO_4 и $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в отношении обоих типов клеток. Выживаемость прикрепленных родококков оценивали (в %) по количеству оставшихся жизнеспособных клеток и их метаболической активности после хранения при температуре $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ без источника углерода и энергии в течение 8 мес.

Эксперименты по биодеградации углеводов проводили в колбах Эрленмейера со 100 мл среды “К” (160 об/мин, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 21 сут) и металлических поддонах с 500 г модельной почвы или 600 г почвы Turkey Yard (Великобритания) (комнатная температура, регулярное рыхление и полив, 35–196 сут). В качестве углеводородных субстратов использовали индивидуальные углеводороды и их смеси, модельную и сырую нефть. Состав модельной нефти: *n*-декан, *n*-ундекан, *n*-додекан, *n*-тетрадекан, *n*-гексадекан, *n*-гептадекан, *n*-нонадекан – 11,90 вес. % каждый, пристан – 3,96 вес. %, нафталин, аценафтен, антрацен, фенантрен – 2,68 вес. % каждый (Walker, Colwell, 1974; Abed *et al.*, 2006). Углеводородные загрязнители вносили в концентрациях от 0,01 до 10 вес. %. В качестве инокулята использовали свободные либо прикрепленные на подложке клетки в концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл среды или г почвы. Остаточные углеводороды анализировали методами гравиметрии и газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Общее содержание ПАУ в почве определяли спектрофотометрически при 254 и 288 нм после экстракции ацетонитрилом (Cloarec *et al.*, 2002). Дыхательную активность бактерий в процессе биодеградации оценивали с помощью респирометра Micro-Охумах (Columbus Instruments, США) с программным обеспечением MicroОхумах V1.6.8.

Геном *R. ruber* ИЭГМ 231 секвенировали в Национальном центре секвенирования Франции “Геноскоп” университета Эври. Геномная последовательность депонирована в базах данных DDBJ/EMBL/GenBank под номерами CCSD01000001–CCSD01000115. Поиск генов, кодирующих потенциальные адгезины, проводили с использованием баз данных MicroScope (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>) и NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Сравнение нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы BLASTn (NCBI).

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трех–восьмикратной повторности, математическую обработку результатов – с использованием программ Microsoft® Excel® 2019 MSO (Microsoft, 2019) и Statistica 13 (TIBCO Software Inc., 2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Адгезия *Rhodococcus* в присутствии углеводов. В присутствии углеводов родококки образуют обособленные многоклеточные агрегаты разной формы и размеров. В богатой питательной среде (LB) и минимальной среде с глюкозой образования подобных скоплений не происходит. В составе клеточных агрегатов, формирующихся в присутствии твердых углеводородных субстратов (например, *n*-гексакозана) обнаруживаются частицы окисляемого субстрата (рисунок 1).

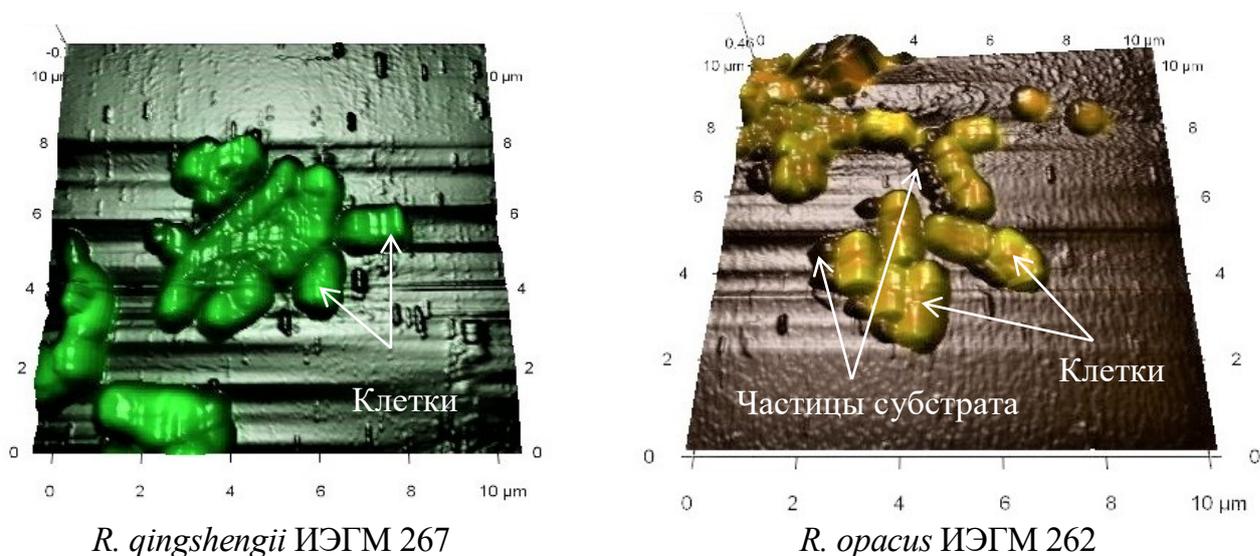


Рисунок 1 – Агрегация родококков в присутствии 2 г/л *n*-гексакозана (совмещенные 3D АСМ/КЛСМ – изображения).

Рост родококков в присутствии углеводов приводит к увеличению в 2–23 раза их адгезивной активности в отношении твердых поверхностей. Как видно из рисунка 2, количество прикрепившихся к полистиролу клеток в питательной среде LB, минеральной среде “К” с *n*-гексадеканом и в атмосфере пропана составляет 3–18, 20–97 и 11–100% соответственно. Исключением являются три штамма *R. jostii* ИЭГМ 32, *R. ruber* ИЭГМ 231 и *R. erythropolis* ИЭГМ 271, которые наиболее активно (58, 68 и 85% соответственно) прикрепляются к полистиролу в среде LB, в присутствии углеводов их адгезивная активность не увеличивается.

Агрегация клеток и их адгезия к твердым поверхностям, инициируемые присутствием углеводов, сопровождаются изменением микрорельефа поверхности родококков. Об этом свидетельствует выявленное с помощью АСМ увеличение в 1,1–2,9 раза степени шероховатости клеток, растущих в присутствии углеводов, по сравнению с клетками, растущими в LB и среде с глюкозой (таблица 1). Изменение поверхностного рельефа родококков документировано также в присутствии экополютантов неуглеводородной природы (например, дртаверина гидрохлорида, Мухутдинова, 2014; дегидроабиетиновой кислоты, Cheremnykh *et al.*, 2018 или диклофенака натрия, Ivshina *et al.*, 2019), и является, очевидно, типичной адаптивной реакцией *Rhodococcus* на присутствие в среде гидрофобных соединений.

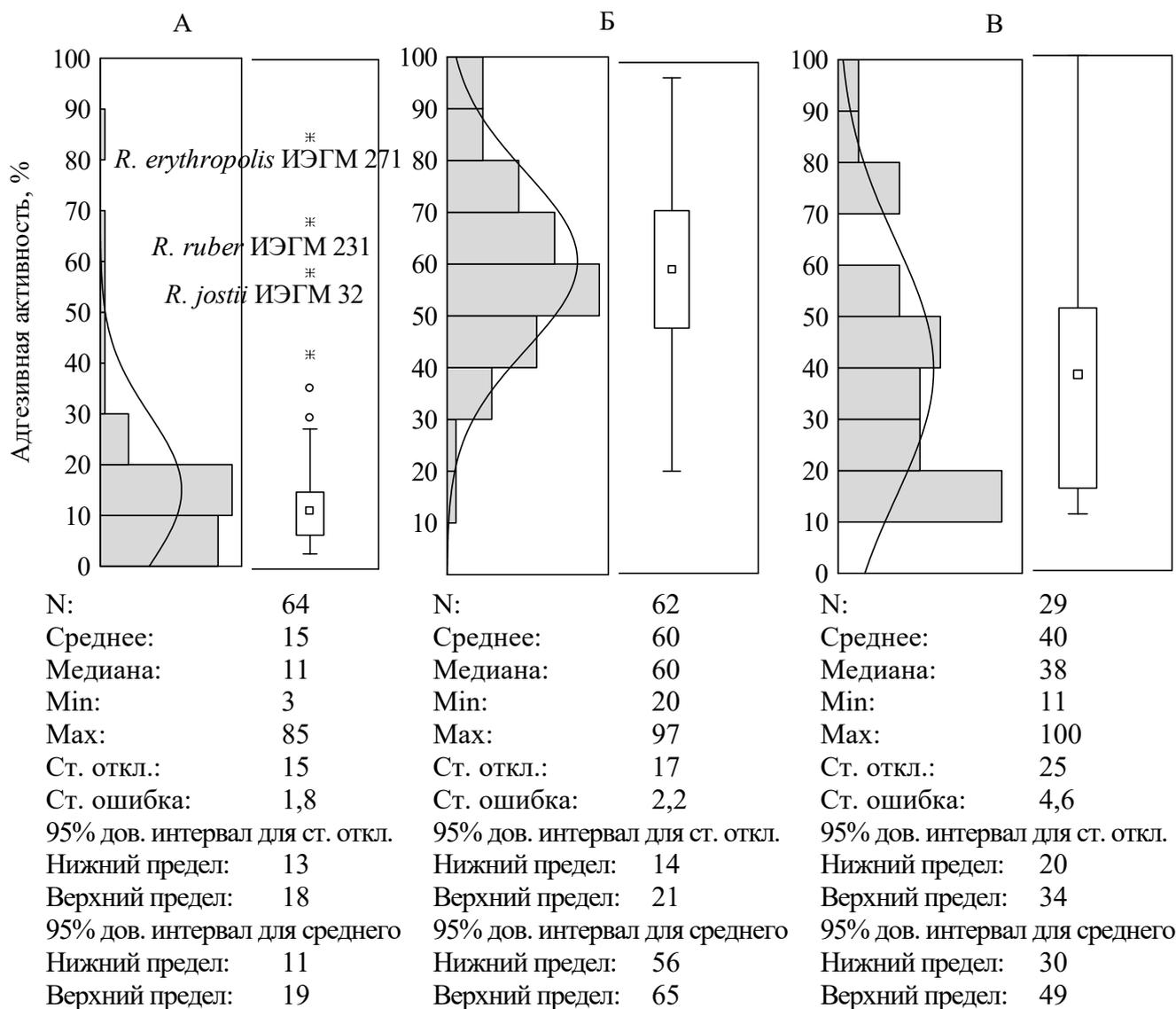


Рисунок 2 – Влияние углеводов на адгезивную активность родококков в отношении полистирола.

Условия культивирования: А – среда LB, Б – 3 об. % *n*-гексадекана, В – пропан : воздух 1 : 5.

Таблица 1 – Изменение микрорельефа клеточной поверхности *Rhodococcus* spp. в зависимости от состава среды культивирования

Штамм	Среда культивирования	Степень шероховатости клеток (R_a), нм
<i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 267	LB	101 ± 10
	3 об. % <i>n</i> -гексадекана	289 ± 12*
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647	LB	142 ± 5
	3 об. % <i>n</i> -гексадекана	160 ± 8*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 346	5 г/л глюкозы	198 ± 2
	3 об. % <i>n</i> -гексадекана	216 ± 6*
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 57	LB	245 ± 80
	Пропан : воздух 1 : 5	443 ± 159*

* Статистически достоверно ($p < 0,05$) от среды без углеводов.

Другим характерным свойством прикрепленных клеток *Rhodococcus*, проявляющемся при культивировании их в средах с жидкими углеводородами, является заметное (на 42%) усиление синтеза гликолипидных биосурфактантов по сравнению со свободными клетками. *Rhodococcus*-биосурфактанты и выросты клеточной поверхности, по-видимому, участвуют в адгезии родококков и являются важными факторами, регулирующими этот процесс.

Выявлена положительная зависимость между адгезивной и углеводородокисляющей активностью штаммов *Rhodococcus* spp. Родококки с повышенной адгезивной активностью в отношении твердых углеводов (*n*-алканы C₂₂–C₃₁, ПАУ) лучше растут в их присутствии. По нашим данным, родококки с высокими ($\geq 40\%$) показателями адгезии к твердым углеводородам характеризуются наиболее высокой (50%) углеводородокисляющей активностью в отношении данных соединений. Для штаммов с низкой (20%) адгезивной активностью клеток в отношении твердых углеводов эффективность биodeградации данных соединений не превышает 15% (таблица 2).

Таблица 2 – Степень адгезивной активности клеток и биodeградации твердых углеводов родококками после 9 сут эксперимента

Штамм	Углеводород	Адгезивная активность, %	Биodeградация, %
<i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 267	<i>n</i> -Гексакозан	20 ± 6	15 ± 2
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 262	<i>n</i> -Гексакозан	70 ± 2	50 ± 6
<i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 267	Антрацен	10 ± 2	5 ± 1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 212	Антрацен	40 ± 15	50 ± 7

Установлено, что биodeградация родококками жидких углеводов зависит от адгезивной активности клеток в отношении твердых поверхностей. Так, выявлена строгая ($R_{\text{Пирсона}}=0,63$, $p=0,00$) корреляция между степенью адгезии родококков к полистиролу и скоростью биodeградации *n*-гексадекана (рисунок 3).

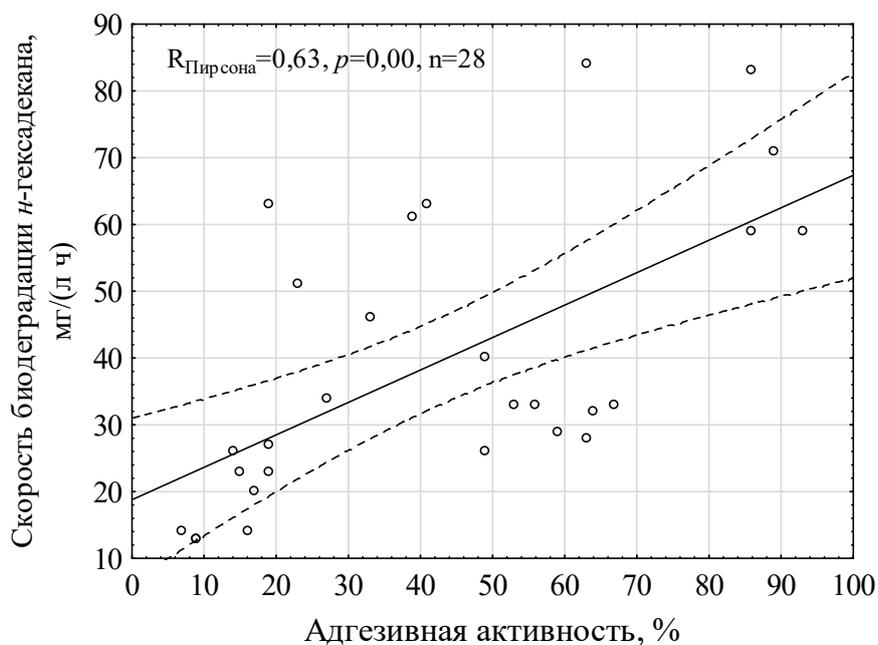


Рисунок 3 – Корреляция между адгезивной активностью *Rhodococcus* spp. в отношении полистирола и скоростью биodeградации *n*-гексадекана.

Приведена линия регрессии с границами доверительного интервала (уровень надежности 95%), точки – экспериментальные значения, n – число исследованных штаммов.

Удельная углеводородокисляющая активность прикрепленных родококков в 3–18 раз превышает таковую планктонных клеток (рисунок 4А). При этом убыль (рисунок 4Б) и скорость биodeградации (рисунок 4В) углеводородов прикрепленными клетками превышают в 2–5 раз либо не отличаются от аналогичных показателей свободных клеток. Эти показатели зависят не только от удельной активности клеток, но и степени адсорбции углеводородов на поверхности подложки (рисунок 4Б), а также от количества прикрепленных клеток и расположения подложки в двухфазной системе *n*-гексадекан/вода. Повышение удельной углеводородокисляющей активности прикрепленных родококков может быть связано с характерной для прикрепленных клеток способностью сохранять метаболическую активность на стабильно высоком уровне в течение длительного (до 400 сут) времени (Ефременко, 2018; Carvalho *et al.*, 2001; Vinage, van Rohr, 2003a,b; Hatzinger *et al.*, 2011; Pannier *et al.*, 2012; An *et al.*, 2018).

Как видно из таблицы 3, прикрепленные клетки сохраняют жизнеспособность и более активно окисляют углеводороды после 8 мес хранения при температуре 4 °С без источника углерода и энергии и последующего восстановления в среде с 3 об. % *n*-гексадекана. Двукратное повышение углеводородокисляющей активности клеток в этом случае может быть связано с усилением метаболизма клеток при переходе от дефицита питательных веществ к их избытку. Этот феномен используется, например, в молекулярной биологии для получения больших количеств РНК и достигается путем переноса клеток с олиготрофной среды в двойной питательный бульон (Handbook of Nucleic Acid., 2008). Еще одним подтверждением высокой жизнеспособности прикрепленных родококков является их повышенная устойчивость к действию токсичных соединений. При определении минимальных подавляющих концентраций солей тяжелых металлов установлено, что эти показатели в 2 раза превышают таковые для свободных клеток (таблица 3). Повышенная жизнеспособность, стрессоустойчивость и сохранение метаболической активности на стабильном уровне в течение длительного времени характерны для прикрепленных клеток и связаны с пространственной компартментализацией и разобщенностью клеток в присутствии подложки, формированием фенотипа толерантности, изменением биохимического состава клеток (Ефременко, 2018).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что адгезия является необходимым пусковым фактором и обязательным условием биodeградации углеводородов родококками. Биологическое значение адгезии состоит в формировании условий для окисления гидрофобного субстрата и защите клеток от токсического действия углеводородов. Адгезированные клетки осуществляют “коллективную” атаку на углеводородный субстрат; образуется “кооперативная клеточная система”, обеспечивающая согласованное функционирование многочисленных ассоциированных клеток. На границе клетка-углеводород образуется многокомпонентная подвижная липофильная мезофаза, функция которой состоит в постепенном растворении и запуске механизма транспорта субстрата в клетку (Тарасова, 2014; Тюмина, 2019; Atrat *et al.*, 1991; Bastiaens *et al.*, 2000; Tarasova *et al.*, 2017). Способность родококков к агрегации и усиленной адгезии отмечена в присутствии *n*-алканов C₈–C₁₆, толуола, органических спиртов, диметилформамида, ароматических кислот и их производных, терпеноидов, антибиотиков (Соляникова и др., 2017; de Carvalho *et al.*, 2004; de Carvalho, da Fonseca, 2007; Corno *et al.*, 2014; Weathers *et al.*, 2015; Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018; Ivshina *et al.*, 2019; Pátek *et al.*, 2021).

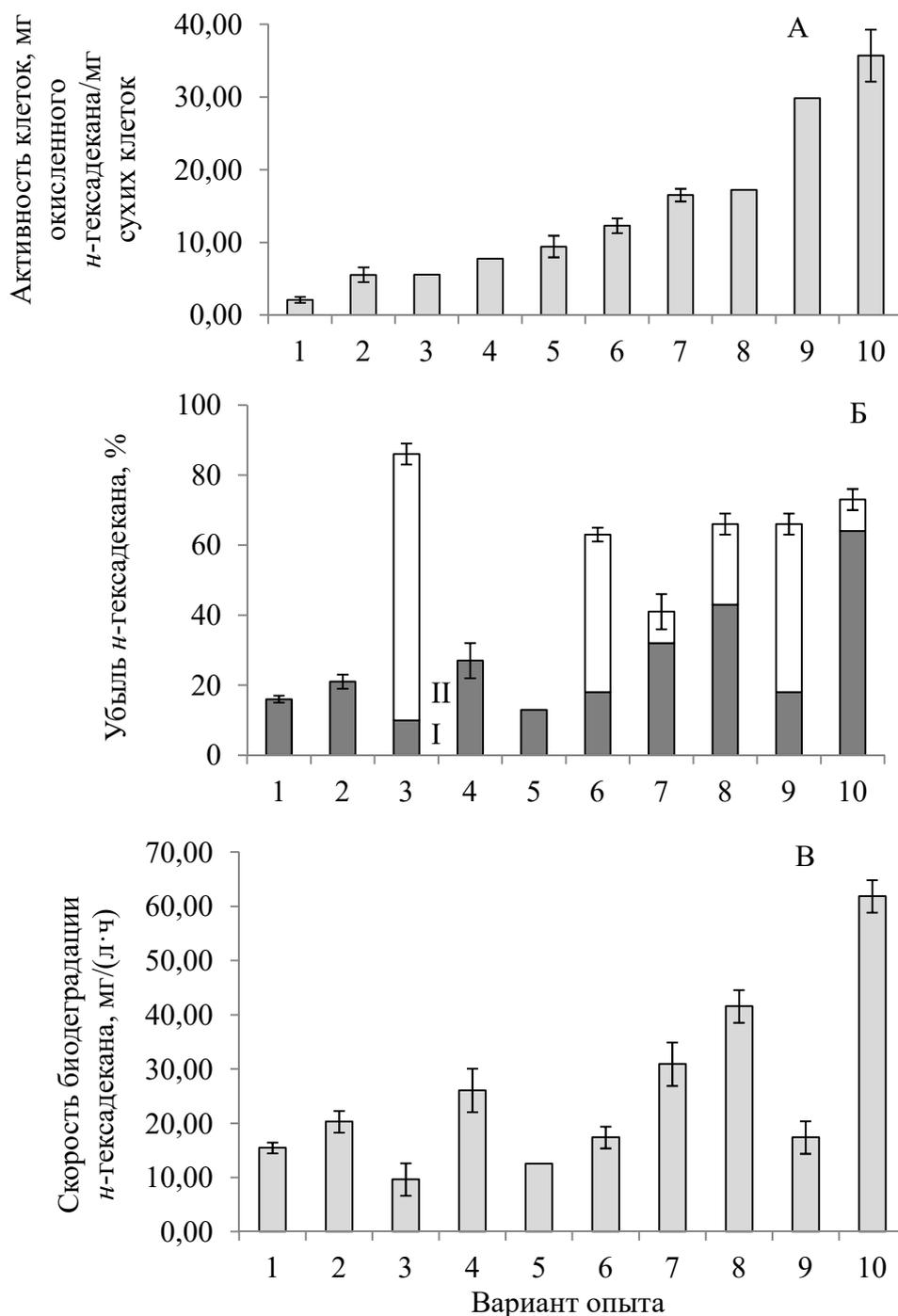


Рисунок 4 – Биодegradация n-гексадекана планктонными и прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 в течение 10 сут.

Оцениваемые параметры: А – удельная активность клеток, Б – убыль n-гексадекана, В – скорость биодegradации n-гексадекана. Варианты опыта: 1 – планктонные клетки, 2–10 – клетки, прикрепленные к подложкам, таким как кожевенные отходы, обработанные 10 вес. % силиконовой эмульсии (2), куриные перья, обработанные 10 вес. % силиконовой эмульсии (3), древесные опилки, обработанные 10 вес. % n-гексадекана (4), кожевенные отходы (5), куриные перья, обработанные 10 вес. % олифы (6), куриные перья (7), древесные опилки (8), древесные опилки, обработанные 10 вес. % олифы (9), древесные опилки, обработанные 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов (10). I – биодegradация, II – адсорбция.

Таблица 3 – Сохранение метаболической активности и жизнеспособности прикрепленных к древесным опилкам клеток *R. ruber* ИЭГМ 231

Параметр	До хранения	После 8 мес хранения при +4 °С без источника углерода
Угледородородокисляющая активность, % окисленного <i>n</i> -гексадекана	36 ± 4	88 ± 10
Число жизнеспособных клеток, ×10 ⁷ КОЕ/см ²	8,9 ± 0,9	9,4 ± 0,6
Устойчивость к ZnSO ₄ и K ₂ CrO ₄ , мМ*:		
прикрепленные клетки	20	Нет данных
планктонные клетки	10	Нет данных

*Приведены значения минимальных ингибирующих концентраций.

Биофизические особенности адгезии родококков. Установлено, что адгезивная активность родококков строго коррелирует ($R_{\text{Пирсона}}=0,93$, $p=0,00$) со степенью шероховатости клеток (рисунок 5). Так, клетки с высокой ($\geq 47\%$) адгезивной активностью обладают развитым рельефом поверхности с множеством специфических придаточных структур в виде шишковидных выростов, гребней, выступов, складок. Показатель $R_{\text{max}}-R_{\text{min}}$ (разница между максимальным и минимальным значениям шероховатости) таких клеток составляет около 793 нм. Родококки с низкой ($<18\%$) адгезивной активностью обладают гладкой клеточной поверхностью, практически без регистрируемых с помощью АСМ многочисленных клеточных выступов. Показатель $R_{\text{max}}-R_{\text{min}}$ для гладких клеток составляет около 260 нм (рисунок 6).

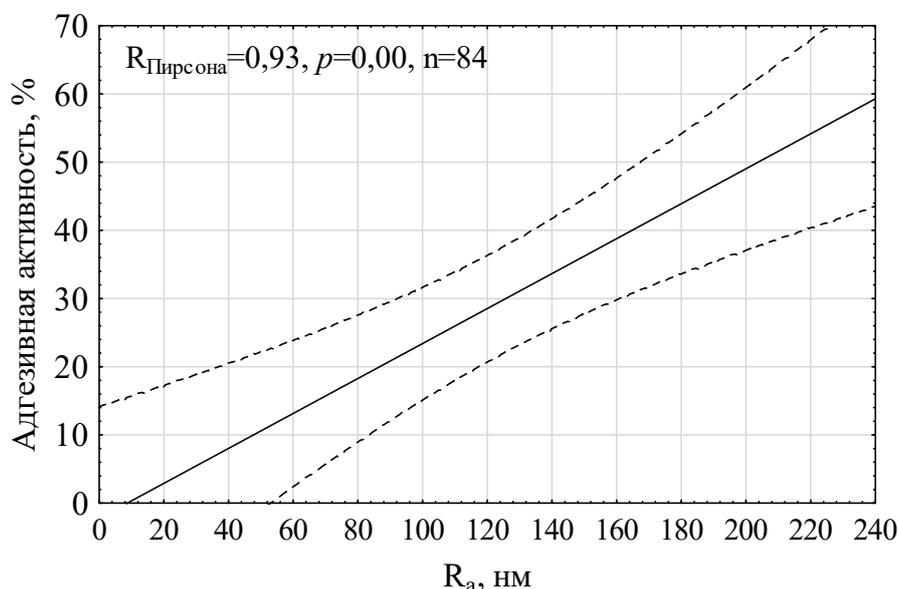


Рисунок 5 – Корреляция между степенью шероховатости клеток и адгезивной активностью *Rhodococcus* spp. в отношении полистирола.

Приведена линия регрессии с границами доверительного интервала (уровень надежности 95%), n – число исследованных штаммов.

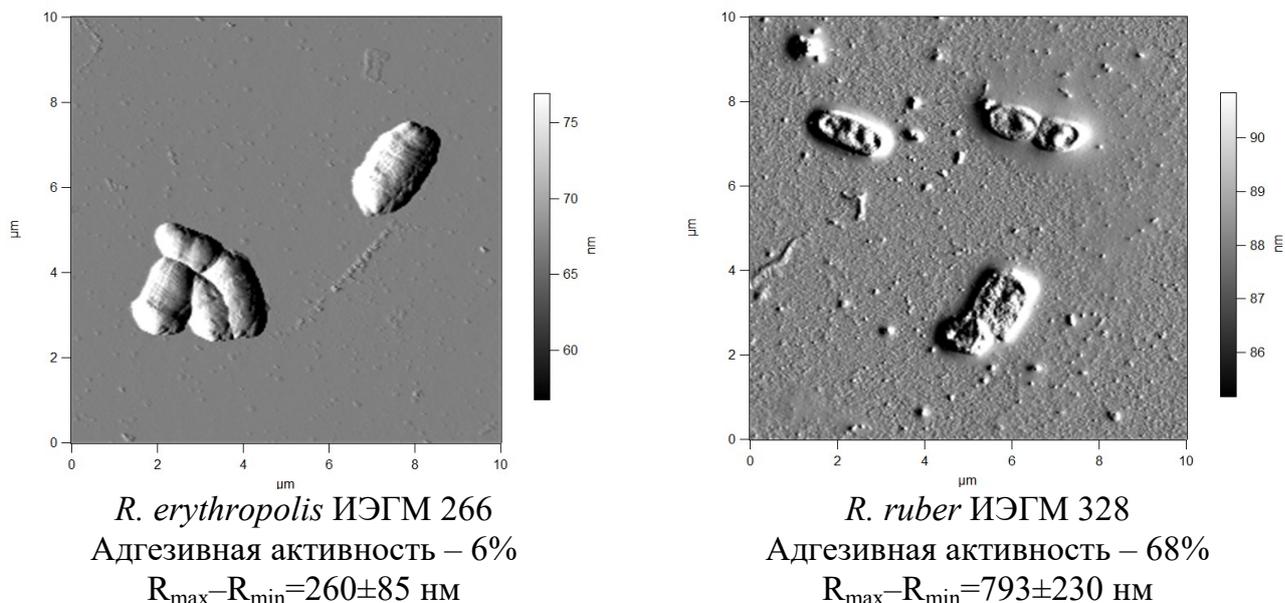


Рисунок 6 – АСМ-изображения клеток *Rhodococcus* с низкой и высокой адгезивной активностью в отношении полистирола.

$R_{\max}-R_{\min}$ – разница между максимальным и минимальным показателями шероховатости, мкм.

С помощью АСМ установлено, что специфические придаточные структуры родококков разных видов обладают повышенной силой адгезии ($F_a > 0,6$ нН) и модулем упругости ($E > 6,0$ МПа) по сравнению с основной частью клеточной стенки (рисунок 7). Положительная корреляция между F_a , E и степенью шероховатости (R_a) отдельных участков клеточной поверхности подтверждается статистически достоверными значениями коэффициентов корреляции – 0,9 при $p=0,01$ для F_a и R_a и 0,5 при $p=0,04$ для E и R_a соответственно. Полученные данные свидетельствуют об особенностях химического состава клеточных выступов и приуроченности к ним возможных адгезинов. Высокая упругость поверхностных придаточных структур (шишковидных выростов) может быть объяснена повышенным содержанием и высокой плотностью входящего в их состав материала клеточной стенки. Это показано М. Salerno с соавт. (2010) на примере заполнения пор агарозных пластин полилизинном – в местах нанесения полипептида обнаруживается уплотнение полисахаридной основы, что сопровождается увеличением модуля упругости в 1,5–2,0 раза.

Предполагается, что в поверхностных придаточных структурах родококков располагаются адгезивные молекулы липидной природы. По данным литературы, сила адгезии зонда АСМ к белкам и полисахаридам колеблется от 0,040 до 2,500 нН (Wright, Armstrong, 2006; Salerno *et al.*, 2010), сила адгезии зонда к липидам (в частности, анионному липидному бислою и миколовым кислотам) в 6 раз превышает силу адгезии к белкам и полилизину (Choi, Dimitriadis, 2004) и составляет порядка 3 нН (Dorobantu *et al.*, 2009). В наших экспериментах медиана F_a подложки (покровные стекла с полилизинном) составляет 0,785 нН, сила адгезии зонда АСМ к придаточным структурам в 2–10 раз превышает таковую к подложке, что, как мы предполагаем, подтверждает присутствие в них липидных компонентов. Адгезивные свойства придаточных структур могут быть обусловлены не только присутствием в них липидов и их высокой силой адгезии. Поверхностные выросты обладают небольшой, по сравнению с целой клеткой, площадью, а значение свободной поверхностной энергии γ зависит от площади поверхности: чем она меньше, тем меньше значение γ , тем легче таким структурам преодолеть энергетический

барьер при сближении с поверхностью подложки (Hori, Matsumoto, 2010; Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018).

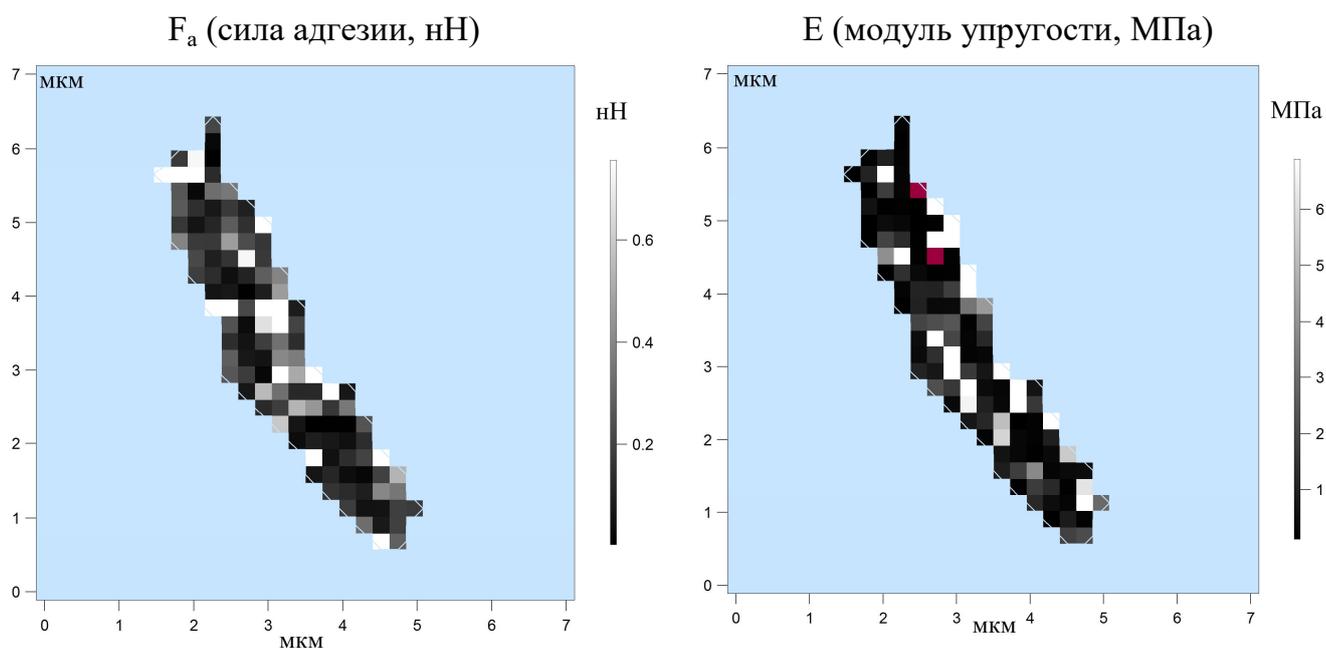


Рисунок 7 – Карты распределения сил адгезии зонда АСМ и модуля упругости на поверхности единичной клетки *R. opacus* ИЭГМ 57.

Участки с $F_a > 0,6$ нН и $E > 6,0$ МПа соответствуют специфическим придаточным структурам клеточной стенки.

Способ закрепления клеток за счет характерных выростов, содержащих молекулы адгезии, относится к новому, ранее не описанному механизму адгезии родококков. Влияние рельефа поверхности клеток на адгезивные свойства бактерий исследовано лишь в отношении специализированных структур – жгутиков, пилей, тяжей ЭПС, адгезивных структур *Caulobacter crescentus*, *Acinetobacter* sp. Tol 5, архей (Ishii *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Słotwińska, 2013; Pen *et al.*, 2015; Chaudhury *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2020). У родококков отсутствуют жгутики, присутствие пилей, полученных в результате горизонтального переноса генов от грамотрицательных бактерий, подтверждено лишь у патогенного вида *R. equi* (Letek *et al.*, 2010). Специфические придаточные цитоадгезивные структуры могут обеспечивать взаимодействие родококков с твердыми субстратами для их окисления, колонизацию абиотических поверхностей, образование агрегатов для защиты клеток от токсикантов и коллективной атаки на труднодоступные субстраты, а также прочное сцепление клеток друг с другом в результате их конъюгации.

При изучении макрорельефа поверхности подложек подтверждено влияние этого параметра на процесс бактериальной адгезии. Показано, что к материалам с высокой (показатель сорбционной влажности $\geq 0,23$ г H_2O /г) степенью шероховатости, например, к древесным опилкам, нативным и обработанным модифицирующими агентами в концентрации 5–20 вес. %, прикрепляется от 40 до 93% родококков. К материалам с низкой (показатель сорбционной влажности $\leq 0,12$ г H_2O /г) степенью шероховатости, например, на основе отходов кукурузных початков и обработанных избыточным (1:1,5, 1:2,0) количеством олифы древесным опилкам, прикрепляется лишь не более 19% клеток. Сглаживание рельефа поверхности при использовании избытка поверхностно-модифицирующих агентов может влиять на гидродинамические условия адгезии. Так, опилки представляют собой совокупность открытых полых смежных трубок – остатков

трахеид диаметром около 50 мкм, внутрь которых могут попадать бактериальные клетки и задерживаться там за счет капиллярных явлений и сил поверхностного натяжения.

Использование различных модифицирующих агентов в низких и умеренных (<20 вес. %) количествах не влияет на макрорельеф поверхности подложки, однако приводит к изменению профиля поверхности на микроуровне (масштаб, сопоставимый с размерами бактериальных клеток) и обуславливает характер расположения бактерий. Как видно из рисунка 8, *Rhodococcus*-биосурфактанты наиболее равномерно распределяются по поверхности подложки, заполняя при этом все ее неровности, что способствует формированию поверхности, характеризующейся показателями шероховатости, аналогичными с таковыми стекла. Олифа менее равномерно покрывает поверхность подложки, оставляя незаполненные участки шириной от 0,1 до 0,5 мкм. При использовании *n*-гексадекана формируются пленки с разрывами $\geq 1,0$ мкм (рисунок 8).

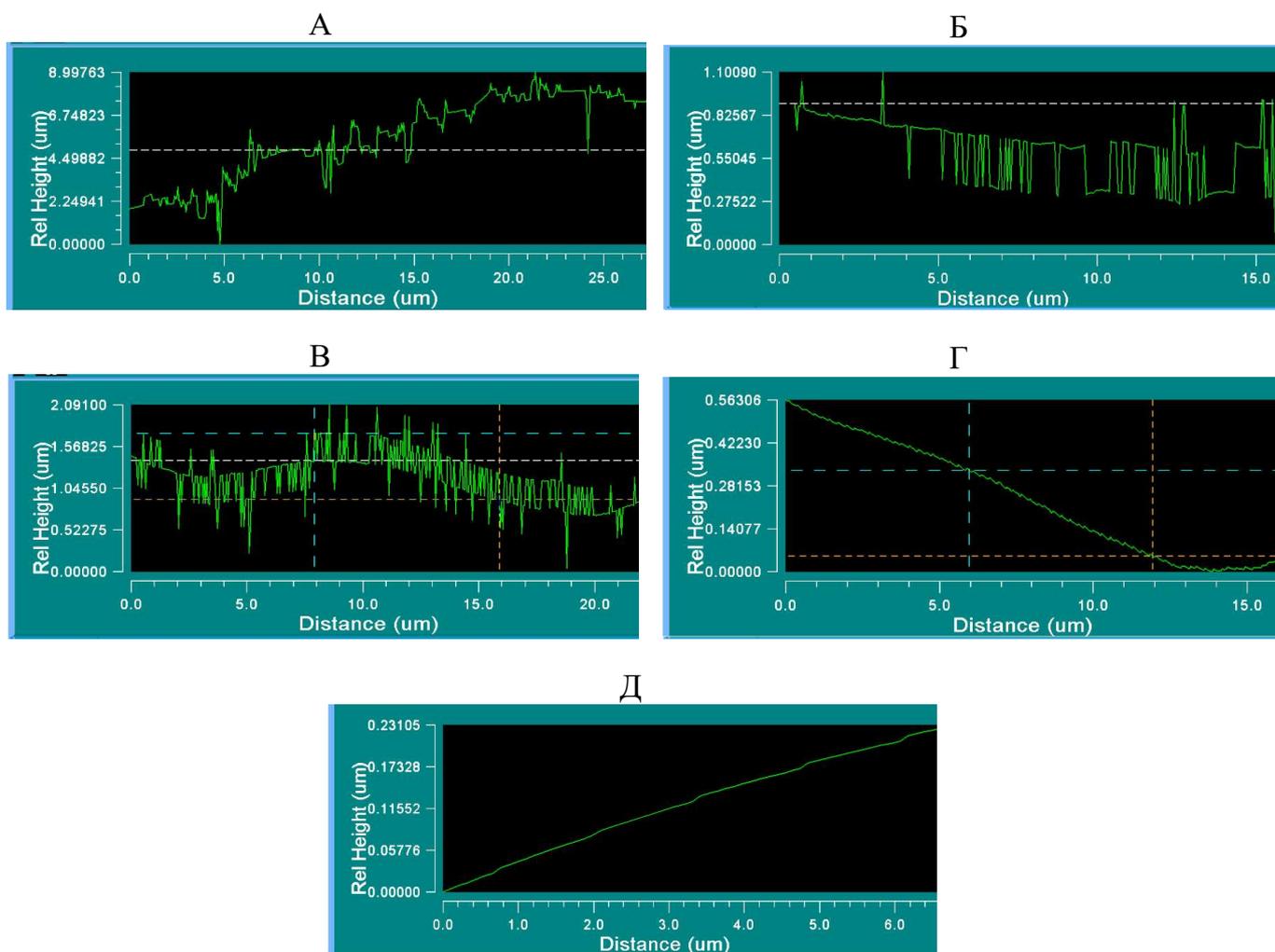


Рисунок 8 – Профили поверхности подложек, полученные с помощью интерференционной микроскопии.

Материал подложки + модифицирующий агент: А – древесные опилки без модификации, Б – древесные опилки + 10 вес. % *n*-гексадекана, В – древесные опилки + 10 вес. % олифы, Г – древесные опилки + 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов, Д – предметное стекло.

Такие же пленки образуются при использовании силиконовой эмульсии или парафина. Установлено, что *n*-гексадекан, силиконовая эмульсия или парафин располагаются на поверхности подложек в виде гидрофобных капель. Клетки *Rhodococcus* закрепляются на этих каплях в виде небольших ассоциаций, которые обнаруживаются в интерференционном микроскопе. В составе таких скоплений обычно от 60 до 80 клеток, которые располагаются достаточно плотно на расстоянии 0,2–1,0 мкм друг от друга. На

необработанных и покрытых 10–20 вес. % олифы или 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов подложках родококки располагаются в виде равномерной, практически монослойной биопленки, достаточно свободно друг от друга на расстоянии от 0,5 до 2,0 мкм (рисунок 9).

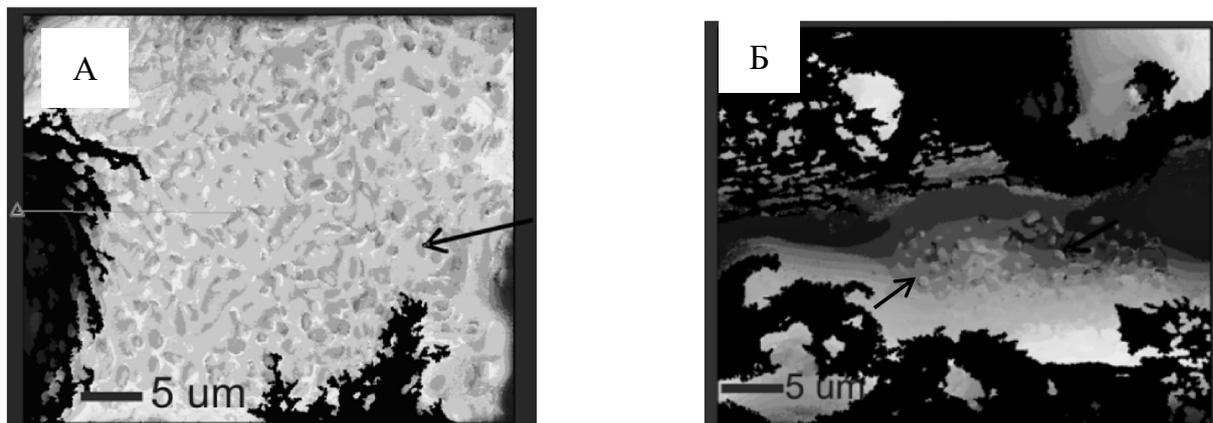


Рисунок 9 – Изображения подложек с прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 в интерференционном микроскопе.

Материал подложки + модифицирующий агент: А – древесные опилки + 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов, Б – древесные опилки + 10 вес. % *n*-гексадекана. Стрелками показаны бактериальные клетки.

Известно, что физико-химические взаимодействия (электростатические, гидрофобные, ван дер Ваальсовы, броуновское движение) обуславливают сближение бактерий с подложкой, их первичном (обычно обратимом) контакте и удержании клеток у поверхности подложки. В литературе этот процесс называется *docking* (анг. “постановка в док” или “стыковка”). Далее молекулярные факторы клеток обеспечивают необратимую адгезию и многоточечное связывание с поверхностью подложки. Этот процесс называется *anchoring* (“заякоривание”) (Серегина и др., 2008). Отмечается как положительная корреляция между адгезивной активностью клеток и гидрофобными свойствами клеток и подложки (Серегина и др., 2008; Chen *et al.*, 2003), так и отсутствие таких зависимостей, что связывают с влиянием на процесс адгезии выростов клеток и неровностей абиотических поверхностей (Lehocký *et al.*, 2009; Carniello *et al.*, 2018).

По нашим данным, агрегация родококков зависит от степени гидрофобности и электрокинетического потенциала клеток: клетки с повышенной степенью гидрофобности (0,4–0,8 М по данным метода SAT, ζ -потенциал – -16 ± 3 мВ) образуют в 2,5 раза более крупные агрегаты, чем клетки с более низкой степенью гидрофобности (1,0–1,4 М по данным метода SAT, ζ -потенциал – -27 ± 4 мВ) (таблица 4). Строгой корреляции между адгезивной активностью родококков в отношении твердых поверхностей и гидрофобными свойствами клеток и подложек не выявлено, что, по-видимому, связано с сильным влиянием рельефа подложек. Коэффициенты корреляции между показателями адгезии родококков к подложкам и такими параметрами, как адгезия клеток к MATS-субстратам, водопоглощающая способность подложек, адсорбция подложками *n*-гексадекана, растворимость в воде и коэффициент гидрофобности $\log P_{O/W}$ твердых углеводов, статистически недостоверны – $R \leq 0,7$ при $p \geq 0,05$. В таблице 5 приведены показатели адгезии двух штаммов (*R. erythropolis* ИЭГМ 212 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 64) к твердым углеводородам. Клетки штамма ИЭГМ 212 – гидрофильные (по данным МАТН-теста, степень гидрофобности 19%; по данным теста SAT – 1,4 М, ζ -потенциал – -34 мВ), при этом они в 2–6 раз лучше прикрепляются к твердым углеводородам, чем гидрофобные (по данным МАТН-теста, степень гидрофобности 97%; по данным теста SAT – 0,2 М, ζ -потенциал – -29 мВ) клетки штамма ИЭГМ 64. Лишь при адгезии родококков к некоторым

твердым углеводородам задокументировано влияние гидрофобных взаимодействий: выявлена корреляция ($R_{\text{Спирмена}}=0,54-0,64, p<0,05$) между адгезивной активностью клеток в отношении углеводородной подложки и степенью гидрофобности клеток, по данным метода MATH или SAT.

Таблица 4 – Агрегация родококков в среде с 3 об. % *n*-гексадекана в зависимости от ζ -потенциала и степени гидрофобности клеток

ζ -потенциал клеток, мВ	Степень гидрофобности клеток, М (NH ₄) ₂ SO ₄	Размеры агрегатов, мкм	Количество штаммов
-16 ± 3	0,4–0,8	50 ± 10	10
-27 ± 4	1,0–1,4	20 ± 5	10

Таблица 5 – Адгезивная активность родококков в отношении твердых углеводородов в зависимости от степени гидрофобности и ζ -потенциала клеток

Показатель	Штамм	<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 212	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 64
	Адгезия к нафталину, ×10 ⁶ КОЕ/см ²		2,8 ± 0,0
Адгезия к <i>n</i> -октакозану, ×10 ⁶ КОЕ/см ²		2,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0
Адгезия к <i>n</i> -нонакозану, ×10 ⁶ КОЕ/см ²		2,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Степень гидрофобности клеток (по данным MATH-теста), %		19 ± 3	97 ± 5
Степень гидрофобности клеток (по данным теста SAT), М (NH ₄) ₂ SO ₄		1,4	0,2
ζ -потенциал клеток, мВ		-34 ± 1	-29 ± 1

Характерной особенностью адгезии *Rhodococcus* spp. является выраженный экзотермический эффект данного процесса. В экспериментах по инфракрасной термографии выявлено заметное (от 0,60 до 3,14 °С) повышение температуры на поверхности подложек после прикрепления к ним родококков (рисунок 10). Рассчитанные термодинамические параметры в 2–1000 раз превышают таковые при адгезии других микроорганизмов и составляют следующие значения: тепловая мощность 0,3·10⁻³–2,7·10⁻³ Вт, работа 4,0·10⁻³–8,2·10⁻³ Дж, суммарный тепловой эффект 0,20–0,53 Дж (таблица 6).

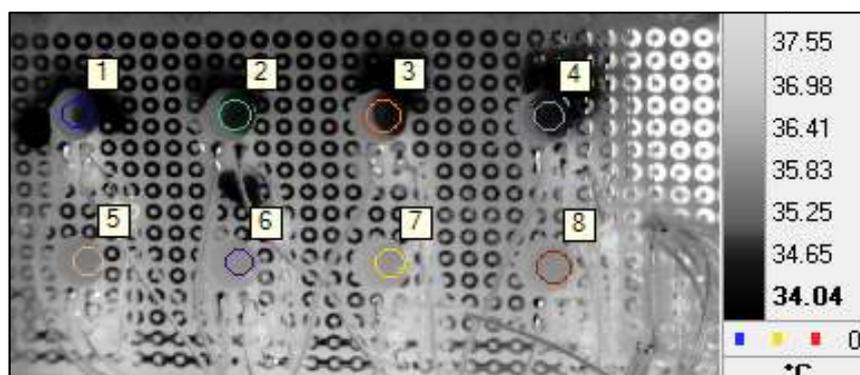


Рисунок 10 – Изображение 96-луночного полистиролового микропланшета с прикрепленными родококками в инфракрасной камере.

Варианты опыта: 1–4 – абиотический контроль (стерильный раствор 0,5% NaCl), 5–8 – суспензия клеток *R. ruber* ИЭГМ 342 в концентрации 1·10⁸ КОЕ/мл. Цветными окружностями показаны области, для которых считали среднюю температуру θ .

Это свидетельствует о прочной необратимой адгезии родококков. Полученные с помощью инфракрасной термографии результаты подтверждаются высокими ($-2,50 \cdot 10^{-3}$ – $-0,19 \cdot 10^{-3}$ Дж/м²) значениями $\Delta G_{\text{адг}}$, которые в $36\text{--}2 \cdot 10^8$ раз превышают таковые, опубликованные в литературе для других бактерий (таблица 6). По данным спектрофотометрии, степень удержания родококков на поверхности подложек составляет $\geq 83\%$, при этом прочно связанные клетки не смываются детергентами и 1М NaCl.

Таблица 6 – Термодинамические параметры адгезии родококков в сравнении с данными литературы

Параметр	Адгезия <i>Rhodococcus</i> spp.	Адгезия других микроорганизмов (по данным литературы)*
Изменение свободной энергии адгезии $\Delta G_{\text{адг}}$, Дж/м ²	$-2,50 \cdot 10^{-3}$ – $-0,19 \cdot 10^{-3}$	$-8 \cdot 10^{-13}$ – $-9 \cdot 10^{-4}$
Тепловая мощность Q, Вт	$0,3 \cdot 10^{-3}$ – $2,7 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-5}$ – $3 \cdot 10^{-5}$
Работа адгезии Q _{прод} , Дж	$4,0 \cdot 10^{-3}$ – $8,2 \cdot 10^{-3}$	Нет данных
Суммарный тепловой эффект Q _{общ} , Дж	0,20–0,53	0,07–0,11

*Приведены данные для *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sanguinis* при адгезии к стеклу, модифицированному индиево-оловянным оксидом стекла, песку (Chen *et al.*, 2003; Hauser-Gerspach *et al.*, 2008; Bayouhd *et al.*, 2009).

Молекулярные факторы, регулирующие адгезию родококков. По нашим данным, основными факторами, регулирующими адгезию родококков в присутствии жидких углеводов, являются поверхностно-активные комплексы на основе гликолипидных биосурфактантов. Адгезивная активность *Rhodococcus* сильно зависит ($R_{\text{Пирсона}}=0,92$, $p=0,03$) от продукции биосурфактантов (рисунок 11).

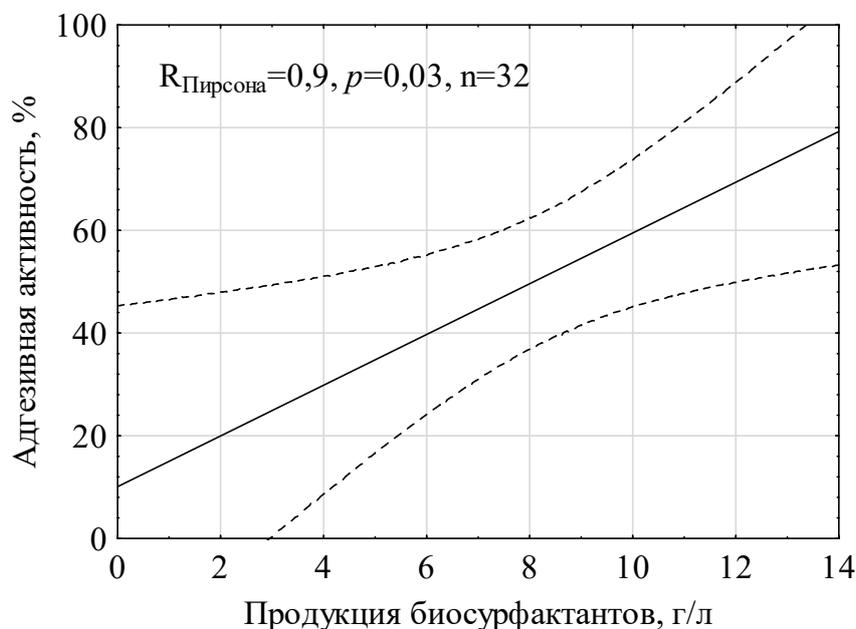


Рисунок 11 – Адгезивная активность родококков в отношении полистирола и продукция клетками гликолипидных биосурфактантов в присутствии 3 об. % *n*-гексадекана.

Приведена линия регрессии с границами доверительного интервала (уровень надежности 95%), n – количество исследованных штаммов.

Получены Tn5-мутанты *R. ruber* ИЭГМ 231, обладающие повышенной (индекс эмульгирования *n*-гексадекана 85, 23 и 18% через 1, 24 и 168 ч соответственно) эмульгирующей активностью по сравнению с родительским штаммом (индекс эмульгирования *n*-гексадекана 67, 15 и 5% через 1, 24 и 168 ч соответственно). Показатели адгезии полученных Tn5-мутантов к полистиролу в 1,5–2,6 раза превышают таковые клеток дикого типа. У Tn5-мутантов с эмульгирующей активностью, сопоставимой с таковой клеток дикого типа, и Tn5-мутантов, не способных к образованию стабильных эмульсий *n*-гексадекана в воде, изменения показателей адгезии не выявлено (таблица 7).

Таблица 7 – Эмульгирующая и адгезивная активности Tn5-мутантов *R. ruber* ИЭГМ 231

Кол-во Tn5-мутантов	Адгезия к полистиролу, %	Индекс эмульгирования <i>n</i> -гексадекана, %		
		1 ч	24 ч	168 ч
15	41–73*	85 ± 2	23 ± 2*	18 ± 2*
81	17–27	65 ± 15	7 ± 1*	5 ± 1
22	18–27	Не образуют стабильные эмульсии**		
Дикий тип	28 ± 2	67 ± 20	15 ± 5	5 ± 2

*Значения статистически достоверно ($p < 0,05$) отличаются от таковых для дикого типа.

**Данные мутанты не образуют эмульсии или образуют эмульсии, стабильные в течение <24 ч.

Сила адгезии *Rhodococcus*-биосурфактантов к твердой подложке составляет $0,495 \pm 0,010$ нН. Контакт биосурфактантов с полистиролом, по-видимому, происходит за счет липофильной части молекул, представляющей собой остатки миколовых кислот. По данным литературы, сила адгезии полимерных частиц к кондиционирующей пленке из миколовых кислот составляет величину порядка 0,750 нН (Geoghegan *et al.*, 2008). Сила адгезии гидрофильных веществ (биополимеров с большим количеством заряженных функциональных групп, например, полисахаридов) к синтетическим полимерам в 20 раз меньше и составляет около 0,040 нН (Wright, Armstrong, 2006).

С помощью АСМ показано, что *Rhodococcus*-биосурфактанты адсорбируются на поверхности подложек с образованием мицеллоподобных структур со средним диаметром 30–50 нм, равномерно распределенных на поверхности либо собранных в тяжи длиной от 0,2 до 2,0 мкм, и крупных, неправильной формы везикул диаметром от 100 до 300 нм (рисунок 12). Характер структур зависит от концентрации *Rhodococcus*-биосурфактантов.

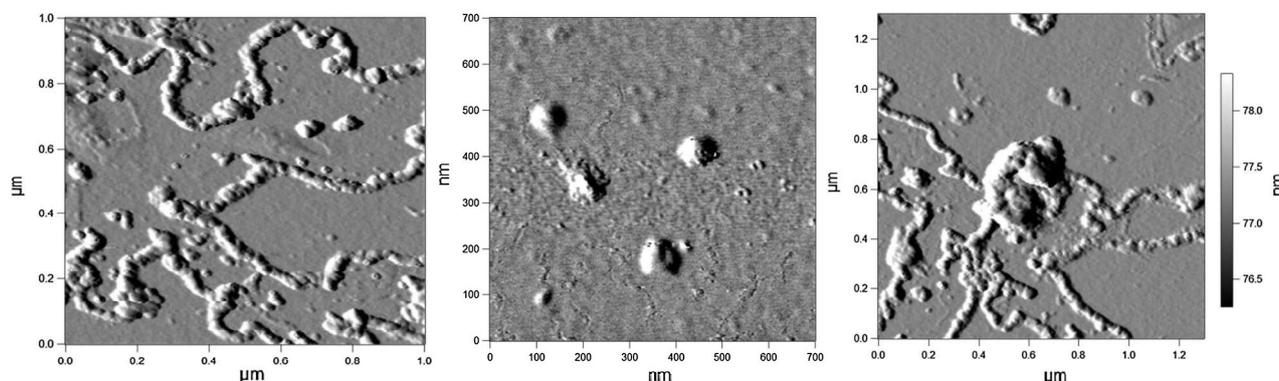


Рисунок 12 – АСМ-изображения поверхности стекла с нанесенными на него *Rhodococcus*-биосурфактантами.

С увеличением количества молекул биосурфактантов на подложке образуется меньше мицелл, начинают преобладать тяжи и затем везикулы. При очень высокой (5 вес. %) концентрации биосурфактантов отдельные структуры на поверхности подложки не обнаруживаются и формируется равномерная кондиционирующая пленка (см. рисунок 8).

При этом присутствие биосурфактантов на твердой поверхности даже в небольших (0,01–1 мг/л) количествах приводит к 2-х–3-хкратному увеличению числа прикрепленных родококков по сравнению с немодифицированной поверхностью (рисунок 13).

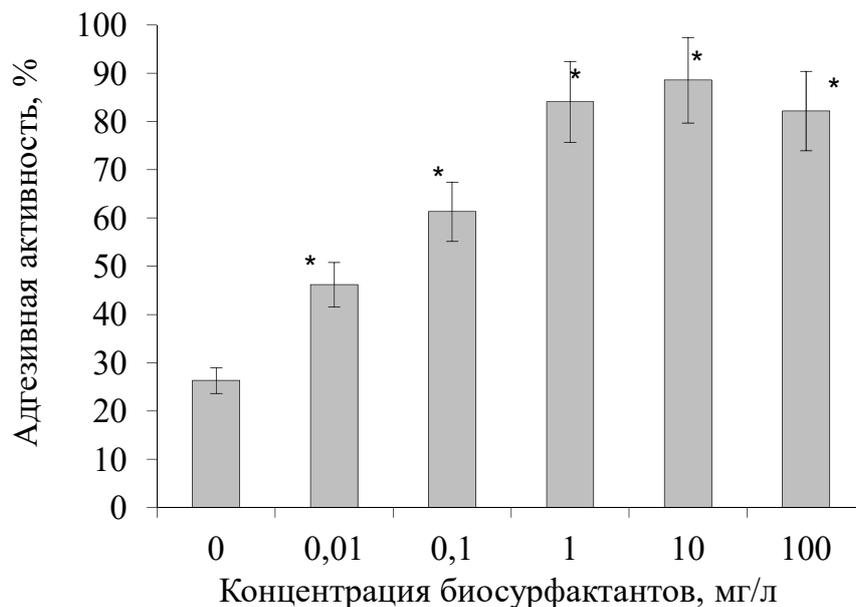


Рисунок 13 – Адгезивная активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 в зависимости от концентрации гликолипидных биосурфактантов на поверхности полистирола.

* Статистически достоверно ($p < 0,05$) от немодифицированного полистирола.

Как видно из рисунка 13, использование биосурфактантных комплексов в концентрации >1 мг/л не сопровождается дальнейшим усилением адгезии, что может быть обусловлено образованием соответствующих тяжей и везикул, заполнением ими доступной площади и отсутствием дополнительных сайтов связывания клеток (Adamczyk *et al.*, 2005).

Другие компоненты, влияющие на адгезивную активность родококков, – неполярные липиды и поверхностные белки. По нашим данным, повышение количества общих клеточных липидов в 2–4 раза приводит к двукратному увеличению степени гидрофобности родококков и инициирует образование ими клеточных агрегатов (таблица 8). Адгезивная активность *Rhodococcus* в отношении твердых поверхностей не зависит от содержания общих липидов. Хотя выявлено незначительное (на 15%) увеличение количества клеток на подложке в присутствии *n*-гексадекана (условия, способствующие синтезу липидных компонентов), эта тенденция не подтверждается при статистическом анализе (таблица 8). Также показано отсутствие ($R_{\text{Спирмена}} = 0,65$, $p = 0,38$) корреляционной зависимости между количеством свободных миколовых кислот и адгезивной активностью родококков в отношении полистирола (таблица 9). Однако, как показано в предыдущих экспериментах, липиды могут концентрироваться в специфических придаточных структурах клеточной стенки родококков и выполнять роль молекул адгезии.

Влияние поверхностных белков на процесс адгезии обнаружено у 18 штаммов родококков. При этом у 14 штаммов белки усиливают (снижение на 11–55% адгезивной активности после инкубации клеток с протеиназой К), а у 4 штаммов препятствуют (увеличение на 22–100% адгезивной активности после инкубации клеток с протеиназой К) адгезии клеток к полистиролу (таблица 10). Результаты экспериментов с протеиназой К подтверждены в опытах по ингибированию синтеза белка. Показано, что предварительное культивирование клеток *R. ruber* ИЭГМ 238 в присутствии 0,4–6,3 мкг/мл эритромицина и 1,6–12,5 мкг/мл олеандомицина приводит к снижению в 2–4 раза их адгезивной активности

Таблица 8 – Агрегация и адгезия родококков к твердым поверхностям в зависимости от содержания клеточных липидов

Штаммы	Условия культивирования	Липиды, мг/г сухих клеток	Степень гидрофобности, М (NH ₄) ₂ SO ₄ *	Агрегация	Адгезия к подложке **, мг сухих клеток/г
<i>R. rhodochrous</i> (4 штамма)	LB	18 ± 4	0,4	–	19,0 ± 3,4
	3 об. % <i>n</i> -гексадекана	72 ± 15***	0,2***	+	22,5 ± 4,8
<i>R. ruber</i> (5 штаммов)	5 г/л глюкозы	434 ± 81	0,8–1,0	–	32,0 ± 5,1
	3 об. % <i>n</i> -гексадекана	708 ± 120***	0,2–0,6***	+	37,5 ± 5,3

* По данным метода SAT. ** В качестве подложки использовали древесные опилки, обработанные 20 вес. % олифы. *** Значения статистически достоверно ($p < 0,05$) отличаются от таковых в средах без углеводов.

Таблица 9 – Содержание миколовых кислот и адгезивная активность родококков

Штамм	ОП _{494 нм} экстрактов миколовых кислот	Адгезивная активность в отношении полистирола, %
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 20	2,079 ± 0,270	56 ± 6
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 185	2,448 ± 0,367	52 ± 6
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 186	2,008 ± 0,241	46 ± 5
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 188	2,567 ± 0,308	78 ± 9
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 212	2,613 ± 0,261	82 ± 7
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 29	2,451 ± 0,294	48 ± 5
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 219	2,460 ± 0,271	44 ± 5
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 325	2,037 ± 0,204	37 ± 3
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 328	2,532 ± 0,279	59 ± 5

Коэффициент корреляции между ОП_{494 нм} и адгезивной активностью клеток $R_{\text{Спирмена}} = 0,65$, $p = 0,38$.

Таблица 10 – Изменение адгезивной активности родококков в отношении полистирола после обработки клеток протеиназой К (0,2 мкг/мл) в течение 3 ч

Адгезивная активность после обработки протеиназой К	Количество штаммов
Не изменяется	36
Снижается на 11–55%	14
Увеличивается на 22–100%	4

Все изменения статистически достоверны при $p < 0,05$.

в отношении полистирола (рисунок 14). Для штамма ИЭГМ 238 отмечено снижение его адгезивной активности после обработки клеток протеиназой К, что подтверждает участие белков в адгезии данного штамма. В отношении штамма *R. ruber* ИЭГМ 328 не выявлено существенного влияния антибиотиков (рисунок 14) и влияния протеиназы К на его адгезивные свойства, что свидетельствует об отсутствии участия поверхностных белков в адгезии данного штамма.

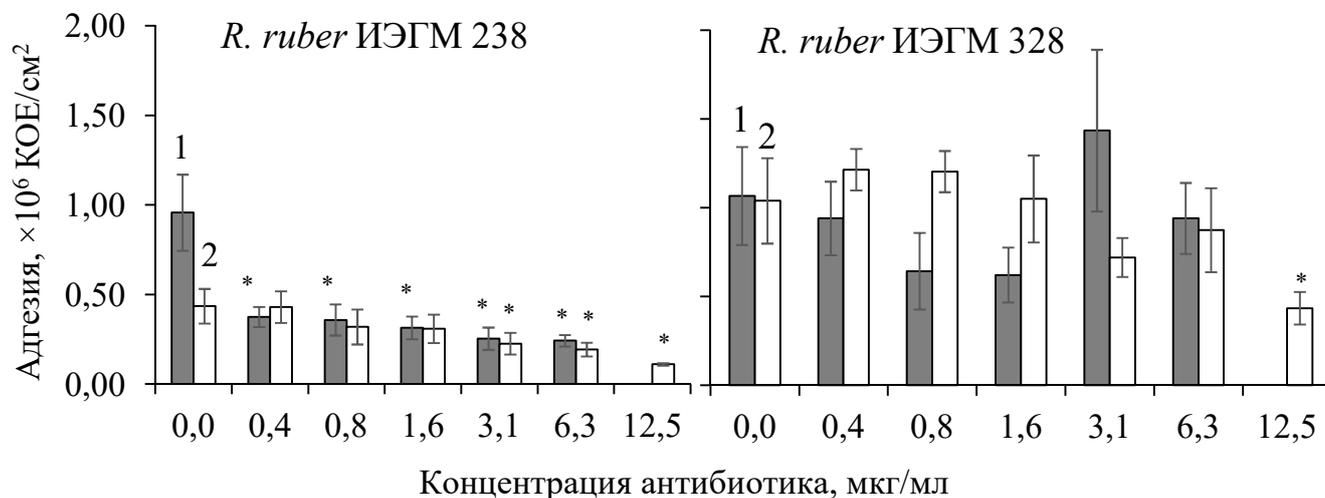


Рисунок 14 – Влияние антибиотиков – ингибиторов белкового синтеза на адгезивную активность родококков в отношении полистирола.

Варианты опыта: 1 – эритромицин, 2 – олеандомицин. * Статистически достоверно ($p < 0,05$) от контроля (среда без антибиотиков). В экспериментах использовали нерастущие клетки в концентрации $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

В исследованиях Т. Мøretro с соавт. (2015) обработка родококков с помощью протеиназы К приводила к снижению их способности агрегировать с клетками *Acinetobacter calcoaceticus*, при этом не все исследованные штаммы были чувствительны к этой процедуре. Степень участия поверхностных белков в адгезии родококков, по-видимому, является штаммовым признаком.

При анализе полногеномной последовательности *R. ruber* ИЭГМ 231 обнаружено 20 кодирующих последовательностей длиной от 281 до 9396 п.н., имеющих 64–99% сходства с генами, кодирующими предполагаемые адгезины у других актинобактерий (*Actinomyces oris*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Mycobacterium* spp., *Mycolicibacterium fortuitum*, *Streptomyces* spp., *R. qingshengii*, *R. ruber*). Среди предполагаемых адгезинов найдены белки с консервативными доменами AidA и MSCRAMM_SdrC и доменами аутотранспортных адгезинов MisL и BigA, ламининсвязывающий белок – малатсинтаза GlcB, шаперон DnaK, шаперонин GroEL, гепаринсвязывающий гемагглютинин HbhA. Наибольшее сходство обнаружено между геном микобактинсинтетазы В (номер гена RHRU231v1_750149) *R. ruber* ИЭГМ 231 и геном нерибосомного пептид-синтезирующего белка с консервативным доменом AidA штамма *R. ruber* SD3 (gene ID 61543227 в базе данных NCBI Gene). Также в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 обнаружено два гена, кодирующих дигидролипоамиддегидрогеназы Lpd и AcoD. Белок Lpd обладает 100%-ным сходством с документированным адгезином родококков – титансвязывающей дигидролипоамиддегидрогеназой TiBP *R. ruber* GIN1 (Siegmann *et al.*, 2009). Ген *lpd* есть у всех представителей *R. ruber*, однако штаммы этого вида обладают разной адгезивной активностью, поэтому белок Lpd/TiBP не следует рассматривать в качестве одного из основных факторов адгезии родококков. Следует отметить, что продукты всех описанных генов могут потенциально выполнять функции адгезинов.

Разработка метода количественной оценки адгезии *Rhodococcus* и получение работающих прототипов биокатализаторов на основе углеводородокисляющих родококков. Для количественной оценки адгезии родококков разработан метод на основе высокочувствительной инфракрасной термографии. Преимуществами данного метода являются высокая ($0,025\text{ }^{\circ}\text{C}$) чувствительность, отсутствие контакта прибора с образцом во время измерений (сохранение нативных условий), возможность мониторинга адгезионного процесса в режиме реального времени на начальных (в течение первого часа) этапах процесса, простота исполнения, экспрессность (минимальная продолжительность анализа вместе с пробоподготовкой составляет 30 мин).

В качестве референтного метода для оценки достоверности измеряемых с помощью инфракрасной камеры температурных показателей использовали платиновые термометры сопротивления PR100. Установлено, что оба метода детектируют сходный характер изменения температуры в процессе адгезии родококков и одинаковую разницу температур между лунками полистиролового микропланшета с клетками и без них (рисунок 15).

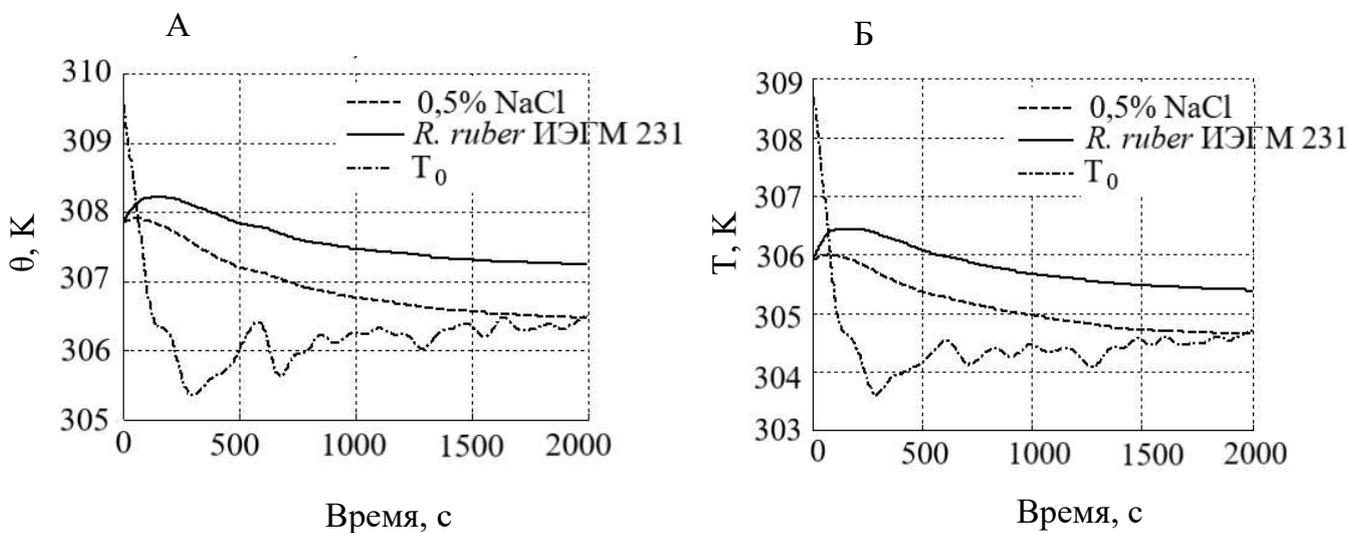


Рисунок 15 – Динамика изменения температуры в 96-луночных полистироловых микропланшетах с клетками *R. ruber* ИЭГМ 342.

Метод детекции тепла: А – инфракрасная термография, Б – прецизионная термометрия с использованием платиновых термометров сопротивления PR100. Условные обозначения: θ – средняя температура в лунке планшета, К; T – экспериментальная температура по данным прецизионной термометрии, К; T_0 – фоновая температура (температура пустых лунок микропланшета), К.

Показано, что при внесении в культуральный планшет бактериальной суспензии в течение первых 100 с происходит повышение температуры на $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ по сравнению с фоновым значением, затем наблюдается ее постепенное снижение. В абиотическом контроле не выявлено заметного увеличения температуры в начале эксперимента, неинокулированные лунки сразу же начинают остывать, и через 35 мин (2000 с) температура достигает фоновых значений. По-видимому, в первые секунды контакта клеток с подложкой процесс адгезии наиболее интенсивный. В этот период свободны все сайты связывания клеток, и к подложке одновременно прикрепляется большое количество клеток, что сопровождается выделением значительных порций энергии (Adamczyk *et al.*, 2005). Это предположение подтверждается данными по изменению тепловой мощности адгезии Q (Вт). Данный показатель максимальный ($1,8 \cdot 10^{-3}$ – $2,7 \cdot 10^{-3}$ Вт) в начальный момент контакта клеток и подложки. Затем величина Q снижается, при этом снижение происходит поэтапно: быстрее в течение первых 100 с и медленнее в течение последующих 400 с. После 500 с тепловая

мощность больше не изменяется, сохраняется на уровне $3 \cdot 10^{-4}$ Вт и, вероятнее всего, регистрируется уже тепловая мощность клеточного метаболизма, а не адгезии.

Разница температур между подложкой с прикрепленными клетками и без них может быть использована для определения типа расположения родококков. Как видно из таблицы 11, максимальные (2,90–3,14 °С) показатели Δt характерны для монослойного расположения клеток, более низкие (1,91–2,29 °С) значения Δt свидетельствуют о расположении клеток в виде скоплений, значения $\Delta t=1,38$ °С не позволяют судить о характере расположения. Величина Δt нелинейно зависит от количества прикрепленных клеток: значение $\Delta t=1,38$ °С обусловлено адгезией $2,1 \cdot 10^7$ КОЕ/см², $\Delta t=1,91$ – $2,29$ °С соответствует адгезии $18,0 \cdot 10^7$ – $19,3 \cdot 10^7$ КОЕ/см², $\Delta t=2,90$ – $3,14$ °С связано с адгезией $9,4 \cdot 10^7$ – $14,0 \cdot 10^7$ КОЕ/см². При измерении температур на подложке в конце адгезионного процесса регистрируется тепло только от метаболических процессов. Внутри скоплений клетки могут испытывать диффузионные затруднения, оказываются более чувствительными к высокой плотности клеток, что отрицательно влияет на их метаболическую активность и приводит к снижению продукции тепла.

Таблица 11 – Приrost температуры, характер расположения и количество прикрепленных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после 5 сут адгезии

Материал подложки + поверхностно- модифицирующий агент	Δt^* , °С	Кол-во прикрепленных клеток, $\times 10^7$ КОЕ/см ²	Расположение клеток
Древесные бруски	$2,90 \pm 0,23$	$9,8 \pm 0,4$	Монослой
Древесные бруски + 20 вес. % олифы	$3,14 \pm 0,35$	$9,4 \pm 0,6$	Монослой
Древесные бруски + 5 вес. % <i>Rhodococcus</i> -биосурфактантов	$2,97 \pm 0,20$	$14,0 \pm 0,6$	Монослой
Древесные бруски + 10 вес. % <i>n</i> -гексадекана	$2,29 \pm 0,22$	$18,0 \pm 0,6$	В виде скоплений клеток
Древесные бруски + 20 вес. % силиконовой эмульсии	$1,91 \pm 0,17$	$19,3 \pm 0,5$	В виде скоплений клеток
Древесные бруски + олифа 1:1,5	$1,38 \pm 0,53$	$2,1 \pm 0,0$	Не применимо

* Δt – разница температур между подложкой с клетками и без клеток.

Нелинейная зависимость термодинамических параметров от количества прикрепленных клеток подтверждается данными по динамике изменения работы адгезии и показателям суммарной тепловой продукции. Число прикрепленных клеток, показатели $Q_{\text{прод}}$ и $Q_{\text{общ}}$ зависят от исходной концентрации клеток в суспензии C_0 . При $C_0=1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл к подложке прикрепляется в 2–4 раза больше клеток родококков, чем при $C_0=1 \cdot 10^8$ и $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Однако $Q_{\text{прод}}$ и $Q_{\text{общ}}$ при $C_0=1 \cdot 10^8$ и $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в 2–3 раза превышают таковые при $C_0=1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Соотношения между числом клеток на подложке и термодинамическими величинами выглядят следующим образом: $Q_{\text{прод}}=7,2 \cdot 10^{-3}$ – $8,2 \cdot 10^{-3}$ Дж и $Q_{\text{общ}}=0,47$ – $0,53$ Дж соответствуют числу прикрепленных клеток $0,3 \cdot 10^7$ – $0,5 \cdot 10^7$ КОЕ/см², $Q_{\text{прод}}=4,0 \cdot 10^{-3}$ Дж и $Q_{\text{общ}}=0,20$ Дж соответствует числу прикрепленных клеток $1,2 \cdot 10^7$ КОЕ/см² (рисунок 16). Более низкие показатели $Q_{\text{прод}}$ и $Q_{\text{общ}}$ при адгезии родококков из концентрированной ($C_0=1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл) суспензии могут быть связаны с образованием клеточных агрегатов и их менее выраженной адгезией (Toda *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2015). Динамика работы адгезии наиболее точно отражает траекторию изменения числа прикрепленных клеток. Как видно из рисунка 16, оба показателя экспоненциально увеличиваются в течение первых 20 мин от начала адгезии, затем

скорость их изменения резко снижается. В этот период к полистиролу прикрепляется от 20 до 100% родококков, остальные клетки прикрепляются в течение последующих 24 ч (не показано на рисунке 16).

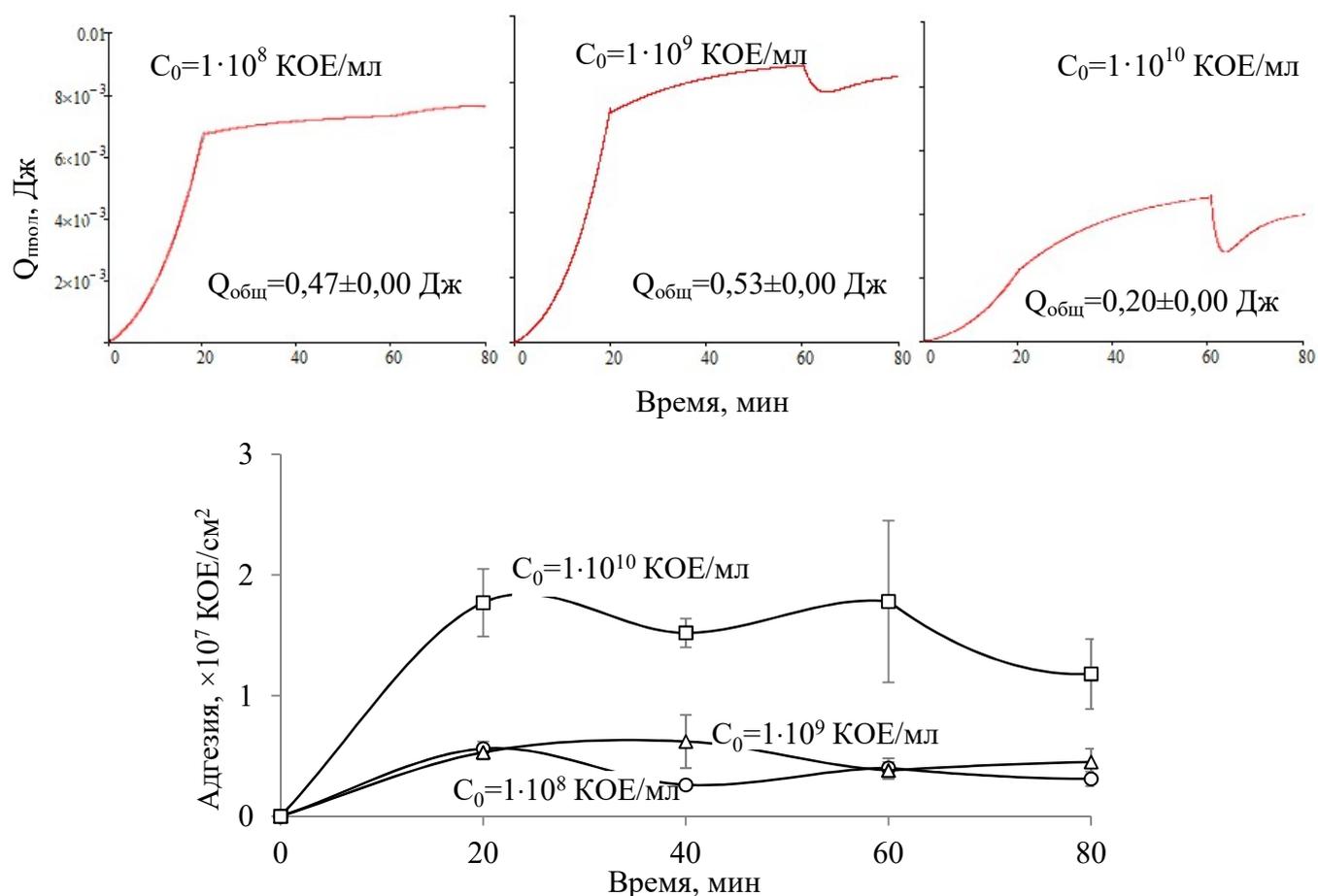


Рисунок 16 – Динамика изменения работы адгезии ($Q_{\text{прод}}$) и числа прикрепленных к полистиролу клеток *R. ruber* ИЭГМ 342 в зависимости от исходной концентрации клеток в суспензии C_0 .

$Q_{\text{общ}}$ – суммарное количество тепла, выделившегося в процессе адгезии, Дж.

На основании проведенных исследований созданы прототипы биокатализаторов на основе прикрепленных клеток *Rhodococcus* spp. для деградации нефтяных углеводородов в почвенных и водных средах. В качестве подложки для прикрепления бактериальных клеток использовали древесные опилки, обработанные 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов, обладающие следующими преимуществами: доступность материала, высокая экологическая безопасность (в отличие от других поверхностно-модифицирующих агентов биосурфактанты не являются дополнительным источником углеводородного загрязнения), оптимальные физико-химические свойства, высокая (29 мг сухих клеток/г, или 67% прикрепленных клеток) адсорбционная емкость, расположение клеток в виде монослоя, высокая ($61,87 \pm 3,00$ мг/(л·ч)) скорость биodeградации *n*-гексадекана закрепленными на данной подложке родококками. В экспериментах по биodeградации модельной и сырой нефти, а также смеси ПАУ установлено, что применение биокатализаторов способствует деградации 34–77% углеводородов в течение 21–196 сут при исходном уровне загрязнения 0,05–10 вес. % (таблица 12). Эти показатели в 1,3–8,0 раз превышают таковые для планктонных клеток и сопоставимы или в 2–3 раза превышают аналогичные показатели при биodeградации нефтяных углеводородов иммобилизованными микроорганизмами, по данным литературы (Morris *et al.*, 2012; Annie *et al.*, 2020; Catania *et al.*, 2020; Dou *et al.*, 2021; Naloka *et al.*, 2021).

Таблица 12 – Биодegradация углеводородных загрязнителей с помощью биокатализаторов на основе планктонных или прикрепленных клеток *Rhodococcus* spp.

Условия эксперимента	Загрязнитель	Уровень загрязнения, вес. %	Продолжительность биодеградации, сут	Биодegradация*, %	
				Планктонные клетки	Прикрепленные клетки**
Среда “К”	Модельная нефть	1,5	21	62 ± 5	77 ± 5***
Среда “К”	Сырая нефть	0,4	21	34 ± 3	48 ± 4***
Модельная почва	Модельная нефть	5	40	50 ± 4	65 ± 4***
Модельная почва	Сырая нефть	10	35	24 ± 3	34 ± 4***
Почва Turkey Yard	Смесь ПАУ (нафталин, фенантрен, пирен, хризен, бензпирен в равных соотношениях)	0,05	196	5 ± 0	40 ± 6***

Примечание. * С учетом потерь в абиотическом контроле, в том числе за счет адсорбции загрязнителя на подложке. ** Клетки закрепляли на древесных опилках, обработанных 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов. *** Статистически достоверно ($p < 0,05$) от планктонных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование адгезивных свойств углеводородокисляющих актинобактерий рода *Rhodococcus*. Определена роль адгезии в адаптации родококков к присутствию в среде углеводородов. Экспериментально обосновано, что адгезия является универсальной ответной реакцией родококков на присутствие в среде газообразных, жидких и твердых углеводородов и необходимым пусковым фактором процесса их окисления. Присутствие углеводородов инициирует морфологические и физиологические изменения клеток, такие как увеличение степени шероховатости и гидрофобности клеточной поверхности, синтез биосурфактантов. Это приводит к формированию клеточных агрегатов и способствует усилению адгезивной активности родококков в отношении твердых поверхностей. Подобные ответные реакции родококков выявлены в отношении многих других соединений углеводородной и неуглеводородной природы (Соляникова и др., 2017; de Carvalho *et al.*, 2004; de Carvalho, da Fonseca, 2007; Corno *et al.*, 2014; Weathers *et al.*, 2015; Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018; Ivshina *et al.*, 2019; Pátek *et al.*, 2021), что позволяет оценивать адгезию как один из ключевых механизмов адаптации *Rhodococcus* к изменяющимся условиям внешней среды. Известно, что в агрегатах пространственное расположение клеток обычно подчиняется правилу минимальных диффузионных расстояний, при этом сокращается расстояние между субстратом и клеткой. Это способствует облегчению и ускорению транспорта молекул гидрофобного субстрата к клеточной стенке и через неё к мембране для дальнейшего окисления внутри клетки (Заварзин, 2003; Bastiaens *et al.*, 2000; Van Hamme, 2004). Прикрепленные клетки “сочетают” в себе свойства клеток экспоненциальной и

стационарной фаз роста. Они обладают фенотипом толерантности и в то же время сохраняют способность к росту. Это защищает клетки от воздействия стрессорных факторов, обеспечивает стабильную работу ферментных систем и способствует длительному сохранению их жизнеспособности (Ефременко, 2018). Так, для прикрепленных родококков характерна повышенная удельная активность при окислении углеводов, сохранение жизнеспособности и функциональной активности после 8 мес хранения при температуре 4 °С без источника углерода и энергии и повышенная устойчивость к действию токсичных соединений, в частности солей тяжелых металлов. Таким образом, усиленная способность родококков к адгезии в присутствии гидрофобных веществ обеспечивает им определенные конкурентные преимущества, позволяя быстро адаптироваться к появлению в среде труднодоступных субстратов, поддерживать метаболическую активность и численность клеток на стабильном уровне и в меньшей степени зависеть от действия стрессорных факторов.

При исследовании механизмов адгезии родококков получены принципиально новые научные сведения. Показано, что основными факторами, регулирующими адгезионный процесс, являются рельеф клеточной поверхности и поверхности подложки, гликолипидные биосурфактанты, липидные компоненты, обуславливающие гидрофобные свойства клеток, а также поверхностные белки. На поверхности родококков обнаружены цитоадгезивные придаточные структуры диаметром около 45 нм и длиной 400–600 нм, обладающие повышенной силой адгезии ($>0,6$ нН) и модулем упругости ($>6,0$ Мпа) и являющиеся местом локализации адгезинов, предположительно, липидной природы. Способ закрепления клеток за счет специфических придаточных структур отнесен в настоящей работе к новому, ранее не описанному, механизму адгезии родококков. Впервые задокументирована функция биосурфактантов *Rhodococcus* в качестве молекул адгезии. Полученные данные позволяют рассматривать гликолипидные биосурфактанты как многофункциональные соединения, роль которых не ограничивается эмульгированием гидрофобных субстратов и увеличением их биодоступности, но также заключается в регулировании физико-химических свойств клеток и подложек и усилении адгезивных свойств родококков.

Проведенные исследования выполнены с использованием междисциплинарного подхода и сугубо физических методов анализа на основе интерференционной микроскопии, АСМ, высокочувствительной инфракрасной термографии и прецизионной термометрии с применением платиновых термометров сопротивления, совмещенных методы анализа (АСМ/КЛСМ, инфракрасная термография/прецизионная термометрия), а также методов биоинформатики (поиск генов, кодирующих адгезины) и молекулярной биологии (Tn5-мутagenез). Применение современной методологической базы позволило выявить существенные детали адгезионного процесса: установить влияние поверхностно-модифицирующих агентов на рельеф поверхности подложки и характер распределения прикрепленных клеток, определить силу адгезии *Rhodococcus*-биосурфактантов, обнаружить цитоадгезивные придаточные структуры на поверхности родококков и установить приуроченность к ним адгезинов, исследовать динамику адгезии родококков, напрямую оценить величину теплового эффекта адгезии. Использование методов прямой оценки тепла (инфракрасная термография, прецизионная термометрия) позволило установить, что характерной особенностью адгезии родококков является выраженный экзотермический эффект, свидетельствующий о прочном и необратимом прикреплении клеток к поверхности подложки. На основе высокочувствительной инфракрасной термографии разработан оригинальный метод количественной оценки адгезии родококков, позволяющий в режиме реального времени и в условиях свободного теплообмена клеток с окружающей средой определять количество прикрепленных родококков, характер их распределения и динамику адгезии на начальных этапах этого процесса.

Выявленные механизмы адгезии родококков требуют дальнейшего углубленного изучения. Необходима сравнительная оценка с помощью АСМ сил адгезионного взаимодействия различных компонентов клеточной стенки с исследуемыми подложками для подтверждения природы адгезивных молекул, а также прямая оценка силы адгезии родококков при агрегации и прикреплении к твердым поверхностям. Практически не изучено влияние на адгезию родококков таких компонентов, как тейхоевые и липотейхоевые кислоты, а также ЭПС в условиях роста клеток в присутствии углеводов. Требуется уточнения вопрос о степени влияния гидрофобных свойств клеток и подложек на процесс адгезии родококков. Необходимо уточнение роли и идентификация поверхностных белков, участвующих в адгезии родококков. Перспективными представляются исследования в области изучения термодинамики агрегации родококков и определение теплового эффекта данного процесса.

Полученные сведения позволили разработать научно-практический подход к созданию биокатализаторов на основе углеводородокисляющих родококков. При отборе штаммов учитывается их способность к продукции гликолипидных биосурфактантов, количественные показатели адгезивной активности и особенности клеточного рельефа. Определены условия формирования кондиционирующей пленки на поверхности подложек, наличие которой приводит к выравниванию микрорельефа поверхности и обеспечивает монослойное распределение родококков и их высокую метаболическую активность. Получена серия работающих прототипов биокатализаторов на основе иммобилизованных родококков, сохраняющих активность в течение длительного (8 мес) времени и обеспечивающих деградацию 34–77% углеводородных загрязнителей в течение 21–196 сут при исходном уровне загрязнения 0,01–10 вес. %.

Наиболее важным итогом проведенных исследований является более глубокое понимание механизмов выживания родококков в антропогенно загрязненных биотопах. Выявленные в работе закономерности, ответные реакции бактерий на присутствие в среде загрязнителей в виде усиления адгезивных свойств клеток в отношении твердых поверхностей и образования клеточных агрегатов, установленные механизмы адгезии, вероятно, характерны не только для углеводородокисляющих родококков, но справедливы в отношении других стресс-толерантных микроорганизмов – биодеструкторов органических соединений.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что адгезия является необходимым пусковым фактором процесса биodeградации углеводов родококками. В присутствии углеводов образуются обособленные многоклеточные агрегаты разной формы и размеров, в 2–23 и 1,1–2,9 раза увеличивается адгезивная активность и степень шероховатости клеток соответственно. Углеводородокисляющая активность *Rhodococcus* зависит ($R_{\text{Пирсона}}=0,63$, $p=0,00$) от адгезивной активности клеток. Клетки с адгезивной активностью $\geq 40\%$ окисляют 50% *n*-алканов и ПАУ, клетки с адгезивной активностью $\leq 20\%$ окисляют не более 15% *n*-алканов и ПАУ в течение 9 сут. Родококки в прикрепленном состоянии синтезируют на 42% больше гликолипидных биосурфактантов, в 3–18 раз более активно окисляют *n*-гексадекан, в 2 раза более устойчивы к действию солей тяжелых металлов и сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность после хранения в течение 8 мес при температуре 4 °С без источника углерода по сравнению с планктонными клетками.

2. Выявлены основные биофизические особенности адгезии родококков. Количество прикрепленных клеток прямо пропорционально зависит от степени шероховатости клеточной поверхности ($R_{\text{Пирсона}}=0,93$, $p=0,00$) и поверхности подложки (к подложкам с показателем сорбционной влажности $\leq 0,12$ г H₂O/г прикрепляется <19% клеток, к подложкам с показателем сорбционной влажности $\geq 0,23$ г H₂O/г прикрепляется

$\geq 40\%$ клеток). На поверхности родококков обнаружены специфические придаточные структуры, обладающие повышенной силой адгезии ($>0,6$ нН) и модулем упругости ($>6,0$ МПа) и являющиеся местом локализации адгезинов. Способ закрепления клеток за счет характерных выростов, содержащих молекулы адгезии, относится к новому, ранее не описанному механизму адгезии родококков. Химическая модификация поверхности подложки влияет на характер распределения клеток: при формировании равномерной пленки из поверхностно-модифицирующих агентов родококки располагаются практически в виде равномерного монослоя, на подложках с неравномерным покрытием – в виде клеточных скоплений. Агрегация *Rhodococcus* зависит от степени гидрофобности и электрокинетического потенциала клеток (клетки с повышенной степенью гидрофобности и менее отрицательным ζ -потенциалом образуют более крупные агрегаты), тогда как строгой корреляции между показателями адгезии родококков к твердым поверхностям и физико-химическими свойствами клеток и подложек не установлено ($R \leq 0,7$, $p \geq 0,05$). Характерной особенностью адгезии родококков является высокий ($\Delta t = 0,60 - 3,14$ °С, $Q = 0,3 \cdot 10^{-3} - 2,7 \cdot 10^{-3}$ Вт, $Q_{\text{прод}} = 4,0 \cdot 10^{-3} - 8,2 \cdot 10^{-3}$ Дж, $Q_{\text{общ}} = 0,20 - 0,53$ Дж) экзотермический эффект, свидетельствующий о прочном необратимом прикреплении клеток.

3. Установлено, что основными молекулярными факторами, регулирующими адгезию родококков, являются клеточно-связанные комплексы на основе гликолипидных *Rhodococcus*-биосурфактантов, а также поверхностные белки и липидные компоненты клеточной стенки родококков. Адгезивная активность родококков прямо пропорциональна ($R_{\text{Пирсона}} = 0,92$, $p = 0,03$) продукции биосурфактантов. Тn5-мутанты с повышенной (индекс эмульгирования *n*-гексадекана 85, 23 и 18% через 1, 24 и 168 ч соответственно) эмульгирующей активностью в 1,5–2,6 раза лучше прикрепляются к полистиролу по сравнению с клетками дикого типа, сила адгезии *Rhodococcus*-биосурфактантов к полистиролу составляет ($0,495 \pm 0,010$) нН. Биосурфактанты могут адсорбироваться на поверхности подложек с образованием мицеллоподобных структур, тяжей и везикул, их присутствие на подложке в 2–3 раза усиливает адгезию родококков. Увеличение в 2–4 раза количества общих липидов в клетках родококков способствует клеточной агрегации. Поверхностные белки участвуют в адгезии родококков, при этом у одних штаммов они на 11–55 % усиливают, у других – на 22–100% ослабляют адгезивную активность клеток.

4. Разработан метод количественной оценки адгезии родококков на основе высокочувствительной инфракрасной термографии, позволяющий в режиме реального времени и в условиях свободного теплообмена клеток с внешней средой определять количество прикрепленных клеток, характер их распределения на твердой поверхности и динамику адгезии родококков на начальных этапах прикрепления клеток. Показано, что показатель $\Delta t = 2,90 - 3,14$ °С соответствует адгезии $9,4 \cdot 10^7 - 14,0 \cdot 10^7$ КОЕ/см² и монослойному расположению клеток, $\Delta t = 1,91 - 2,29$ °С – адгезии $18,0 \cdot 10^7 - 19,3 \cdot 10^7$ КОЕ/см² и расположению клеток в виде скоплений, $\Delta t \leq 1,38$ °С – адгезии $\leq 2,1 \cdot 10^7$ КОЕ/см² без определения типа расположения клеток; показатель $Q_{\text{прод}} = 7,2 \cdot 10^{-3} - 8,2 \cdot 10^{-3}$ Дж и $Q_{\text{общ}} = 0,47 - 0,53$ Дж соответствует числу прикрепленных клеток $0,3 \cdot 10^7 - 0,5 \cdot 10^7$ КОЕ/см², $Q_{\text{прод}} = 4,0 \cdot 10^{-3}$ Дж и $Q_{\text{общ}} = 0,20$ Дж – числу прикрепленных клеток $1,2 \cdot 10^7$ КОЕ/см². Установлено, что в течение первых 20 мин к подложке прикрепляется 20–100% клеток, динамика $Q_{\text{прод}}$ наиболее точно соответствует траектории изменения числа прикрепленных клеток.

5. Получены работающие прототипы биокатализаторов на основе клеток *Rhodococcus* spp., иммобилизованных на древесных опилках, обработанных 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов. Использование полученных биокатализаторов обеспечивает биodeградацию 34–77% модельной и сырой нефти, а также смеси ПАУ в течение 21–196 сут при исходном уровне загрязнения 0,05–10 вес. %.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

В изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ

Обзорные статьи

1. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Elkin A.A., Makarov S.O., Cunningham C.J., Peshkur T.A., Atlas R.M., Philp J.C. Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies // *Environmental Science: Processes and Impacts*. – 2015. – V. 17. – P. 1201–1219. DOI: 10.1039/c5em00070j. Scopus, Web of Science, Q2.
2. Krivoruchko A.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies // *Catalysts*. – 2019. – V. 9, N. 3. – Article 236. – 19 pp. – DOI: 10.3390/catal9030236. Scopus, Web of Science, Q2.
3. Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Ivshina I.B. Advanced bioreactor treatments of hydrocarbon-containing wastewater // *Applied Sciences*. – 2020. – V. 10. – Article 831. – 19 pp. DOI: 10.3390/app10030831. Scopus, Web of Science, Q2.
4. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Tyumina E.A. Response mechanisms to ecopollutants and pathogenization risks of saprotrophic *Rhodococcus* / *Pathogens*. – 2021. – V. 10. – Article 974. – 23 pp. Scopus, Web of Science, Q2.

Экспериментальные статьи

5. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Осипенко М.А., Няшин Ю.И., Тюленева А.Н., Серебренникова М.К., Криворучко А.В. Кинетическая модель процесса иммобилизации бактериальных клеток на твердом носителе // *Российский журнал биомеханики*. – 2007. – Т. 11. – № 2. – С. 79–87.
6. Рубцова Е.В., Криворучко А.В., Харахорина Р.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Адгезия клеток родококков, выделенных из разных экосистем // *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*. – 2009. – Т. 114. – Приложение 1. Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах. – С. 262–264.
7. Рубцова Е.В., Криворучко А.В., Ноговицина Е.М., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Адгезивные свойства Tn5 мутантов родококков // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2011. – № 4/1. – С. 49–50.
8. Ившина И.Б., Криворучко А.В., Куюкина М.С., Костина Л.В., Пешкур Т.А., Каннингхэм К.Дж. Биоремедиация нарушенных углеводородами и тяжелыми металлами почв с использованием *Rhodococcus*-биосурфактантов и иммобилизованных родококков // *Аграрный вестник Урала*. – 2012. – Т. 100, № 8. – С. 65–68.
9. Рубцова Е.В., Криворучко А.В., Яруллина Д.Р., Богачев М.И., Ким А.С., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние физико-химических свойств актинобактерий рода *Rhodococcus* на их адгезию к полистиролу и *n*-гексадекану // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 4. – С. 900–904.
10. Серебренникова М.К., Куюкина М.С., Криворучко А.В., Ившина И.Б. Адаптация коиммобилизованных родококков к нефтяным углеводородам в колоночном биореакторе // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 295–303.
11. Криворучко А.В., Коршунова И.О., Лунегова И.С. Поверхностная ультраструктура и наномеханические свойства родококков с разной адгезивной активностью // *Российский иммунологический журнал*. – 2015. – Т. (18), № 2 (1). – С. 740–741.
12. Kuyukina M., Ivshina I., Krivoruchko A., Podorozhko E., Lozinsky V., Cunningham C., Philp J. Novel biocatalysts based on immobilized *Rhodococcus* cells for oil-contaminated water purification // *Journal of Biotechnology*. – 2007. – V. 131S. – P. 99–100. Scopus, Web of Science, Q2.

13. Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Philp J.C., Cunningham C.J. Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber* // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99, № 6. – P. 2001–2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.03.024. Scopus, Web of Science, Q2.
14. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K., Krivoruchko A.V., Podorozhko E.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I. Petroleum-contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor with immobilized *Rhodococcus* cells // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2009. – V. 63. – P. 427–432. DOI: 10.1016/j.ibiod.2008.12.001. Scopus, Web of Science, Q2.
15. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Plekhov O.A., Naimark O.B., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I. Biosurfactant-enhanced immobilization of hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus ruber* on sawdust // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 97(12). – P. 5315–5327. DOI: 10.1007/s00253-013-4869-y. Scopus, Web of Science, Q1.
16. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K., Rubtsova E.V., Krivoruchko A.V. Simultaneous species-specific PCR detection and viability testing of poly(vinyl alcohol) cryogel-entrapped *Rhodococcus* spp. after their exposure to petroleum hydrocarbons // *Journal of Microbiological Methods*. – 2013. – V. 94. – P. 135–140. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.05.016. Scopus, Web of Science, Q3.
17. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Barbe V., Fischer C. Draft genome sequence of propane- and butane-oxidizing actinobacterium *Rhodococcus ruber* IEGM 231 // *Genome Announcements*. – 2014. – V. 2(6): e01297-14. DOI:10.1128/genomeA.01297-14. Scopus, Web of Science, Q3.
18. Ivshina I., Kostina L., Krivoruchko A., Kuyukina M., Peshkur T., Anderson P., Cunningham C. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil spiked with model mixtures of petroleum hydrocarbons and heterocycles using biosurfactants from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 // *Journal of Hazardous Materials*. – 2016. – V. 312. – P. 8–17. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.007. Scopus, Web of Science, Q1.
19. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Korshunova I.O., Stukova G.I., Krivoruchko A.V. Diverse effects of a biosurfactant from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on the adhesion of resting and growing bacteria to polystyrene // *AMB Express*. – 2016. – V. 6(14). – 12 p. DOI: 10.1186/s13568-016-0186-z. Scopus, Web of Science, Q3.
20. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K., Krivoruchko A.V., Korshunova I.O., Peshkur T.A., Cunningham C.J. Oilfield wastewater biotreatment in a fluidized-bed bioreactor using co-immobilized *Rhodococcus* cultures // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2017. – V. 5. – P. 1252–1260. DOI: 10.1016/j.jece.2017.01.043. Scopus, Web of Science, Q1.
21. Krivoruchko A.V., Iziumova A.Yu., Kuyukina M.S., Plekhov O.A., Naimark O.B., Ivshina I.B. Adhesion of *Rhodococcus ruber* IEGM 342 to polystyrene studied using contact and non-contact temperature measurement techniques // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – V. 102(19). – P. 8525–8536. DOI:10.1007/s00253-018-9297-6. Scopus, Web of Science, Q1.
22. Kuyukina M., Krivoruchko A., Ivshina I. Hydrocarbon- and metal-polluted soil bioremediation: progress and challenges // *Microbiology Australia*. – 2018. – V. 39(3). – P. 133–136. DOI: 10.1071/MA18041. Scopus, Web of Science.
23. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Krivoruchko A.V., Peshkur T.A., Cunningham C.J. Improvement of jet fuel contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor by introducing nickel nanoparticles / *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2021. – V. 164. – 105308. – 10 pp. – DOI 10.1016/j.ibiod.2021.105308. Scopus, Web of Science, Q1.

Главы в книгах

24. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications* / Ed. by I. Kurtböke. – Elsevier, 2017. – P. 121–148. ISBN 978-0-12-804765-1. DOI: 10.1016/B978-0-12-804765-1.00006-0. Scopus, Web of Science.

25. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Extremotolerant *Rhodococcus* as an important resource for environmental biotechnology // *Actinomycetes in extreme and marine environments: An unexhausted source for microbial biotechnology* / Ed. by I. Kurtböke. – Science Publishers, CRC Press: Boca Raton, 2021.

Коллективные монографии

26. Андрияшина В.А., Балабанова Т.В., Беклемишев А.Б., Варфоломеев С.Д., Водякова М.А., Демаков В.А., Дитченко Т.И., Джавахия В.В., Дроздова М.Г., Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Ившина И.Б., Исмаилов А.Д., Карпова Н.В., Коваленко Г.А., Криворучко А.В., Куюкина М.С., Лозинский В.И., Лягин И.В., Максимова Ю.Г., Мамедова Ф.Т., Марквичева Е.А., Маслова О.В., Махлис Т.А., Молчан О.В., Перминова Л.В., Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н., Сенько О.В., Степанов Н.А., Стыценко Т.С., Филиппова С.Н., Холстов А.В., Юрин В.М., Ядерев В.В. Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы / Под ред. Е.Н. Ефременко. – М.: РИОР, 2018. – 499 с. ISBN 978-5-369-02004-3.

Монографии

27. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Углеводородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. – УрО РАН, 2021. – 140 с.

Учебные пособия

28. Ившина И.Б., Криворучко А.В., Куюкина М.С. Биоразнообразие и систематика микроорганизмов: учеб. пособие. – Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2019. – 304 с.

Патенты

29. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Криворучко А.В., Наймарк О.Б., Плехов О.А., Федорова А.Ю. Способ и установка для определения эффективности адсорбционной иммобилизации микроорганизмов и мониторинга функционального состояния биокатализаторов на основе иммобилизованных микробных клеток / Патент РФ 2475542. Зарегистр. в Госреестре изобр. РФ 20.02.2013. Бюлл. № 5.

30. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Серебренникова М.К., Рубцова Е.В., Криворучко А.В. Способ видовой дифференциации жизнеспособных родококков, иммобилизованных в гелевом носителе. Патент РФ 2525934. Зарегистр. в Госреестре изобр. РФ 20.08.2014. Бюлл. № 23.

Криворучко Анастасия Владимировна

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
АДГЕЗИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ**

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Подписано в печать

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1

Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный

Отпечатано в