

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

На правах рукописи

Криворучко Анастасия Владимировна

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДГЕЗИИ
УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ**

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
академик РАН, профессор, доктор
биологических наук
Ившина Ирина Борисовна

Пермь – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Введение	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ГЛАВА 1. Адгезия как ключевой фактор адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды. Механизмы бактериальной адгезии	16
1.1. Роль адгезии в адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды	16
1.2. Механизмы неспецифической адгезии	26
1.3. Структуры бактериальных клеток, участвующие в адгезии	40
1.4. Бактериальные адгезины	47
ГЛАВА 2. Приспособленность актинобактерий рода <i>Rhodococcus</i> к условиям антропогенного загрязнения среды. Механизмы адгезии актинобактерий	50
2.1. Адаптивные приспособления родококков к условиям антропогенно загрязненных экосистем	50
2.2. Механизмы адгезии актинобактерий	54
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 3. Материалы и методы исследования	65
3.1. Реагенты	65
3.2. Рабочая коллекция и условия культивирования родококков	65
3.3. Подложки для прикрепления клеток родококков	71
3.4. Определение адгезивной активности родококков	74
3.5. Физико-химические методы исследования	77
3.6. Биохимические методы исследования	78
3.7. Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия	79
3.8. Интерференционная микроскопия	81

3.9. Световая и электронная микроскопия	82
3.10. Метод краевых углов смачивания	83
3.11. Инфракрасная термография и прецизионная термометрия с использованием платиновых термометров сопротивления	83
3.12. Оценка жизнеспособности родококков	89
3.13. Эксперименты по биодegradации углеводов	90
3.14. Биоинформатический анализ	91
3.15. Статистическая обработка результатов исследования	92
ГЛАВА 4. Адгезия – типичная реакция родококков на присутствие углеводов	93
4.1. Усиление адгезивных свойств родококков в присутствии углеводов	93
4.2. Корреляция между адгезивной и углеводородокисляющей активностью родококков	101
4.3. Биологические особенности прикрепленных клеток родококков. Роль адгезии в адаптации родококков к присутствию в среде углеводов	108
ГЛАВА 5. Биофизические особенности адгезии родококков	113
5.1. Рельеф поверхности клеток и подложек – основные факторы, регулирующие адгезию родококков	113
5.2. Специфические придаточные структуры клеточной стенки родококков – место локализации адгезинов	122
5.3. Физико-химические свойства клеток и подложек и эффективность адгезии родококков	127
5.4. Высокий экзотермический эффект адгезии родококков	135
ГЛАВА 6. Молекулярные факторы, регулирующие адгезию родококков	139
6.1. Гликолипидные биосурфактанты – основной молекулярный фактор адгезии родококков	139

6.2. Липидные компоненты клеточной стенки родококков как возможные адгезины	146
6.3. Роль поверхностных белков в адгезии родококков. Предполагаемые адгезины белковой природы	148
ГЛАВА 7. Разработка метода количественной оценки адгезии <i>Rhodococcus</i>. Получение работающих прототипов биокатализаторов на основе углеводородокисляющих родококков	161
7.1. Метод количественной оценки адгезии родококков на основе инфракрасной термографии	161
7.2. Подбор оптимальных подложек для прикрепления клеток родококков	170
7.3. Оценка эффективности биокатализаторов на основе прикрепленных клеток родококков для деградации нефтяных углеводородов	176
Заключение	184
Выводы	188
Список сокращений	191
Список литературы	192

ВВЕДЕНИЕ

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 (Approved Lists 1980) (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; Cenicerós *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 своё 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; Hamedi, 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 экололлютантов 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). Биологическая роль, механизмы адгезии и факторы, регулирующие этот процесс, 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 мало 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 взаимодействия отвечают за 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, аутотранспортные 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). Деление на специфическую и неспецифическую адгезию достаточно условно, не всегда представляется возможным определить тип адгезионного взаимодействия. 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 биопленкообразованию 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). Частично исследованными можно считать биопленки *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 *Rhodococcus 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 этого 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 точных методов прямого мониторинга процесса бактериальной адгезии. Перспективными в этом плане являются методы, основанные на измерении температурных показателей, такие как инфракрасная термография (Salaimeh *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 свежевыделенных 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 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 “Нефтяная микробиология”, “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков”, “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 (www.iegmcol.ru).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Адгезия является необходимым пусковым фактором процесса биodeградации 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.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 59 печатных работ, в том числе 16 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, Pathogens), 7 статей в других журналах, 1 учебное пособие, 1 коллективная монография, 1 монография-атлас, 2 главы в книгах, 8 материалов конференций, 5 публикаций в научных трудах, 16 тезисов докладов, 2 патента.

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 РНФ (№ 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., профессору Марии Станиславовне Куюкиной 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.

Обзор литературы

Глава 1. АДГЕЗИЯ КАК КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР АДАПТАЦИИ БАКТЕРИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ. МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ АДГЕЗИИ

1.1. Роль адгезии в адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды

Большинство бактериологических исследований проводится с культурами планктонных клеток. Однако к настоящему времени накопилось достаточно много подтверждающих сведений о том, что в природе бактерии находятся в основном в фиксированном состоянии, в составе различного рода скоплений (Заварзин, 2003; Николаев, Плакунов, 2007; Ефременко, 2018; Cai, 2020). Адаптивное значение прикрепленного образа жизни для бактерий заключается в защите от стрессовых воздействий и создании условий для эффективного усвоения питательных веществ. Прикрепление клеток связано с процессом адгезии, обуславливающим сближение клеток и подложки, первичный контакт и многоточечное связывание клеток; адгезия – это фактор инициации морфологических и физиолого-биохимических изменений, необходимых для адаптации клеток при переходе к прикрепленному образу жизни. В клеточных скоплениях пространственное расположение клеток подчиняется правилу минимальных диффузионных расстояний, обеспечивающему наиболее быстрый обмен веществами между взаимодействующими микроорганизмами. Особенно важно соблюдение этого правила для метаногенных сообществ, циано-бактериальных матов и гидролитических бактерий. Синтрофные организмы, осуществляющие межвидовой перенос водорода от первичных анаэробов к метаногенам, характеризуются очень тесным, почти мембрана к мембране, расположением клеток. Фиксация клеток внутри циано-бактериальных матов приводит к быстрому переносу органических веществ и соединений серы между различными видами микроорганизмов, а также обеспечивает механическую устойчивость мата к водным течениям и его невосприимчивость к

стерилизующему действию ультрафиолета. Гидролитики сталкиваются с проблемой минимизации рассеяния продуктов гидролиза. Бактерии, синтезирующие гидролазы, заселяют поверхность гидролизуемого носителя и образуют на ней микроколонии, внутри которых происходит обобществление гидролизующих экзоферментов. По другому варианту клетки целлюлозолитических бактерий, например, цитофаг, плотно прилегают к волокнам целлюлозы (Заварзин, Колотилова, 2001; Заварзин, 2003).

Наиболее изученными клеточными скоплениями являются биопленки. Биопленка представляет собой пространственно и метаболически структурированное сообщество микроорганизмов, заключенное во внеклеточный полимерный матрикс и расположенное на границе раздела сред. Биопленки могут развиваться на границе жидкость-твердое тело, жидкость-воздух, две несмешивающиеся жидкости, твердое тело-воздух. Они образуются на слизистых оболочках многоклеточных организмов (например, псевдомембраны на небных миндалинах при дифтерии), частях растений, подводных скалах и камнях (эпилитические биопленки), в донных осадках, на внутренних стенках водопроводов, на поверхности корабельных бортов и днищ, медицинских протезов, катетеров, в капельных фильтрах для очистки воздуха и сточных вод, в почве, на агаризованных питательных средах, на поверхности водоемов, на границе раздела сред сырая нефть/вода. Функции биопленок многочисленны: создание транспортных колодцев для проникновения питательных веществ, ограничение проникновения вредных факторов химической (антибиотики, дезинфектанты, ксенобиотики) и биологической (питающиеся бактериями мелкие хищники-протисты) природы, облегченный обмен метаболитами и сигнальными молекулами, возможность горизонтального переноса генов, снижение токсичного действия субстратов с целью их дальнейшего метаболизирования. Биопленки обладают высоким адаптационным потенциалом; считаются надорганизменной формой существования одноклеточных организмов. Их адаптационный потенциал настолько велик, что они позволяют бактериям обживать экстремальные местообитания (например, сернистые горячие источники, гиперсолёные и кислые

озера, арктические и тропические пустыни), а также технические системы, такие как электроды теплоснабжения и охлаждения на теплоэлектростанциях, оборудование атомных электростанций, поверхность кварцевых защитных экранов ультрафиолетовых ламп. По сути, биопленки – это своего рода специализированная экосистема, обеспечивающая поддержку жизнеспособности всей микробной ассоциации и ее компонентам (Ившина и др., 2007; Николаев, Плакунов, 2007; *Microbial biofilms*, 2003; Van Hamme, 2004; *Biofilms..*, 2016).

Суспендированные в жидкости микроорганизмы формируют биопленкоподобные структуры – микробные гранулы и флоки (хлопья). Микробные гранулы с однородной структурой состоят из одного или двух доминирующих видов бактерий с малочисленными “примесями” других видов. Например, формиатдеградирующие биогранулы состоят из нитчатых *Methanobacterium formicicum*-подобных бактерий, а ацетат-деградирующие биогранулы содержат *Methanothrix*-подобные нитчатые с вкраплениями кластеров *Methanosarcina*-подобных бактерий. Микробные гранулы формируют слоистую структуру в случае, когда начальная стадия деградации субстрата протекает значительно быстрее последующей деградации метаболитов. В этом случае исходный субстрат быстро утилизируется бактериями на поверхности гранулы, концентрация метаболитов возрастает, и они диффундируют по градиенту концентраций вглубь гранулы для дальнейшей деградации. В этом случае внешние слои ответственны за быструю начальную стадию превращения субстрата, а внутренние – за последующие превращения метаболитов. Многокомпонентное сообщество анаэробных организмов в метантенках представлено в виде флоков размером с гречневую крупу, в которых метаноген образует пористую псевдопаренхиму или плотный клубок, в свободном пространстве располагаются другие организмы сообщества. В результате метаногенное сообщество в грануле способно осуществлять всю трофическую цепь преобразований от растворимого органического вещества до CH_4 и CO_2 (Заварзин, 2003; Сироткин и др., 2007; Lai *et al.*, 2018).

Адгезия, по-видимому, вносит существенный вклад в процессы биологического окисления нерастворимых в воде веществ – несмешивающихся с водой жидкостей и твердых субстратов, таких как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), целлюлоза, крахмал, элементарная сера. Однако этой проблеме посвящено незначительное количество исследований. Микроорганизмы-деструкторы часто обнаруживаются прикрепленными к каплям, зернам или кристаллам этих веществ, мортмассе (Заварзин, 2003; Bastiaens *et al.*, 2000; Wick *et al.*, 2002). По данным L. Bastiaens с соавт. (2000), адгезия – один из трех основных механизмов, обеспечивающих биodeградацию твердых углеводов бактериальными клетками наряду с биосурфактантами и специфичными системами транспорта. При адгезии сокращается расстояние между субстратом и клеткой, что предотвращает рассеивание молекул субстрата при диффузии. Прикрепленные клетки далее могут синтезировать клеточно-связанные биосурфактанты для локальной “псевдосолюбилизации” субстрата в месте контакта. Это способствует облегчению и ускорению транспорта молекул гидрофобного субстрата к клеточной стенке и через нее к мембране для дальнейшего окисления внутри клетки (Bastiaens *et al.*, 2000; Van Hamme, 2004; Verne *et al.*, 2018).

Прикрепленные бактериальные клетки обладают набором признаков, существенно отличающих их от планктонных клеток. Особенности прикрепленных клеток связаны с изменением удельной скорости роста, активности отдельных ферментов и биохимического состава клеток, приобретением способности сохранять метаболическую активность на стабильном уровне в течение длительного времени, формированием фенотипа толерантности и увеличением стабильности плазмид.

1) *Скорость роста и зависимость данного показателя от плотности клеток.* Удельная скорость роста (μ) прикрепленных клеток ниже таковой свободных клеток в экспоненциальной фазе роста, но не равна нулю, как у покоящихся или находящихся в стационарной фазе свободных клеток:

$$\mu_{\text{своб. эксп}} > \mu_{\text{прикрепленные}} > (\mu_{\text{своб. стац}} = \mu_{\text{покоящиеся}} = 0).$$

До недавнего времени считалось, что прикрепленные клетки физиологически подобны свободным клеткам в стационарной фазе и даже покоящимся формам клеток: во всех случаях отсутствует рост. К настоящему времени накопилось достаточно много фактов, свидетельствующих о том, что прикрепленные клетки растут даже после длительного периода от начала фиксации и не могут быть отнесены ни к покоящимся, ни к находящимся в стационарной фазе свободным клеткам (Ефременко, 2018; Junter *et al.*, 2002; Junter, Jouenne, 2004).

В целом, снижение удельной скорости роста прикрепленных клеток по сравнению со свободными клетками в логарифмической фазе роста происходит не в разы, а не более чем на 65%. При этом рост прикрепленных клеток приводит к достижению их высокой плотности до 10^{12} клеток/мл, что превышает в 100–1000 раз тот максимум, который достигается при росте свободных клеток тех же культур в жидких питательных средах – 10^9 – 10^{10} клеток/мл (Ефременко, 2018).

Еще больше прикрепленные бактерии отличаются от покоящихся форм. Согласно современным представлениям, покоящиеся микробные клетки образуются в условиях голодания (чаще всего по азоту) и последующего длительного хранения. Они обладают набором признаков, которыми не обладают прикрепленные клетки: отсутствие признаков деления и колониеобразующей активности, укороченная округлая форма, уплотненная клеточная стенка, наличие наружного капсульного слоя, электронноплотная гомогенная цитоплазма с крупными электроннопрозрачными включениями (Ivshina *et al.*, 2015).

2) *Длительность сохранения метаболической активности на стабильном уровне.* Известно, что прикрепленные клетки могут сохранять метаболическую активность на стабильно высоком уровне на протяжении длительного времени, от 30 до 400 сут (Prieto *et al.*, 2002a; Vinage, van Rohr, 2003a,b; Hatzinger *et al.*, 2011; Pannier *et al.*, 2012; An *et al.*, 2018). При этом они могут сохранять такую активность даже после 5 месяцев голодания (Carvalho *et al.*, 2001). Для эукариотических микроорганизмов (дрожжей) подсчитано, что общая продолжительность существования метаболически активных фиксированных клеток максимально может составлять 6,8 лет (Ефременко, 2018).

Сохранение способности прикрепленных клеток к росту и их высокую операционную стабильность связывают с пространственной компартментализацией и разобщенностью клеток в присутствии носителя. Кроме того, в культуре прикрепленных клеток, в отличие от таковой свободных клеток, не происходит клеточной агрегации, которая считается причиной увеличения вязкости среды и снижения биодоступности питательных субстратов для клеток, находящихся в центре агрегатов. В публикациях по изучению морфологии прикрепленных клеток отмечается, что для клеток, иммобилизованных в высоких концентрациях (как минимум 10^9 клеток/мл), характерно значительное увеличение их размеров. Известно, что старение микроорганизмов сопровождается увеличением размеров клеток. Это косвенно подтверждает теоретическую вероятность того, что в составе иммобилизованных биокатализаторов и природных клеточных скоплений длительное время могут функционировать одни и те же “старые” клетки; это, по-видимому, может происходить даже на фоне непрекращающегося роста прикрепленных клеток (Ma *et al.*, 2019; Cai, 2020).

3) *Активность отдельных ферментов.* Часто прикрепленные клетки обладают повышенной ферментативной активностью. Именно эта особенность прикрепленных клеток послужила основой для широкого использования в биотехнологии приема иммобилизации с целью интенсификации биотехнологических процессов и повышения выхода целевых продуктов. В то же время – это наиболее дискуссионный вопрос в выявлении различий между фиксированными и свободными клетками. Показано, что в результате искусственной иммобилизации может происходить значительное (в 3–10 раз) увеличение удельной активности (α -амилазной, аминопептидазной, аспартазной, β -галактозидазной, β -глюкозидазной, по внеклеточной щелочной протеазе) клеток (Абелян, 2000; Chang *et al.*, 2007). В качестве причин повышения ферментативной активности иммобилизованных клеток исследователи называют повышение уровня синтеза ферментов (Абелян, 2000), сокращение лаг-фазы роста бактериальной культуры (Prieto *et al.*, 2002a,b), высокую клеточную нагрузку и

устойчивость к токсическому действию субстрата и метаболитов (Junter *et al.*, 2002; Junter, Jouenne, 2004) у бактерий после иммобилизации, изменение процессов регуляции синтеза ферментов (Маркова и др., 2018).

Однако не всегда прикрепленные бактерии характеризуются повышенной активностью ферментов по сравнению со свободными клетками, в отдельных случаях даже отмечается снижение функциональной активности клеток (Медведева и др., 2001; Китова и др., 2004; Максимова и др., 2015; Chand *et al.*, 2004; Junter, Jouenne, 2004; Claudino *et al.*, 2008; Jézéquel, Lebeau, 2008; Tapingkae *et al.*, 2010). Это связано с тем, что ферментативная активность бактерий зависит от различных факторов, например, от биологических свойств бактерий и физико-химических свойств адсорбентов, доступности субстрата, особенностей внутриклеточной регуляции уровня экспрессии и активности фермента, возможных диффузионных затруднений, характерных воздействий в процессе фиксации клеток.

4) *Биохимический состав клеток.* Биохимический состав прикрепленных и свободных клеток различен. Содержание ДНК, РНК, белков и полисахаридов становится в несколько раз выше после перехода клеток в фиксированное состояние. У свободных и прикрепленных бактерий различается химический состав клеточной стенки, цитоплазматической мембраны и внутриклеточных белков. Для прикрепленных клеток характерны сдвиг состава жирных кислот цитоплазматической мембраны в сторону насыщения, изменение состава гликопротеинов клеточной стенки, может наблюдаться формирование вокруг фиксированных клеток защитного слоя ЭПС. Все это приводит к увеличению текучести цитоплазматической мембраны и увеличению проницаемости клеточной оболочки, при этом создаются условия для интенсификации массообменных процессов, что также может быть причиной повышения ферментативной активности бактериальных клеток после фиксации (Otto, 2014; Scoffield, Wu, 2019).

Существенные различия выявлены в составе белков прикрепленных и планктонных клеток. Изменения затрагивают от 3 до 84% белков, при этом

отмечается как сверхпродукция, так и пониженный синтез белков. Из 694 проанализированных белков в биопленках *Streptococcus mutans* выявлено 13 новых белков, установлено, что экспрессия 57 белков выше, экспрессия 78 белков ниже и 9 белков отсутствуют по сравнению с планктонными клетками. Наибольшие отличия в составе белков между прикрепленными и планктонными бактериями выявлены при изучении белковых профилей “молодых” (≤ 6 сут) биопленок. Также отмечается, что с увеличением времени инкубации у прикрепленных бактерий увеличивается количество белков с пониженным уровнем экспрессии и уменьшается количество белков с повышенным уровнем экспрессии. Например, у иммобилизованных клеток *Pseudomonas aeruginosa* количество белков с пониженным уровнем экспрессии составляет 63 и 112, количество белков с повышенным уровнем экспрессии – 114 и 53 после 18 и 48 ч инкубирования соответственно (Svensäter *et al.*, 2001; Junter, Jouenne, 2004; Otto, 2014).

Среди белков, количество которых в наибольшей степени изменяется у прикрепленных бактерий по сравнению с планктонными формами, выделяют три группы: (1) мембранные белки и белки клеточной стенки, (2) ферменты центрального метаболизма и (3) белки адаптации (Junter, Jouenne, 2004; Otto, 2014). Уровень экспрессии белков первых двух групп, по одним сведениям, индивидуален в каждом случае и зависит от совокупности факторов, таких как биологические особенности микроорганизма, тип и материал носителя, среда культивирования (Svensäter *et al.*, 2001; Junter, Jouenne, 2004; Resch *et al.*, 2005), по другим сведениям, синтез их в прикрепленных клетках всегда увеличивается (Ефременко, 2018). В отношении белков адаптации выявляется четкая тенденция к накоплению в прикрепленных клетках стрессорных белков (Ефременко, 2018; Junter, Jouenne, 2004; Otto, 2014; Scoffield, Wu, 2019).

5) *Устойчивость к стрессорным факторам.* Универсальной реакцией микроорганизмов на процесс фиксации клеток является формирование фенотипа толерантности, что выражается в увеличении продукции белков теплового, холодного, осмотического, окислительного и алкалоидного шоков, в частности,

дипептидсвязывающего белка DppA и ДНК-связывающего белка Dps (Ефременко, 2018; Junter *et al.*, 2002; Junter, Jouenne, 2004; Resch *et al.*, 2005). Фиксированные клетки часто (Svensäter *et al.*, 2001; Junter *et al.*, 2002; Junter, Jouenne, 2004; Tapingkae *et al.*, 2010; Otto, 2014; Cai, 2020), хотя не всегда (Tapingkae *et al.*, 2010), более устойчивы к изменениям pH и температуры, действию антибиотиков, биоцидов и этанола, высоким концентрациям солей и органических веществ, фагоцитозу по сравнению со свободными клетками. Все это, казалось бы, свидетельствует о том, что прикрепленные клетки испытывают и преодолевают стресс, подобно свободным клеткам, попадающим в условия лимитирования по субстрату при переходе в стационарную фазу роста. Для клеток в стационарной фазе хорошо известны феномены резко увеличивающегося синтеза и секреции вторичных метаболитов (усиление биосинтетических процессов), а также синтеза ферментов стрессоустойчивости (Ефременко, 2018). С формированием фенотипа толерантности и преодолением стресса могут быть связаны описанные выше снижение скорости роста, сверхпродолжительная метаболическая активность, усиленные каталитические функции, изменение биохимического состава (в частности, увеличение доли недоэкспрессированных и снижение доли сверхэкспрессированных белков) прикрепленных клеток.

Однако ответ бактерий на воздействия, возникающие в процессе фиксации клеток, нельзя приравнивать к ответу на обычные стрессовые воздействия. Под понятием “стресс” в современной молекулярной биологии понимают общий комплекс неспецифических компенсаторно-приспособительных процессов, развивающихся у микроорганизмов в ответ на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды. Первичный ответ планктонных клеток направлен на то, чтобы нивелировать сдвиги внутриклеточного равновесия. Если клетка не способна преодолеть стресс, возможно изменение в экспрессии генов с целью синтеза новых клеточных компонентов или для стимуляции имеющихся систем. При этом активность системы ответа на стрессовое воздействие снижается параллельно с преодолением клеткой стресса. Новый стабильный уровень активности клетки, как правило, ниже, чем до стрессового воздействия. Если

стресс не преодолен за счет компенсаторных механизмов или действие стрессового фактора усиливается, то клетка погибает. Прикрепленные клетки усиливают основные пути метаболизма, характерные для них, и успешно существуют длительные периоды времени в условиях нарастающих, негативных с точки зрения свободных клеток, эффектов, таких как увеличение концентрации клеток и связанные с этим диффузионные проблемы, лимитирование по субстрату, нарастающий окислительный стресс, ингибирование метаболитами. Еще одна особенность ответных реакций фиксированных клеток по сравнению с таковыми свободных – это устойчивый характер изменений, которые сохраняются вплоть до 4-ой генерации после возвращения клеток в планктонное состояние. Тогда как обязательным признаком стресса в традиционном понимании считается именно его обратимость, возможность возврата к нормальному функционированию сразу же после снятия стрессового воздействия (Ефременко, 2018; Otto, 2014).

б) *Генетические свойства.* Показано, что плазмиды более стабильны в прикрепленных бактериях, чем в планктонных: 88% клеток в культуре прикрепленных клеток содержит плазмиды после 240 удвоений. Эта стабильность не зависит от способа фиксации, носителя и условий культивирования. Установлено, что в бактериальных биопленках также резко увеличивается (в 2–12 раз) копияность плазмид в клетках, чаще происходит конъюгативный обмен генетической информацией, выше эффективность трансформации клеток по сравнению с жидкими культурами. Увеличение частоты конъюгативного переноса генов связывают с тем, что мостики между “обездвиженными” клетками, образованные F-пилями, не разрушаются и остаются целыми на протяжении всей конъюгации. Увеличение же эффективности трансформации иммобилизованных бактерий свободно плавающими молекулами ДНК объясняется повышенной копияностью плазмид, высокой плотностью клеток и повышенной жизнеспособностью иммобилизованных компетентных клеток (Ефременко, 2018; Junter, Jouenne, 2004; Chen *et al.*, 2006).

Выявленные физиологические, биохимические и генетические особенности фиксированных клеток исследователи связывают с формированием высокой плотности клеток. Процесс фиксации и удерживание обездвиженных клеток в высоких концентрациях активизирует проявление у них генетически запрограммированного ответа, приводящего к изменению биохимических характеристик. Известно, что плотностно-зависимые регуляторные факторы экспрессии генов в клетках – это сигнальные молекулы систем quorum sensing (кворумный ответ, QS) и quorum quenching (тушение кворума, QQ). Несмотря на то, что доказана наиважнейшая роль QS-регуляции в формировании бактериальных биопленок, QS- и QQ-процессы для клеток в составе клеточных скоплений еще крайне мало изучены (Ефременко, 2018; Маркова и др., 2018; Ma *et al.*, 2019; Cai, 2020).

1.2. Механизмы неспецифической адгезии

Существует два принципиально разных типа адгезионных взаимодействий: специфические и неспецифические. *Специфическая адгезия* связана с “узнаванием” бактериями подложки. Этот процесс обусловлен стереоспецифическими взаимодействиями между отдельными группами молекул на поверхности клетки и подложки. Данный тип адгезии хорошо изучен в отношении патогенных микроорганизмов. Соединения клеточной стенки патогена, участвующие в специфической адгезии, называются адгезинами и традиционно относятся к факторам вирулентности. Адгезины взаимодействуют с рецепторами клеток организма-хозяина (Boks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Słotwińska, 2013; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

Неспецифическая адгезия обычно описывается в терминах физической и коллоидной химии и связана с фундаментальными силами взаимодействия между двумя контактирующими поверхностями, такими как электростатическое притяжение/отталкивание, силы ван дер Ваальса, образование водородных связей, комплексообразование. Факторы неспецифической адгезии – гидрофобные свойства клеток и подложки, характер распределения участков с разной степенью

гидрофобности/гидрофильности на поверхности клеток и подложки, ультраструктурные особенности клеток, степень шероховатости подложки, величина свободной энергии взаимодействующих участков, электрический заряд на поверхности клетки и подложки, распределение электронной плотности на разных участках взаимодействующих поверхностей (Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

В настоящее время накопилось достаточно сведений, свидетельствующих о неоднозначности ситуации и невозможности дифференцировать специфическую и неспецифическую адгезию. Например, *Corynebacterium diphtheriae* могут регулировать гидрофобно-гидрофильные свойства клеточной поверхности путем экспонирования белков-гидрофобинов или гидрофилинов, а также с помощью ферментативного удаления остатков сиаловой кислоты; выявлены различия в толщине липидного слоя и мозаичности расположения открытых липидных участков. Гидрофобная клеточная стенка характерна для штаммов *C. diphtheriae*, колонизирующих поврежденные кожные покровы человека, тогда как более гидрофильные варианты заселяют слизистые ткани верхних дыхательных путей (Харсеева, Алиева, 2014; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000). Действие специфических адгезивных структур грамотрицательных бактерий – пилией, состоящих из белков пилинов, – основано на гидрофобно-гидрофильных взаимодействиях и понижении свободной поверхностной энергии (Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018). Белок TiBP обеспечивает специфическую адгезию штамма *R. ruber* GIN1 к диоксиду титана за счет своих гидрофобных свойств (Gertler *et al.*, 2003; Siegmann *et al.*, 2009; Dayan *et al.*, 2017). Специальные адгезивные структуры образуют некоторые археи. Однако эти приспособления не обладают специфичностью в отношении твердых поверхностей и помогают археям связываться с различными природными материалами (Moissl *et al.*, 2003; Henneberger *et al.*, 2006).

Универсального механизма адгезии не существует, один и тот же микроорганизм может использовать различные адгезивные факторы в зависимости от типа подложки, условий культивирования и характеристик

внешней среды. Физико-химические взаимодействия (электростатические, гидрофобные, ван дер Ваальсовы, броуновское движение) участвуют в сближении 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). Существует несколько подходов к описанию неспецифической адгезии.

Коллоидно-химический (традиционный) подход. Средние размеры бактериальных клеток составляют 0,5–2,0 мкм, что близко к размерам коллоидных частиц. Процессы взаимодействия коллоидных частиц друг с другом и с твердой поверхностью описываются в рамках теории Дерягина-Ландау-Вервея-Овербека (теория ДЛВО). Согласно теории ДЛВО, сила взаимодействия между коллоидной частицей и носителем – это суммарный эффект сил Лифшица-ван дер Ваальса и электростатических сил = сил Кулона.

Силы ван дер Ваальса – это слабые электромагнитные взаимодействия между двумя диполями. Различают три типа ван дер Ваальсовых взаимодействий: ориентационные силы притяжения между двумя постоянными диполями, дисперсионные или лондоновские силы притяжения между мгновенным и наведенным диполями, индукционное притяжение между постоянным и наведенным диполями. Силы ван дер Ваальса – это всегда силы притяжения, величина которых обратно пропорциональна расстоянию между диполями (Кудряшева, Бондарева, 2019). Непосредственно у поверхности носителя силы ван дер Ваальса преобладают над остальными типами взаимодействия, в результате чего коллоидные частицы, хоть и хаотично двигающиеся вследствие

броуновского движения, не могут отделиться от носителя и необратимо к нему прикрепляются (Hori, Matsumoto, 2010; Corniello *et al.*, 2018).

Кулоновские взаимодействия (их принято называть электростатическими, хотя к таковым, по существу, относятся все электромагнитные взаимодействия) – это взаимодействия между двумя точечными неподвижными зарядами (Кудряшева, Бондарева, 2019). Они преобладают на некотором расстоянии от поверхности носителя, где силы ван дер Ваальса значительно ослабевают. Чаще всего дисперсионные частицы и природные поверхности в водной среде заряжены отрицательно, тогда кулоновские силы – это силы отталкивания. Это утверждение справедливо в отношении практически всех бактериальных клеток, заряженных отрицательно за счет ионизированных гидроксильных и карбоксильных групп на их поверхности (Hori, Matsumoto, 2010; Corniello *et al.*, 2018).

Теория ДЛВО – это теория стабильности коллоидных частиц. Согласно этой теории, суммарная сила взаимодействия при адгезии и ее направленность складываются из сил ван дер Ваальса и электростатических сил в двойных электронных слоях, действующих при контакте между двумя поверхностями. Силы ван дер Ваальса проявляются при любом адгезионном взаимодействии, их величина не зависит от ионной силы раствора, зависит от постоянной Хамакера:

$$A_{ii} = 24\pi l_0^2 \gamma^{LW} \quad (1),$$

где A_{ii} – постоянная Хамакера, Дж; l_0 – минимальное равновесное расстояние между двумя параллельными плоскими слоями материала i , м; γ^{LW} – неполярный, или ван-дер-ваальсовский, компонент свободной поверхностной энергии γ , Дж/м². Минимально возможное расстояние в литературе оценивается, как $l_0 = (1,57 \pm 0,09) \text{ \AA}$. Компонент γ^{LW} для микробных клеток определяют экспериментально по углам контакта капель стандартных жидкостей с поверхностью клеток (бактериальным газоном). По сути, постоянная Хамакера отражает силу межмолекулярных взаимодействий (Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

Электростатические силы очень чувствительны к ионной силе и химическому составу жидкости, в которой происходит адгезия. Вклад этих сил

можно оценить экспериментально через показатели электростатического заряда на взаимодействующих поверхностях, т.к. поверхностный заряд практически равен дзета-потенциалу (Dorobantu *et al.*, 2009).

Коллоидные частицы, в том числе бактериальные клетки, обычно суспендированы в растворах электролитов. В случае клеток – это водные растворы солей и питательные среды. Соли в воде подвергаются гидролизу с образованием отрицательно и положительно заряженных ионов. В присутствии заряженных дисперсионных частиц (клетки, или коллоидные частицы), ионы со знаком заряда, противоположным таковому на поверхности частиц, притягиваются к ним, при этом вокруг частиц образуется двойной электрический слой. Бактерии и большинство поверхностей в водной среде заряжены отрицательно и отталкиваются друг от друга из-за перекрывания двойных электрических слоев. Сила электростатического отталкивания увеличивается с уменьшением ионной силы раствора, что связано со снижением количества ионов в двойном слое. Когда бактерия при низкой ионной силе приближается к поверхности субстрата, она достигает энергетического барьера, который не может преодолеть, двигаясь лишь за счет броуновского движения или пассивного дрейфа в воде. Этот барьер еще называют вторичным энергетическим минимумом адгезии. Расстояние от поверхности носителя до вторичного энергетического уровня обычно составляет несколько нанометров и зависит от ионной силы раствора. Вначале бактерии приближаются на это расстояние и обратимо, непрочно прикрепляются к поверхности носителя, удерживаются около нее. На следующем этапе клетки используют “нановолокна” – пили и фимбрии, а также продуцируют тяжи ЭПС, которые могут преодолевать энергетический барьер из-за своего маленького радиуса. Когда барьер становится выше и отдаляется от субстрата (чем ниже ионная сила раствора, тем больше это расстояние), “нановолокна” и тяжи ЭПС не могут “дотянуться” до поверхности адсорбента, и адгезии не происходит. И, наоборот, при высокой ионной силе энергетический барьер исчезает, и клетки легко и необратимо прикрепляются к поверхности (рисунок 1). Многие исследователи подтверждают положительную

корреляционную связь между ионной силой раствора и эффективностью бактериальной адгезии (Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

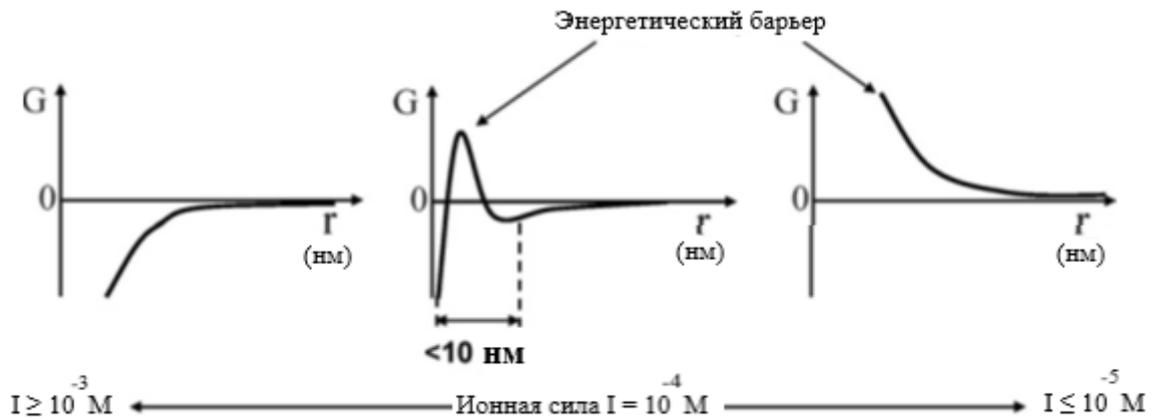


Рисунок 1 – Энергия взаимодействия между клеткой и поверхностью адсорбента в зависимости от ионной силы раствора (модифицировано по Hori, Matsumoto, 2010)

При этом изменение стандартной свободной энергии адгезии ($\Delta G_{\text{адг}}$, Дж/м²) отрицательно, т.е. адгезия термодинамически выгодна в двух случаях: малых (<0,01 нм) и больших (0,1–0,2 нм) расстояний клетки от поверхности адсорбента (рисунок 1). В первом случае (первичный минимум) величина $\Delta G_{\text{адг}}$ существенно меньше нуля, т.е. адгезия носит практически необратимый характер. Во втором (вторичный минимум) – $\Delta G_{\text{адг}}$ лишь немного меньше нуля (-3–-4 кТ), т.е. адгезия легко обратима. Между первичным и вторичным минимумами находится энергетический барьер. Обычно при первичном контакте клеток с инертными поверхностями реализуется именно второй случай, т.к. вследствие электростатического отталкивания этот барьер становится труднопреодолимым (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2004; Carniello *et al.*, 2018).

Термодинамический (физико-химический) подход. Данный подход рассматривает процесс закрепления клеток в рамках аппарата, разработанного для процесса адсорбции, и опирается на две теории – теорию Ленгмюра и теорию

смачиваемости. Основной величиной, от которой зависит адгезия микробных клеток, является величина изменения свободной энергии адгезии = свободной энергии Гиббса $\Delta G_{\text{адг}}$:

$$\Delta G_{\text{адг}} = \gamma_{\text{тм}} - \gamma_{\text{тж}} - \gamma_{\text{мж}} \quad (2),$$

где $\gamma_{\text{тм}}$, $\gamma_{\text{тж}}$ и $\gamma_{\text{мж}}$ – свободная энергия на границе раздела адсорбент-микроорганизм, адсорбент-жидкость и микроорганизм-жидкость соответственно, Дж/м². Адгезия теоретически возможна, если $\Delta G_{\text{адг}}$ меньше нуля. Термодинамический подход подразумевает обратимость адгезионного процесса, что не всегда соответствует реальной ситуации. Согласно теории ДЛВО, бактериальная адгезия – двухфазный процесс, включающий начальную, кратковременную, обратимую физическую фазу I и длительную, необратимую молекулярно-клеточную фазу II. Термодинамический подход неприменим к первой фазе, т.к. на расстоянии второго энергетического минимума еще не формируется межфазная граница твердое тело-микроорганизм.

Таким образом, термодинамический подход, который предполагает вычисление свободной энергии на границе клетка-адсорбент с учетом свободных энергий на границах адсорбент-среда и клетка-адсорбент, противоположен теории ДЛВО, согласно которой энергия взаимодействия между клеткой и субстратом зависит от расстояния между ними. Однако термодинамический подход позволяет объяснить тот факт, что клетки с высокой степенью гидрофобности лучше прикрепляются к гидрофобным поверхностям, тогда как гидрофильные клетки лучше прикрепляются к гидрофильным поверхностям (Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

В связи с тем, что на взаимодействующих поверхностях присутствуют как заряженные, так и незаряженные молекулярные группы, величину межфазной свободной энергии γ разделяют на два компонента – полярный и неполярный:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2(\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})^{1/2} - 2(\gamma_1^{AB} \gamma_2^{AB})^{1/2} \quad (3),$$

где γ_1 , γ_2 и γ_{12} – свободные энергии на поверхностях 1 и 2 и на границе контакта поверхностей 1 и 2 соответственно, Дж/м². Индексы LW и AB обозначают

неполярный (Lifshitz-van der Waals – силы Лифшица-ван дер Ваальса) и полярный (acid-base – кислотно-основные взаимодействия) компоненты γ соответственно. Полярную составляющую γ , в свою очередь, рассматривают как сумму электрон-донорного и электрон-акцептирующего компонентов (Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

Гидрофобность – важный фактор, который оказывает сильное влияние на адгезию клеток. Гидрофобные взаимодействия между двумя неполярными поверхностями, погруженными в воду, – это следствие когезии молекул воды, окружающих эти поверхности, за счет водородных связей. Водородная связь – это форма электрондонорных и электроакцепторных взаимодействий = взаимодействий между основаниями (донор электронов) и кислотами (акцептор электронов) Льюиса. Карел ван Осс (van Oss *et al.*, 1987) разработана расширенная теория ДЛВО, учитывающая влияние кислотно-основных взаимодействий на адгезионные процессы в воде. В соответствии с этой теорией поверхностная энергия складывается из компонента Лифшица-ван дер Ваальса γ^{LW} и кислотно-основного компонента Льюиса γ^{AB} , а изменение общей свободной энергии адгезии выражается следующим уравнением:

$$\Delta G_{\text{адг}} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{dl} + \Delta G^{AB} \quad (4),$$

где G^{LW} – свободная энергия взаимодействия Лифшица-ван дер Ваальса, G^{dl} – свободная энергия взаимодействия двойных электрических слоев, G^{AB} – свободная энергия кислотно-основных взаимодействий, Дж/м². Последний компонент, по сути, представляет собой компонент, отражающий гидрофобное притяжение и отталкивание за счет гидратационного эффекта. Влияние кислотно-основных взаимодействий преобладает над электростатическими взаимодействиями и взаимодействиями Лифшица-ван дер Ваальса. Эта зависимость прослеживается в определенном диапазоне расстояний между взаимодействующими поверхностями. В результате математических расчетов показано, что в воде по мере удаления клетки от поверхности адсорбента степень влияния кислотно-основных взаимодействий и перекрывания двойных электрических слоев экспоненциально снижается, и на расстоянии >5 нм

кислотно-основные взаимодействия не влияют на адгезию. Расширенная теория ДЛВО в некоторых случаях достаточно точно предсказывает экспериментальные результаты адгезии: она позволяет детектировать очень сильное кислотно-основное взаимодействие без энергетического барьера, когда, согласно классической теории ДЛВО, адгезия не ожидается (Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

Для оценки поверхностной свободной энергии γ используют краевой угол смачивания (контактный угол) жидкостей с известным значением поверхностного натяжения на исследуемой твердой поверхности. Контактный угол связан с межфазной свободной энергией уравнением Юнга:

$$\cos \theta = \frac{(\gamma_{\text{T}} - \gamma_{\text{TЖ}})}{\gamma_{\text{ж}}} \quad (5),$$

где θ – контактный угол, °; γ_{T} и $\gamma_{\text{ж}}$ – поверхностные энергии (в случае жидкостей – поверхностное натяжение) адсорбента и жидкости, соответственно, и $\gamma_{\text{TЖ}}$ – межфазная энергия на границе раздела двух фаз твердой и жидкой, мДж/м². В зависимости от дробления величины свободной энергии на компоненты проводят измерения контактных углов одной (обычно воды), двух или трех жидкостей. В последних случаях одна жидкость должна быть обязательно неполярной ($\gamma^{\text{LW}} \neq 0$, $\gamma^+ = 0$, $\gamma^- = 0$), например, дийодметан, α -бромнафтаген, *n*-алканы, и одна жидкость должна быть полярной ($\gamma^{\text{LW}} \neq 0$, γ^+ или $\gamma^- \neq 0$), например, вода, хлороформ, эфиры, спирты (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002; Voks *et al.*, 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

Уточненные теории адгезии. До настоящего времени не оценена правомерность применения коллоидного и физико-химического подходов при описании бактериальной адгезии. Если оба эти подхода правомерны, то с учетом ионной силы раствора и полярных свойств адсорбента должна наблюдаться зависимость между числом адгезированных бактерий и такими показателями (одним или несколькими из них), как $\Delta G_{\text{адг}}$, степень гидрофобности клеток и адсорбента, дзета-потенциал клеток и адсорбента. Однако в литературе можно встретить противоречивые данные.

Из данных, подтверждающих состоятельность классической расширенной теорий ДЛВО, можно привести следующие. G. Chen с соавт. (2003) описывают экспоненциальную зависимость между числом прикрепленных к аллювиальному песку клеток *Escherichia coli* и *Pseudomonas* spp. и $\Delta G_{\text{адг}}$. Считается, что гидрофобность и заряд клеточной поверхности являются важными факторами, регулирующими процесс биофлокуляции. Показано, что при увеличении возраста ила поверхность хлопьев характеризуется большей гидрофобностью и имеет меньший отрицательный заряд (Сироткин и др., 2007). В.В. Федорович с соавт. (2002а,б) использовали термодинамический подход при построении математической модели адсорбции клеток *E. coli* и *Listeria monocytogenes* на низкоэнергетических гидрофобных поверхностях (ацеталевая смола, полиэтилен низкой плотности, сульфонированный и несulfонированный полистирол, фторированный сополимер этилена и пропилена). Установлено, что бактерии закрепляются на свободной части поверхности, а не на ранее адсорбированных бактериях и, следовательно, свободная энергия адгезии остается прежней. Тем не менее, скорость адсорбции падает по мере сокращения доступной поверхности. Таким образом, по данным В.В. Федоровича с соавт. (2002а,б), адгезия бактерий подчиняется закономерностям адгезии коллоидных частиц (Adamczyk *et al.*, 2005).

Наоборот, по данным J.P. Busalmen и S.R. de Sánchez (2001), адгезия клеток *Pseudomonas fluorescens* подчиняется закономерностям теории ДЛВО при низкой (0,01 М) ионной силе раствора, либо на низкоэнергетической гидрофобной поверхности (незаряженный электрод с золотым покрытием); при использовании полярных поверхностей (заряженный электрод с золотым покрытием) и увеличении ионной силы до 0,1 М наблюдаются значительные отклонения от теории ДЛВО. L. Bastiaens с соавт. (2000) выделены из почвы три штамма *Mycobacterium* spp., которые прочно прикрепляются к тефлоновым пластинам, покрытым фенантrenom или антраценом, и в дальнейшем утилизируют адсорбированные на поверхности тефлона ПАУ. Выделенные штаммы обладают экстремально высокими ($\theta_{\text{вода}} \geq 85^\circ$) показателями гидрофобности клеточной

стенки. В то же время два из трех штаммов характеризуются также необычно низкими (от -66 до -44 мВ) значениями дзета-потенциала (ζ , мВ) и ярко выраженной способностью к адгезии как к гидрофобным (тефлон, ПАУ), так и к гидрофильным (стекло) твердым поверхностям. N. Iwabuchi с соавт. (2003) объясняют зависимость адгезивных свойств *Rhodococcus* spp. от степени гидрофобности клеток, но не от их дзета-потенциала преобладанием гидрофобных взаимодействий по сравнению с электростатическими взаимодействиями при адгезии.

Явление бактериальной адгезии гораздо сложнее, чем его описание в рамках коллоидно-химического и физико-химического подходов, которые не учитывают следующие параметры: образование кондиционирующей пленки, гетерогенность клеточной поверхности, рельеф поверхности адсорбента.

Абиотические поверхности, с которыми клетки контактируют в природных условиях или в условиях биореактора, не являются абсолютно чистыми и однородными, на них адсорбированы различные вещества органической и неорганической природы, образующие кондиционирующую пленку. Физико-химические свойства кондиционирующей пленки отличаются от таковых основного материала, и это следует принимать во внимание при определении показателей адгезии. Кондиционирующую пленку, способствующую или препятствующую бактериальной адгезии, можно создавать искусственно с использованием специально подобранных модифицирующих веществ. Подбору таких модификаторов твердых поверхностей посвящено большое количество исследовательских работ; большинство из них касается создания покрытий, предотвращающих адгезию бактерий и образование биопленок (Norde, 2006; Leňocký *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2020).

Поверхность бактериальных клеток структурно и химически гетерогенна. Например, грамотрицательные бактерии имеют наружную мембрану, представляющую собой двойной слой липидов с ЛПС на наружной стороне мембраны. ЛПС покрывают клетку неоднородно, в результате чего на клеточной поверхности есть участки с ЛПС и без них. Особая роль отводится клеточным

выростам разной длины, или нановолокнам. Это тонкие структуры диаметром от нескольких единиц до десятков нанометров. Пили и жгутики – типичные нановолокна, имеющие длину от нескольких сотен нанометров до нескольких микрометров. Они обладают низкой свободной поверхностной энергией не столько за счет химического состава, сколько за счет небольшой площади: показатель γ измеряется в Дж/м² и зависит от площади. Присутствие таких гидрофобных (низкоэнергетических) участков в составе бактериальных нановолокон на фоне в целом высокой степени гидрофильности клеточной поверхности определяет также ориентацию клетки в межфазном пространстве. Считается, что взаимодействие нановолокон с твердой поверхностью носит в целом обратимый характер, но благодаря наличию большого количества сайтов связывания адгезия целой клетки становится необратимой (Voks *et al.*, 2008; Dorobantu *et al.*, 2009; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

V. Vadillo-Rodríguez с соавт. (2004) объясняют несостоятельность коллоидного и физико-химического аспектов при описании бактериальной адгезии макроскопическим подходом к данному процессу, когда взаимодействие между поверхностью клеток и твердым субстратом считается однородным. Основным фактором микробной адгезии авторы считают стерические взаимодействия между отдельными участками поверхности клеток и адсорбента. Эти взаимодействия по природе являются силами отталкивания и действуют на расстояниях между клеткой и твердым субстратом более 10 нм. При этом электростатические силы и силы ван дер Ваальса на таком расстоянии уже перестают действовать. Величина силы отталкивания соответствует величине энергетического барьера (2700–15000 кТ), который клетке необходимо преодолеть, чтобы начали действовать силы притяжения и начался процесс адгезии. Максимальное расстояние, на котором действуют силы притяжения, зависит от физико-химических свойств адгезированных клеток, и составляет от 120 до 1200 нм (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2004).

Стерические взаимодействия при бактериальной адгезии описываются уравнением (Dorobantu *et al.*, 2009):

$$F_{St} = 50k_B T a L_0 \Gamma^{3/2} \exp(-2\pi h / L_0) \quad (6),$$

где F_{St} – сила адгезии зонда кантилевера АСМ к поверхности с полимерным покрытием (в данном контексте к бактериальной клетке), Н; k_B – постоянная Больцмана, $1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К; T – абсолютная температура, К; a – радиус наконечника зонда кантилевера АСМ, 40 нм; Γ – плотность полимерного покрытия (в данном контексте плотность ВПВ на поверхности бактериальной клетки), m^{-2} ; h – расстояние между двумя поверхностями, м; L_0 – толщина полимерного покрытия, м. Согласно этой модели, протестированной на примере адгезии зонда АСМ, модифицированного ундеканолом или октадеканом, к клеткам *Acinetobacter venetianus* RAG-1 (грамотрицательные бактерии, обладают пиллями, клетки относительно гидрофильные) и *Rhodococcus erythropolis* 20s-E1-c (грамположительные бактерии, без пилей, гидрофобные, отрицательно заряженные), силы Лифшица-ван дер Ваальса (гидрофобные взаимодействия) не принимают участия в адгезии. Значение имеют стерические силы отталкивания между функционализированным зондом и клетками. Чем больше сжимается слой внеклеточных веществ, тем сильнее адгезия. Например, в случае *A. venetianus* RAG-1 адгезия зонда сначала связана со сжатием (сокращением) пилей, затем сжатием слоя ВПВ, затем сжатием ЛПС наружной мембраны и межмолекулярными взаимодействиями (рисунок 2).

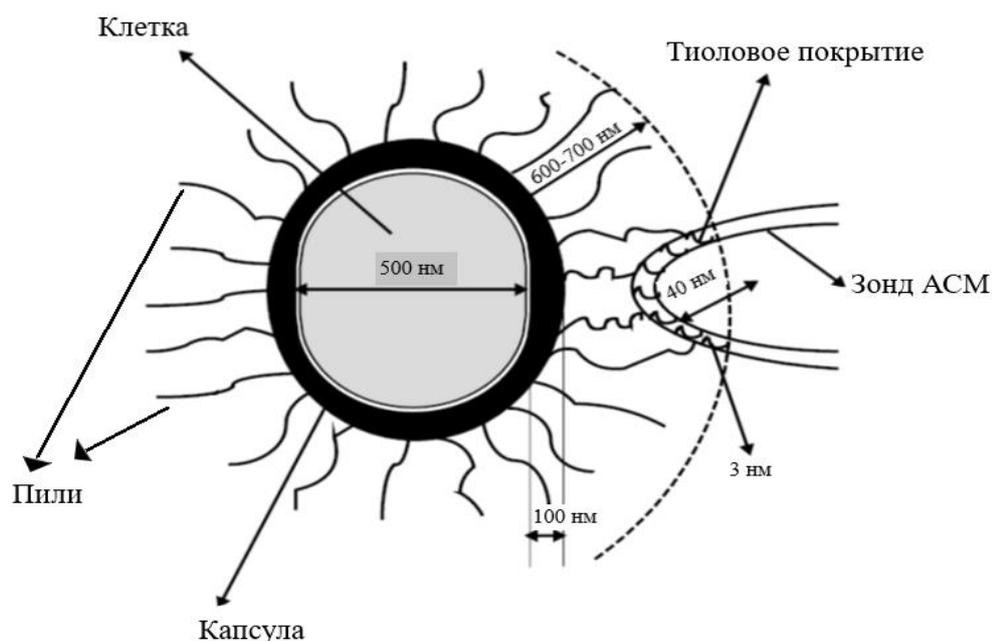


Рисунок 2 – Схематическое представление стерического взаимодействия между бактериальной клеткой, обладающей полимерной слизистой капсулой и пилиями, и функционализированным (покрытым тиолом) зондом АСМ (модифицировано по Dorobantu *et al.*, 2009)

О зависимости бактериальной адгезии от степени шероховатости и рельефа поверхности подложки упоминается в большом количестве публикаций, однако эти свойства никак не учитываются в рамках коллоидного и физико-химического подходов. Возможно, именно эти особенности твердых поверхностей оказывают существенное влияние на эффективность адгезионного процесса. Условно подложки для прикрепления клеток можно разделить на следующие категории (Сироткин и др., 2007):

- “песок”; поверхность песка является однородной, без макро-, мезопор и трещин, а также без ярко выраженных впадин и гребней, поэтому частицы песка оказываются покрыты монослоем микробных клеток, находящихся на расстоянии около 1,5 мкм друг от друга и закрепившихся благодаря адгезии в соответствии с закономерностями, выявленными для коллоидных частиц (Федорович и др., 2002а,б; Adamczyk *et al.*, 2005); полисахаридной пленки на поверхности частиц песка не наблюдается;

- “керамзит”; керамзит содержит в основном макропоры с эффективным радиусом 0,5–8,0 мкм и мезопоры; адсорбция микроорганизмов на поверхности частиц керамзита обусловлена не только наличием впадин и гребней загрузки, но и электростатическим притяжением положительно заряженных концов пластин чистых частиц керамзита и отрицательно заряженных карбоксильных групп поверхности микробных клеток; при заселении свободной поверхности керамзита немалую роль играют ван-дер-ваальсовы силы; в начальный период колонии клеток обнаруживаются лишь в макропорах, однако затем образуется рыхлый и неоднородный слой биопленки толщиной до 75 мкм; при этом не только мезо-, но и макропоры частиц керамзита оказываются закрыты полисахаридной пленкой, содержащей микробные клетки;

- “активированный уголь”; гранулы активированного угля содержат супермакропоры (35 мкм), макропоры (0,25–3,00 мкм), мезопоры (0,10 мкм), а также трещины и гребни, которые могут заселяться микроорганизмами. Бактериальная пленка имеет многослойную структуру, при этом ее сила сцепления с поверхностью угля настолько велика, что в реакторе с турбулентным потоком потери биопленки за счет воздействия срезающих сил практически не наблюдается.

1.3. Структуры бактериальных клеток, участвующие в адгезии

1. *Нитевидные выросты клеточной поверхности.* К ним относятся *жгутики* (син. “фибриллы”) и *пили* (син. “фимбрии”). Как упоминалось выше, диаметр таких выростов составляет от нескольких нанометров до нескольких десятков нанометров, длина колеблется от нескольких сотен нанометров до нескольких микрометров. Жгутики и пили содержат адгезины, обладающие высокой степенью гидрофобности либо стереоспецифически взаимодействующие с рецепторами (Dorobantu *et al.*, 2009; Hori, Matsumoto, 2010; Hori, 2015; Carniello *et al.*, 2018).

Основная функция жгутиков – обеспечение активной подвижности клеток. Они могут способствовать перемещению клеток к колонизируемой поверхности и

пассивно участвовать в адгезии за счет своего малого диаметра и низкой поверхностной энергии. Известны отдельные примеры, когда фибриллы непосредственно выполняют функцию адгезии (Handley *et al.*, 2005; Naiko, Westerlund-Wikström, 2013). Так, P.S. Handley с соавт. (2005) показано, что клетки *St. cristatus*, обладающие большим количеством длинных фибрилл, характеризуются повышенной гидрофобностью и адгезивной способностью в отношении белков слюны по сравнению с безфибрилярными клетками или клетками, обладающими небольшим количеством коротких фибрилл. Гидрофобные свойства фибрилл авторы связывают с наличием в их составе белка-адгезина SrpA.

Пили – это специализированные структуры. Их функции: индукция сигналов в клетках организма-хозяина, восприятие сигналов, адгезия к тканям многоклеточных эукариотов, коагрегация, образование биопленок, иммуномодуляция, подвижность, транспорт ДНК внутрь клетки, перенос электронов от клетки к внеклеточным акцепторам электронов (“нанопровода”). Размеры пилей составляют 1–10 нм в диаметре и 0,07–3,00 мкм в длину. Пили состоят из состыкованных друг с другом молекул белка пилина (их количество составляет несколько сотен), формирующих закрученную в спираль ось. На конце каждой оси располагается несколько других белков, сверху которых находится непосредственно адгезин. Различают несколько типов пилей, которые отличаются друг от друга функциями, строением, механизмами секреции и сборки. У одной бактерии может быть несколько типов пилей (Hori, Matsumoto, 2010; Ofek *et al.*, 2013; Ramsugit, Pillay, 2015).

Первоначальная классификация пилей основана на их антигенной структуре (Пиневич, 2006):

I тип – “маннозо-чувствительные” фимбрии, вызываемая ими агглютинация эритроцитов курицы или морской свинки ингибируется маннозой или гликозидами со сходной структурой;

II тип – “маннозо-нечувствительные” фимбрии, а также фимбрии, не вызывающие гемагглютинацию;

III тип – фимбрии, которые агглютинируют эритроциты человека, обработанные танниновой кислотой;

IV тип – “половые” фимбрии, участвующие в бактериальной конъюгации.

Пили классифицируют также на главные (их функция – исключительно адгезивная, осуществление адгезии к рецепторам эукариотов, к ним относятся пили I–III типов) и альтернативные (многофункциональные пили, способны быстро саморазбираться и за счет этого сокращаться, к ним относятся пили IV типа) (Пиневич, 2006).

В адгезии бактерий к абиотическим поверхностям участвуют следующие типы пилей:

а) пили IV типа; наиболее часто встречающиеся адгезивные структуры; присутствуют как у грамотрицательных бактерий, например, *Mycococcus xanthus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* (Hori, Matsumoto, 2010), так и у грамположительных бактерий, например, *Mycobacterium tuberculosis* (Ramsugit, Pillay, 2015). Участвуют в неспецифической адгезии бактерий к абиотическим поверхностям, а также в специфическом связывании с рецепторными молекулами в организме хозяина. Пили IV типа располагаются на полюсах бактериальных клеток, они способствуют перемещению клеток вдоль поверхности адсорбента, так называемой форме поверхностно ассоциированной подвижности. У миксобактерий перемещение до точки контакта происходит за счет “скольжения”; для псевдомонад характерна конвульсивная двигательная активность (англ. twitching mobility), т.е. движение рывками за счет сокращения и удлинения пилей (Сироткин и др., 2007; Hori, Matsumoto, 2010). Предшественник пилина – препилин – секретируется в периплазматическое пространство с помощью Sec-зависимой системы секреции, далее пептидазы, находящиеся в цитоплазматической мембране, превращают его в пилин, который секретируется из клетки с помощью белков II системы секреции через образование пор в наружной мембране (Пиневич, 2006; Hori, Matsumoto, 2010).

б) “curli”, пили грамотрицательных бактерий (Ramsugit, Pillay, 2015).

в) *chaperone/usher-assembled* (пили I типа и Р-пили) = пили, собранные с помощью шаперонов и ашер-белков (от англ. “usher” – привратник); встречаются у грамотрицательных бактерий, например, у *E. coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Salmonella* spp. (Kamaguchi *et al.*, 2003; Hori, Matsumoto, 2010). Субъединицы основного структурного белка пилей I типа и Р-пилей выводятся через цитоплазматическую мембрану с помощью Sec-зависимой системы транспорта, в периплазматическом пространстве они связываются с шаперонами. Полученный комплекс далее связывается с ашер-белками – платформой, располагающейся в наружной мембране и обеспечивающей правильную сборку пилей в виде длинной нити. Субъединицы структурного пилина собираются в цепочку и вытягиваются с помощью ашер-белков на наружную поверхность клеточной стенки, шаперон отсоединяется и остается в периплазматическом пространстве. Структурный белок пилей I типа и Р-пилей кодируется генами *fimA* и *rapA*, адгезины – генами *fimH* и *rapG* соответственно. Расположение пилей I типа и Р-пилей перитрихиальное, они не используются для движения, их основная функция – специфическая адгезия к другим клеткам. Например, адгезин FimH связывается с маннозными рецепторами на поверхности эукариотических клеток (Hori, Matsumoto, 2010; Ramsugit, Pillay, 2015).

г) пили, собранные с помощью сортаз. Характерны для грамположительных бактерий, например, представителей *Corynebacterium* и *Streptococcus*. В отличие от пилей I и IV типов, Р-пилей, субъединицы структурного белка этих пилей связаны друг с другом ковалентными связями. Субъединицы пилина экскретируются из клетки также с помощью Sec-зависимой системы, затем транспептидазный белок сортаза узнает специфические мотивы и соединяет субъединицы межмолекулярными изопептидными мостиками. Полностью собранная нитевидная структура прикрепляется к пептидогликану клеточной стенки. Пили, собранные с помощью сортаз, сложны в обнаружении, они очень тонкие, диаметром 2–3 нм, их основная функция – специфическая адгезия для дальнейшей инвазии в ткани организма-хозяина (Hori, Matsumoto, 2010; Ramsugit, Pillay, 2015).

2. *ЛПС наружной мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий.* Ключевой фактор адгезии патогенных и условно-патогенных грамотрицательных бактерий. Состоит из липида А, коровых полисахаридов и внешних участков О-антигена. ЛПС участвует в инициации адгезионного процесса. Общий А-антиген в составе О-антигена состоит из 10–20 повторяющихся остатков D-рамнозы, серотипспецифический В-антиген состоит из повторяющихся остатков ди- и пентасахаридов. В-антиген содержит более длинные полисахариды, больше аминсахаров, но меньше остатков сульфатов и рамнозы по сравнению с А-антигеном. Показано, что при контакте В-антигена с минеральными поверхностями образуются водородные связи и выделяется 2,5 кТ энергии при образовании каждой связи. Считается, что образования 1000 водородных связей достаточно для прочного связывания клетки с твердой поверхностью. Однако, по-видимому, из-за высокого отрицательного заряда ЛПС грамотрицательным бактериям необходимо преодолеть энергетический барьер при сближении с поверхностью минералов в несколько сотен кТ. По подсчетам исследователей, это происходит на расстоянии между клеткой и абиотической поверхностью, равном 20 нм (Hori, Matsumoto, 2010; Ofek *et al.*, 2013).

3. *ВПВ, связанные с наружной поверхностью клеточной стенки бактерий.* Важнейшими компонентами ВПВ являются полисахариды, липополисахариды, белки, нуклеиновые кислоты. Это слабые полиэлектролиты с высоким содержанием ионогенных групп, в основном карбоксильных и фосфатных групп полисахаридов, которые легко могут быть протонированы или депротонированы в зависимости от кислотности среды. Степень протонирования ионогенных групп, а также их количество в двойном электрическом слое, образующемся вокруг бактериальной клетки в любом солевом растворе и представляющем, по сути, самый наружный слой клетки, влияет на величину и плотность электрического заряда клеточной поверхности (ζ). Таким образом, внеклеточные полимеры влияют на характер и силу электростатического взаимодействия, возникающего в процессах бактериальной агрегации и адгезии (Сироткин и др., 2007; *Microbial biofilms*, 2003; Pen *et al.*, 2015).

ВПВ участвуют в трех типах слабых взаимодействий (Сироткин и др., 2007; Pen *et al.*, 2015):

- дисперсионное взаимодействие под действием сил ван дер Ваальса с энергией связывания порядка 2,5 кДж/моль, действуют на расстоянии 0,3–0,4 нм, блокируется поверхностно-активными веществами;

- электростатическое взаимодействие между заряженными функциональными группами белков и полисахаридов (карбоксильные, фосфорильные, сульфурильные, сульфгидрильные и аминокислотные), энергия связывания 12–29 кДж/моль, действуют на расстоянии примерно 0,3 нм, блокируется комплексообразователями, например, Ca^{2+} ;

- водородные связи, действующие преимущественно между гидроксильными группами полисахаридов и в четвертичной структуре белков, энергия связывания 10–30 кДж/моль, действуют на расстоянии 0,27–0,31 нм, блокируется в присутствии мочевины.

Если макромолекула обладает 10^6 такими центрами связывания, их совместная энергия может соответствовать энергии ковалентного связывания (Сироткин и др., 2007; Pen *et al.*, 2015).

Основной вклад в адгезионные взаимодействия вносят такие компоненты ВПВ, как ЭПС. ЭПС состоят из нескольких фракций: (1) прочно связанные с клеткой, образующие капсулу, (2) слабо связанные с клеткой, входящие в состав слизи, (3) растворимые в воде, несвязанные с клеткой молекулы. Пространственная структура и целостность биопленок в большой степени зависят от продукции клетками ЭПС (Сироткин и др., 2007; *Microbial biofilms*, 2003; Pen *et al.*, 2015; *Biofilms..*, 2016). Инкапсуляция в ЭПС позволяет бактериям-комменсалам, населяющим кишечник человека, защищаться от клеток иммунной системы и делает их менее чувствительными к антибиотикам (Zhang *et al.*, 2020).

Показано, что ВПВ имеют ключевое значение для биофлокуляции и формирования биопленок. ВПВ составляют 50–90% всего углерода биопленки и являются основой ее матрикса, являются основными компонентами слизистой матрицы хлопьев активного ила, инициируют образование хлопьев по полимерно-

мостииковому механизму, общее содержание ВПВ важно для осаждения ила. ВПВ формируют пространство между бактериальными клетками, заключая их в трехмерную матрицу и способствуя удержанию на поверхности, сообщают биопленкам их форму и физические свойства. Чаще всего ВПВ образуют высокогидратизированную слизистую матрицу с содержанием воды до 98%, представляющую собой губчатоподобный гель; могут содержать и фибриллярные структуры (Сироткин и др., 2007; *Microbial biofilms*, 2003; *Biofilms...*, 2016; Cai, 2020).

4. *Специфические структуры отдельных прокариотов.* Японскими учеными из биореактора для очистки отработанных газов от летучих органических загрязнителей выделен биодеструктор толуола *Acinetobacter* sp. Tol 5 с необычайно высокой адгезивной активностью в отношении твердых поверхностей. Адгезивная способность этого штамма настолько высока, что он в виде сгустков прилипает к внутренней поверхности наконечников при отборе клеточной суспензии автоматическим дозатором. У клеток *Acinetobacter* sp. Tol 5 обнаружено три типа морфологически различающихся пилеподобных перитрихиальных нановолокон и один тип якорных (закрепленных в наружной мембране, по-видимому, белковых) нановолокон. Получен менее адгезионноспособный мутант *Acinetobacter* sp. T1, дефектный по данным нановолокнам. Адгезивная активность мутанта T1 заметно снижается с уменьшением ионной силы, и он полностью теряет способность к адгезии при концентрации ионов 0,015 мМ, тогда как адгезия клеток дикого типа не зависит от ионной силы раствора. По-видимому, даже небольшого количества поверхностных нановолокон достаточно для адгезии штамма Tol 5, поскольку он сохраняет эту способность при разной ионной силе даже при предварительном выращивании в условиях, затрудняющих образование клеточных выростов. Выявленные особенности *Acinetobacter* sp. Tol 5 являются подтверждением того, что клеточные выросты (нановолокна) оказывают существенное влияние на процесс бактериальной адгезии. Более того, клетки дикого типа прикрепляются необратимо к поверхности носителя практически сразу же после контакта с

носителем, в отличие от мутанта T1 им не требуется время для постепенного сближения с носителем, нановолокна сразу же приходят с ним в прочный контакт без преодоления энергетического барьера. Показано, что обнаруженные клеточные выросты также участвуют в клеточной агрегации Tol 5: клетки T1 не агрегируют друг с другом и адсорбируются на твердых носителях в виде монослоя, тогда как клетки Tol 5 хорошо прилипают друг к другу и адгезируют к твердым поверхностям с образованием мощных клеточных скоплений (Hori *et al.*, 2001, 2008; Ishii *et al.*, 2006, 2008; Hori, Matsumoto, 2010).

1.4. Бактериальные адгезины

Известно, что незаряженные (гидрофобные) молекулярные группы всегда испытывают силы притяжения ван дер Ваальса, поэтому для усиления адгезивной способности клетки синтезируют вещества – адгезины, увеличивающие степень гидрофобности клетки или ее отдельных участков (Hori, 2015; Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018). Другая функция адгезинов – это стереоспецифическое взаимодействие (Liang *et al.*, 2000; Yousef, Espinosa-Urgel, 2007; Dorobantu *et al.*, 2009). Поэтому для бактериальных адгезинов характерны следующие свойства: высокая степень гидрофобности; специфичность; индуцируемость (синтез адгезинов происходит в ответ на присутствие индуктора – твердой поверхности, специфического рецептора или конкретных условий культивирования) (Mogensen *et al.*, 2005).

По своей природе бактериальные адгезины могут быть белками (Handley *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2008; Hickey *et al.*, 2009; Alamuri *et al.*, 2010; Casutt-Meyer *et al.*, 2010; Ristow *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017), углеводами (Agladze *et al.*, 2005; Sadovskaya *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2005), липидами (Rubinsztein-Dunlop *et al.*, 2005), липоолигосахаридами (Nassif, 2000; de Jesus *et al.*, 2005), липопротеинами (Roachford *et al.*, 2019), тейхоевыми кислотами (Sokolovska *et al.*, 2003). У одной бактерии может быть несколько типов адгезинов. Например, адгезины *P. fluorescens* представляют собой комплекс полисахаридов и белков (Николаев и др., 2000). Адгезины возбудителя дифтерии

C. diphtheriae включают белки (гемагглютинины, лектиноподобные белки, ферменты с *транс*-сиалидазной активностью) и углеводы (остатки N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, галактозы, маннозы и сиаловой кислоты). Эти соединения обеспечивают стереоспецифическое узнавание клетками *C. diphtheriae* углеводных рецепторов и лектиновых лигандов на поверхности эпителиальных клеток человека (Маркова и др., 2018; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000).

По расположению на клеточной поверхности различают фимбриальные и афимбриальные адгезины. Фимбриальные адгезины располагаются в фимбриях (пиях), характерны для грамотрицательных бактерий. Многие фимбриальные адгезины – это углеводсвязывающие белки-лектины (Выдрякова и др., 2007; Yajima *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006; De Greve *et al.*, 2007). Фимбриальные адгезины могут располагаться на кончиках или по всей длине поверхностных выростов (Handley *et al.*, 2005; Starks *et al.*, 2006; De Greve *et al.*, 2007).

Афимбриальные адгезины располагаются в основной части клеточной стенки, они не связаны с выростами и нановолокнами. Афимбриальное расположение адгезинов в клеточной стенке характерно для тейхоевых и миколовых кислот (Sokolovska *et al.*, 2003), белковых адгезинов грамотрицательных бактерий, принадлежащие к семействам OMP (outer membrane proteins – белки наружной мембраны) (Mogensen *et al.*, 2005; Hinsa, O'Toole, 2006) и ATADs (autotransporter adhesins – аутотранспортные адгезины) (Hori, Matsumoto, 2010). Возможно также расположение адгезинов в капсуле, слизи или в специальных везикулах, тогда их не относят ни к фимбриальным, ни к афимбриальным адгезинам (Amano, 2003; Kamaguchi *et al.*, 2003; Słotwińska, 2013).

Из фимбриальных белковых адгезинов наиболее хорошо изучен белок FimH/PilE. Он обнаружен у энтеробактерий, например, у *E. coli* и *Salmonella enterica*. Располагается в кончиках фимбрий I типа, рецептором для него служит остаток маннозы на клеточной поверхности эпителиальных клеток. Данный адгезин может находиться в двух конформационных состояниях – в первом

состоянии белок обеспечивает слабое связывание с субстратом, во втором – более сильное. Сигналом для перехода FimH из первого состояния во второе является увеличение скорости или силы потока. Таким образом, усиление связи FimH с маннозным рецептором способствует более прочному удержанию бактериальных клеток в условиях высокой скорости потока. FimH – это фактор вирулентности, он взаимодействует с рецепторами на тканях человека и позволяет бактериям их колонизировать, таким образом обеспечивая адгезию бактерий с дальнейшим формированием биопленки (Nillson *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2006). Кроме FimH *E. coli* синтезируют белки пилины CooD, выполняющие функцию адгезинов, которые также располагаются в кончиках фимбрий (Starks *et al.*, 2006).

Наибольшим разнообразием среди афимбриальных белковых адгезинов характеризуются аутотранспортные адгезины ATADs. Различают два типа ATADs: мономерные ATADs и тримерные аутотранспортные адгезины ТААs. Особенность аутотранспортных адгезинов – секреция из клетки без участия других белков. Такой механизм секреции относится к V типу систем секреции. Синтезированные в клетке ATADs с помощью Sec-зависимого механизма выводятся в периплазматическое пространство. Сигнальные пептиды модифицируют ATADs по N-концу, после чего ATADs с помощью C-концевого домена встраиваются в наружную мембрану с формированием поры, через которую при участии другого домена ATADs “протягивают” себя на наружную поверхность клеточной стенки (Пиневиц, 2006; Hori, Matsumoto, 2010).

Глава 2. ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS* К УСЛОВИЯМ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ. МЕХАНИЗМЫ АДГЕЗИИ АКТИНОБАКТЕРИЙ

2.1. Адаптивные приспособления родококков к условиям антропогенно загрязненных экосистем

Актинобактерии рода *Rhodococcus* Zopf 1891 (Approved Lists 1980) (филум *Actinobacteria*, класс *Actinomycetia*, порядок *Corynebacteriales*, семейство *Nocardiaceae*) (<https://lpsn.dsmz.de/class/actinomycetia>) – это аэробные, грамположительные, неподвижные, некислотоустойчивые, неспорообразующие бактерии с трехстадийным циклом развития “кокки – ветвящиеся нитевидные клетки – кокки” (Bergey’s Manual., 2012). На настоящий момент род включает 51 вид (с учетом только валидных, правильных названий без синонимов) (Genus *Rhodococcus*, 2021).

Родококки – экстремотолератные бактерии. Они обитают в холодных полярных пустынях, антарктических и альпийских почвах, почв тундры с ежегодным промерзанием и оттаиванием в соседствующих с ледниками районах, болотных солончаках, сухом песке в пустыне, поверхностных пресных, грунтовых, минеральных и пластовых водах, обнаруживаются в коралловых рифах, снеге и керне (Ившина, 2012; Luz *et al.*, 2004; Sheng *et al.*, 2011; Konishi *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2015; Viggor *et al.*, 2015; Goordial *et al.*, 2016; Röttig *et al.*, 2016; Sinha *et al.*, 2017; Táncsics *et al.*, 2017; Habib *et al.*, 2018; Ramaprasad *et al.*, 2018). Родококки обнаруживаются во многих антропогенно загрязненных экосистемах, таких как нефтезагрязненная почва, загрязненные нефтепродуктами донные осадки рек и северных морей, нефтешламы, загрязненные дизельным и биодизельным топливом почвенные среды, загрязненные микропластиком мангровые осадочные отложения, загрязненные фенолом отходы, сточные воды текстильной и целлюлозно-бумажной промышленности, грунтовые воды вблизи автомобилестроительных заводов, почвы с длительным загрязнением хлорорганическими соединениями, загрязненные взрывчатыми веществами

водные и почвенные среды (Ившина, 2012; Bej *et al.*, 2000; Hassanshahian *et al.*, 2013; Acosta-González *et al.*, 2015; Mikolasch *et al.*, 2015; Aggarwal *et al.*, 2016; Egorova *et al.*, 2017; Auta *et al.*, 2018; Cheremnykh *et al.*, 2018; Kuyukina, Ivshina, 2019a; Istvan, Ronen, 2020; Mitter *et al.*, 2021; Miao *et al.*, 2021; Naloka *et al.*, 2021; Pátek *et al.*, 2021).

Биологические особенности родококков, способствующие их выживанию в антропогенно нарушенных, загрязненных экосистемах включают (Ившина и др., 2007; Ившина, 2012; Iwabuchi *et al.*, 2003; Sokolovska *et al.*, 2003; Martínková *et al.*, 2009; Larkin *et al.*, 2010a,b; Sutcliffe *et al.*, 2010; Yam *et al.*, 2010; de Carvalho *et al.*, 2014; Ivshina *et al.*, 2015; Cappelletti *et al.*, 2019a,b; Kuyukina, Ivshina, 2019a,b; Pátek *et al.*, 2021):

- большой геном размером более 5 млн. п.н. с высоким (50–70%) содержанием в геноме пар гуанин-цитозин, что обуславливает физическую стабильность нуклеиновых кислот;

- “избыточный” геном с множеством функциональных генов-аналогов с дублирующими функциями;

- разнообразие оксидоредуктаз и гидролаз (дегидрогеназы, пероксидазы, оксигеназы, сульфатазы, нитрилгидратазы, фенолгидролазы, полимедные оксидазы и др.), среди которых присутствуют оксигеназные комплексы с широкой субстратной специфичностью, что позволяет родококкам использовать необычайно широкий спектр метаболических и кометаболических субстратов;

- наличие жесткой липофильной клеточной стенки с высоким содержанием миколовых кислот (длинноцепочечные α -разветвленные β -гидроксилированные жирные кислоты), обеспечивающей защиту от поедания простейшими и обладающей повышенным сродством к гидрофобным соединениям;

- образование капсулоподобных структур вокруг клеток для защиты от неблагоприятных факторов среды, в частности, от осмотического стресса и высыхания;

- естественная колониально-морфологическая изменчивость (диссоциация) и связанные с ней изменчивость многих физиолого-биохимических свойств и

возможность существования родококков в виде гетерогенных популяций с разной выраженностью признаков у членов популяции;

- клеточный полиморфизм и наличие в цикле развития переживающей стадии временно покоящихся, но потенциально активных цистоподобных клеток, а также низкий уровень эндогенного дыхания, что обеспечивает выживание родококков в условиях длительного голодания;

- синтез протекторных и макроэргических соединений, каротиноидных пигментов, экстрацеллюлярных и клеточно связанных гликолипидов;

- способность к азотфиксации в присутствии углеводов и олигонитрофилия;

- отсутствие катаболитной репрессии, способность к диауксо-, олиго- и психротрофии – свойства, обеспечивающие быстрый переход клеток с углеводородного субстрата на углеводный и сохранение метаболизма в условиях низкой концентрации субстрата и низкой скорости протекания биохимических процессов;

- ацидо-, алкало-, гало-, ксеро-, термо- и осмоотолерантность.

Перечень поллютантов, которые могут метаболизировать актинобактерии рода *Rhodococcus*, включает предельные и разветвленные алканы с длиной цепи от двух до 30 и более атомов углерода, циклопарафины, бензол и его гомологи, ПАУ, фенолы, ароматические кислоты и их производные, галогенированные углеводороды, нитрилы, взрывчатые вещества на основе нитросоединений, эндокринные дизрапторы, смоляные кислоты, S- и N-гетероциклические соединения с выраженной биологической активностью, синтетические полимеры (Ившина, 2012; Соляникова и др., 2017; Li *et al.*, 2006; Martínková *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Larkin *et al.*, 2010b; Yam *et al.*, 2010; Ivshina *et al.*, 2012, 2015, 2019; Gilan, Sivan, 2013; He *et al.*, 2014; Egorova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018; Kuyukina, Ivshina, 2019a,b; Istvan, Ronen, 2020). Штаммы *Rhodococcus*, выделенные из экотопов с высоким уровнем антропогенной нагрузки, характеризуются выраженной эмульгирующей и биодеструктивной способностью в отношении индивидуальных углеводородов и нефтепродуктов, повышенной

устойчивостью к высоким концентрациям (от 100 и 250 мМ и более) тяжелых металлов (кадмий, цинк, никель, медь, молибден, свинец, хром, ванадий и др.) и органических растворителей (от 20 до 80 об. %), а также стабильной активностью в условиях экстремальной кислотности (рН 2–6) и засоленности (2–6% NaCl) среды, проявляют деградиционную способность при высоких (40 °С и выше) и низких (4–15 °С) показателях температуры. Родококки занимают постоянное и доминирующее положение в бактериоценозах почв нефтепромыслов в условиях повышенного долговременного воздействия тяжелыми металлами и нефтяными углеводородами (Ившина, 2012; de Carvalho *et al.*, 2014; Kuyukina, Ivshina, 2019a). Способность родококков к окислительной трансформации и деструкции природных и антропогенных углеводородов разных классов делает их наименее зависимыми от внешней среды, позволяет избежать жесткой конкуренции за субстрат в природных средах и существовать в экстремальных условиях загрязнения среды углеводородами.

Родококки могут быть отнесены к трофической группировке диссипотрофов, эффективно использующих рассеянный поток мономеров. Для диссипотрофов в микробном сообществе характерны высокое сродство к углеродному субстрату; способность использовать его в низкой концентрации; относительно высокие скорости роста в этой области концентраций; адаптация к длительному переживанию неблагоприятных условий. С позиций современной микробной экологии, родококки – стресс-толеранты. Это микроорганизмы-персисторы, выживающие в неблагоприятных и стрессовых условиях окружающей среды (Но *et al.*, 2017). Механизмы персистенции стресс-толерантов в окружающей среде до конца не изучены. Эту жизненную стратегию могут реализовывать микроорганизмы с пластичным геномом, развитым метаболическим потенциалом, способностью к усвоению широкого спектра питательных субстратов, набором адаптивных приспособлений к различного рода стрессам.

2.2. Механизмы адгезии актинобактерий

Факторы адгезии патогенных актинобактерий. Наиболее детально изучены адгезины патогенных микобактерий. Они представляют собой белки и липополисахариды клеточной стенки, специфически взаимодействующие с рецепторами на поверхности клеток хозяина (*Mycobacteria protocols*, 2015; Bisht, Meena, 2019):

1) Липоарабиноманнан (ЛАМ) – полисахарид клеточной стенки. У патогенных микобактерий (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*) преобладает маннозо-ЛАМ, связывающийся с остатками маннозы на поверхности эукариотических клеток. У непатогенных микобактерий (*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis*) преобладает арабинофуранозил-ЛАМ. Функции ЛАМ заключаются в снижении концентрации ионов Ca^{2+} в макрофагах для предотвращения слияния фагосом, блокировании процесса апоптоза, подавлении иммунного ответа, осуществляемого дендритными клетками.

2) Фибронектинсвязывающие белки FnBPs. Являются секреторными белками. Обеспечивают связывание микобактериальных клеток с внеклеточным матриксом, блокируют функцию фибронектина как лиганда рецептора интегринов, обладают миколилтрансферазной активностью.

3) Шаперон Спр60.2 (Hsp65). Связывается с рецептором CD43 на поверхности макрофагов. Это помогает микобактериям попасть внутрь макрофагов, предотвращает узнавание зараженных макрофагов клетками иммунной системы и нарушает нормальное течение воспалительного процесса. Дополнительная функция Спр60.2, как белка теплового шока, заключается в его защитном действии при стрессе.

4) Гепаринсвязывающий гемагглютинин НВНА. Поверхностный белок, отвечающий за связывание микобактерий с эпителиальными клетками и диссеминацию возбудителя в организме.

5) Белок размером 19 кДа – липопротеин, экспрессируемый медленно растущими (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium vaccae*) микобактериями. Не до конца

изученный белок. Считается, что отвечает за адгезию к клеткам организма-хозяина, модулирует иммунный ответ макроорганизма и отвечает за транспорт питательных веществ в клетки микобактерий.

6) Малатсинтаза. Внеклеточный адгезин, связывающийся с ламинином, фибронектином и эпителиальными клетками легких A549. Кроме того, данный белок помогает в ассимиляции микобактериями компонентов цикла Кребса, участвует в защите микобактериальных патогенов от окислительного стресса.

7) Пили МТР. Относятся к амилоидным белкам, пилиям IV типа и “curli”. Адгезируют к ламинину и специфическим рецепторам на поверхности макрофагов. Обеспечивают агрегацию микобактерий, образование ими биопленок, колонизацию тканей и инвазию внутрь макрофагов.

Перечень адгезинов возбудителя дифтерии *C. diphtheriae* включает в себя лектиноподобные белки гемагглютинины, остатки N-ацетилглюкозамина, галактозы, маннозы и сиаловой кислоты, гидрофобины, ферменты с нейраминидазной и *транс*-сиалидазной активностями. Показано, что гемагглютинины *C. diphtheriae* могут не только взаимодействуют с субстратом как лектины, но и действуют как белки-гидрофобины. В целом гидрофобины коринебактерий имеют фимбриальное и афимбриальное расположение. Адгезины на основе углеводов (обычно входящие в состав внеклеточной слизи) – N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, галактозы, маннозы и сиаловой кислоты – участвуют во взаимодействии коринебактериальных клеток с эпителиальными клетками и абиогенными поверхностями, например, стеклом. Кроме того, *C. diphtheriae* способны регулировать степень гидрофобности клеточной стенки путем отщепления и присоединения к ней углеводных остатков (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2015; Krishnan, 2015; Sangal *et al.*, 2015).

Патогенные микобактерии обладают рядом специфических адгезивных рецепторов, которые связываются с белками на поверхности клеток (эндотелия кровеносных сосудов, фагоцитах) млекопитающих, обеспечивая избирательную клеточную адгезию. В качестве таких рецепторов могут выступать белки, углеводы и фосфолипиды (фосфатидилинозитол маннозид, в частности), которые

являются ключевыми биомаркерами в диагностике микобактериальных инфекций (Ramsugit, Pillay, 2014, 2015; De Maio *et al.*, 2018; Squeglia *et al.*, 2018; Bisht, Meena, 2019).

В настоящий момент достоверно документирована патогенная природа *Rhodococcus equi* для человека и животных (Ng *et al.*, 2013; Kämpfer *et al.*, 2014; Anastasi *et al.*, 2016; MacArthur *et al.*, 2017; Risk group database, 2021). Хотя встречаются единичные описания и других видов родококков как инфекционных агентов (Cuello *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004; Avendaño-Herrera *et al.*, 2011). Представители условно-патогенного вида *R. equi* являются обычными обитателями почвенных экосистем. При наличии в клетках особой плазмиды *var*, в которой закодированы факторы вирулентности, они становятся способны вызывать бронхопневмонию с сопутствующим поражением желудочно-кишечного тракта и лимфоузлов, главным образом у жеребят, но также у других животных и у иммунокомпromетированных (в основном ВИЧ-инфицированных) людей (Meijer, Prescott, 2004; von Bargaen, Haas, 2009; Notification 6786-01-0213, 2012; Vázquez-Boland, Meijer, 2019). Патогенез ассоциированной с *R. equi* инфекции подобен таковому при туберкулезе. Бактерии *R. equi* – это факультативные внутриклеточные паразиты, выживающие внутри макрофагов. Клетки *R. equi* обладают механизмами, препятствующими слиянию фагосом и лизосом внутри макрофага, что позволяет этим бактериям персистировать и размножаться в организме хозяина (von Bargaen, Haas, 2009).

Основные факторы вирулентности *R. equi* – это белки VarA–VarH, закодированные в плазмиде размером 80–90 тыс. п.н. Клетки *R. equi* попадают в организм хозяина при дыхании и инфицируют альвеолярные макрофаги. Связывание *R. equi* с макрофагами происходит при участии как специфических, так и неспецифических факторов: системы комплемента, рецептора Mac-1, гемагглютинаина, гидрофобных взаимодействий. В ответ на инфекцию активированные макрофаги образуют большие количества реактивных форм кислорода, таких как H₂O₂ и супероксид-анион. Чтобы противостоять окислительному стрессу, внутриклеточные патогены *R. equi* обладают

определенными механизмами. Экспрессия их плазмидных генов запускается изменением pH, уменьшением доступности железа, усилением окислительного стресса и повышением температуры. Экспрессия белка VarA возрастает при окислительном стрессе и пониженном значении pH. Белок VarA сдвигает значения pH внутри макрофага в нейтральную сторону, он способствует исключению из фагосомы вакуолярной формы АТФазы. VarA далее может транспортироваться из фагосом в лизосомы, делая их мембраны более проницаемыми для протонов. Кроме того, у *R. equi* обнаружены гены, кодирующие белки теплового шока, протеазы Clp, каталазы, супероксиддисмутазы, алкилгидропероксидредуктазы, микоредоксины (von Bargen, Haas, 2009; Heller *et al.*, 2010; Letek *et al.*, 2010; von Bargen *et al.*, 2019; Mourenza *et al.*, 2019).

М. Letek с соавт. (2010) проведен детальный анализ генома и фенотипических свойств *R. equi* 103S, в результате которого выявлены следующие молекулы адгезии:

- фибронектин-связывающие белки REQ01990, 02000, 08890, 20840 – гомологи белка Fbp/антигена 85 *M. tuberculosis*;
- цитoadгезивные пили типа IVb из подсемейства Flp-пилей грамотрицательных бактерий для прикрепления к эпителиальным клеткам и макрофагам: по-видимому, внесены в геном *R. equi* 103S в результате горизонтального переноса генов в виде *rpl*-фрагмента из 9 генов, кодирующих биогенез этих структур; *rpl*-фрагмент не обнаружен в геномах *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis* и непатогенных *Rhodococcus*, таких как *R. erythropolis* и *R. jostii*;
- адгезины REQ38170 и REQ31340 – гомологи микобактериальных цитoadгезинов: гепарансульфатсвязывающего гемагглютинаина HbhA и мультифункционального гистоноподобного / ламинин- и глюкозаминогликан-связывающего белка Lbp/Hlp;
- адгезин REQ34990 – белок с неизвестной функцией, имеющий домен FAS1/BigH3, ответственный за клеточную адгезию с помощью интегринов.

Факторы адгезии фитопатогенных родококков. Родококки обнаруживаются в составе ризосферной (корневой) и филлосферной (листовой) микробиоты (Zhao *et al.*, 2012; Kämpfer *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). Ассоциируясь с растениями, родококки могут не только стимулировать их продуктивность, но и вызывать патологию. Описаны фитопатогены *Rhodococcus corynebacterioides* и “*Rhodococcus fascians* assemblage”, вызывающие синдромы кустистости верхушек фисташковых деревьев (Stamler *et al.*, 2015; Vereecke *et al.*, 2020) и листовых галлов (Goethals *et al.*, 2001; Stes *et al.*, 2013). Наличие в клетках линейной плазмиды pFiD188 является необходимым условием проявления вирулентных свойств *R. fascians*. В плазмиде располагаются гены, кодирующие белки перехода бактериальных клеток из эпифитного в эндофитное состояние и последующий синтез специфичных цитокининов, которые изменяют метаболизм в растительном организме. Эндофитные клетки *R. fascians* размножаются в межклеточном пространстве галлов, а также внутри клеток. Персистенция клеток *R. fascians* в тканях инфицированных растений связана с экспрессией генов глиоксилатного цикла и метаболизма глицина, что позволяет бактериям использовать метаболиты растений в качестве источников углерода. Установлено, что плазида pFiD188 не влияет на колонизацию. Клетки *R. fascians* внутри галлов располагаются между растительными клетками, отдельные клетки родококков находятся внутри растительных клеток. Клетки *R. fascians* окружены слизью, состоящей, по-видимому, из ЭПС. Слизь создает для клеток благоприятные условия и защищает от высыхания. *R. fascians* – эпифит, превращающийся в эндофит (Stes *et al.*, 2011, 2013; Creason *et al.*, 2014). Механизмы адгезии бактерий данного вида в эпифитной форме к поверхности листьев растений не изучены.

Факторы адгезии непатогенных актинобактерий. Между степенью гидрофобности клеточной поверхности и адгезивными свойствами актинобактерий чаще выявляется статистически значимая корреляция по сравнению с таковой между величиной заряда клеток и их адгезивной активностью (Iwabuchi *et al.*, 2003). Для *G. amarae* отмечается наличие

амилоидных белков в составе фибрилл, которые необходимы для связывания клеток друг с другом и формирования клеточных агрегатов (Larsen *et al.*, 2008). Способность актинобактерий к адгезии влияет на биodeградацию гидрофобных соединений данной группой микроорганизмов. Так, непатогенные штаммы *Mycobacterium* spp., выделенные из почвы и обладающие экстремально ($\theta_{\text{вода}} \geq 85^\circ$) высокими показателями гидрофобности клеточной стенки, прочно прикрепляются к тефлоновым пластинам, покрытым фенантроном или антраценом, и осуществляют эффективную биodeградацию адсорбированных углеводов (Bastiaens *et al.*, 2000).

Факторы адгезии непатогенных родококков. Выявлено влияние ВПВ на адгезию непатогенных родококков. На примере штамма *Rhodococcus* sp. RC291 показано, что адгезия родококков зависит от состава и структурных особенностей внеклеточных полимеров (Pen *et al.*, 2015). Родококки синтезируют ЭПС, состоящие из остатков рамнозы, галактозы, глюкозы и глюкуроновой кислоты, могут содержать липиды (Iwabuchi *et al.*, 2003; Pen *et al.*, 2015). В экспоненциальной фазе роста бактерий молекулы ЭПС связаны друг с другом β -1,3- и β -1,4-гликозидными связями. В результате образуются жесткие полимерные спирали, собранные в рыхлые, тянущиеся за клеткой тяжи. Такие полисахаридные тяжи характеризуются невысокой (≤ 1 нН) силой адгезии к твердой минеральной поверхности, в частности к диоксиду кремния. В стационарной фазе роста ЭПС родококков связаны α -1,2- и α -1,6-гликозидными связями, а также содержат О-ацетильные группы. Это приводит к образованию полимерной структуры, окружающей клетку практически сплошным чехлом. Сила адгезии экзополисахаридного чехла к диоксиду кремния колеблется от 2 до 4 нН. Форма силовых кривых свидетельствует о том, что адгезия ЭПС родококков к минеральному субстрату связана с образованием водородных связей (Pen *et al.*, 2015). Эта гипотеза может быть подтверждена данными, полученными Н. Li с соавт. (2015) и L.Y. Lopez с соавт. (2015). На примере *Rhodococcus opacus* и *R. ruber* этими авторами показано, что родококки наиболее эффективно прикрепляются к минеральным поверхностям (гематит, кальцит, серпентин,

доломит) при рН 3,0–3,3, и с увеличением показателя кислотности среды адгезивная активность родококков снижается. Выявлено, что при рН 3,0–3,3 клетки не заряжены ($\zeta=0$ мВ, изоэлектрическая точка). Это связано с тем, что в среде при данных значениях рН находится большое количество протонов, которые связываются с отрицательно заряженными карбоксильными и фосфатными группами ЭПС родококков и полностью их экранируют. Протонирование ионогенных групп приводит к образованию водородных связей между клетками и минеральными частицами. В то же время, по данным L.M.S. de Mesquita с соавт. (2003), пик адгезии *R. oracis* к минералам наблюдается при больших значениях рН, при максимальной разнице потенциалов и разноименном заряде взаимодействующих поверхностей.

Другой механизм действия ВПВ связан с их влиянием на показатели гидрофобности клеток родококков. Экзополимеры располагаются на самой наружной поверхности клеточной стенки, “экранируя” собой липиды и свободные миколовые кислоты – соединения, обеспечивающие, липофильные свойства актинобактериальных клеток. Чем меньше экзополимеров, тем больше открытых липофильных участков. Это наглядно продемонстрировано в работе N. Iwabuchi с соавт. (2003) на примере штаммов родококков, отличающихся морфологией колоний. Авторами показано, что родококки, образующие шероховатые (R-морфотип) колонии, продуцируют в 2–10 раз меньше ЭПС, обладают в 2 раза более гидрофобной клеточной стенкой, проявляют ярко выраженную тенденцию к агрегации и в 6–9 раз лучше прикрепляются к твердым поверхностям (кварц, стекло, Тефлон) по сравнению с родококками, образующими слизистые (M-морфотип) и гладкие (S-морфотип) колонии. Кроме того, установлено, что добавление экстрагированных из слизистых колоний ЭПС к суспензии родококков R-типа ингибирует их адгезивную активность. Это связано с тем, что молекулы свободных полисахаридов действуют как гидрофилины, они прикрепляются к клеточной поверхности родококков и снижают ее липофильность (Iwabuchi *et al.*, 2003).

Т. Mørretrø с соавторами (2015) исследовали коагрегацию штаммов *Rhodococcus* spp. и *Acinetobacter calcoaceticus*, выделенных с поверхности оборудования пищевого производства. Авторами установлено, что инкубация клеток одного из штаммов родококков (*Rhodococcus* sp. MF3803) в присутствии протеиназы К сопровождается значительным снижением их способности взаимодействовать с *A. calcoaceticus*. Влияния протеиназы К на способность других штаммов родококков к коагрегации не выявлено. Протеиназа К расщепляет и инактивирует поверхностные белки. Полученные данные свидетельствуют о том, что у отдельных штаммов родококков поверхностные белки выполняют функцию адгезинов.

Группой немецких ученых (Gertler *et al.*, 2003; Siegmann *et al.*, 2009; Dayan *et al.*, 2017) из морской экосистемы выделен штамм *R. ruber* GIN1 (NCIMB 40340) с высокой ($4,0 \cdot 10^{10}$ – $7,5 \cdot 10^{10}$ клеток/г) адгезивной активностью в отношении оксидов титана и цинка, а также обогащенной TiO_2 угольной золы, и низкой ($0,3 \cdot 10^{10}$ – $1,5 \cdot 10^{10}$ клеток/г) адгезивной активностью в отношении оксидов других металлов. Выявлено, что между твердой поверхностью оксида и клетками родококков образуются прочные структуры типа мостиков, в образовании которых участвует специфический белок клеточной стенки TiBP (рисунок 3). Мостики обеспечивают практически необратимую адгезию *R. ruber* GIN1 на поверхности TiO_2 . Установлено, что TiBP – это белок массой 55 кДа, по последовательности аминокислот аналогичный гомодимерному ферменту дигидролипоамиддегидрогеназе. Известно, что титансвязывающей активностью обладают многие белки, такие как гемоглобин, цитохром с, бычий сывороточный альбумин, фибронектин. Особенностью TiBP является то, что он взаимодействует с диоксидом титана посредством гидрофобных, но не электростатических, сил. Авторы предлагают использовать белок TiBP в медицине для обработки титановых имплантов и стентов с целью предотвращения адсорбции на них других белков и в качестве молекулярного зонда для высокоаффинного связывания белковых молекул (Gertler *et al.*, 2003; Siegmann *et al.*, 2009; Dayan *et al.*, 2017).

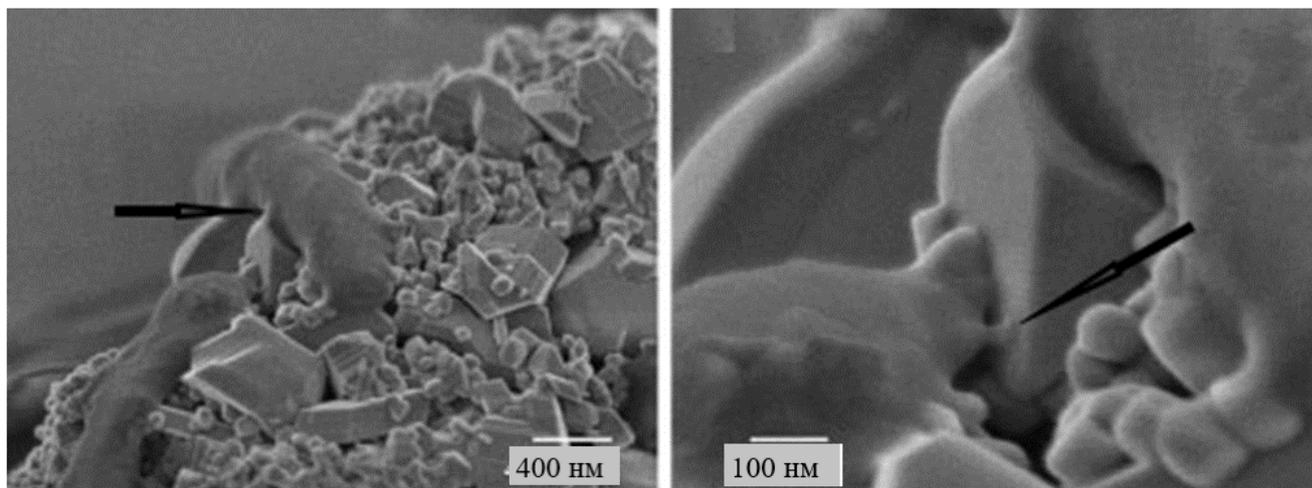


Рисунок 3 – Электронные микрофотографии клеток *R. ruber* GIN1, прикрепленных к частицам анатаза (природная модификация диоксида титана). Стрелками показаны “мостики”, образованные поверхностным белком TiBP (модифицировано по Gertler *et al.*, 2003)

Рядом исследователей отмечено, что многие органические соединения, в частности, *n*-алканы C₈–C₁₆, толуол, этанол, бутанол, диметилформамид, бис(2-этилгексил)фталат, перфторалкильные кислоты и антибиотики, провоцируют агрегацию родококков (de Carvalho *et al.*, 2004; de Carvalho, da Fonseca, 2007; Corno *et al.*, 2014; Weathers *et al.*, 2015; Pátek *et al.*, 2021). Наиболее ярко этот эффект выражен в присутствии полярных растворителей, таких как бутанол. Агрегированные клетки оказываются настолько устойчивы к токсическому действию бутанола (выживают в присутствии 50 об. % бутанола), что приобретают способность к его деградации (de Carvalho *et al.*, 2004). Установлено, что в присутствии растворителей увеличивается степень гидрофобности клеток и уровень насыщения жирных кислот в цитоплазматической мембране. Обработка клеточных агрегатов родококков с помощью терпенов (карвеол, карвон) приводит к изменению состава жирных кислот цитоплазматической мембраны (уменьшается средняя длина молекул и степень их насыщения) и сопровождается разрушением агрегатов (de Carvalho, da Fonseca, 2007). Отмечено усиление экспрессии генов *sigF3* и *prmA*, а также повышение уровня секреции клетками

ВПВ в процессе агрегации родококков. Ген *sigF3* кодирует сигма-субъединицу, отвечающую за регуляцию уровня экспрессии генов устойчивости клетки к тепловому, осмотическому стрессам и высыханию. Ген *prmA* кодирует пропанмонооксигеназу, усиление его экспрессии может быть связано с вовлечением данного фермента в процессы биodeградации. ВПВ необходимы для удержания клеток в агрегате друг с другом и образования стабильных флокул (Weathers *et al.*, 2015). Считается, что агрегация выполняет защитную функцию: затрудняет проникновение токсичных веществ внутрь конгломератов, способствуя выживанию расположенных внутри клеток. Однако G. Corno с соавт. (2014) показано, что родококки в составе (ко)агрегатов не приобретают, например, повышенную устойчивость в отношении антибиотиков, хотя при этом сохраняют способность к росту и метаболизированию на том же уровне, что и в среде без внесения антибиотиков.

Показано влияние подложек на процесс адгезии родококков. По данным Г.А. Коваленко с соавт. (1999), при увеличении степени гидрофобности модифицированных углеродных материалов возрастает их адсорбционная емкость в отношении родококков. Большое значение имеет геометрическое соответствие подложки и клеток (форма и пористость материала подложки, размеры и форма клеток, наличие на взаимодействующих поверхностях выступов). Т.А. Пешкур (2002) отмечает влияние геометрической формы и величины поверхности подложки на количество прикрепленных клеток родококков, что обуславливает высокую адсорбционную емкость силикагеля по сравнению с полимерной стружкой, полиэтиленом и пористым стеклом. По данным Е.О. Омаровой с соавт. (2012), родококки прикрепляются в виде монослоя, скоплений клеток, интрузии в волокно или формируют слизистый матрикс, к органическим полимерным материалам в зависимости от структуры и плотности упаковки полимерных волокон в полотне, а также от характера поверхности волокон (гладкие, с бугорками, наноструктурированные).

Представленные данные свидетельствуют, с одной стороны, об интересе исследователей к процессам адгезии патогенных и непатогенных актинобактерий, с другой стороны, о недостаточной изученности этих процессов. Сведения об адгезивных свойствах и механизмах адгезии непатогенных актинобактерий рода *Rhodococcus* разрознены и не систематизированы, хотя отдельные аспекты феномена адгезии у родококков, такие как механизм действия адгезивных молекул на основе ВПВ и белка TiBP, можно считать изученными. Требуется уточнения роль адгезии в адаптации родококков к условиям загрязненных биотопов. Отмечается лишь защитная функция адгезии, не ясно, является ли инициация этого процесса универсальной ответной реакцией родококков на действие стрессовых факторов. Не определены основные факторы, регулирующие адгезионный процесс, и молекулы адгезии родококков, в частности, не изучено участие в адгезии углеводородокисляющих родококков поверхностно-активных комплексов на основе гликолипидов.

Экспериментальная часть

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. 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 (Великобритания) или Merck (Германия). Использовали следующие углеводороды: газообразные (пропан), жидкие (*n*-додекан, *n*-гексадекан) и твердые (*n*-докозан, *n*-гексакозан, *n*-октакозан, *n*-нонакозан, *n*-гептриаконтан) *n*-алканы, ПАУ с 2–5 конденсированными бензольными кольцами (нафталин, антрацен, фенантрен, пирен, хризен, бензантрацен, бензпирен). *Rhodococcus*-биосурфактанты выделяли из клеток родококков, выращенных в присутствии *n*-додекана или *n*-гексадекана, согласно методике, описанной в статье М.С. Куукина с соавт. (2001).

3.2. Рабочая коллекция и условия культивирования родококков

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.iegmcol.ru), принадлежащих к видам *R. erythropolis* (14 штаммов), *R. cerastii* (1 штамм), *R. fascians* (4 штамма), *Rhodococcus jostii* (7 штаммов), *R. opacus* (9 штаммов), *Rhodococcus 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.

Штаммы выделены из чистых и загрязненных природных субстратов: вода из поверхностных водоемов (реки, озера, родники, в том числе в районах нефтепромысла), пластовые и грунтовые воды нефтяных месторождений, нефтезагрязненная вода, бытовая сточная вода, почва (чистая, отобранная вблизи нефтегазовых месторождений и промышленных предприятий, нефтезагрязненная), меловые отложения, песчаная горная порода, нефтезагрязненные донные отложения, снег в районе нефтепромысла, сланец из шламоотстойника, кожа карпа (таблица 1).

Таблица 1 – Используемые в работе штаммы родококков

Номер штамма	Источник выделения
<i>R. erythropolis</i>	
ИЭГМ 20	Нефтезагрязненная почва, Украина
ИЭГМ 185	Вода, Камское водохранилище, Пермский край, Россия
ИЭГМ 186	Вода, Камское водохранилище, Пермский край, Россия
ИЭГМ 188	Нефтезагрязненные донные отложения, р. Остецкий Живец, Тюменская обл., Россия
ИЭГМ 192	Нефтезагрязненные донные отложения, оз. Безымянное, Тюменская обл., Россия
ИЭГМ 212	Бытовая сточная вода, г. Харбин, Китай
ИЭГМ 265	Нефтезагрязненная почва в районе нефтепромысла, Пермский край, Россия
ИЭГМ 266	Нефтезагрязненная почва в районе нефтепромысла, Пермский край, Россия
ИЭГМ 268	Нефтезагрязненная почва в районе нефтепромысла, Пермский край, Россия
ИЭГМ 269	Нефтезагрязненная почва в районе нефтепромысла, Пермский край, Россия
ИЭГМ 271	Нефтезагрязненная почва в районе нефтепромысла, Пермский край, Россия
ИЭГМ 487	Вода, оз. Байкал, Иркутская обл., Россия
ИЭГМ 708	Сланец из шламоотстойника, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 1189	Вода, Тюменская область, Россия

Номер штамма	Источник выделения
<i>R. cerastii</i>	
ИЭГМ 1243	Ризосфера, берег озера Камнылор, Ханты-Мансийский автономный округ, Югра, Тюменская область, Россия
<i>R. fascians</i>	
ИЭГМ 34	Кожа карпа
ИЭГМ 39	Пластовая вода, нефтяное месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 170	Снежный покров, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 278	Речная вода, Тюменская обл., Россия
<i>R. jostii</i>	
ИЭГМ 28	Почва, берег пруда, Днепропетровская обл., Украина
ИЭГМ 29	Нефтезагрязненная почва, нефтегазовое месторождение, Полтавская обл., Украина
ИЭГМ 31	Нефтезагрязненная почва, нефтегазовое месторождение, Полтавская обл., Украина
ИЭГМ 32	Почва, поле, Полтавская обл., Украина
ИЭГМ 33	Нефтезагрязненная почва, нефтегазовое месторождение, Ивано-Франковская обл., Украина
ИЭГМ 60	Нефтезагрязненная почва, нефтяное месторождение, Украина
ИЭГМ 68	Почва, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
<i>R. opacus</i>	
ИЭГМ 56	Почва, лесополоса, Херсонская обл., Украина
ИЭГМ 57	Нефтезагрязненная почва, Украина
ИЭГМ 59	Нет информации
ИЭГМ 246	Почва вблизи предприятия по производству лавсана, Беларусь
ИЭГМ 261	Почва вблизи предприятия по производству лавсана, Беларусь
ИЭГМ 262	Почва вблизи предприятия по производству лавсана, Беларусь
ИЭГМ 716 ^T	Аварийный газопровод, Великобритания
ИЭГМ 717	Почва
ИЭГМ 1157	Почва, Пермь, Пермский край, Россия
<i>R. qingshengii</i>	
ИЭГМ 267	Нефтезагрязненная почва в районе нефтепромысла, Пермский край, Россия
ИЭГМ 1359	Донные отложения озерных систем, остров Ли Смита, Земля Франца-Иосифа, Архангельская область, Россия

Номер штамма	Источник выделения
<i>R. rhodochrous</i>	
ИЭГМ 63	Нефтезагрязненная почва, Украина
ИЭГМ 64	Нет информации
ИЭГМ 66	Нет информации
ИЭГМ 67	Почва, Великобритания
ИЭГМ 608	Вода, г. Березники, Пермский край, Россия
ИЭГМ 632	Вода, г. Березники, Пермский край, Россия
ИЭГМ 639	Снег, нефтяное месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 646	Вода, г. Березники, Пермский край, Россия
ИЭГМ 647	Нефтезагрязненная вода, Межевское нефтяное месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 1137	Нефтезагрязненная почва, Соликамск, Пермский край, Россия
ИЭГМ 1138	Нефтезагрязненная почва, Соликамск, Пермский край, Россия
<i>R. ruber</i>	
ИЭГМ 65	Вода, р. Миссисипи, США
ИЭГМ 73	Грунтовая вода, контурная зона Мазунинского нефтяного месторождения, Пермский край, Россия
ИЭГМ 76	Снег, контурная зона нефтяного месторождения, Пермский край, Россия
ИЭГМ 77	Вода, родник, контурная зона нефтяного месторождения, Пермский край, Россия
ИЭГМ 84	Песчаная порода, Гомельская обл., Беларусь
ИЭГМ 90	Вода, поверхностный водоем, Красноярский край, Россия
ИЭГМ 93	Песчаная порода, Иркутская обл., Россия
ИЭГМ 172	Пластовая вода, нефтяное месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 219	Вода, верховье р. Илыч, респ. Коми, Россия
ИЭГМ 223	Почва, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 224	Почва, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 225	Почва, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 231	Вода, родник, Ольховский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 233	Почва, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 235	Снег, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 236	Почва, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия

Номер штамма	Источник выделения
<i>R. ruber</i>	
ИЭГМ 238	Песчаная порода, Гомельская обл., Беларусь
ИЭГМ 241	Меловое отложение, Гомельская обл., Беларусь
ИЭГМ 323	Дерново-подзолистая почва, Свердловская обл., Россия
ИЭГМ 325	Нефтезагрязненная вода, Быстринское нефтяное месторождение, Тюменская обл., Россия
ИЭГМ 326	Дерново-подзолистая почва, нефтегазовое месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 327	Дерново-подзолистая почва, нефтегазовое месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 328	Вода, колодец, нефтегазовое месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 334	Песчаная порода с глубины 6 м, Беларусь
ИЭГМ 342	Грунтовая вода, нефтяное месторождение, Пермский край, Россия
ИЭГМ 381	Вода, оз. Байкал, Иркутская обл., Россия
ИЭГМ 385	Донные отложения, оз. Байкал, Иркутская обл., Россия
ИЭГМ 436	Почва, берег р. Печора, Россия
ИЭГМ 438	Нефтезагрязненная вода в районе нефтепромысла, Пермский край, Россия
ИЭГМ 440	Нефтезагрязненный песок, Беларусь
ИЭГМ 443	Нет информации
ИЭГМ 1276	Нефтезагрязненные отходы, Сосногорск, Республика Коми
<i>Rhodococcus</i> sp.	
ИЭГМ 27	Нефтезагрязненная почва, нефтегазовое месторождение, Полтавская обл., Украина
ИЭГМ 61	Нефтезагрязненная почва, Украина
ИЭГМ 69	Почва, Полазненский нефтепромысел, Пермский край, Россия
ИЭГМ 1276	Нефтяной шлам, Удмуртская Республика, Россия

В качестве родительского штамма при получении Tn5-мутантов использовали *R. ruber* ИЭГМ 231. Процедуру Tn5-мутагенеза осуществляли с использованием транспозомы EZ-Tn5TM <KAN-2> Tnp TransposomeTM Kit (Lucigen, США) в соответствии с протоколом производителя и методикой,

описанной в статье P.J. Fernandes с соавт. (2001). Присутствие транспозона в ДНК Tn5-мутантов подтверждали методом ПЦР-РВ с использованием термоциклера CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, США). Tn5-мутанты хранили в 10% глицерине при температуре -80 °С.

Родококки выращивали в жидких и на твердых питательных средах. В качестве жидких сред использовали бульон Лурия-Бертани (LB) и минеральные среды “Киевская” (К) и “*Rhodococcus-surfactant*” (RS). Состав среды LB (Sigma-Aldrich, США), г/л: триптон – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 5,0. Состав среды К, г/л: KH_2PO_4 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, NaCl – 1,0, KNO_3 – 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, CaCl_2 – 0,02, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 (Каталог штаммов., 1994). Состав среды RS, г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0, K_2HPO_4 – 2,0, KH_2PO_4 – 2,0, KNO_3 – 1,0, NaCl – 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, CaCl_2 – 0,02, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 (Ivshina *et al.*, 1998). В качестве источника углерода и энергии в минеральные среды вносили D-глюкозу в концентрации 1 или 5 г/л, *n*-додекан или *n*-гесадекан в концентрации 3 об. %, *n*-докозан, *n*-гексакозан, *n*-октакозан, *n*-нонакозан, *n*-гентриаконтан, нафталин, антрацен, фенантрен, бензантрацен или бензпирен в концентрации 2 г/л. *n*-Алканы C_{22} – C_{31} и ПАУ предварительно растворяли в ацетоне, затем добавляли в среду культивирования. Культивирование родококков в жидких средах проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл питательной среды на орбитальной качалке Certomat IS (Sartorius, Германия) при скорости перемешивания 160 об/мин или в 96-луночных полистироловых микропланшетах (“Медполимер”, Санкт-Петербург) с объемом среды 100 или 200 мкл в каждой лунке на шейкере-инкубаторе для микропланшетов Titramax 1000 (Heidolph-Instruments, Германия) при частоте перемешивания 600 об/мин. Температура культивирования составляла 28 °С, продолжительность культивирования – 1–9 сут. В качестве твердых питательных сред использовали среду LBA (Sigma-Aldrich, США) и агаризованную среду К. Для выращивания родококков в атмосфере пропана чашки Петри с агаризованной средой К помещали в эксикаторы с газовой смесью пропан : воздух 1 : 5. В отдельных экспериментах *n*-гексадеканом пропитывали стерильные диски из фильтровальной бумаги,

которые помещали под крышки чашек Петри с агаризованной средой К. Культивирование родококков на твердых средах проводили стационарно при температуре 28 °С в течение 2–7 сут.

3.3. Подложки для прикрепления клеток родококков

В качестве подложек для прикрепления клеток родококков использовали 96-луночные полистироловые микропланшеты, отходы кукурузных початков (Hodmarket, Венгрия), опилки древесных пород, деревянные бруски, куриные перья (Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН, Москва), отходы кожевенного производства (Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН, Москва), каталитический волокнистый углерод (Институт катализа имени Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск), керамзит (Институт катализа имени Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск), предметные стекла (ООО “МиниЛаб”, Дятьково), твердые углеводороды (*n*-алканы C₂₂–C₃₁, ПАУ) (таблица 2). Для получения подложек из углеводородов *n*-алканы C₂₂–C₃₁ и ПАУ растворяли в ацетонитриле в концентрации 5–10 мг/мл, вносили в 96-луночные полистироловые микропланшеты в объёме 300 мкл и оставляли в вытяжном шкафу. После полного испарения растворителя углеводороды покрывали плотным слоем поверхность лунок микропланшетов. Остальные подложки стерилизовали автоклавированием при температуре 105 °С в течение 15 мин, куриные перья выдерживали в 96%-ном этаноле в течение 2 сут или кипятили в течение 2 ч.

Для направленного изменения физико-химических свойств поверхности подложек их обрабатывали поверхностно-модифицирующими агентами, в качестве которых использовали *n*-гексадекан, смесь парафинов, силиконовую эмульсию (марка КЭ-30-04) производства ООМП “Ксеросил” (Москва), натуральную олифу на основе подсолнечного (ОАО “Обушки”, Москва) и льняного (АОЗТ “Оливеста”, Москва) масел и *Rhodococcus*-биосурфактанты. Для обработки использовали избыточные (соотношение материала подложки и

модифицирующего агента 1 : 1,5 или 1 : 2,0 по весу), умеренные (2,5–20,0 вес. %) и низкие (0,01–1000 мг/л) количества модифицирующих агентов (таблица 2).

Таблица 2 – Подложки для прикрепления клеток родококков

Материал	Форма, размеры	Поверхностно-модифицирующие агенты
Органические материалы		
<i>Полимеры</i>		
Полистирол	Круглодонные и плоскодонные 96-луночные микропланшеты	Нет <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанты 0,001–1000 мг/л
<i>Природные целлюлозосодержащие</i>		
Спрессованные остатки сердцевин кукурузных початков	Loss Trol XTF: размер частиц ≤0,2 мм	Нет
	Loss Trol XTC: размер частиц 2–8 мм	Нет
Хвойная древесина	Опилки 1–3 мм	Нет <i>n</i> -Гексадекан, 10 вес. % Смесь парафинов, 10 вес. % Силиконовая эмульсия, 10–20 вес. % Олифа, 10–20 вес. % Олифа в избытке, соотношение опилки:олифа 1 : 1,5 или 1 : 2,0 по весу <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанты, 5 вес. % <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанты, 2,5 вес. % + <i>n</i> -гексадекан, 10 вес. % <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанты, 10 вес. % + олифа, 10 вес. % <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанты, 2,5 вес. % + <i>n</i> -гексадекан, 10 вес. % + олифа, 10 вес. %
		Нет <i>n</i> -Гексадекан, 10 вес. % Олифа, 10 вес. % <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанты, 5 вес. %
	Бруски 2×2×2 см	Нет <i>n</i> -Гексадекан, 10 вес. % Олифа, 10 вес. % <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанты, 5 вес. %

Материал	Форма, размеры	Поверхностно-модифицирующие агенты
Органические материалы		
<i>Природные кератинсодержащие</i>		
Куриные перья	Целые перья	Нет Силиконовая эмульсия, 10–20 вес. % Олифа, 10 вес. %
<i>Природные коллагенсодержащие</i>		
Отходы кожевенного производства	Гранулы 0,2–0,4 мм в диаметре	Нет Силиконовая эмульсия, 10–20 вес. %
Неорганические материалы		
Каталитический волокнистый углерод	0,5–1,0 мм	Нет
Керамзит	2–5 мм	Нет
Стекло	Предметные стекла 24×24×0,17 мм	Нет
Твердые углеводороды		
<i>n</i> -Докозан <i>n</i> -Гексакозан <i>n</i> -Октакозан <i>n</i> -Нонакозан <i>n</i> -Гентриаконтан Нафталин Антрацен Фенантрен Бензантрацен Бензпирен	В виде покрытия на поверхности лунок 96-луночных полистироловых микропланшетов	Нет

Обработку твердых материалов *n*-гексадеканом проводили в парах углеводорода: подложки помещали в закрытой емкости над *n*-гексадеканом, емкость нагревали до температуры 25 °С и выдерживали в течение 6–8 ч. Силиконовую эмульсию и *Rhodococcus*-биосурфактанты разбавляли водой до достижения концентрации 10–20 вес. %, разбавленную эмульсию равномерно распределяли по поверхности подложек, которые затем высушивали на воздухе.

Олифу растворяли в уайтспирите, готовили водные эмульсии олифы, либо подложку погружали в олифу. Концентрация олифы в уайт-спирите и воде составляла 10–20 вес. %. Для стабилизации водных эмульсий олифы в них вносили: 3 вес. % Твина 80 (Sigma-Aldrich, США), 3 вес. % поли(винилового спирта) (НПО “Азот”, Украина), 1 вес. % метилцеллюлозы (ООО “АО Реахим”, Москва) или 1 вес. % карбоксиметилцеллюлозы (ООО “АО Реахим”, Москва). Материал подложки тщательно перемешивали с раствором или эмульсией олифы в соотношении 1 : 1 по весу в течение 10 мин. Затем подложку высушивали на воздухе при температуре 25 °С в течение 24 ч и нагревали до 110 °С в течение 1 ч для полного удаления растворителя. При погружении подложки в олифу получали избыточно (соотношение материала подложки и олифы 1 : 1,5 или 1 : 2,0 по весу) гидрофобизованные подложки. В качестве поверхностно-модифицирующих агентов использовали также смеси *Rhodococcus*-биосурфактантов с олифой и/или *n*-гексадеканом (таблица 2).

3.4. Определение адгезивной активности родококков

Эксперименты по адгезии *Rhodococcus* проводили в 96-луночных полистироловых микропланшетах и в колбах Эрленмейера. Использовали растущие либо нерастущие клетки в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Для получения нерастущих клеток родококки в поздней экспоненциальной-ранней стационарной фазе роста дважды отмывали от питательной среды с помощью изотонического солевого раствора, 0,5% NaCl или натрий-фосфатного буфера (НФБ), и ресуспендировали в таком же изотоническом солевом растворе до нужной концентрации клеток. Состав НФБ, г/л: Na_2HPO_4 – 3,53; KH_2PO_4 – 3,39 (Досон и др., 1991). В качестве абиотического контроля использовали стерильную среду или изотонический солевой раствор без клеток.

В 96-луночные полистироловые микропланшеты вносили 100 или 200 мкл клеточной суспензии и инкубировали при 28 °С, частоте перемешивания 600 об/мин в течение 0,3–72,0 ч. Адгезивную активность родококков, растущих в присутствии пропана, определяли в стационарных условиях. В конце

адгезионного процесса микропланшеты два раза промывали изотоническим солевым раствором, прикрепленные клетки окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового (хч, ООО “АО Реахим”, Москва) при комнатной температуре в течение 20 мин, затем планшеты снова промывали и 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). Адгезивную активность считали по формулам:

$$C_a(\%) = \frac{C_{\text{кф}}}{C_{\text{общ}}} \cdot 100 \quad (7),$$

$$C_a(\text{КОЕ}/\text{см}^2) = \frac{C_{\text{кф}} \cdot V}{S} \quad (8),$$

где $C_{\text{кф}}$ – концентрация клеток, определенная по калибровочным графикам после окрашивания кристаллическим фиолетовым (рисунок 4), КОЕ/мл; $C_{\text{общ}}$ – общее число клеток, КОЕ/мл; v – объем внесенной в лунку жидкости, мл; S – площадь контакта жидкости с лункой (1,1 см^2 для обоих типов планшетов при $v=100$ мкл, 1,8 и 2,2 см^2 для кругло- и плоскодонных планшетов соответственно при $v=200$ мкл). В случае с нерастущими клетками $C_{\text{общ}}$ считалось равным исходной концентрации клеток в суспензии. В случае с растущими клетками $C_{\text{общ}}$ считали, как сумму суспендированных и прикрепленных клеток.

Условия адгезии *Rhodococcus* в колбах Эрленмейера: соотношение подложки и клеточной суспензии 1 : 50 по объему, температура 28 °С, скорость перемешивания 130 об/мин либо стационарно, время эксперимента 3–10 сут. Процесс адгезии контролировали спектрофотометрически при длине волны 600 нм. Адгезивную активность растущих и нерастущих клеток вычисляли по-разному. Для нерастущих клеток использовали две формулы:

$$C_a = (C_{\text{исх}} - C_{\text{равн}}) \cdot V / m \quad (9),$$

где C_a – адгезивная активность клеток, мг АСВ клеток/г адсорбента; $C_{\text{исх}}$ – исходная концентрация клеток в суспензии, мг АСВ клеток/мл; $C_{\text{равн}}$ – концентрация клеток в суспензии в конце адгезионного процесса, мг АСВ

клеток/мл; V – объем суспензии, мл; m – масса адсорбента, г (Медведева и др., 2001);

$$C_a = (\text{ОП}_{600 \text{ нм исх}} - \text{ОП}_{600 \text{ нм равн}}) \cdot 100\% / \text{ОП}_{600 \text{ нм исх}} \quad (10),$$

где C_a – адгезивная активность клеток, %; $\text{ОП}_{600 \text{ нм исх}}$ – исходная оптическая плотность суспензии; $\text{ОП}_{600 \text{ нм равн}}$ – оптическая плотность суспензии в конце адгезионного процесса (Ившина и др., 2002). Адгезивную активность растущих клеток определяли путем окрашивания кристаллическим фиолетовым, как в экспериментах с 96-луночными полистироловыми микропланшетами.

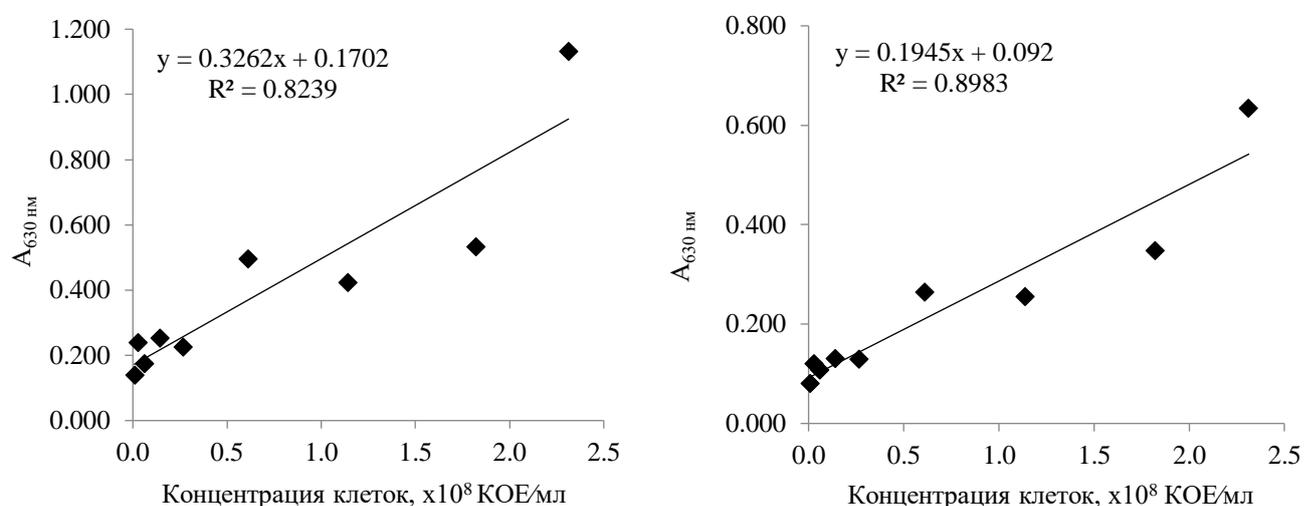


Рисунок 4 – Калибровочные графики для определения концентрации родококков в круглодонных (слева) и плоскодонных (справа) 96-луночных полистироловых микропланшетах

Для определения удерживающей способности подложек их в конце адгезионного процесса 3 раза промывали изотоническим солевым раствором, добавляли такой же объем 1М NaCl, перемешивали при 130 об/мин в течение 3 сут и затем измеряли показатель $\text{ОП}_{600 \text{ нм}}$ в суспензии. Показатель удерживающей способности выражали в мг АСВ прочно связанных клеток/г и в процентах от числа прикрепленных клеток.

3.5. Физико-химические методы исследования

Степень гидрофобности клеток родококков определяли методами 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) согласно рекомендациям M.L. с соавт. (1991), M.-N. Bellon-Fontaine с соавт. (1996), A.L. Mattos-Guaraldi с соавт. (1999). В таблице 3 приведены значения компонентов свободной поверхностной энергии для использованных в работе MATS-субстратов. Дзета-потенциала (ζ -потенциал) клеток определяли методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZetaSizer, v. 2.2.

Таблица 3 – Компоненты свободной поверхностной энергии MATS-субстратов

Жидкость	γ^{LW} , мДж/м ²	γ^+ , мДж/м ²	γ^- , мДж/м ²
Хлороформ	27,2	3,8	0,0
<i>n</i> -Гексадекан	27,7	0,0	0,0
Диэтиловый эфир	16,7	0,0	16,4
<i>n</i> -Гексан	18,4	0,0	0,0
Этилацетат	23,9	0,0	19,4
<i>n</i> -Декан	23,9	0,0	0,0
Вода	21,8	25,5	25,5

Цит. по Bellon-Fontaine et al., 1996.

Относительную гидрофобность подложек оценивали по водопоглощающей способности, распределению их в системе вода/*n*-гексадекан и степени адсорбции *n*-гексадекана материалом подложки. Показатель сорбционной влажности (г Н₂О/г) использовали для оценки величины поверхности подложек. Для этого подложку выкладывали в закрытом контейнере над слоем воды (100% влажность)

и оставляли при комнатной температуре на 7 сут. Количество поглощенной воды и *n*-гексадекана определяли гравиметрически (Подорожко и др., 2007).

3.6. Биохимические методы исследования

Количество общих липидов в клетках определяли гравиметрически по известной методике (Ившина, 2014). Для определения количества свободных миколовых кислот сухую клеточную биомассу (100 мг) лизировали смесью 5 мл метанола, 5 мл толуола и 0,2 мл концентрированной серной кислоты при температуре 75 °С в течение 16 ч. Образованные метиловые эфиры экстрагировали с помощью *n*-гексана, который вносили в охлажденный лизат в объеме 1 мл. Смесь тщательно перемешивали, затем для расслоения выдерживали при температуре 4 °С в течение 30 мин. Слой *n*-гексана отбирали и окрашивали карболовым фуксином Циля (ООО “НИЦФ”, Санкт-Петербург) в объемном соотношении 1 : 1. Количество миколовых кислот после окрашивания определяли спектрофотометрически при 495 нм (Khanuja *et al.*, 2004).

О продукции родококками гликолипидных биосурфактантов судили по их количественному содержанию в клетках, которое определяли гравиметрическим методом, а также по показателю эмульгирующей активности бактериальной культуры через 6 мин, 1 ч, 24 ч и далее один раз в сутки в течение 7 сут (Коронелли, Юферова, 1990).

О степени вовлеченности поверхностных белков в адгезионный процесс судили по изменению адгезивной активности родококков после их инкубации в 96-луночных полистироловых микропланшетах с 0,02, 0,2 или 2 мкг/мл протеиназы К (Sigma-Aldrich, США) при 160 об/мин, 28 °С в течение 3 ч (Николаев, Паников, 2002). Активность протеиназы К контролировали в реакции с бычим сывороточным альбумином (ООО “АО Реахим”, Москва). Для этого в 0,2, 2 и 20% растворы альбумина добавляли протеиназу К и инкубировали при 160 об/мин, 28 °С в течение 3 ч. Белок, не вступивший в реакцию с протеиназой К, осаждали 4 мл трихлоруксусной кислоты при температуре 28 °С в течение 20 мин. От осадка избавлялись фильтрованием реакционной смеси через бумажные

фильтры. В фильтрат добавляли нингидрин (Sigma-Aldrich, США) – вещество, специфически взаимодействующее со свободными аминогруппами, в объемном соотношении 2 : 1. О протеолизе альбумина под действием протеиназы К судили по появлению сине-фиолетового окрашивания.

В качестве ингибиторов синтеза белков использовали бактериостатические антибиотики – эритромицин (Sigma-Aldrich, США) и олеандомицин (Sigma-Aldrich, США). Родококки вносили в среду LB с 0,4–6,3 мкг/мл эритромицина, 0,4–12,5 мкг/мл олеандомицина или без антибиотиков и выращивали при 160 об/мин, 28 °С в течение 48 ч. Использованные концентрации антибиотиков не ингибируют или не полностью ингибируют рост родококков. После культивирования готовили суспензии нерастущих клеток в НФБ в одинаковой концентрации $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл ($OP_{600 \text{ нм}}=1,0$), затем с использованием 96-луночных микропланшетов определяли их адгезивную активность.

3.7. Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Эксперименты с использованием методов атомно-силовой (АСМ) и конфокальной лазерной сканирующей (КЛСМ) микроскопии проводили на базе *Rhodococcus*-центра ПГНИУ (руководитель – профессор И.Б. Ившина). Для визуализации клеток в АСМ родококки отмывали от питательной среды и ресуспендировали в 0,5% NaCl до достижения $OP_{600 \text{ нм}}=1,0$. Клеточную суспензию объемом 15–20 мкл наносили на покровное стекло, предварительно обработанное 0,2% раствором полилизина (Sigma-Aldrich). Микропрепараты сушили на воздухе 30 мин, затем выдерживали при 100% влажности в эксикаторе с 93% KNO_3 в течение 2 сут (Васильченко, 2012). Сканирование проводили с помощью атомно-силового микроскопа MFP-3D-BIO™ (Asylum Research, США) в водной среде в режиме постоянного контакта зонда кантилевера с образцом. Использовали кантилеверы TR400PB (Olympus Corporation, Япония) со следующими техническими характеристиками: материал – силиконнитрид, покрытие золотом, коэффициент жесткости 0,09 Н/м, радиус кривизны иглы 42 нм, резонансная частота 32 кГц, форма зонда пирамидальная. Кантилеверы предварительно

калибровали в автоматическом режиме согласно инструкции производителя микроскопа. Первоначально выбирали площадь сканирования 10×10 мкм, затем выделяли область с одной клеткой и сканировали с максимальным разрешением 32×32 пикселя. Скорость сканирования образцов составляла 1 линия/с. После получения топографических карт ту же самую клетку сканировали в режиме силовых измерений для получения карт распределения сил адгезии (F_a , нН) и модулей упругости (E , МПа) на клеточной поверхности. На каждом микропрепарате анализировали не менее 6 клеток. В отдельных экспериментах кантилевер модифицировали путем погружения в *Rhodococcus*-биосурфактанты. Модифицированные кантилеверы использовали для определения силы адгезии данных соединений к модельной твердой поверхности. Для этого на предметном столике с помощью липкой ленты закрепляли фрагмент полистирола.

Для обработки АСМ-изображений и совмещения топографических и силовых карт клеточной поверхности родококков использовали пакет программ IgorPro 6.22A (WaveMetrics, США). Определяли средние значения шероховатости клеток (R_a , нм), разницу между самым высоким и самым низкими участками образца ($R_{\max} - R_{\min}$, нм), средние показатели силы адгезии F_a и модуля упругости E клеточной поверхности, а также характер распределения этих значений на поверхности клетки. При статистической обработке данных не учитывали абсолютные значения шероховатости $R_a \leq 100$ нм и единичные значения $F_{\text{адг}}$ и E . Шероховатость ≤ 100 нм считали относящуюся к подложке, чаще всего такие значения встречались на границах контуров клеток. Подложку (предметные стекла, покрытые полилизинном) сканировали отдельно для каждой новой серии сканирований. Среднее значение и стандартное отклонение показателя шероховатости R_a для подложки составляло (81 ± 50) нм, медиана – 81 нм. Единичные значения сил адгезии и модуля упругости Юнга считали случайными и искажающими реальные частоты встречаемости значений анализируемых показателей.

Для КЛСМ бактериальную культуру (15–20 мкл) помещали на очищенное 70%-ным этанолом покровное стекло ($24 \times 50 \times 0,15$ мм), смешивали с

эквивалентным объемом красителя LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и подсушивали на воздухе в темноте в течение 10–15 мин. Затем препарат промывали деионизированной водой для удаления незакрепившихся клеток и остатков красителя и сканировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Япония) с использованием 100 х иммерсионного объектива (числовая апертура 1,4). Для возбуждения флуоресценции SYTO 9 и пропидиум иодида в составе красителя применяли аргоновый лазер ($\lambda=488$ нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda=543$ нм) с 560/660-нм барьерным фильтром, соответственно. Изображения размером 0,12 х 0,12 мм (разрешение 1600 х 1600 пикселей) получали со скоростью 40 нм/пиксель. Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). Клетки, флуоресцирующие зеленым цветом, считали живыми, красным – мертвыми.

АСМ и КЛСМ имели систему совмещения и позволяли сканировать один и тот же образец без его перемещения. Для этого сначала проводили сканирование с помощью КЛСМ, как описано выше. Затем КЛСМ-изображения импортировали в программное обеспечение АСМ и проводили сканирование нужной области 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.

3.8. Интерференционная микроскопия

Расположение бактериальных клеток на поверхности подложек исследовали с применением профилометра-интерферометра высокого разрешения New View 5000 (Zygo, США) в 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). Получение качественных

изображений требует для данного вида микроскопии использования гладких поверхностей с низкой степенью шероховатости. В связи с этим в экспериментах по профилометрии для прикрепления клеток родококков использовали подложки на основе древесных брусков и предметных стекол. Деревянные бруски тщательно обрабатывали мелкозернистой (средний размер зерна 58,5 мкм) наждачной бумагой. Образцы подложек с прикрепленными клетками или без них (абиотический контроль) помещали на предметный столик микроскопа и проводили сканирование путем последовательного вертикального перемещения объектива микроскопа с шагом порядка 75 нм. В качестве источника света использовали галогеновую лампу белого света на 50 Вт. Увеличение при сканировании, включая использование цифрового зума, составляло $\times 2000$ – $\times 4000$. Полученное изображение поверхности образца с наложенной интерференционной картиной фиксировали с помощью аналоговой видеокамеры. В результате компьютерной обработки с помощью программы MetroPro (Zygo, США) получали трехмерный рельеф поверхности – топографическую карту, а также профили поверхностей. Процент нечитаемых (черных) областей на изображениях составлял $\leq 20\%$.

3.9. Световая и электронная микроскопия

Для световой микроскопии использовали систему визуализации микроскопического изображения, включающую тринокулярный микроскоп Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) и лицензионное программное обеспечение “Видео Тест-Размер 5.0” (ВидеоТест, Санкт-Петербург). Наблюдения проводили в режиме фазового контраста при увеличении $\times 1000$. Электронную микроскопию поверхности подложек с закрепленными на них родококками проводили на базе Университета Нэпиер (Эдинбург, Великобритания). Образцы закрепляли на алюминиевой подложке с помощью специального двустороннего скотча. Затем с помощью напылителя Polaron E5100 Series 2 (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) в течение 6 мин на образец сверху наносили тонкий слой золота. Подготовленный для сканирования образец помещали на предметный столик

сканирующего электронного микроскопа Cambridge S90 (Cambridge Instruments, Великобритания). Сканирование проводили в вакууме при напряжении 10 кВ.

3.10. Метод краевых углов смачивания

Поверхностную свободную энергию твердых носителей γ и энергию взаимодействия между клетками и поверхностью носителей $\Delta G_{\text{адг}}$ определяли по значениям краевых углов смачивания поверхностей подложек и бактериального газона дистиллированной водой и *n*-гексадеканом. Газон получали путем выращивания клеток родококков в чашках Петри со средой LBA, либо путем концентрирования клеток на мембранных фильтрах. Углы измеряли методом неподвижной капли (Carniello *et al.*, 2018). Для этого на исследуемую поверхность наносили каплю жидкости объемом 10 мкл, сразу же делали цифровой снимок капли, полученные изображения анализировали с помощью программы ВидеоТест-Размер 5.0. При подстановке значений контактных углов воды и *n*-гексадекана в уравнение Юнга (Carniello *et al.*, 2018) получали следующие выражения для вычисления γ :

$$\gamma_{\text{T}}^{AB} = (\cos \theta_{\text{вода}} - 2,622 \cdot \cos \theta_{\text{гексадекан}} - 1,622)^2 \quad (11),$$

$$\gamma_{\text{T}}^{LW} = 6,875 \cdot (\cos \theta_{\text{гексадекан}} + 1)^2 \quad (12),$$

$$\gamma_{\text{T}} = \gamma_{\text{T}}^{AB} + \gamma_{\text{T}}^{LW} \quad (13),$$

где $\theta_{\text{вода}}$ и $\theta_{\text{гексадекан}}$ – контактные углы воды и *n*-гексадекана на исследуемой поверхности, °; γ_{T}^{AB} и γ_{T}^{LW} – полярный и неполярный компоненты свободной энергии γ_{T} исследуемой твердой поверхности, Дж/м², при этом индекс “Т” обозначает поверхность подложки или газона клеток родококков.

3.11. Инфракрасная термография и прецизионная термометрия с использованием платиновых термометров сопротивления

Эксперименты по инфракрасной термографии (ИКТ) и прецизионной термометрии 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).

Для инфракрасного сканирования использовали камеру FLIR® SC5000 (FLIR® Systems, Inc.) 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. В экспериментах не добивались постоянной температуры окружающей среды, но минимизировали влияние внешних температурных флуктуаций. В связи с этим инфракрасное сканирование проводили в отдельной комнате при дневном освещении и комнатной температуре. Камера, компьютер, теплоизоляционный бокс для образцов и все необходимое для экспериментов (посуда, одноразовые наконечники, дозаторы, 96-луночные полистироловые микропланшеты, стерильный 0,5% NaCl) находились в комнате как минимум 12 ч до начала измерений. Теплоизоляционный бокс изготавливали самостоятельно из пенопласта. Толщина стенок бокса составляла 3 см. Бокс был дополнительно обернут фольгой. В крышке боксе было проделано отверстие под объектив камеры. Расстояние между образцом и объективом составляло 15 см. Камера была повернута под углом 10° во фронтальной плоскости. Это позволяло (1) минимизировать рассеяние инфракрасного излучения, поступающего на детектор инфракрасной камеры от образца, (2) снизить влияние внешних колебаний температуры, (3) уменьшить эффект отражения объектива камеры от поверхности адсорбентов. Инфракрасную камеру включали за 30–40 мин до начала измерений для охлаждения детектора до -198°C , что обеспечивало максимальную чувствительность камеры. Камеру калибровали автоматически в диапазоне температур от 2,5 до $55,0^\circ\text{C}$ с использованием встроенных калибровочных таблиц.

При использовании в экспериментах 96-луночных микропланшетов после заполнения планшетов жидкостью в течение первых 5–10 мин наблюдались высокоамплитудные колебания температур, связанные с выравниванием температурных показателей между внесенной жидкостью и пустым планшетом.

Чтобы избежать данного эффекта, неинокулированную питательную среду или 0,5% NaCl добавляли в микропланшеты за 20 мин до начала измерений из расчета 95 мкл на лунку. Затем в планшеты многоканальной пипеткой вносили 5 мкл концентрированной в 20 раз суспензии родококков и сразу же после внесения клеток начинали измерения. Концентрированную суспензию также готовили заранее и оставляли ее в комнате для измерений, как минимум за 20 мин до внесения. Экспериментальные и контрольные лунки микропланшетов чередовали так, чтобы оба типа лунок попадали на одно изображение.

Время экспозиции камеры при измерениях составляло 2000–2100 мкс, частота 25–380 Гц. Общая продолжительность составляла время одной экспозиции либо делали 4 серии непрерывных экспозиций по 20 мин. Ограничения в длительности съемкок были связаны с размером виртуальной памяти компьютера при обработке изображений.

В качестве референтного метода при определении температур в процессе адгезии родококков использовали платиновые термометры сопротивления PR100 (platinum resistance at 100 Ohm). На рисунке 5 показана панель с 8 платиновыми термометрами сопротивления, спаянная специально для настоящей работы и предназначенная для измерения температур в 96-луночных полистироловых микропланшетах непосредственно в жидкости. Технические параметры для каждого термометра были следующие: размер 1,2×1,7 мм, сопротивление 100 Ом при 0 °С, диапазон измеряемых температур 0–150 °С. Платиновые термометры сопротивления PR100 использовали совместно с инфракрасной камерой. Схема совмещенного эксперимента приведена на рисунке 6. В совмещенных экспериментах не использовали термоизоляционный бокс, в связи с тем, что в него не помещалась панель с термометрами. Экспериментальный 96-луночный полистироловый микропланшет заполняли стерильным 0,5% NaCl, термометры погружали в заполненные лунки микропланшета и оставляли на 20 мин для выравнивания температур, затем вносили клетки. Панель с термометрами после каждого эксперимента промывали дистиллированной водой и стерилизовали 70% этанолом.

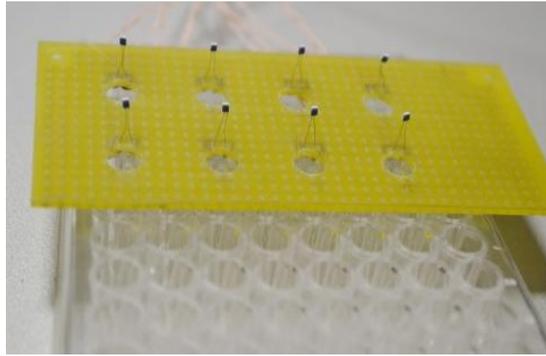


Рисунок 5 – Панель с платиновыми термометрами сопротивления PR100

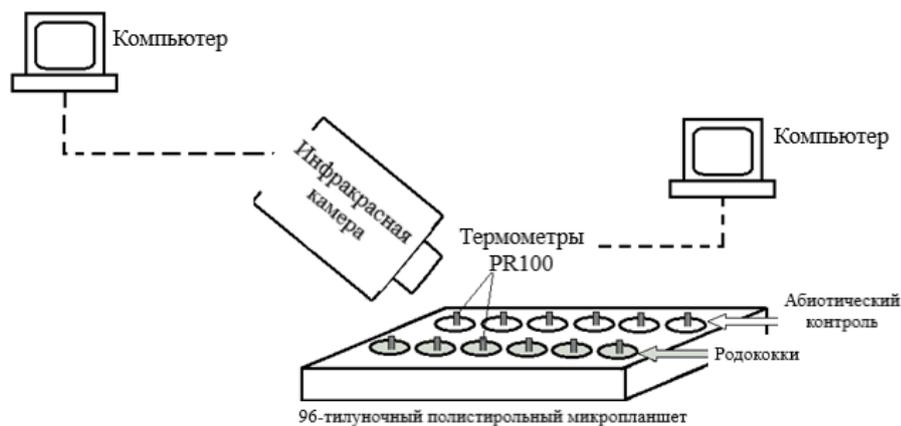


Рисунок 6 – Схема совмещенного эксперимента по ИКТ и прецизионной термометрии

Сигналы с инфракрасной камеры и панели с платиновыми термометрами сопротивления PR100 обрабатывали на разных компьютерах (рисунок 6). Для захвата и обработки изображений с инфракрасной камеры использовали программы Altair (FLIR Systems, Нидерланды) и MathCad 15.0 (Parametric Technology Corporation, США). Для обработки температурных показателей, регистрируемых платиновыми термометрами сопротивления, использовали пакет программ LabVIEW (National Instruments, США), результаты затем конвертировали в данные таблиц Excel.

При первичной обработке значений температур вычисляли ΔT . В случае инфракрасной термографии это была разница между средней температурой отсканированной поверхности инокулированного адсорбента и средней температурой отсканированной поверхности неинокулированного адсорбента. В

случае термометрии это была разница между средними показателями температуры в лунках 96-луночного полистиролового микропланшета с суспензией родококков и неинокулированной средой.

Для конвертации температурных показателей в другие термодинамические величины использовали уравнение теплопроводности:

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \lambda \left(\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 T}{\partial \varphi^2} \right) + Q_{уд}(t) \quad (14),$$

где T – экспериментальная температура, К; t – время, с; φ , r – полярные координаты; ρ – плотность воды, 1000 кг/м^3 ; c – удельная теплоемкость воды, $4183 \text{ Дж/(кг}\cdot\text{К)}$; λ – теплопроводность воды, $4,6 \text{ Вт/(м}\cdot\text{К)}$; $Q_{уд}$ – удельная тепловая мощность, Вт/м^3 .

Бактерии являются слабыми источниками тепла. Изменения температур, связанные с их активностями, находятся на грани разрешения приборов и требуют специальных алгоритмов для обработки температурных показателей. На изображениях 96-луночных полистироловых микропланшетов, полученных с инфракрасной камеры, для каждой лунки считали среднюю температуру:

$$\theta(t) = \frac{1}{\pi r_0^2} \iint_0^{2\pi r_0} r(T(r, \varphi, t) - T_0) dr d\varphi \quad (15),$$

где θ – средняя температура, К; T_0 – температура окружающей среды, измеренная в пустых лунках планшета, К; r_0 – радиус лунки, м.

Формула для граничных условий эксперимента:

$$-\lambda \frac{\partial T(r_0, \varphi, t)}{\partial r} = \beta_0 \theta(t) \quad (16),$$

где β_0 – коэффициент теплопередачи, $\text{Вт/(м}^2\cdot\text{К)}$. Его определяли экспериментальным путем по динамике изменения средней температуры в лунках микропланшета с водой в процессе ее остывания:

$$\theta_{\text{вода}}(t) = \theta_i e^{\frac{2\beta_0}{\rho c} t} - T_0 \quad (17),$$

where $\theta_{\text{вода}}(t)$ – средняя температура воды, К; θ_i – исходная средняя температура воды, К. По своему физическому смыслу коэффициент β_0 связан с процессом испарения воды и характеризует фоновое снижение температуры в экспериментах по адгезии родококков.

Считали, что экспериментальная температура T не зависела от угла вращения φ $\left(\frac{\partial T}{\partial \varphi}\right) = 0$, производная T по всему радиусу r_0 отличалась от нуля только на границах исследуемой окружности (границы лунки), и $Q_{уд}$ не изменялась вдоль координат r и φ . В этом случае уравнение теплопроводности, учитывающее изменения средней температуры θ , выглядело следующим образом:

$$\rho c \frac{\partial \theta(t)}{\partial t} = -\frac{2}{r_0} \beta_0 \theta(t) + Q_{уд}(t) \quad (18).$$

Далее вводили удельный коэффициент теплопередачи $\beta = \frac{2}{r_0} \beta_0$, Вт/(м³·К), и тепловую мощность считали согласно следующему уравнению:

$$Q(t) = mc \frac{\partial \theta(t)}{\partial t} + \beta V \theta(t) \quad (19),$$

где Q – суммарная тепловая мощность, Вт; V – анализируемый объем = объем жидкости в лунке, $1 \cdot 10^{-7}$ м³; m – вес = вес жидкости, внесенной в лунку, $1 \cdot 10^{-4}$ кг. Для платиновых термометров сопротивления PR100, вместо средней температуры θ в уравнении (19) использовали экспериментальную температуру T .

Тепловую мощность $Q(t)$, Вт, генерируемую родококками, считали, как разницу между суммарной тепловой мощностью $Q(t)$ в бактериальной суспензии и таковой в абиотическом контроле. В контроле тепловая мощность была связана с неспецифическими фоновыми абиотическими процессами, в частности, с испарением воды. Работу адгезии $Q_{прод}$, Дж, в момент времени t считали следующим образом: $Q_{прод} = Q_{клетки} \times t$. Суммарное количество продуцируемого тепла $Q_{общ}$, Дж, вычисляли по площади под линией графике $Q_{прод}$ от времени.

Наряду с вычислением термодинамических параметров, строили двумерную математическую модель распределения и изменения температур на поверхности 96-луночного полистиролового микропланшета с родококками. Моделирование проводили с использованием пакета программ ANSYS 12.1 (ANSYS, США, лицензия ANSYS Academic Research Mechanical and CFD № 1064623) в соответствии со следующей системой уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \lambda \Delta T + Q_{\text{уд}}(x, y, t), \quad 0 < x < x_0, \quad 0 < y < y_0, \quad t > 0, \\ \frac{\partial T}{\partial x} \Big|_{x=x_0} = -\beta(T - T_0), \\ \frac{\partial T}{\partial x} \Big|_{x=0} = -\beta(T - T_0), \\ \frac{\partial T}{\partial y} \Big|_{y=y_0} = -\beta(T - T_0), \\ \frac{\partial T}{\partial y} \Big|_{y=0} = -\beta(T - T_0), \\ T(x, y, 0) = T_0 \end{array} \right. \quad (20),$$

где x, y – прямоугольные координаты; x_0, y_0 – длина и ширина 96-луночного полистиролового микропланшета соответственно, м; ΔT – разница между максимальным и минимальным значениями температур на микропланшете, К.

3.12. Оценка жизнеспособности родококков

Жизнеспособность планктонных и прикрепленных клеток определяли путем окрашивания йодонитротеразолием фиолетовым (ИНТ) и LIVE/DEAD[®], а также микрометодом точечных высевов (Веслополова, 1995). Окрашивание ИНТ (Sigma-Aldrich, США) проводили согласно В.А. Wrenn и А.Д. Venosa (1996). Подложки с прикрепленными клетками родококков трижды отмывали НФБ, окрашивали 0,2% ИНТ при комнатной температуре в течение 2 ч, три раза промывали, формазан экстрагировали с помощью этилацетата и определяли ОП_{480 нм}. Количество прикрепленных клеток вычисляли с использованием калибровочных графиков.

Для оценки резистентности свободных и прикрепленных клеток *Rhodococcus* к действию стрессорных факторов определяли минимальные ингибирующие концентрации солей тяжелых металлов ZnSO₄·7H₂O, NiSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, K₂CrO₄ и (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O и выживаемость клеток по проценту оставшихся жизнеспособных клеток и их метаболической активности после хранения при температуре +4 °С без источника углерода и энергии в течение 8 мес. Соли тяжелых металлов растворяли в LB в концентрации 80,00 мМ, автоклавировали при 105 °С в течение 15 мин и затем готовили серию двукратных разведений в LB в диапазоне от 0,15 до 80,00 мМ (Костина, 2010). Растворы солей

вносили по 1 мл в пустые стерильные пробирки или пробирки с прикрепленными клетками. Объем подложки с клетками в каждой пробирке составлял 80 мкл. Суспензию свободных клеток также вносили в пробирки в объеме 80 мкл, при этом концентрация клеток в суспензии была подобрана таким образом, чтобы после внесения суспензии достигалась концентрация клеток, равная таковой в пробирках с закрепленными клетками. Пробирки со свободными и закрепленными клетками родококков инкубировали при перемешивании (130 об/мин), 28 °С в течение 7 сут. Жизнеспособность клеток определяли через 1 (бактериостатическая концентрация) и 7 сут (бактерицидная концентрация). В качестве биотического контроля использовали свободные и прикрепленные клетки в среде LB без солей тяжелых металлов, в качестве абиотического контроля – неинокулированную среду LB.

3.13. Эксперименты по биодegradации углеводов

Эксперименты по биодegradации углеводов проводили в колбах Эрленмейера со 100 мл среды К при перемешивании 160 об/мин и температуре 28 °С в течение 21 сут или металлических поддонах с 500 г модельной почвы либо 600 г почвы Turkey Yard (Великобритания) при комнатной температуре в течение 35–196 сут. В качестве загрязнителей использовали смесь ПАУ (нафталин, фенантрен, пирен, хризен и бензпирен в равных количествах), модельную и сырую нефть (Осинское месторождение, Пермский край, скв. 499, $\rho_{20^{\circ}}=0,8896$ г/см³). 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 (Abed *et al.*, 2006). Углеводородные загрязнители вносили в диапазоне концентраций от 0,05 до 10 вес. %. В качестве инокулята использовали свободные либо прикрепленные на подложке клетки родококков в концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл среды или г почвы. Модельная почва состояла из 50% песка, 30% глины и 20% плодородного верхнего слоя почвы, все компоненты предварительно высушивали при 80°C и просеивали через 1 мм сито. Почву ежедневно рыхлили и

увлажняли до достижения уровня относительной влажности 20%. Родококки вносили 1–6 раз на протяжении эксперимента. Один раз в 1–2 нед делали отбор проб для измерения содержания остаточных углеводов, рН и численности микроорганизмов путем посева на твердые питательные среды. Дыхательную активность бактерий в процессе биodeградации оценивали с помощью респирометра Micro-Охумах (Columbus Instruments, США) с программным обеспечением MicroОхумах V1.6.8.

Остаточные углеводороды анализировали методами гравиметрии после экстракции *n*-гексаном или хлороформом и газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Хроматографическое разделение углеводов проводили с помощью газового хроматографа Agilent 6890N с квадрупольным масс-спектрометром Agilent MSD 5973B (Agilent Technologies, США) в качестве детектора и кварцевой колонкой HP-5ms 30 м×0,25 мм×0,25мкм. Экстракцию ПАУ из почвы проводили методом LLPE (Liquid Low Pressure Extraction), разработанным совместно с коллегами из Исследовательского центра оценки загрязнений почвы и ремедиации (Эдинбургский университет, Эдинбург, Великобритания) и состоящим из этапов нагревания безводного почвенного образца и ацетонитрила в соотношении 1 : 10 (по объему) в закрытых тefлоновых пробирках при температуре 98 °С в течение 5 мин, последующем встряхивании вручную в течение 2 мин, охлаждении при -20 °С в течение 5 мин и центрифугировании при 4000 об/мин в течение 10 мин. Концентрацию ПАУ в ацетонитрильных экстрактах определяли спектрофотометрически при 254 и 288 нм (Cloarec *et al.*, 2002).

3.14. Биоинформатический анализ

Геном *R. ruber* ИЭГМ 231 секвенировали в Национальном центре секвенирования Франции “Геноскоп” (Эври, Франция) Университета Эври (Эври, Франция) с помощью технологии Illumina MiSeq. Полногеномная последовательность *R. ruber* ИЭГМ 231 депонирована в открытых базах данных

DDBJ/EMBL/GenBank под номерами CCSD01000001–CCSD01000115 и MicroScope (https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/mage/viewer.php?O_id=2307).

Поиск генов, кодирующих предполагаемые адгезины у родококков, проводили с использованием баз данных MicroScope и NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). На веб-странице MicroScope с геномом *R. ruber* ИЭГМ 231 в поле “Keywords” вводили слова “Adhesin”, “Adhesion” или названия конкретных ферментов. В базе данных NCBI Gene по ключевым словам “Adhesin actinobacteria” искали гены актинобактерий, кодирующие белки с подтвержденной функцией адгезии и те, в которых присутствуют домены, обнаруженные в генах адгезинов других бактерий. Гены выравнивали по полногеномной последовательности *R. ruber* ИЭГМ 231 с помощью программы BLASTn (NCBI), алгоритмы megablast ($\geq 95\%$ сходства) и discontinuous megablast ($< 95\%$ сходства). Для сравнения аминокислотных последовательностей кодируемых генами белков использовали программу BLAST® blastp suite (NCBI).

3.15. Статистическая обработка результатов исследования

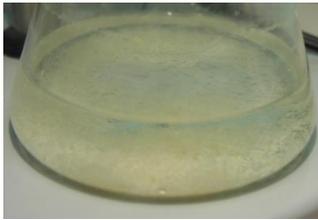
Все эксперименты проводили в 3–8-кратной повторности. Математическую обработку полученных данных осуществляли с помощью компьютерных программ Microsoft® Excel® 2019 MSO (Microsoft, 2019) и Statistica version 13 (TIBCO Software Inc., 2018). Определяли тип распределения, рассчитывали медиану, квартили, средние значения, стандартные отклонения. Для сравнения групп использовали непарные критерии Стьюдента, Крускала-Уоллиса, Ньюмена-Кейлса и F-критерий. Связь между переменными определяли с помощью коэффициентов корреляции Пирсона или Спирмена в зависимости от типа распределения. При кластерном анализе использовали показатели взвешенного среднего числа пары группы, расстояние (S) между которыми рассчитывали по формуле City-block Manhattan distance.

Глава 4. АДГЕЗИЯ – ТИПИЧНАЯ РЕАКЦИЯ РОДОКОККОВ НА ПРИСУТСТВИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ

4.1. Усиление адгезивных свойств родококков в присутствии углеводородов

В результате проведенных исследований установлено, что в присутствии углеводов существенно усиливается адгезивная активность родококков. Родококки образуют обособленные многоклеточные агрегаты разной формы и размеров. Агрегаты имеют продолговатую или округлую форму, форму хлопьев и плотных гранул. Размеры агрегатов колеблются от 6 мкм (микроагрегаты по 5–10 клеток) до 2 см (гранулы *R. erythropolis* ИЭГМ 270) (рисунок 7). В составе агрегатов *Rhodococcus*, формирующихся в средах с твердыми углеводородами, обнаруживаются частицы углеводородного субстрата, что свидетельствует о прикреплении клеток не только друг к другу, но и к углеводороду. В среде LB и минеральной среде с глюкозой для родококков не характерно образование агрегатов, клетки растут в виде гомогенных суспензий. Лишь в культурах с высокой ($1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл) концентрацией клеток наблюдается их слипание с образованием небольших агрегатов, обусловленное тесным контактом между клетками (см. рисунок 7).

Тенденция родококков к агрегации в присутствии углеводов показана в других работах и объясняется необходимостью физического контакта клеток с углеводородным субстратом (Рубцова и др., 2012; de Carvalho *et al.*, 2004). Следует отметить, что подобная реакция типична не для всех углеводородокисляющих бактерий. Например, для грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* основным механизмом поступления углеводов внутрь клеток является не прямой контакт клеток с субстратом, а псевдосольюбилизация углеводов с помощью внеклеточных биосурфактантов рамнолипидной природы. Клетки контактируют с мицеллами биосурфактанта, внутрь которых заключен углеводород, что сопровождается ростом клеток в виде гомогенных суспензий (Bouchez-Naitali, Vandecasteele, 2008).



R. erythropolis ИЭГМ 201



R. erythropolis ИЭГМ 270

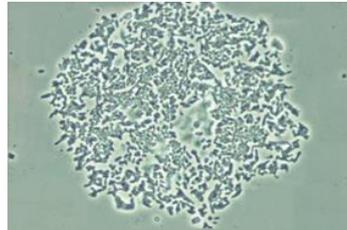


R. ruber ИЭГМ 326

Макроагрегаты, среда с 3 об. % *n*-гексадекана



R. erythropolis ИЭГМ 201

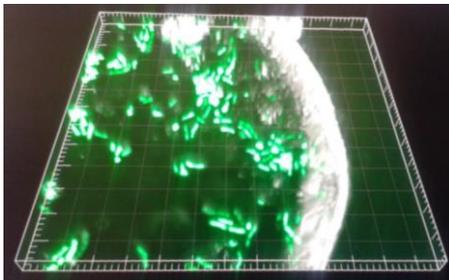


R. erythropolis ИЭГМ 270



R. ruber ИЭГМ 326

Среда с 3 об. % *n*-гексадекана, световая микроскопия, ув. $\times 1000$

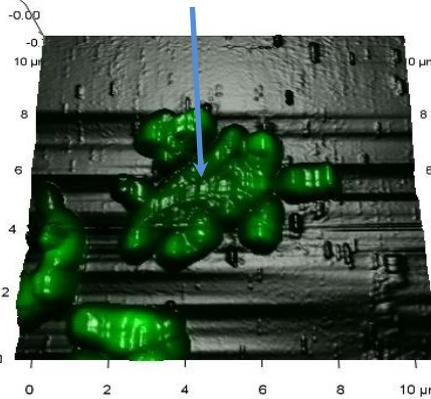


R. ruber ИЭГМ 231 в капле *n*-гексадекана, КЛСМ, ув. $\times 1000$

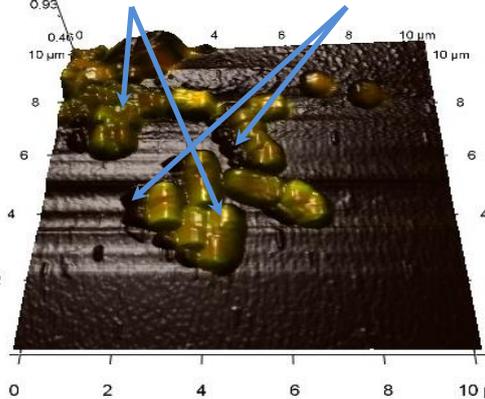
Агрегаты клеток

Агрегаты клеток

Частицы субстрата



R. qingshengii ИЭГМ 267

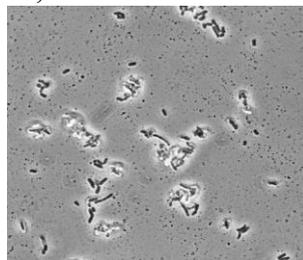


R. opacus ИЭГМ 262

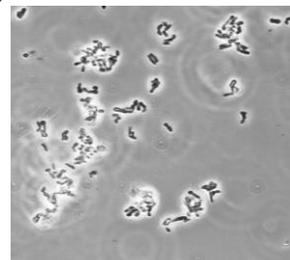
0,2 г/л *n*-гексакозана, АСМ/КЛСМ



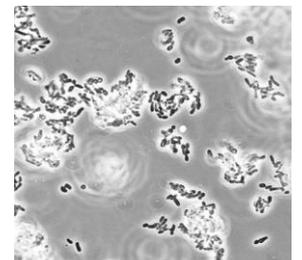
Глюкоза 1 г/л, $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл



LB, $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл



LB, $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл



LB, $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл

R. ruber ИЭГМ 342, световая микроскопия, ув. $\times 1000$

Рисунок 7 – Образование обособленных многоклеточных агрегатов *Rhodococcus* spp. в присутствии углеводов

Родококки, растущие в присутствии жидких и газообразных углеводородов, обладают в 2–23 раза повышенной адгезивной активностью в отношении твердых поверхностей по сравнению с родококками, растущими в среде LB. Медианы показателей адгезии родококков к модельной подложке (полистирол) составляют 11, 60 и 38% в среде LB, в среде с 3 об. % *n*-гексадекана и в присутствии пропана соответственно. Наиболее высокое (в 8–23 раза) увеличение адгезивной активности характерно для клеток, растущих в присутствии жидких (*n*-гексадекан) углеводородов. Исключение из выявленной закономерности составляют штаммы *R. jostii* ИЭГМ 32, *R. ruber* ИЭГМ 231 и *R. erythropolis* ИЭГМ 271, которые наиболее активно (58, 68 и 85%) прикрепляются к полистиролу в среде LB. Для этих штаммов выявлено отсутствие изменений либо понижение в 2–4 раза адгезивной активности при культивировании в средах с углеводородами по сравнению с ростом в среде LB (рисунок 8).

На рисунке 9 представлены дендрограммы распределения штаммов родококков по кластерам в зависимости от адгезивной активности клеток в отношении полистирола. Строгой корреляции между видовой принадлежностью родококков и их адгезивными свойствами не обнаружено. Штаммы в пределах одного вида по адгезивной активности отличаются друг от друга в 3–24 раза, средние показатели адгезии между разными видами отличаются не более, чем в 3 раза. Отмечен незначительный (в диапазоне 12–16%) разброс показателей адгезии для представителей *R. fascians* и характерные низкие (не более 11%, исключение составляет штамм ИЭГМ 271) значения адгезивной активности представителей *R. erythropolis* при росте в среде LB. Показано, что представители *R. jostii* (за исключением штамма ИЭГМ 28) при росте в среде с *n*-гексадеканом и *R. ruber* при росте в присутствии пропана характеризуются наименьшими (42–55 и 15–42% соответственно) показателями адгезивной активности среди исследованных штаммов родококков при росте в присутствии углеводородов (см. рисунок 9). Выявленные различия и сходства в адгезивной активности родококков могут быть связаны с особенностями их ответных реакций на присутствие углеводородов и свойствами клеточной поверхности.

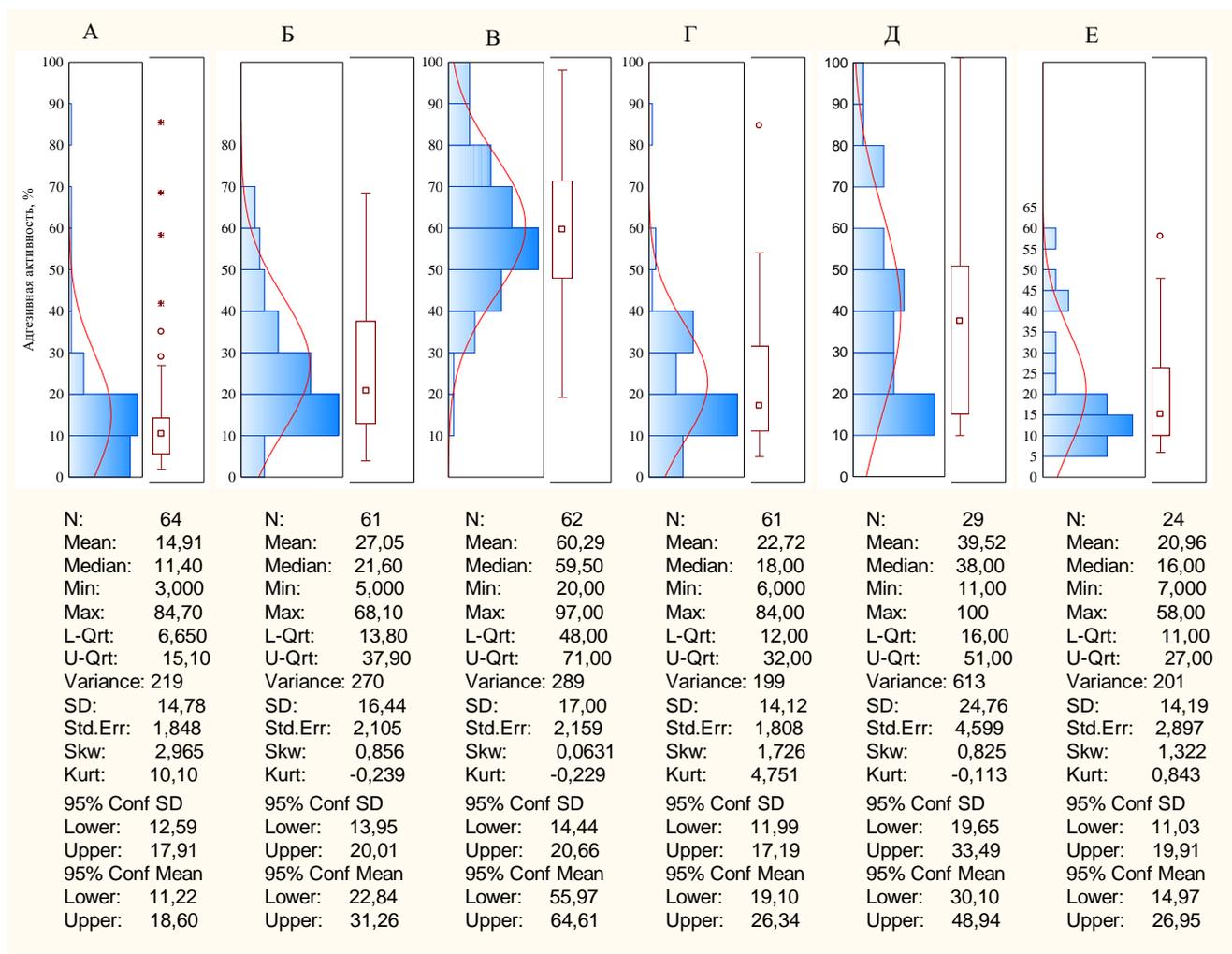
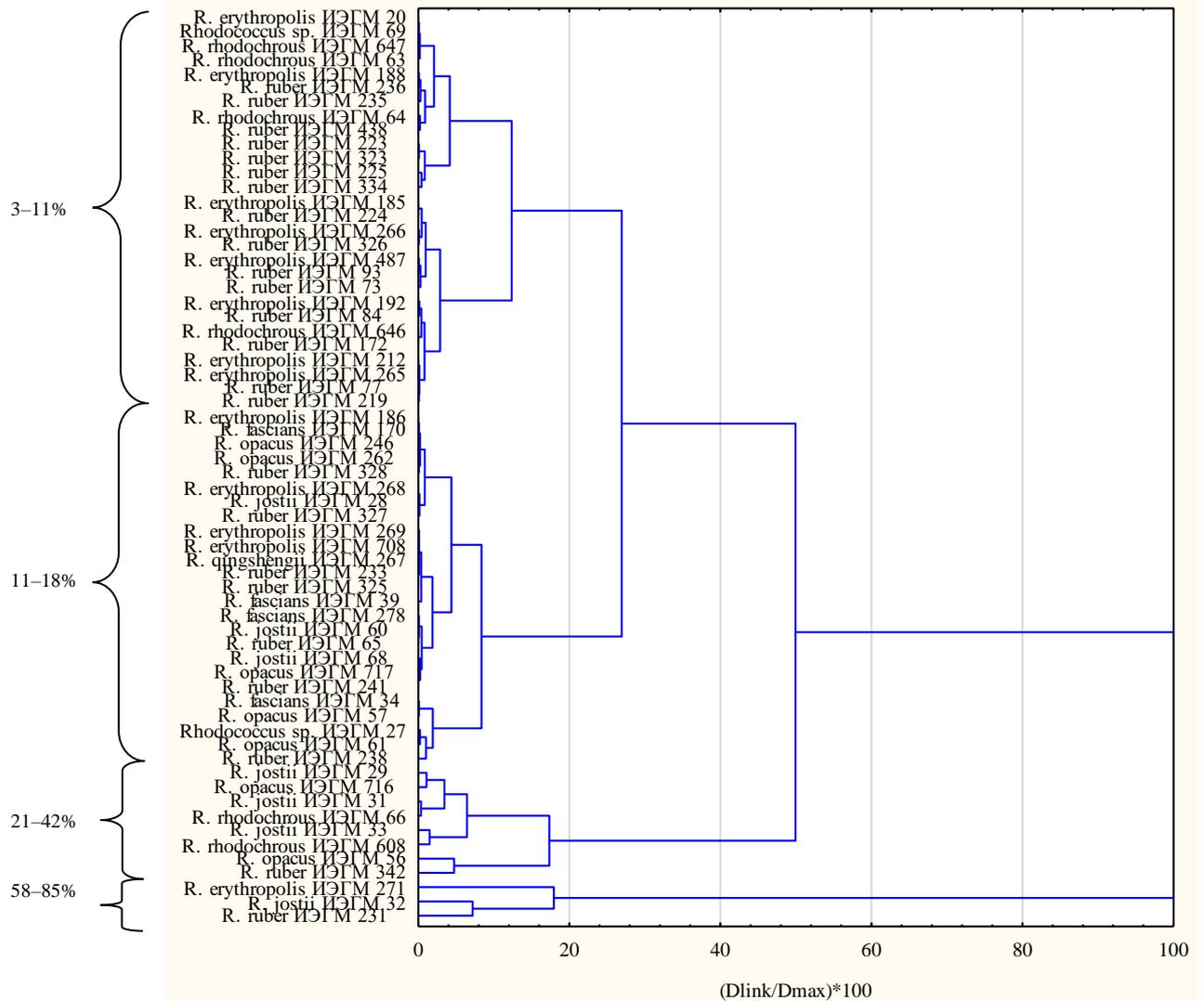


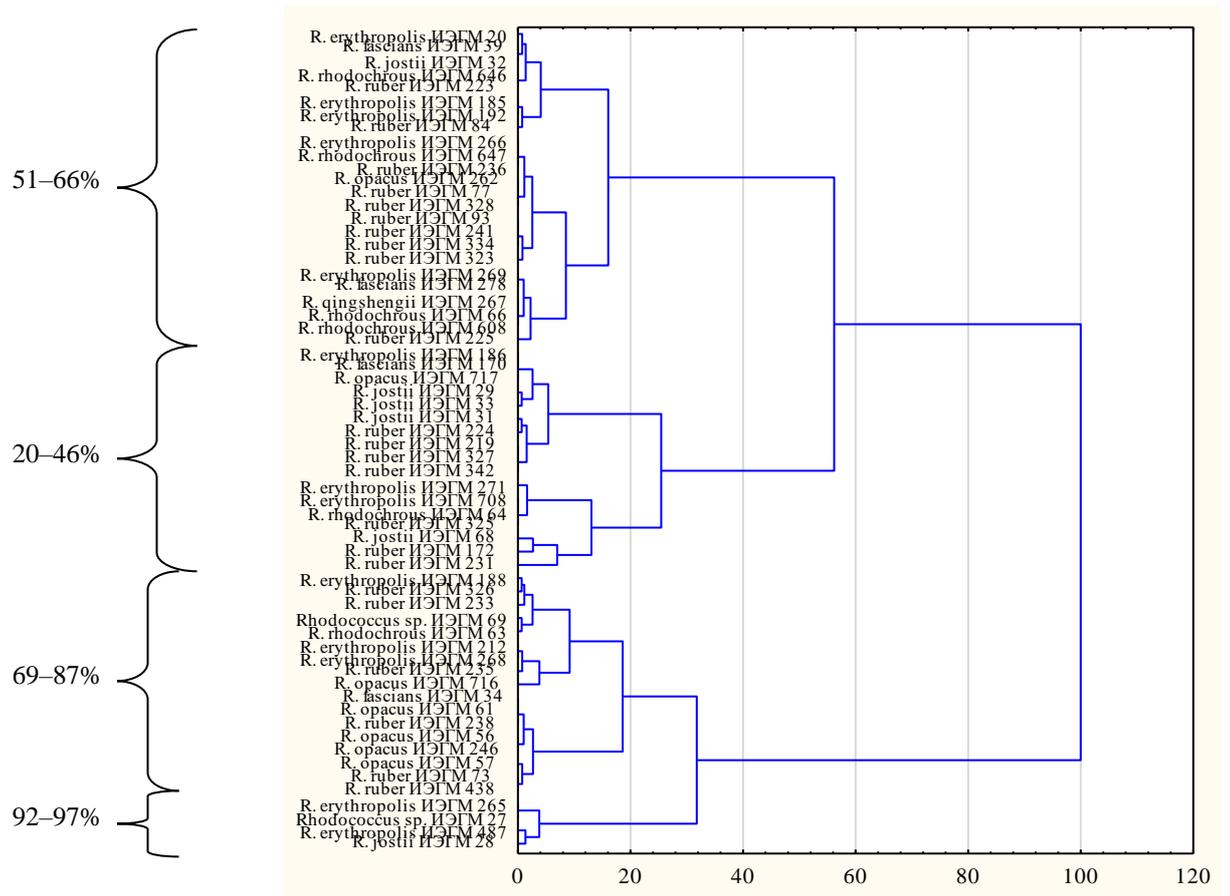
Рисунок 8 – Адгезивная активность родококков в отношении полистирола в зависимости от состава среды культивирования и физиологического состояния клеток

Варианты опыта (среда культивирования, растущие/нерастущие клетки): А – среда LB, растущие клетки; Б – среда LB, нерастущие клетки; В – 3 об. % *n*-гексадекана, растущие клетки; Г – 3 об. % *n*-гексадекана, нерастущие клетки; Д – пропан : воздух 1 : 5, растущие клетки; Е – пропан : воздух 1 : 5, нерастущие клетки

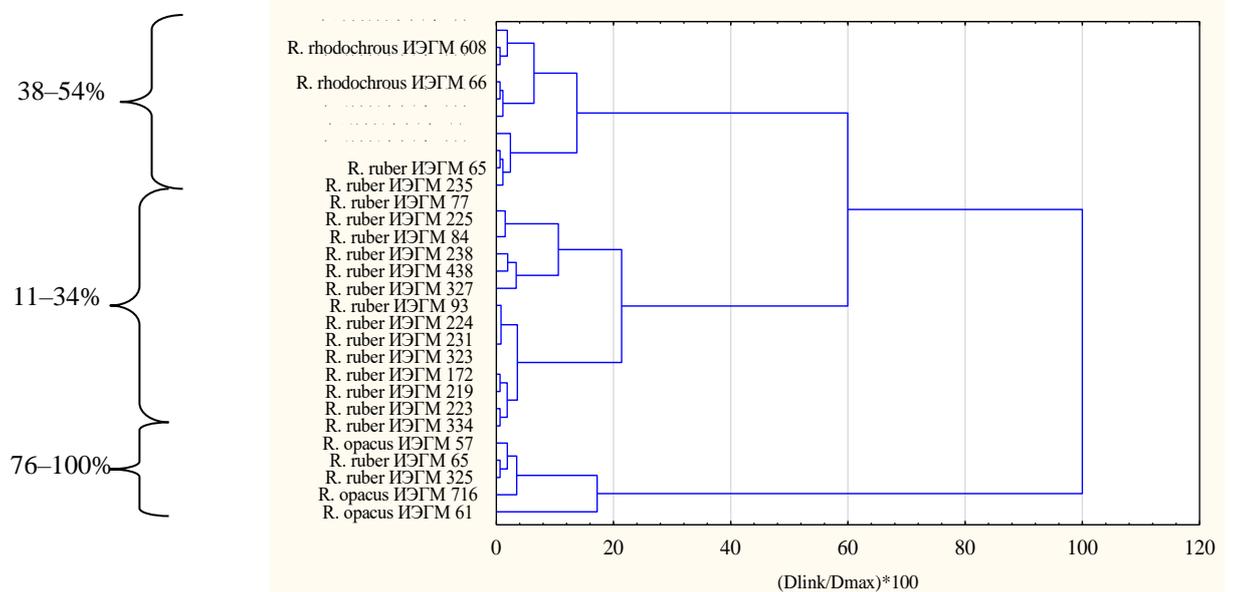


Рост в среде LB

Рисунок 9 – Дендрограмма распределения штаммов родококков по кластерам в зависимости от их адгезивной активности в отношении полистирола



Рост в присутствии 3 об. % *n*-гексадекана

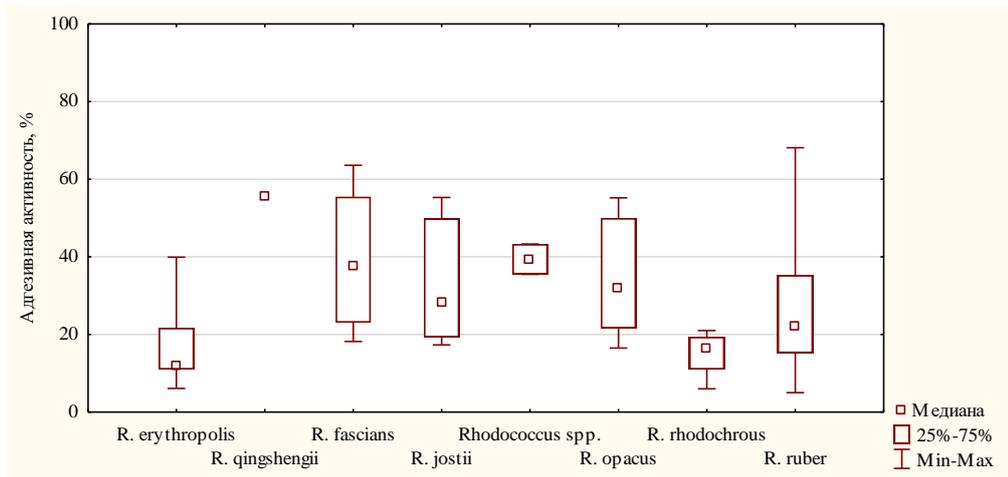


Рост в атмосфере пропан : воздух 1 : 5

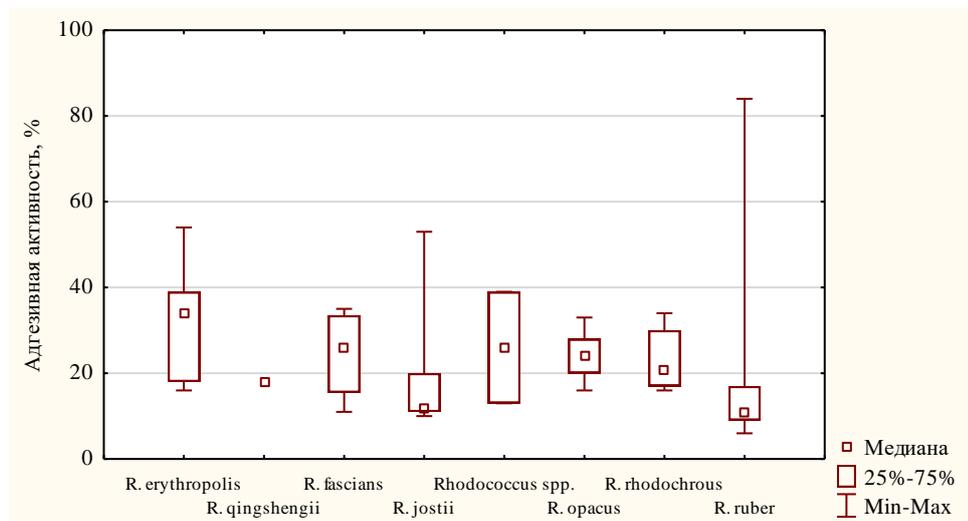
Рисунок 9 (продолжение) – Дендрограмма распределения штаммов родококков по кластерам в зависимости от их адгезивной активности в отношении полистирола

На рисунке 10 представлены данные по адгезивной активности нерастущих родококков. Нерастущие клетки получают в результате отмывания от питательной среды и ресуспендирования в изотоническом солевом растворе. Полученные таким образом клетки находятся в поздней экспоненциальной-ранней стационарной фазе роста, в отсутствие источника углерода и энергии. В этих условиях клеточная оболочка бактерий начинает подвергаться существенным изменениям: снижаются степень текучести цитоплазматической мембраны, ее энергодающая и транспортная функция; клеточная стенка становится более гидрофобной, вследствие чего возможно усиление адгезивных свойств клеток (Бухарин и др., 2005). Кроме того, в солевых растворах в отличие от питательных сред практически не содержатся органические вещества, отвечающие за образование на подложке кондиционирующей пленки (Hori, Matsumoto, 2010; Carniello *et al.*, 2018). Адсорбция компонентов среды LB на поверхности ложки и ее гидрофилизация вследствие этого процесса могут ингибировать адгезию и быть причиной низких значений адгезивной активности клеток.

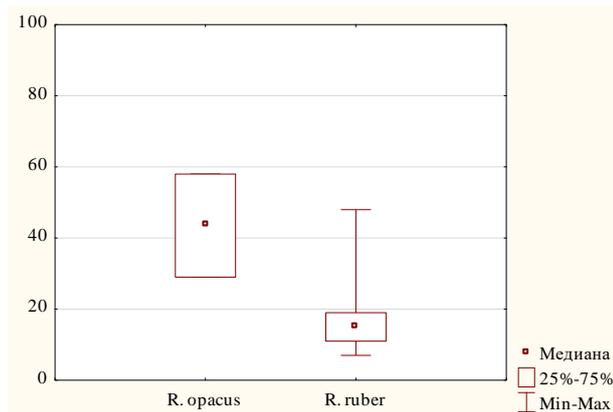
По нашим данным, отмывые от среды LB, нерастущие родококки в 2–9 раз лучше прикрепляются к поверхности полистирола по сравнению с растущими в LB клетками. Эта тенденция выявлена у 72% исследованных штаммов и наиболее четко прослеживается у представителей *R. fascians*, *R. jostii*, *R. opacus* и *R. ruber* (рисунок 10). У 8% штаммов выявлена противоположная тенденция – снижение в 2–13 раз адгезивной активности нерастущих клеток по сравнению с таковой растущих клеток. В этот список входят штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 271, *R. jostii* ИЭГМ 32, *R. ruber* ИЭГМ 231, которые в условиях роста в среде LB демонстрируют наиболее высокие показатели адгезии (рисунок 10). Четкой корреляции между видовой принадлежностью родококков и их адгезивными свойствами вновь не обнаружено. Однако показано, что растущие в LB и отмывые от LB клетки *R. erythropolis*, за исключением штамма ИЭГМ 271, характеризуются одними из самых низких (5–11% и 11–21% соответственно) показателей адгезивной активности в отношении полистирола; узкий (16–19%) диапазон показателей адгезии характерен также для отмывых от LB клеток *R. rhodochrous* (рисунки 9, 10).



Клетки предварительно выращивали в среде LB



Клетки предварительно выращивали в парах *n*-гексадекана



Клетки предварительно выращивали в атмосфере пропан : воздух 1 : 5

Рисунок 10 – Адгезивная активность нерастущих клеток родококков в отношении полистирола

Нерастущие клетки, полученные после культивирования в средах с углеводородами, в 2–8 раз хуже либо с такой же эффективностью прикрепляются к подложке по сравнению с растущими клетками. Возможных объяснений этому может быть несколько.

(1) Присутствие подложки в среде активирует морфолого-физиологические изменения клеток и синтез молекулярных факторов, способствующих адгезии (Киричук и др., 2019).

(2) Важным фактором адгезии родококков являются биосурфактанты, синтез которых происходит в жидких средах и которые необходимы для образования эмульсии углеводородного субстрата в воде. При получении нерастущих клеток родококки выращивают не в жидкой, а на агаризованной среде в парах *n*-гексадекана. В этих условиях синтеза биосурфактантов не происходит.

(3) При отмывании с поверхности клеток удаляются компоненты, участвующие в адгезии. Это могут быть ЭПС, гликолипидные биосурфактанты, белки (Sutcliffe *et al.*, 2010).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что углеводороды инициируют процесс адгезии родококков. Несмотря на отсутствие заметного влияния углеводов на адгезивные свойства нерастущих родококков, рост *Rhodococcus* spp. в средах с углеводородами всегда сопровождается агрегацией клеток и увеличением их адгезивной активности в отношении твердых поверхностей.

4.2. Корреляция между адгезивной и углеводородокисляющей активностью родококков

При определении зависимости адгезивной активности родококков от источника выделения штамма не выявлено ($p \geq 0,05$) различий между показателями адгезии штаммов, выделенных из загрязненных (нефтезагрязненные, находящиеся вблизи нефтяных пластов, нефтяных скважин и нефтеперерабатывающих предприятий, газопроводов) и незагрязненных биотопов. Разница между медианами

значений адгезивной активности для этих групп штаммов составляет менее 5% (рисунок 11).

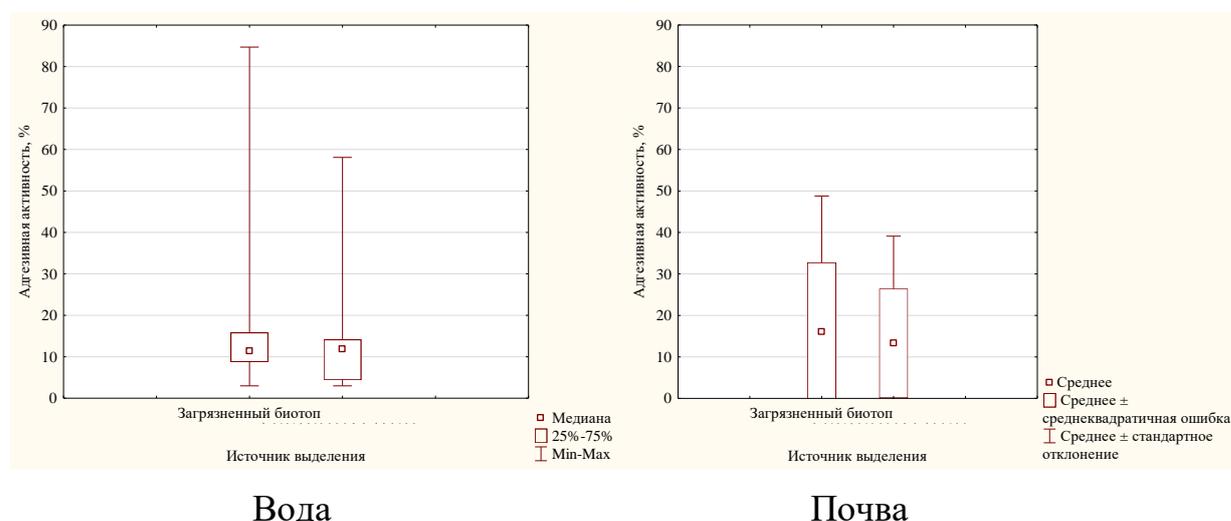


Рисунок 11 – Адгезивная активность родококков в отношении полистирола в зависимости от источника выделения штамма

На рисунке 12 представлены результаты определения адгезивной активности *Rhodococcus* spp. в отношении твердых углеводов. Данный показатель варьирует в диапазоне от 0 до 100%, что соответствует количеству прикрепленных клеток $0,0-10,6 \cdot 10^6$ КОЕ/см². Для большинства исследованных штаммов адгезивная активность клеток не превышает 22%, или $2,2 \cdot 10^6$ КОЕ/см². Два штамма, *R. erythropolis* ИЭГМ 212 и *R. opacus* ИЭГМ 262, обладают повышенной адгезивной активностью, именно у них отмечены максимальные показатели адгезии к твердым углеводам (рисунок 12). При этом показано, что адгезивная активность родококков в отношении твердых углеводов влияет на биодegradацию этих соединений. Чем больше клеток прикрепляется к углеводороду, тем интенсивнее они растут в его присутствии. Об этом свидетельствуют результаты окрашивания прикрепленных клеток кристаллическим фиолетовым и живых клеток ИНТ. В лунках культуральных микропланшетов с наиболее интенсивным окрашиванием ИНТ регистрируется наиболее интенсивное окрашивание кристаллическим фиолетовым (рисунок 13).

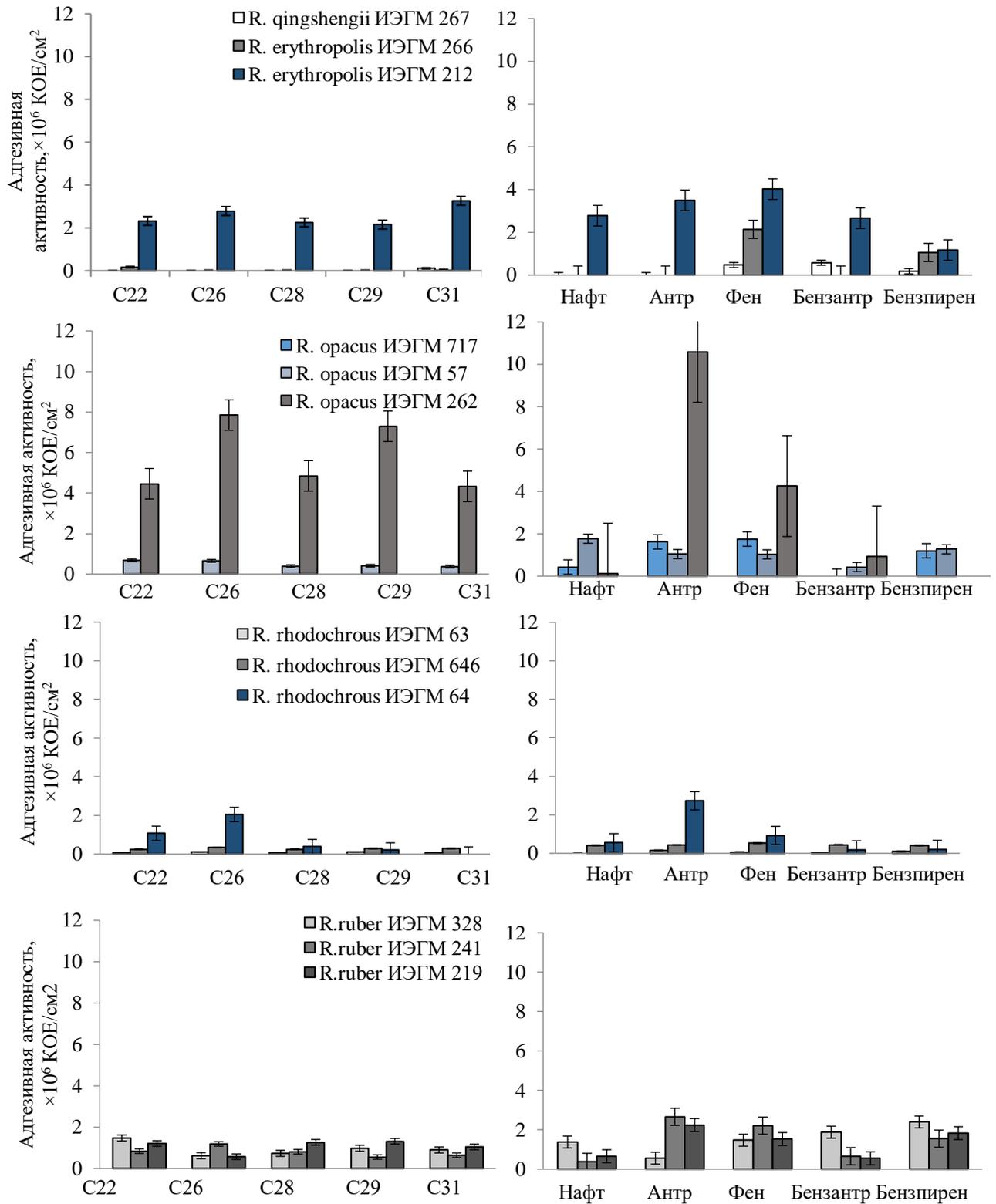


Рисунок 12 – Адгезивная активность родококков в отношении твердых углеводов. Углеводороды: C22 – *n*-докозан, C26 – *n*-гексакозан, C28 – *n*-октакозан, C29 – *n*-нонакозан, C31 – *n*-гентриаконтан, нафт – нафталин, антр – антрацен, фен – фенантрен, бензантр – бензантрацен

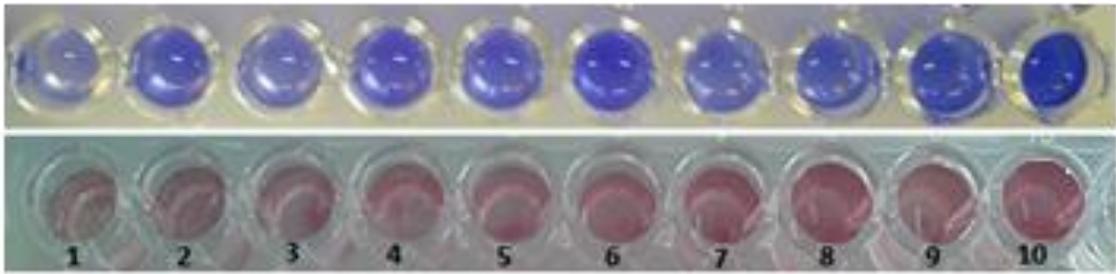


Рисунок 13 – Адгезивная активность и рост клеток *R. opacus* ИЭГМ 262 в присутствии твердых углеводов. Адгезивную активность клеток в отношении углеводов оценивали путем окрашивания кристаллическим фиолетовым (верхний ряд), рост клеток оценивали с помощью ИНТ (нижний ряд). Варианты опыта: 1 – бензпирен, 2 – фенантрен, 3 – нафталин, 4 – бензантрацен, 5 – *n*-октакозан, 6 – *n*-докозан, 7 – *n*-нонакозан, 8 – *n*-гексакозан, 9 – *n*-гентриаконтан, 10 – антрацен.

На рисунке 14 показаны фотографии колб с культурами *R. qingshengii* ИЭГМ 267 и *R. opacus* ИЭГМ 262 после 9 сут биодegradации 2 г/л *n*-гексакозана. Более интенсивный рост отмечается в культуре *R. opacus* ИЭГМ 262 по сравнению с *R. qingshengii* ИЭГМ 267. Процент биодegradации *n*-гексакозана в 3 раза выше при использовании штамма ИЭГМ 262 по сравнению со штаммом ИЭГМ 267, адгезивная активность клеток ИЭГМ 262 в 3,5 раза превышает таковую клеток ИЭГМ 267 (таблица 4). Идентичные результаты получены в экспериментах по окислению антрацена. Процент биодegradации антрацена клетками *R. opacus* ИЭГМ 262 и адгезивная активность данного штамма в отношении антрацена в 10 и 4 раза соответственно превышают аналогичные показатели *R. qingshengii* ИЭГМ 267 (таблица 4).



Рисунок 14 – Колбы с клетками *R. qingshengii* ИЭГМ 267 (слева) и *R. opacus* ИЭГМ 262 (справа) после 9 сут биодegradации 2 г/л *n*-гексакозана

Таблица 4 – Адгезивная активность родококков в отношении твердых углеводов и процент их биодegradации после 9 сут эксперимента

Штамм	Углеводород	Адгезивная активность, %	Число прикрепленных клеток, $\times 10^6$ КОЕ/см ²	Биодegradация, %
<i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 267	<i>n</i> -Гексакозан	20	$2,0 \pm 0,6$	15
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 262	<i>n</i> -Гексакозан	70	$7,0 \pm 0,2$	50
<i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 267	Антрацен	10	$1,0 \pm 0,2$	5
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 212	Антрацен	40	$4,0 \pm 1,5$	50

Следует отметить, что представители *R. ruber* лучше остальных видов родококков прикрепляются к бензпирену – тяжелому ПАУ с пятью конденсированными кольцами; показатели адгезии *R. ruber* к бензпирену составляют 15–24%, или $1,5 \cdot 10^6$ – $2,4 \cdot 10^6$ КОЕ/см² (см. рисунок 12). Бензпирен относится к группе приоритетных загрязнителей из-за высокой степени токсичности, канцерогенности, мутагенности и выраженного тератогенного эффекта. Этот углеводород прочно сорбируется в почве и на дне водоемов и практически не выводится из окружающей среды. Концентрация бензпирена чуть выше детектируемого аналитическими методами уровня 0,02 мг/кг почвы считается

опасной (Санитарные правила и нормы СанПиН 1.2.3685-21, 2021; Lerda, 2010). В связи с этим, штаммы *R. ruber* с высокой адгезивной активностью в отношении бензпирена могут быть востребованы в технологиях биодеструкции этого опасного загрязнителя.

Установлено, что биodeградация родококками жидких углеводов зависит от адгезивной активности клеток в отношении твердых поверхностей. Выявлена строгая ($R_{\text{Пирсона}}=0,63$, $p=0,00$) корреляция между степенью адгезии клеток к полистиролу и скоростью биodeградации ими *n*-гексадекана (рисунок 15).

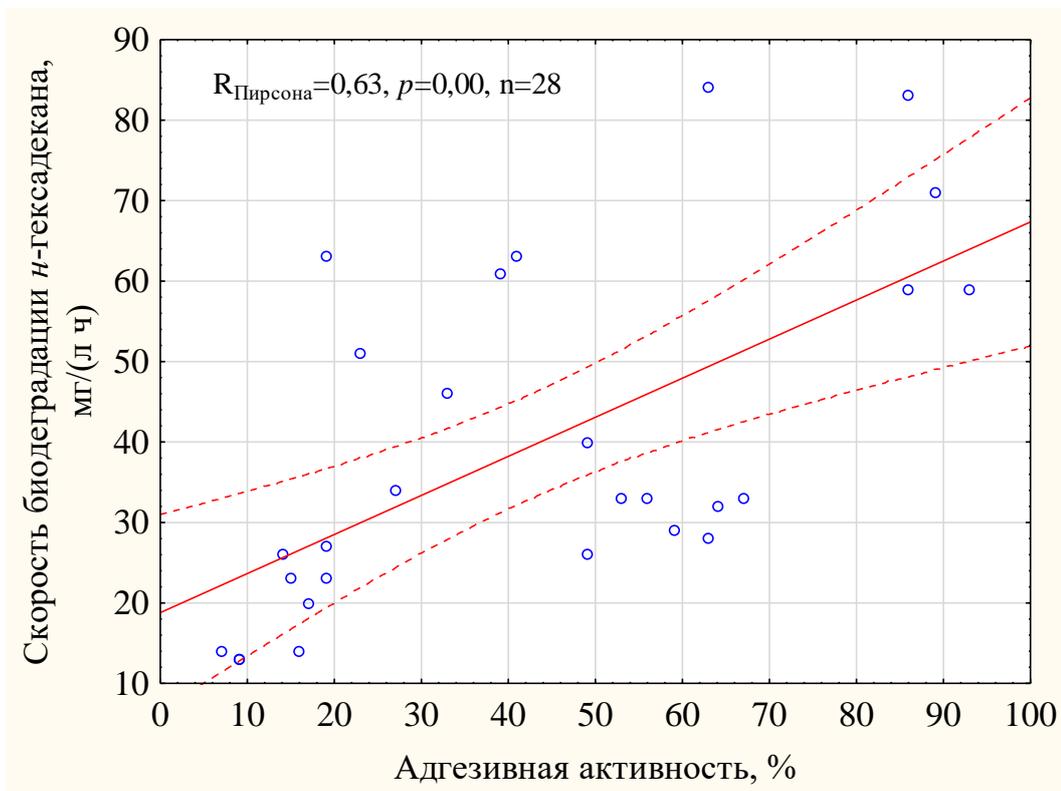


Рисунок 15 – Корреляция между адгезивной активностью *Rhodococcus* spp. в отношении полистирола и скоростью биodeградации *n*-гексадекана. Приведена линия регрессии с границами доверительного интервала (уровень надежности 95%), точки – экспериментальные значения, n – количество исследованных штаммов

При этом удельная углеводородокисляющая активность прикрепленных клеток в 3–18 раз превышает таковую планктонных клеток (рисунок 16). Увеличение удельной активности клеток после прикрепления связано со стабилизацией их метаболической активности. Прикрепленные клетки не переходят из экспоненциальной фазы роста в стационарную, разобщены в пространстве, менее чувствительны к действию ауторегуляторных соединений, обладают фенотипом толерантности и характеризуются биохимическим составом, отличным от такового планктонных клеток (Ефременко, 2018; Carvalho *et al.*, 2001; Vinage, van Rohr, 2003a,b; Hatzinger *et al.*, 2011; Pannier *et al.*, 2012; An *et al.*, 2018).

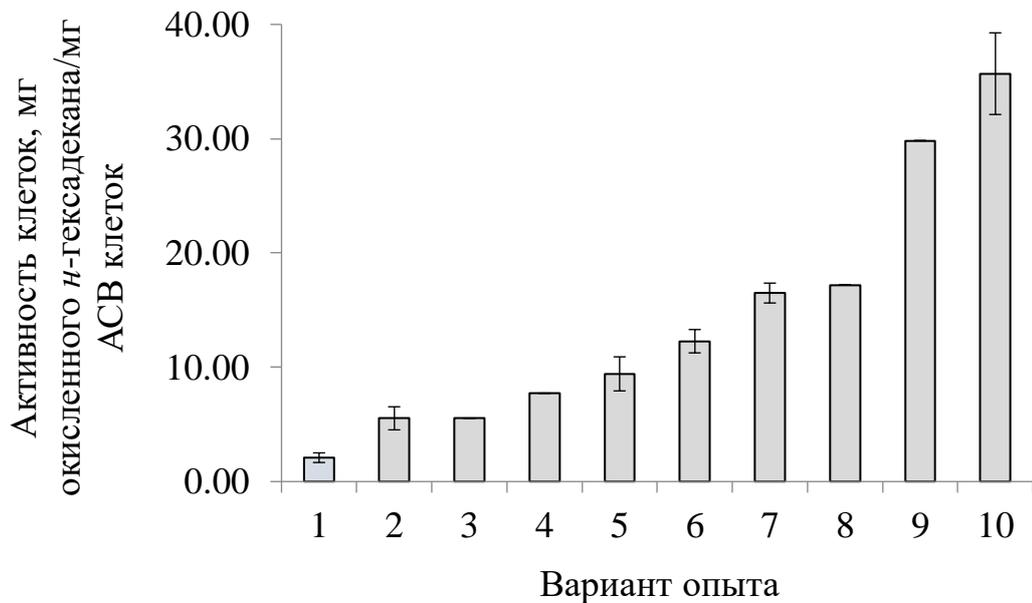


Рисунок 16 – Удельная активность планктонных и прикрепленных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 при окислении *n*-гексадекана. Варианты опыта: 1 – планктонные клетки, 2–10 – клетки, прикрепленные к подложкам, таким как коожевенные отходы, обработанные 10 вес. % силиконовой эмульсии (2), куриные перья, обработанные 10 вес. % силиконовой эмульсии (3), древесные опилки, обработанные 10 вес. % *n*-гексадекана (4), коожевенные 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).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что адгезия является обязательным условием биодegradации углеводов родококками. Адгезированные клетки осуществляют “коллективную” атаку на углеводородный субстрат, образуя “кооперативную клеточную систему” и обеспечивая согласованное функционирование многочисленных ассоциированных клеток. В результате контакта 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).

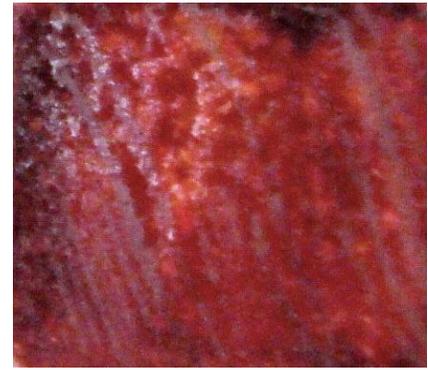
4.3. Биологические особенности прикрепленных клеток родококков

В результате сравнительных исследований прикрепленных и планктонных клеток родококков выявлены следующие характерные особенности прикрепленных *Rhodococcus*.

(1) Сохранение жизнеспособности и метаболической активности в течение длительного времени. По нашим данным, прикрепленные родококки полностью сохраняют жизнеспособность (рисунок 17) и в 2 раза более активно окисляют углеводороды (рисунок 18) после 8 мес хранения при температуре +4 °С без источника углерода и энергии и восстановления в среде с 3 об. % *n*-гексадекана. Сохранение жизнеспособности и активности – характерное свойство клеток, находящихся в фиксированном состоянии (Ефременко, 2018). Повышение углеводородокисляющей активности клеток после хранения может быть связано с усилением их метаболизма 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 из олиготрофной (голодной) среды, например, агаризованной минерально-солевой среды без добавления источника углерода и энергии, в двойной питательный бульон (Handbook of Nucleic Acid..., 2008).



До хранения
($9,4 \pm 0,6$) · 10^7 КОЕ/см²



После хранения (окрашивание ИНТ)
($8,9 \pm 0,9$) · 10^7 КОЕ/см²

Рисунок 17 – Сохранение жизнеспособности прикрепленных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после хранения в условиях голодания при +4 °С в течение 8 мес

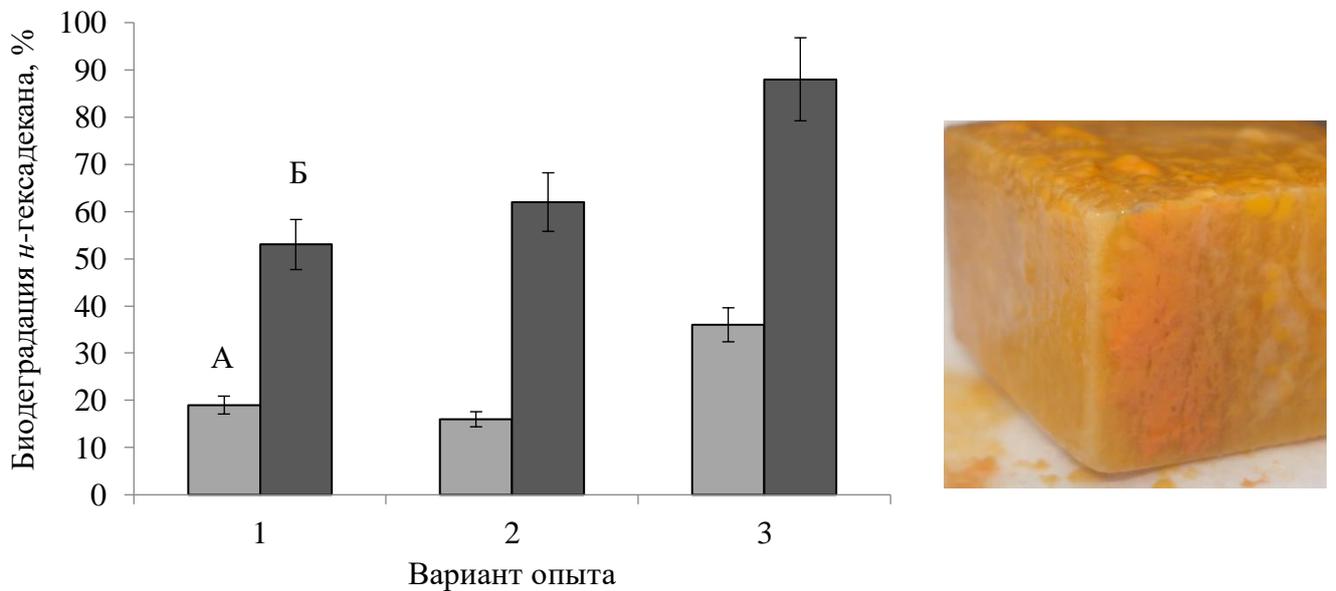


Рисунок 18 – Биодegradация *n*-гексадекана прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 до (А) и после (Б) хранения без источника углерода и энергии при температуре +4 °С в течение 8 мес. Варианты опыта: 1 – нерастущие клетки (среда предварительного культивирования LB), подложка – древесные опилки + 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов; 2 – нерастущие клетки (среда предварительного культивирования LB), подложка – древесные опилки + 20 вес. % олифы; 3 – клетки, растущие в среде с 3 об. % *n*-гексадекана, подложка – древесные опилки + 20 вес. % олифы. На фотографии показано образование биопленки родококками при росте в среде с *n*-гексадеканом после хранения

(2) Повышенная устойчивость к токсичным соединениям. Установлено, что МИКи солей тяжелых металлов в отношении прикрепленных клеток родококков составляют 10–20 мМ, при этом устойчивость клеток не зависит от входящего в состав соли тяжелого металла и определяется штаммовой специфичностью. МИКи солей тяжелых металлов в отношении планктонных клеток родококков составляют 5–10 мМ, и их значения зависят от штаммовой специфичности и элементного состава соли. Показано, что планктонные клетки родококков наиболее чувствительны к K_2CrO_4 , $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, а также $ZnSO_4$, после прикрепления к твердой подложке их устойчивость к данным солям увеличивается в 2 раза (рисунок 19).

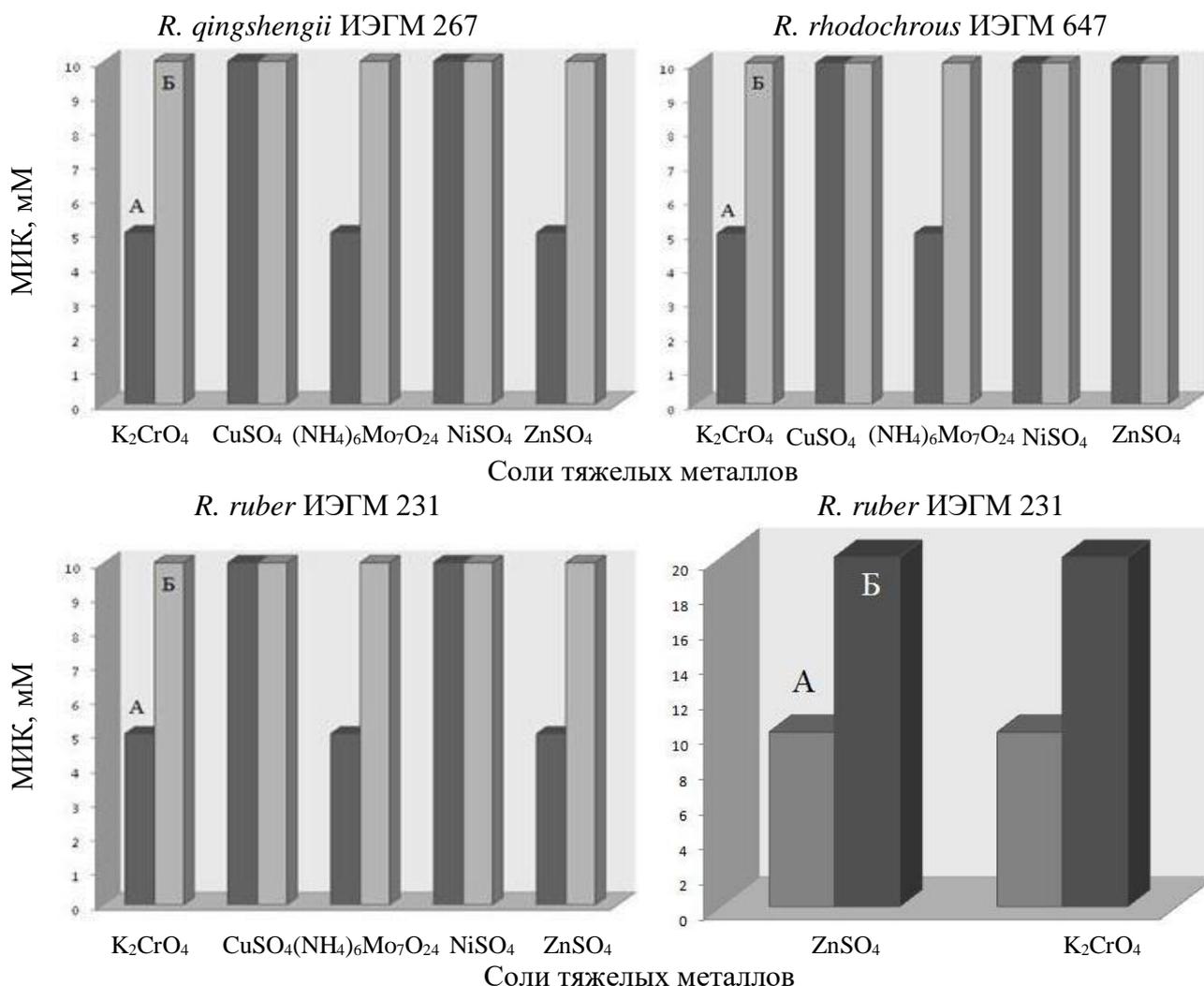


Рисунок 19 – Устойчивость планктонных (А) и прикрепленных (Б) родококков к солям тяжелых металлов

(3) Установлено, что прикрепленные родококки синтезируют на 42% больше гликолипидных биосурфактантов по сравнению с планктонными клетками (рисунок 20). Это является еще одним косвенным подтверждением участия *Rhodococcus*-биосурфактантов в адгезии родококков. Более подробно влияние этих соединений на адгезионный процесс рассмотрено в главе 6.

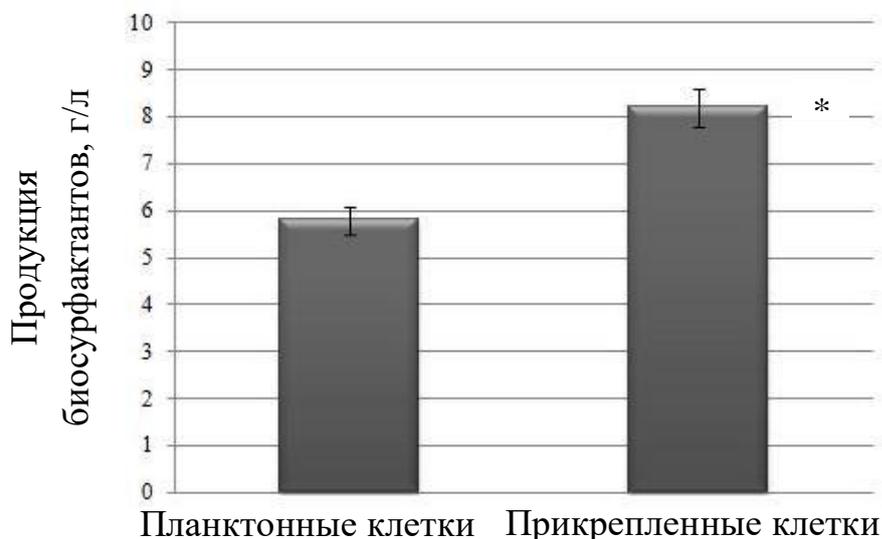


Рисунок 20 – **Производство гликолипидных биосурфактантов планктонными и прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231.** Клетки выращивали в присутствии 3 об. % *n*-гексадекана. В качестве подложки использовали древесные опилки. *Статистически достоверно от планктонных клеток при $p < 0,05$

Таким образом, адгезия является необходимым пусковым фактором биodeградации углеводов родококками. Биологическое значение адгезии состоит в формировании условий для окисления гидрофобного субстрата и защите клеток от токсического действия углеводов. При этом адгезия, по-видимому, является универсальной адаптивной реакцией родококков. Способность родококков к агрегации и усиленной адгезии к твердым поверхностям отмечена в присутствии различных токсичных и нетоксичных гидрофобных субстратов и токсичных соединений неуглеводородной природы, включая *n*-алканы C₈–C₁₆, толуол, органические спирты, диметилформамид, ароматические кислоты и их производные, терпеноиды, антибиотики (Соляникова и др., 2017; Bastiaens *et al.*,

2000; 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).

В таблице 5 приведен список штаммов с наиболее высокими показателями адгезии, перспективных для использования при разработке биокатализаторов на основе прикрепленных родококков.

Таблица 5 – Штаммы *Rhodococcus* с высокой адгезивной активностью

Штаммы	Условия адгезии	Подложка для прикрепления клеток	Адгезивная активность, %
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 271	Ростовые условия, среда LB	Полистирол	85
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231			68
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 32			58
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 328	Неростовые условия, клетки предварительно выращены в среде LB	Полистирол	68
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 238			63
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 325			57
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 28	Ростовые условия, 3 об. % <i>n</i> -гексадекана	Полистирол	97
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 487			95
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 235	Неростовые условия, клетки выращены в парах <i>n</i> -гексадекана	Полистирол	84
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 61	Ростовые условия, в атмосфере пропана	Полистирол	100
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 57			82
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 65			80
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 61	Неростовые условия, клетки выращены в атмосфере пропана	Полистирол	58
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 262	Неростовые условия, клетки предварительно выращены в среде LB	<i>n</i> -Алканы C ₂₂ –C ₃₁ , антрацен, фенантрен	42–100
Штаммы <i>R. ruber</i>		Бензпирен	15–24

Глава 5. БИОФИЗИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АДГЕЗИИ РОДОКОККОВ

5.1. Рельеф поверхности клеток и подложки – основные факторы, регулирующие адгезию родококков

Установлено, что культивирование родококков в присутствии углеводов приводит к статистически достоверному ($p < 0,05$) увеличению степени шероховатости клеток в 1,1–2,9 раза по сравнению со средой LB и минеральной средой с глюкозой (таблица 6). Изменение микрорельефа поверхности родококков задокументировано также в присутствии дротаверина гидрохлорида (Мухутдинова, 2014), дегидроабиетиновой кислоты (Cheremnykh *et al.*, 2018) и диклофенака натрия (Ivshina *et al.*, 2019), что является, очевидно, типичной реакцией *Rhodococcus* на присутствие в среде гидрофобных соединений. Агрегация родококков и их усиленная способность к адгезии к твердым поверхностям в средах с гидрофобными метаболитическими субстратами может быть связана с образованием шероховатых клеток.

Таблица 6 – Изменение микрорельефа клеточной поверхности родококков 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.

Экспериментально подтверждено, что адгезивная активность родококков строго коррелирует ($R_{\text{Пирсона}}=0,93$, $p=0,00$) со степенью шероховатости клеток (рисунок 21). 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 ≥ 793 нм. Тогда как родококки с низкой ($< 18\%$) адгезивной активностью обладают гладкой клеточной поверхностью, практически без клеточных выступов. Показатель $R_{\text{max}}-R_{\text{min}}$ для гладких клеток составляет ≤ 260 нм (рисунок 22).

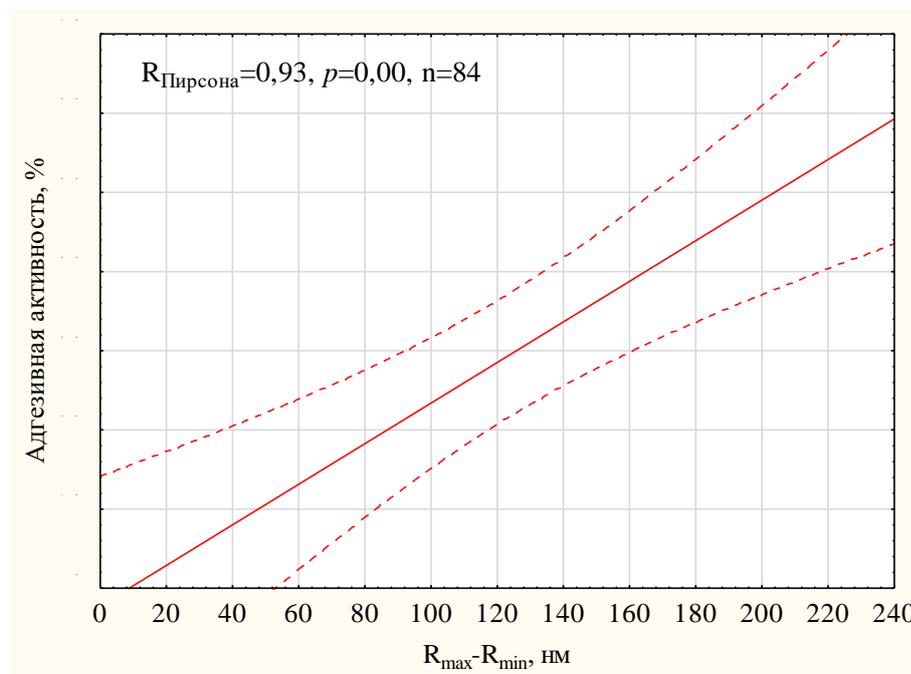


Рисунок 21 – Корреляция между степенью шероховатости клеток и адгезивной активностью *Rhodococcus* spp. в отношении полистирола. Приведена линия регрессии с границами доверительного интервала (уровень надежности 95%), n – количество исследованных штаммов

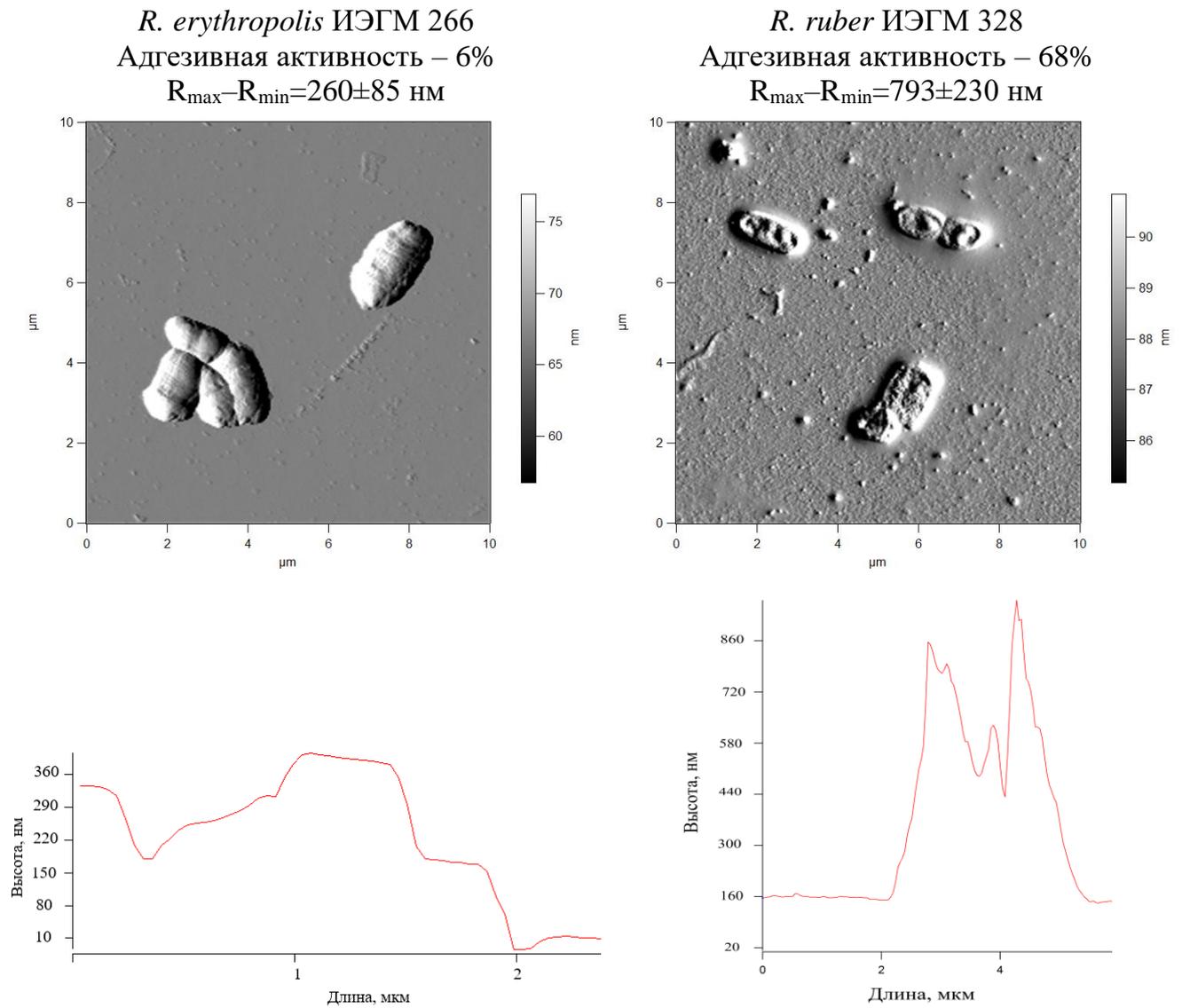


Рисунок 22 – АСМ-изображения и профили клеток *Rhodococcus* с низкими и высокими показателями шероховатости и адгезивной активности в отношении полистирола. На рисунке представлены данные для штаммов с самым низким и высоким показателями шероховатости ($R_{\max}-R_{\min}$) клеток

Способ закрепления клеток за счет характерных выростов можно отнести 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 цитoadгезивных пилей подтверждено только у представителей *R. equi* (Letek *et al.*, 2010). Специфические придаточные структуры могут обеспечивать взаимодействие родококков с твердыми питательными субстратами, колонизацию абиотических поверхностей, образование агрегатов для защиты клеток от токсикантов и коллективной атаки на труднодоступные субстраты, прочное сцепление клеток друг с другом в результате их конъюгации. Ранее при электронно-микроскопическом исследовании родококков на поверхности их клеток были обнаружены множественные шишковидные выросты диаметром порядка 40 нм, предполагалась их роль в сцеплении клеток друг с другом и закреплении на поверхности агаризованной среды или субстрате (Ившина и др., 1987).

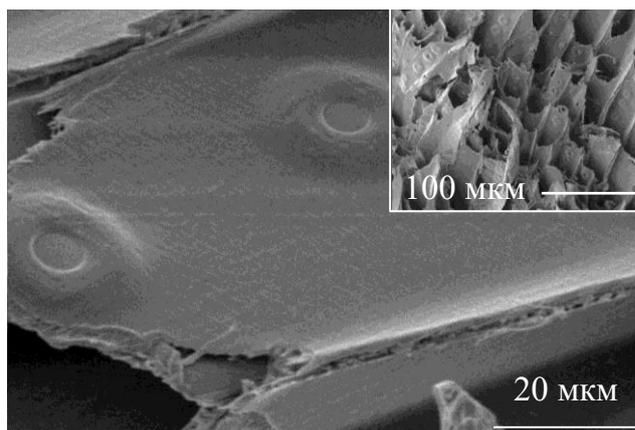
При изучении макрорельефа поверхности подложек подтверждено влияние этого параметра на процесс бактериальной адгезии. Показано, что к материалам с высокой (показатель сорбционной влажности $\geq 0,23$ г H₂O/г) степенью шероховатости, например, к древесным опилкам, нативным и обработанным 5–20 вес. % модифицирующих агентов, прикрепляется от 39 до 93% клеток родококков. К материалам с низкой (показатель сорбционной влажности $\leq 0,12$ г H₂O/г) степенью шероховатости, например, на основе отходов кукурузных початков и обработанных избыточным (1 : 1,5, 1 : 2,0) количеством олифы древесным опилкам, прикрепляется не более 19% клеток (таблица 7). Исключение составляют необработанные куриные перья. Для них показатель сорбционной влажности составляет 0,27–0,35 г H₂O/г, количество прикрепленных клеток – 0–16%. Кипячение куриных перьев для их дезинфекции приводит к увеличению удельной площади поверхности. Перья, обработанные кипячением, сорбируют на 0,08 г/г больше паров воды и к ним прикрепляются клетки, по сравнению с перьями, обработанными для дезинфекции этанолом (таблица 7).

На электронных микрофотографиях видно, что использование избыточных количеств поверхностно-модифицирующих агентов приводит к сильному сглаживанию рельефа поверхности подложек на основе древесных опилок.

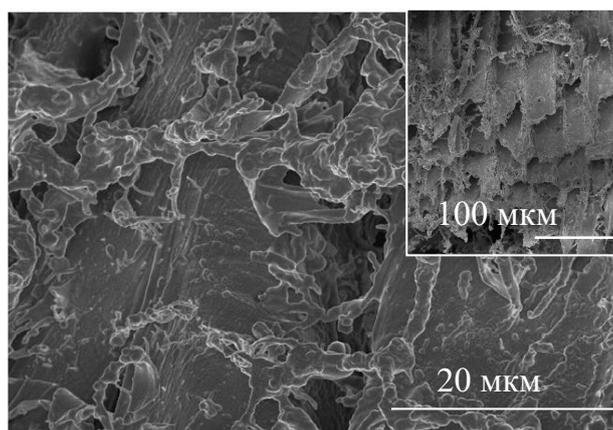
Гладкая поверхность характерна также для материалов на основе отходов кукурузных початков, чем можно объяснить низкую (19%, или 9,0 мг АСВ клеток/г) степень адгезии к ним родококков. Хотя подложки на основе отходов кукурузы имеют поры, их размер в 20–50 раз превышает размер клеток родококков, внутренняя поверхность пор гладкая (рисунок 23).

Таблица 7 – Количество прикрепленных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 в зависимости от сорбционной влажности подложки

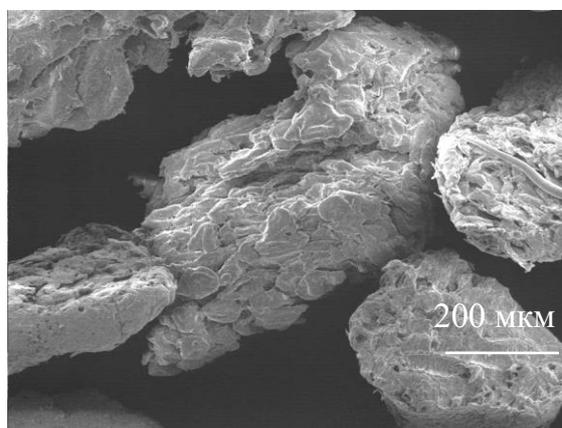
Материал подложки + модифицирующий агент	Кол-во прикрепленных клеток		Сорбционная влажность, %
	мг АСВ клеток/г	%	
<i>Древесные опилки</i>			
без обработки	20,8 ± 1,7	47	0,34 ± 0,02
+ 10 вес. % силиконовой эмульсии	44,5 ± 1,6	93	0,31 ± 0,02
+ 10 вес. % <i>n</i> -гексадекана	40,5 ± 1,6	86	0,31 ± 0,02
+ 5 вес. % <i>Rhodococcus</i> - биосурфактантов	29,0 ± 1,6	67	0,34 ± 0,03
+ 10 вес. % олифы	22,5 ± 1,8	49	0,33 ± 0,02
+ 20 вес. % олифы	19,8 ± 1,2	45	0,30 ± 0,02
+ олифа 1:1,5	4,5 ± 0,0	19	0,10 ± 0,02
+ олифа 1:2,0	Н.д.	Н.д.	0,12 ± 0,02
<i>Куриные перья (дезинфекция этанолом)</i>			
без обработки	Н.д.	Н.д.	0,27 ± 0,02
+ 10 вес. % олифы	115,5 ± 4,8	86	0,30 ± 0,02
+ 10 вес. % силиконовой эмульсии	86,0 ± 5,3	63	0,26 ± 0,02
<i>Куриные перья (дезинфекция кипячением)</i>			
без обработки	23,0 ± 1,3	16	0,35 ± 0,02
+ 10 вес. % олифы	69,0 ± 2,7	39	0,28 ± 0,02
+ 10 вес. % силиконовой эмульсии	56,0 ± 2,7	49	0,23 ± 0,02
<i>Отходы кукурузных початков</i>			
Loss Trol XTF	9,0 ± 1,6	19	0,12 ± 0,02



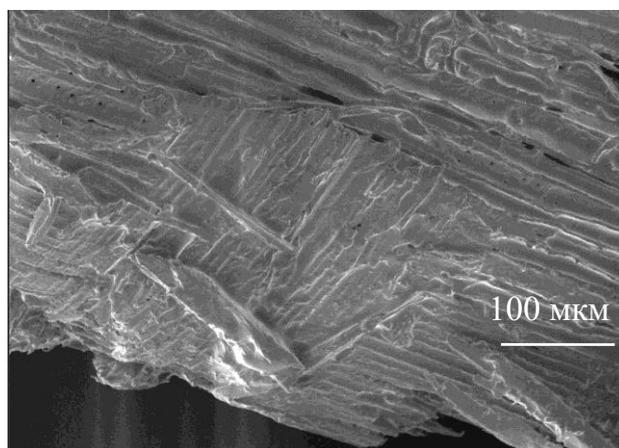
Древесные опилки



Древесные опилки + 10 вес. % силиконовой эмульсии



Отходы кукурузных початков



Древесные опилки + олифа 1 : 1,5

Рисунок 23 – Поверхность подложек для прикрепления клеток в электронном микроскопе, сорбционная влажность подложек и количество прикрепленных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231

Сглаживание рельефа поверхности приводит к уменьшению доступной площади для закрепления бактерий и 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. На ровной поверхности капиллярные эффекты не выражены, бактерии не способны длительное время находиться вблизи подложки, они легко отделяются от нее в результате колебаний водной

среды и броуновского движения. Данные литературы подтверждают, что на гладких, супергидрофобных (superhydrophobic), несмачиваемых поверхностях родококки плохо закрепляются. Это продемонстрировано в экспериментах по адгезии *Rhodococcus* sp. S3E2 и S3E3 к бумаге с тефлоновым и кремнийорганическим покрытием (Lehocký *et al.*, 2009).

На рисунке 24 показан 96-луночный полистироловый микропланшет с твердыми углеводородами. *n*-Алканы C₂₂–C₃₁ равномерно покрывают всю поверхность лунок культуральных микропланшетов, поверхность покрытия относительно гладкая по сравнению с покрытием ПАУ. ПАУ образуют неровное, шероховатое покрытие разной толщины. Это может объяснить различия в адгезивной активности родококков в отношении твердых углеводородов и тот факт, что показатели адгезии родококков к ПАУ в среднем в 4 раза превышают таковые к *n*-алканам, отдельные штаммы прикрепляются только к ПАУ. Так, штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 266, *R. qingshengii* ИЭГМ 267 и *R. opacus* ИЭГМ 717 практически не прикрепляются к *n*-алканам C₂₂–C₃₁, тогда как степень их адгезии к некоторым ПАУ достигает 21%, или $2,1 \cdot 10^6$ КОЕ/см² (см. рисунок 12).



Рисунок 24 – Полистироловый микропланшет с углеводородами. Углеводороды: 1 – бензпирен, 2 – фенантрен, 3 – нафталин, 4 – бензантрацен, 5 – *n*-октакозан, 6 – *n*-докозан, 7 – *n*-нонакозан, 8 – *n*-гексакозан, 9 – *n*-гентриаконтан, 10 – антрацен, 11,12 – контроль (без углеводородов)

Использование небольших количеств модифицирующих агентов не приводит к изменению макрорельефа поверхности подложек (рисунок 23); об этом же свидетельствует отсутствие заметных различий в показателях сорбционной влажности модифицированных и немодифицированных подложек (таблица 7). С помощью интерференционной микроскопии выявлено влияние поверхностно-модифицирующих агентов на микрорельеф поверхности подложки и распределение клеток. Установлено, что на поверхности немодифицированных подложек и подложек, обработанных 10–20 вес. % олифы или 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов, родококки образуют практически монослой, состоящий из равномерно расположенных индивидуальных клеток, расстояние между клетками составляет 0,5–2,0 мкм (рисунок 25). На подложках, обработанных 10 вес. % *n*-гексадекана, или силиконовой эмульсии, родококки располагаются в виде кластеров, состоящих из 60–80 клеток с расстоянием между клетками внутри кластеров от 0,2 до 1,0 мкм и между кластерами от 0,5 до 5,0 мкм. На референсной поверхности предметных стекол клетки располагаются достаточно равномерно с формированием небольших скоплений из 3–10 клеток (рисунок 25).

Разница в расположении родококков связана с особенностями покрытия подложек поверхностно-модифицирующими агентами (рисунок 26). Установлено, что немодифицированные древесные материалы (опилки и бруски) обладают высокой степенью шероховатости, в 39 раз превышающей таковую стекла. На их поверхности обнаруживается множество пор, ямок, выемок и углублений шириной 0,1–0,5 мкм и глубиной 0,6–2,3 мкм. Модифицирующие агенты заполняют эти поры с образованием пленок толщиной 0,4–1,4 мкм (высота столбиков и пиков на профилях на рисунке 26), микрорельеф выравнивается. *n*-Гексадекан и силиконовая эмульсия, а также смесь парафинов, покрывают материалы из хвойной древесины в виде капель (см. рисунок 23), оставляя пустые пространства, обнаруживаемые в интерференционном микроскопе на профилях, как разрывы шириной 1,0–1,5 мкм. Капли поверхностно-модифицирующих агентов, по-видимому, обладают большим сродством к клеткам родококкам по

сравнению с немодифицированной поверхностью древесины, на них происходит адгезия и вокруг них образуются плотные клеточные скопления. Олифа приводит к образованию менее гетерогенных пленок, разрывы в пленке составляют $<0,5$ мкм. *Rhodococcus*-биосурфактанты образуют ровную пленку без разрывов, уровень шероховатости подложек после обработки биосурфактантами сильно снижается и приближается к таковому стекла (рисунок 26). Это приводит к тому, что поверхность подложек, покрытых олифой или *Rhodococcus*-биосурфактантами, становится гомогенной с равномерным распределением сайтов связывания клеток.

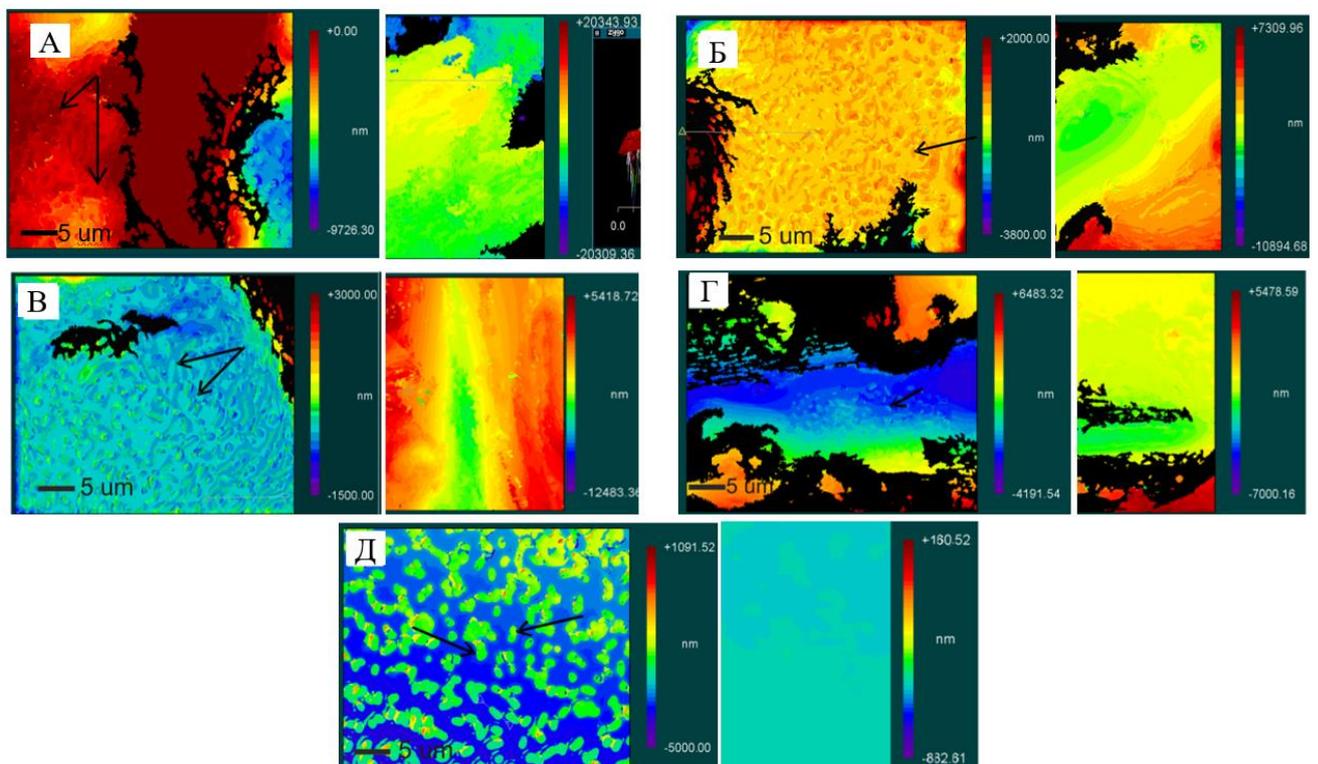


Рисунок 25 – Изображения подложек с прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 в интерференционном микроскопе. Материал подложки + модифицирующий агент: А – древесные опилки без модификации, Б – древесные опилки + 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов, В – древесные опилки + 10 вес. % олифы, Г – древесные опилки + 10 вес. % *n*-гексадекана, Д – предметное стекло. Для каждого варианта опыта слева приведены изображения подложки с прикрепленными клетками (показаны стрелками), справа – изображения подложки без клеток. Цветные шкалы показывают перепад высот на поверхности образца, нм. Черные области – неотсканированные участки образца

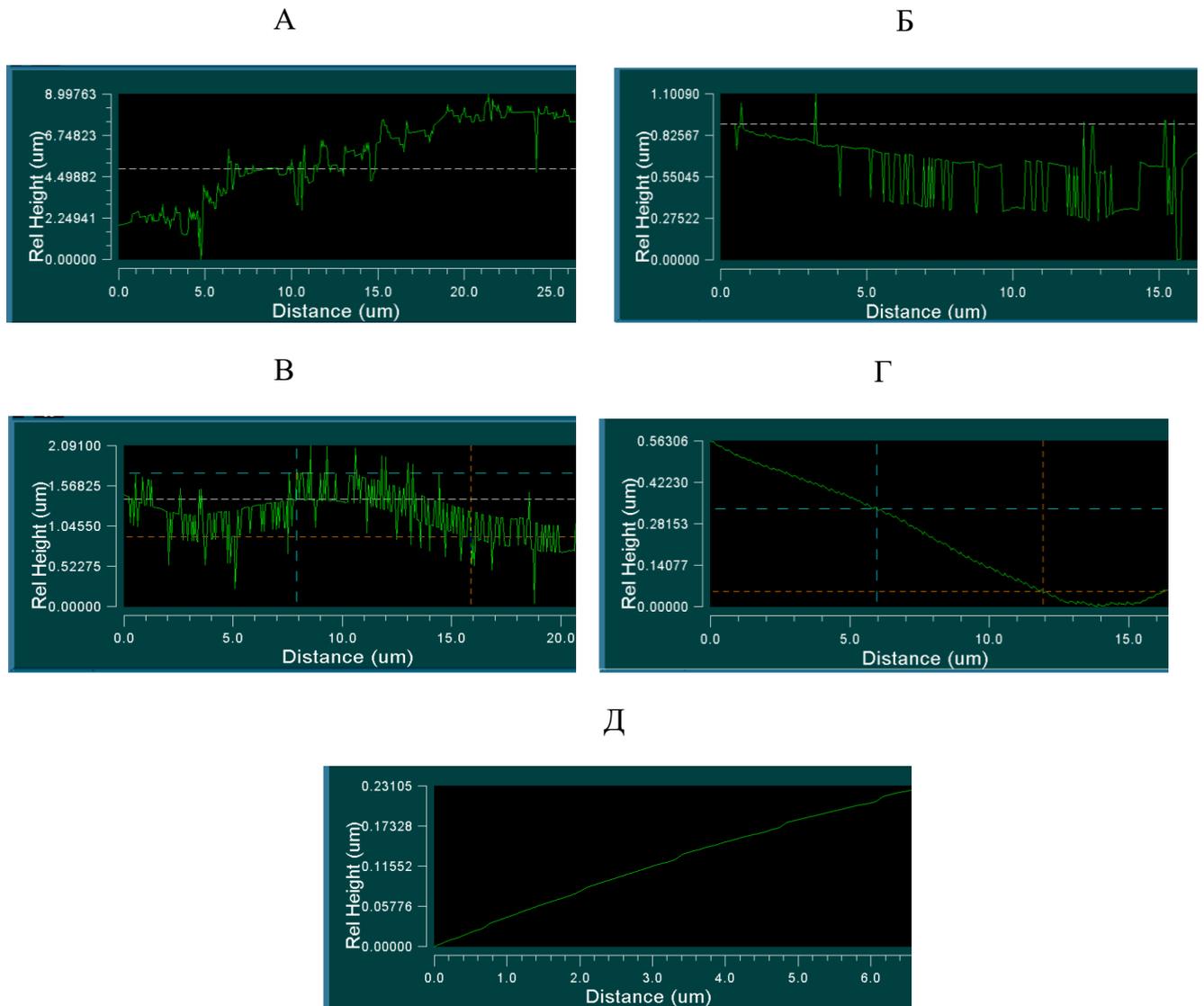


Рисунок 26 – Профили поверхности подложек, полученные с помощью интерференционной микроскопии. Материал подложки + модифицирующий агент: А – древесные опилки без модификации, Б – древесные опилки + 10 вес. % *n*-гексадекана, В – древесные опилки + 10 вес. % олифы, Г – древесные опилки + 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов, Д – предметное стекло.

5.2. Специфические придаточные структуры клеточной стенки родококков – место локализации адгезинов

С целью определения локализации возможных адгезинов в специфических придаточных структурах родококков детально изучали наномеханические свойства этих участков клеточной поверхности. Для этого были получены

силовые карты единичных клеток, представляющие собой пиксельные графические изображения, где каждый пиксель соответствовал отдельному участку клеточной поверхности. Пиксель представлял собой 1/1024 скана. Учитывая, что размер скана с одной клеткой примерно 2,25 мкм² (1,5×1,5 мкм) из расчета усредненного размера клетки *Rhodococcus* spp. 0,5×1,5 мкм (нерастущие клетки, среда культивирования LB), то минимальный размер пикселя приблизительно составлял 45×45 нм (0,002 мкм²). Для каждого пикселя измеряли F_a , E и R_a . При получении силовых карт измерение для каждого пикселя проводилось однократно, контакт зонда кантилевера с образцом происходил в центре пикселя. Таким образом, при картировании расстояния между отдельными значениями F_a , E и R_a составляли ≥ 45 нм. Значения полученных параметров затем анализировали, определяли характер распределения участков с разными значениями этих параметров и их взаимосвязь друг с другом.

В результате детального анализа силовых карт 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 27). 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 (рисунок 28). Полученные данные свидетельствуют об особенностях химического состава клеточных выступов и приуроченности к ним возможных адгезинов. Подобная же гетерогенность клеточной поверхности по показателям F_a и E обнаружена у родококков, *R. erythropolis*, в частности, L.S. Dorobantu с соавт. (2008, 2009). Высокая упругость выявленных придаточных структур может быть объяснена повышенным содержанием и высокой плотностью содержащегося в них материала клеточной стенки. Это показано M. Salerno с соавт. (2010) на примере заполнения пор агарозных пластин полилизинном – в местах нанесения полипептида обнаруживалось уплотнение

полисахаридной основы, что сопровождалось увеличением модуля упругости в 1,5–2,0 раза.

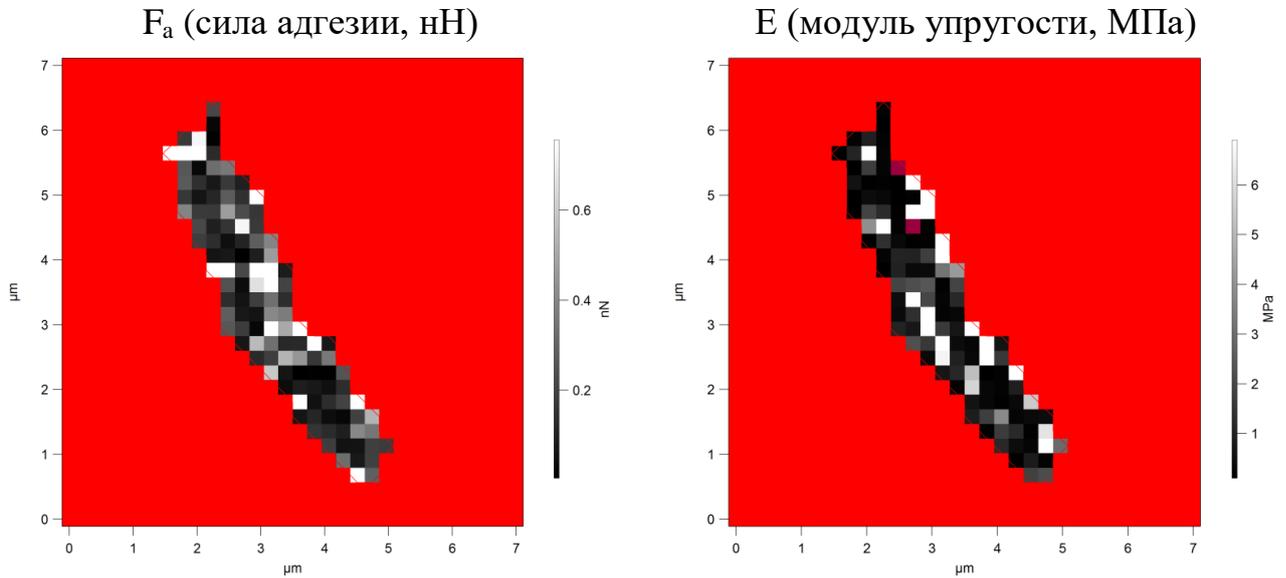


Рисунок 27 – Карты распределения сил адгезии зонда АСМ и модуля упругости на поверхности единичной клетки *R. oracis* ИЭГМ 57. Участки с $F_a > 0,6$ нН и $E > 6,0$ МПа соответствуют специфическим придаточным структурам клеточной стенки.

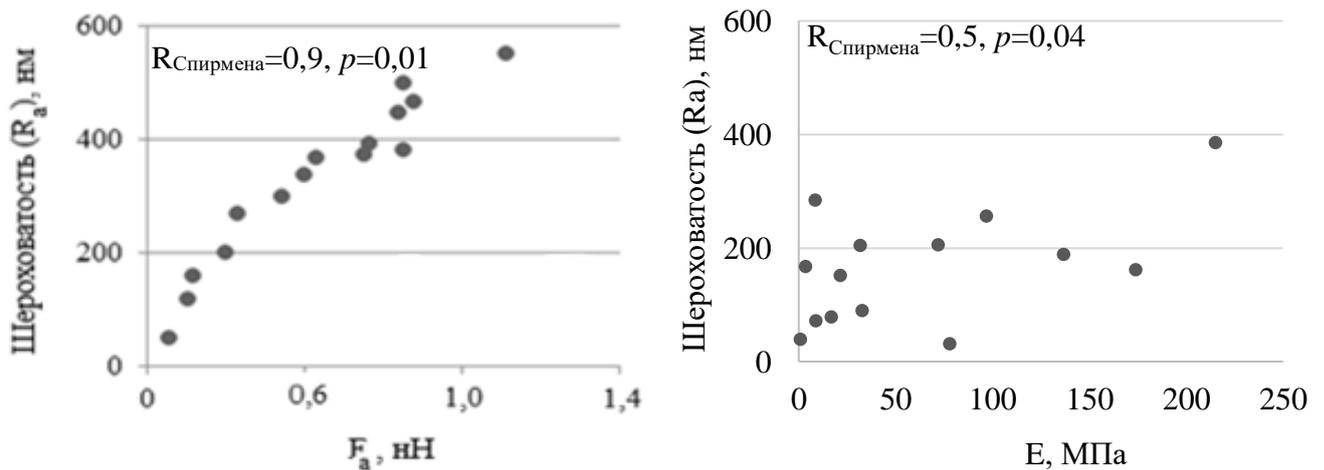


Рисунок 28 – Корреляция между силой адгезии (слева), модулем упругости (справа) и степенью шероховатости отдельных участков поверхности клеток *R. oracis* ИЭГМ 262.

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.

Подобные придаточные структуры в виде шишковидных выростов диаметром около 40 нм были выявлены ранее при электронно-микроскопических исследованиях ультраструктурных особенностей клеток родококков. В этих исследованиях было показано, что их количество больше на поверхности клеток, выращенных в присутствии углеводородов (пропана и *n*-бутана), по сравнению с клетками, выращенными в мясopептонном бульоне, однако функции этих выростов детально не исследовались (Ившина и др., 1982, 1987; Глазачева и др., 1990).

Адгезивные свойства родококков за счет специфических придаточных структур могут быть обусловлены не только аккумуляцией в них липидов, но и снижением свободной поверхностной энергии γ клетки. Поверхностные выросты обладают небольшой, по сравнению с целой клеткой, площадью, а γ зависит от площади поверхности. Чем меньше площадь контакта клетки, тем меньше значение γ , тем легче придаточным структурам (пилям, жгутикам, пилеподобным выростам, неспециализированным клеточным выступам и т.д.) преодолевать энергетический барьер и электростатическое отталкивание при сближении с поверхностью подложки (Hori, Matsumoto, 2010; Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018). Об “термодинамическом” механизме участия цитoadгезивных поверхностных структур родококков можно судить по следующими фактам.

1) Не у всех родококков выявлена приуроченность адгезивных участков к придаточным структурам. Например, у клеток *R. qingshengii* ИЭГМ 267, выращенных в парах *n*-гексадекана, клеточные выросты не отличаются по значениям силы адгезии и модуля упругости от основной части клеточной стенки. При этом адгезивная активность клеток данного штамма в отношении полистирола статистически достоверно не отличается от таковой штаммов *R. erythropolis* ИЭГМ 212 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 646 (таблица 8). Придаточные структуры клеток ИЭГМ 212 и ИЭГМ 646 обладают повышенной силой адгезии и модулем упругости.

2) Не выявлена ($R_{\text{Спирмена}}=0,1$, $p>0,05$) зависимость между адгезивной активностью и медианами силы адгезии и модуля упругости клеток (таблица 8). Так, клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 266 обладают низкой (6%) адгезивной активностью в отношении полистирола, но высокими медианными значениями силы адгезии ($F_a=4,352$ нН) и модуля упругости ($E=7,408$ МПа). Казалось бы, это “высокоадгезивные” клетки (таблица 8). Как отмечалось ранее, клетки данного штамма характеризуются низкой степенью шероховатости, на их поверхности не обнаруживаются характерные клеточные выросты (см. рисунок 22). Клеточные выступы усиливают адгезивные свойства родококков; чем их больше на клеточной поверхности, тем выше адгезивная активность клеток. При этом даже у сильно шероховатых клеток, обладающих большим количеством придаточных структур с повышенной силой адгезии к зонду АСМ, средние значения F_a и E могут быть невысокие, ниже, чем у “гладких” клеток (таблица 8). Доля участков, занятых выступами, на клеточной поверхности составляет до 50% (ориентировочно 20–50%), и значения F_a и E этих участков могут не вносить значительный вклад в средние показатели данных величин. Однако именно клеточные выросты обеспечивают сближение клетки и подложки для дальнейшего их взаимодействия за счет действующего на коротком расстоянии межмолекулярного притяжения (диполь-дипольные взаимодействия, силы ван дер Ваальса), остальная часть клеточной стенки меньше влияет на этот процесс, даже

при условии расположения в ней компонентов с высокой степенью адгезивности по данным АСМ.

Таблица 8 – Адгезивная активность родококков в отношении полистирола в зависимости от средних показателей силы адгезии (F_a) и модуля упругости (E) клеток

Штамм	Адгезивная активность ¹ , %	F_a^2 , нН	E ² , МПа
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 266	6 ± 0	4,352	7,408
<i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 267 ³	18 ± 5	0,176	0,246
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 646	19 ± 2	0,375	0,218
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 212	22 ± 3	7,096	1,411
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 241	28 ± 3	1,674	8,061
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 57 ⁴	44 ± 5	1,010	0,850

Примечание. *Средние значения ± стандартные отклонения. **Медианы значений. Представлены данные для нерастущих клеток, предварительно выращенных в среде LB, за исключением ³(предварительное культивирование в парах *n*-гексадекана) и ⁴(предварительное культивирование в атмосфере пропан : воздух 1 : 5). $R_{\text{Спирмена}}$ между адгезивной активностью и $F_a=0,1$ ($p>0,05$), между адгезивной активностью и $E=0,1$ ($p>0,05$).

5.3. Физико-химические свойства клеток и подложек и эффективность адгезии родококков

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 9).

Таблица 9 – 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

Строгой корреляции между адгезивными свойствами родококков в отношении твердых поверхностей и гидрофобными характеристиками клеток не выявлено. По данным метода MATS, адгезивная активность родококков в отношении полистирола не зависит ($R_{\text{Спирмена}} \leq 0,46$, $p \geq 0,05$) от степени гидрофобности и заряда клеток (таблица 10). Коэффициенты корреляции между адгезивной активностью родококков в отношении твердых углеводородов и степенью гидрофобности клеток статистически не достоверны ($p \geq 0,05$) для большинства исследованных углеводородных субстратов. В случае их достоверности, величина корреляции ($R_{\text{Спирмена}}$) составляет 0,54–0,64. При этом в зависимости от использованного метода определения степени гидрофобности клеток получаются разные значения $R_{\text{Спирмена}}$ и разный уровень их достоверности (таблица 11).

Таблица 10 – Коэффициенты корреляции между адгезивной активностью родококков к полистиролу и MATS-субстратам

MATS-субстрат	$R_{\text{Спирмена}}$	p
<i>n</i> -Гексан	0,27	0,37
<i>n</i> -Декан	0,28	0,34
<i>n</i> -Гексадекан	0,41	0,16
Диэтиловый эфир	0,33	0,43
Хлороформ	0,46	0,11
Этилацетат	0,34	0,30

Таблица 11 – Коэффициенты корреляции между адгезивной активностью родококков в отношении твердых углеводов и степенью гидрофобности клеток

Твердый углеводород	Степень гидрофобности клеток			
	По данным метода MATH		По данным метода SAT	
	$R_{\text{Спирмена}}$	p	$R_{\text{Спирмена}}$	p
<i>n</i> -Докозан	-0,10	$\geq 0,05$	0,38	$\geq 0,05$
<i>n</i> -Гексакозан	0,36	$\geq 0,05$	-0,07	$\geq 0,05$
<i>n</i> -Октакозан	-0,24	$\geq 0,05$	0,49	$\geq 0,05$
<i>n</i> -Нонакозан	-0,44	$\geq 0,05$	0,59	<0,05
<i>n</i> -Гентриаконтан	-0,10	$\geq 0,05$	0,59	<0,05
Нафталин	-0,30	$\geq 0,05$	0,55	<0,05
Антрацен	0,54	<0,05	-0,25	$\geq 0,05$
Фенантрен	0,11	$\geq 0,05$	0,34	$\geq 0,05$
Бензпирен	0,62	<0,05	-0,35	$\geq 0,05$
Бензантрацен	-0,38	$\geq 0,05$	0,64	<0,05

Примечание. Красным выделены статистически достоверные коэффициенты; количество исследованных штаммов $n=12$.

В таблице 12 приведены показатели адгезии двух штаммов родококков, отличающихся друг от друга по гидрофобным характеристикам клеток, к твердым углеводам. Клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 212 – гидрофильные (степень гидрофобности по данным MATH-теста 19%, по данным теста SAT – 1,4 М, ζ -потенциал – -34 мВ), при этом они в 2–6 раз лучше прикрепляются к твердым углеводам, чем гидрофобные клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 64 (степень гидрофобности по данным MATH-теста 97%, по данным теста SAT – 0,2 М, ζ -потенциал – -29 мВ). Значения дзета-потенциала соответствуют разнице в гидрофобных свойствах: у “гидрофобных” клеток штамма ИЭГМ 64 этот показатель на 5 мВ больше, чем у “гидрофильных” клеток штамма ИЭГМ 212. Это может быть связано с присутствием меньшего количества заряженных (полярных) молекул на клеточной поверхности и преобладанием неполярных (гидрофобных) соединений. Отрицательные значения дзета-потенциала являются следствием присутствия в составе клеточной стенки родококков отрицательно

заряженных молекул липидов, липогликанов, тейхоевых и липотейхоевых кислот, ЭПС, гликолипидных сурфактантов (Sutcliffe *et al.*, 2010; Pen *et al.*, 2015).

Таблица 12 – Адгезивная активность родококков в отношении твердых углеводов 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, $\times 10^6$ КОЕ/см ²		2,8 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0
Адгезия к <i>n</i> -октакозану, $\times 10^6$ КОЕ/см ²		2,3 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0
Адгезия к <i>n</i> -нонакозану, $\times 10^6$ КОЕ/см ²		2,2 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0
Степень гидрофобности клеток (по данным МАТН-теста), %		19 \pm 3	97 \pm 5
Степень гидрофобности клеток (по данным теста SAT), М (NH ₄) ₂ SO ₄		1,4	0,2
ζ -потенциал клеток, мВ		-34 \pm 1	-29 \pm 1

Строгой корреляции между физико-химическими свойствами подложек и адгезией к ним родококков также не обнаружено. Так, использование поверхностно-модифицирующих агентов приводит к увеличению степени гидрофобности подложек. Об этом свидетельствует уменьшение в 2–9 раз водопоглощающей способности подложек после модификации, а также адсорбция на них от 22 до 98% *n*-гексадекана в отличие от немодифицированных подложек, которые практически не сорбируют углеводороды. Исключение составляют немодифицированные куриные перья, сорбирующие 48–100% *n*-гексадекана. Данные материалы могут быть рекомендованы, как адсорбенты нефти. Однако количество прикрепленных родококков не зависит от водопоглощающей способности подложек ($R_{\text{Пирсона}}=0,7$, $p=0,12$) и адсорбции на них *n*-гексадекана ($R_{\text{Пирсона}}=0,16$, $p=0,41$) (рисунок 29). После обработки подложек поверхностно-модифицирующими агентами меняется также их расположение в двухфазной системе *n*-гексадекан/вода. Практически все обработанные умеренными количествами модифицирующих агентов подложки располагаются в межфазном

пространстве. Однако количество прикрепленных к ним клеток колеблется в широком диапазоне от 39 до 93%, или 19,8–115,5 мг АСВ клеток/г, независимо от расположения подложки в двухфазной системе (см. таблицу 7). Исключение составляют плотные и “тяжелые” отходы кожевенного производства, которые после модификации остаются в водной фазе.

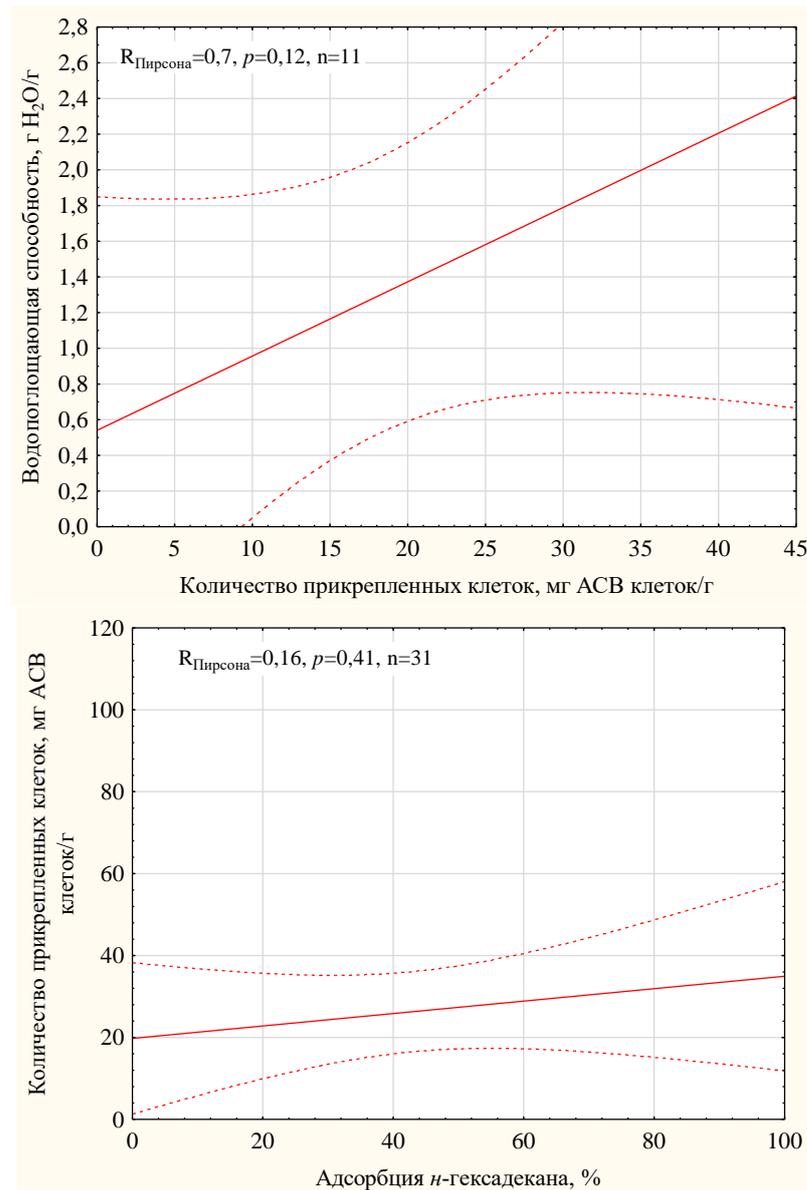
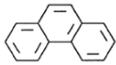
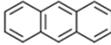
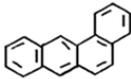
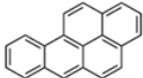


Рисунок 29 – Линии регрессии между количеством прикрепленных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 и водопоглощающей способностью подложек и адсорбцией на них *n*-гексадекана. Пунктирными линиями обозначены границы доверительных интервалов ($p < 0,05$), n – количество исследованных подложек, включая модифицированные и немодифицированные подложки

В таблице 13 представлены данные о физико-химических свойствах твердых углеводов; в таблице 14 представлены значения коэффициентов корреляции между параметрами твердых углеводов и количеством прикрепленных к ним клеток. Исследованные характеристики углеводородных субстратов включали их растворимость в воде, коэффициент гидрофобности $\log P_{O/W}$, молекулярную массу, длину цепи для алканов и число конденсированных колец для ПАУ. Ключевыми показателями считали растворимость в воде и показатель $\log P_{O/W}$. Эти свойства тесно взаимосвязаны друг с другом и определяют доступность углеводов для клеток. Чем выше растворимость и меньше коэффициент $\log P_{O/W}$, тем менее гидрофобным считается соединение, тем более подвижны его молекулы, выше скорость диффузии, тем легче молекулы достигают клеточной стенки и тем выше скорость биodeградации данного вещества (Hill, Ghoshal, 2002). Достаточно высокой (236–269 мкмоль/л) растворимостью и низкой ($\log P_{O/W}=3,5$) степенью гидрофобности характеризуется нафталин; незначительной (6–10 мкмоль/л) растворимостью обладает фенантрен; *n*-алканы C_{22} – C_{31} и остальные ПАУ практически ($\leq 0,5$ мкмоль/л) нерастворимы в воде и обладают повышенными (до 10,3) показателями гидрофобности (таблица 13). Ожидалось, что к *n*-алканам и высокомолекулярным ПАУ будут получены более высокие показатели адгезии родококков. Однако, как видно из таблицы 14, адгезия родококков не зависит от физико-химических свойств углеводов ($R_{\text{Пирсона}} \leq 0,6, p \geq 0,05$).

Таблица 13 – Физико-химические свойства углеводородов

Углеводород	Структурная формула	Растворимость в воде, мкмоль/л	$\log P_{O/W}$
Нафталин		236–269	3,5
Фенантрен		6–10	4,3
Антрацен		0,2–0,5	4,3
Бензантрацен		0,041–0,061	5,5
Бензпирен		0,005–0,019	6,0
<i>n</i> -Докозан	$H_3C-(CH_2)_{20}-CH_3$	0,000001–0,000003	9,7
<i>n</i> -Гексакозан	$H_3C-(CH_2)_{24}-CH_3$	0,00000002–0,000001	10,0
<i>n</i> -Октакозан	$H_3C-(CH_2)_{26}-CH_3$	0,000000002–0,000001	10,1
<i>n</i> -Нонакозан	$H_3C-(CH_2)_{27}-CH_3$	0,0000000007–0,000001	10,2
<i>n</i> -Гентриаконтан	$H_3C-(CH_2)_{29}-CH_3$	0,00000000007–0,0000009	10,3

Примечание. Растворимость углеводородов в воде и $\log P_{O/W}$ определяли на основании экспериментальных данных, опубликованных в статье R.S. Pearlman с соавт. (1984), и теоретических расчетов, проведенных на сайте www.chemspider.com и <http://www.molinspiration.com> (Calculation of molecular properties and prediction of bioactivity → Draw molecule below → Calculate properties).

Таблица 14 – Коэффициенты корреляции между физико-химическими свойствами твердых углеводородов и степенью адгезии к ним родококков

Свойство углеводорода	$R_{\text{Пирсона}}$	p
Растворимость в воде	$\leq 0,6$	$\geq 0,08$
$\log P_{O/W}$	$\leq 0,2$	$\geq 0,10$
Молекулярная масса	$\leq 0,2$	$\geq 0,10$
Длина цепи (для <i>n</i> -алканов)	$\leq 0,6$	$\geq 0,06$
Число колец (для ПАУ)	$\leq 0,2$	$\geq 0,08$

Следует отметить, что влияние степени гидрофобности подложек на процесс адгезии родококков проявляется, по-видимому, в отношении отходов

кожевенного производства и куриных перьев. Эти материалы обладают низкими (0–33% прикрепленных клеток) показателями адсорбционной емкости в отношении родококков. После обработки 10 вес. % олифы или силиконовой эмульсии их адсорбционная емкость увеличивается до 39–93%. Модифицированные и немодифицированные подложки на основе кожевенных отходов и куриных перьев незначительно отличаются друг от друга по величине сорбционной влажности, что свидетельствует о сходном уровне шероховатости их поверхностей. Однако использованные в работе методы оценки гидрофобных характеристик подложек не позволяют сделать однозначный вывод об увеличении степени гидрофобности подложек на основе кожевенных отходов и куриных перьев. Кожевенные отходы после обработки остаются в водной фазе, куриные перья обладают исходно высокой степенью гидрофобности.

Макрорельеф подложки существенно влияет на количество клеток у поверхности подложки и этап обратимой адгезии (“заякоривание”). Чем больше неровностей на подложке, за которые может “зацепиться” клетка и между которыми ограничена ее подвижность, тем больше клеток будет задерживаться возле нее, в этом случае рельеф поверхности будет определяющим фактором адгезии. Гидрофобные взаимодействия, связанные с межмолекулярным притяжением между двумя поверхностями, обеспечивают удержание клеток на подложке после их сближения. В случае сходных топографических свойств эффективность адгезии будет зависеть от силы удержания клеток за счет межмолекулярного притяжения и отсутствия электростатического отталкивания. Наконец, стереоспецифические взаимодействия ответственны за прочное, необратимое, многоточечное связывание клеток с подложкой (Серегина и др., 2008; Hori, Matsumoto, 2010; Carniello *et al.*, 2018).

Влияние рельефа поверхности подложки на адгезию родококков настолько значимо, что не позволяет зафиксировать влияние многих других параметров на этот процесс. При агрегации родококков, когда клетки не контактируют с подложкой, имеющей множество “ловушек” для них в виде неровностей на поверхности, существенным фактором оказываются гидрофобные

взаимодействия. Еще больше влияние степени гидрофобности и заряда клеточной поверхности проявляется при адгезии родококков к гидрофобным жидкостям (Рубцова, 2011). В этом случае контакт клеток с жидкостью происходит за счет всей клеточной поверхности, в том числе по всей длине клеточных выростов.

5.4. Выраженный экзотермический эффект адгезии родококков

Характерной особенностью адгезии *Rhodococcus* spp. является выраженный экзотермический эффект данного процесса. В экспериментах по инфракрасной термографии выявлено повышение на 0,60–3,14 °С температуры на поверхности подложек после прикрепления к ним родококков (рисунок 30). Рассчитанные термодинамические параметры в 2–1000 раза превышают таковые при адгезии других микроорганизмов и составляют следующие значения: тепловая мощность $0,3 \cdot 10^{-3}$ – $2,7 \cdot 10^{-3}$ Вт, работа $4,0 \cdot 10^{-3}$ – $8,2 \cdot 10^{-3}$ Дж, суммарный тепловой эффект 0,20–0,53 Дж (таблица 15). Например, при адгезии условно-патогенных бактерий *Streptococcus sanguinis* к стеклу выделяется 0,0748–0,1070 Дж (в объеме 2,5 мл при исходной концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/мл в течение 1 ч) (Hauser-Gerspach *et al.*, 2008), что в 5–7 раз меньше суммарной продукции тепла при адгезии родококков. Тепловая мощность адгезии *S. sanguinis* составляет $1 \cdot 10^{-5}$ – $3 \cdot 10^{-5}$ Вт после 45 мин от начала адгезии, что в 10–30 раз меньше таковой родококков (Hauser-Gerspach *et al.*, 2008).

Пониженные показатели Q и $Q_{\text{общ}}$ при адгезии *S. sanguinis* могут быть обусловлены двумя причинами. Первая – разное сродство *Rhodococcus* spp. и *S. sanguinis* к твердой поверхности. Вторая причина – отложенное время для начала измерений. Термодинамические показатели при адгезии *S. sanguinis* определяли с помощью метода изотермической микрокалориметрии. Это термометрический метод, заключающийся в том, что образец (клетки и подложка) помещается внутрь ампул (внутренняя поверхность ампул может выполнять роль подложки), которые находятся внутри микрокалориметра в изотермических условиях. Потери тепла при таком методе минимальны, и учитывается тепло, выделяемое всем объемом образца, не только с его поверхности. Однако прибор

требует длительного, в течение 45 мин, выравнивая температур перед началом измерений. В этот период клетки контактируют с подложкой, и метод, по существу, не позволяет детектировать освобождение тепловой энергии на начальных (самых интенсивных) этапах адгезии (Hauser-Gerspach *et al.*, 2008).

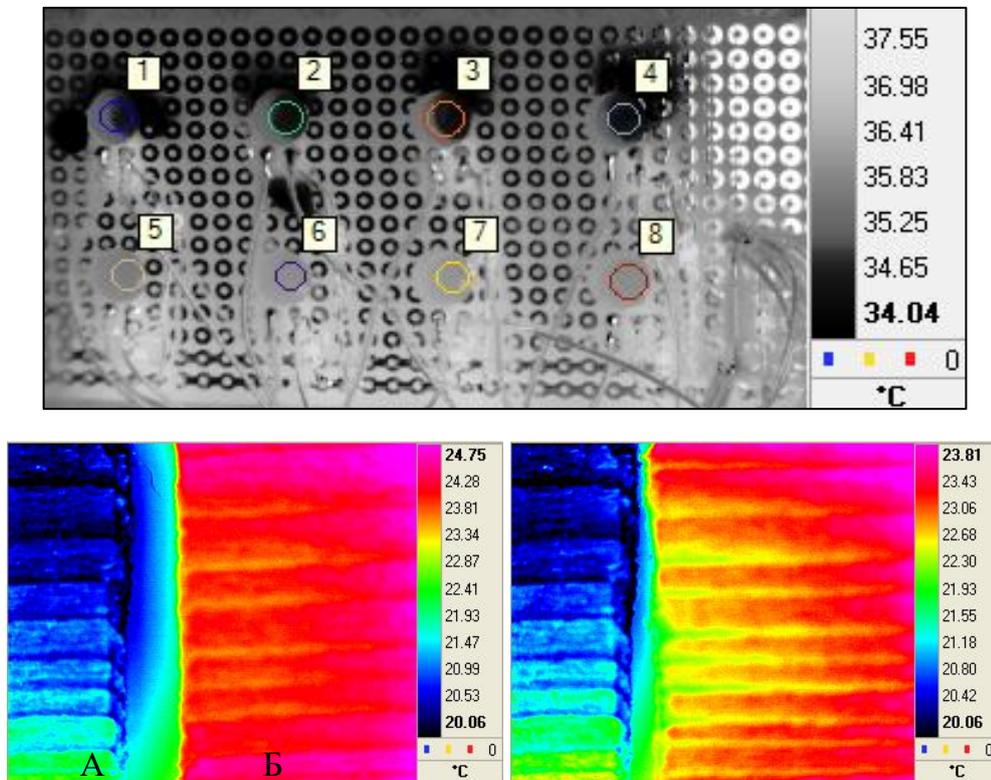


Рисунок 30 – Изображения подложек с прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 342 в инфракрасной камере. Вверху: изображение 96-луночного полистиролового микропланшета. Цифрами обозначены варианты опыта: 1–4 – абиотический контроль (стерильный раствор 0,5% NaCl), 5–8 – клеточная суспензия. Цветными окружностями выделены области для расчета средней температуры θ . Внизу: изображения поверхности древесных брусков, обработанных 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов (слева) или 10 вес. % *n*-гексадекана (справа). Буквами обозначены варианты опыта: А – подложка без клеток, Б – подложка с прикрепленными клетками. Концентрация клеток в суспензии составляет $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, количество прикрепленных клеток – 35–86%.

Таблица 15 – Термодинамические параметры адгезии родококков в сравнении с данными литературы

Параметр	Адгезия <i>Rhodococcus</i> spp.	Адгезия других микроорганизмов*
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

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

Рассчитанный стандартным методом контактных углов термодинамический эффект адгезии родококков $\Delta G_{\text{адг}}$ подтверждает данные инфракрасной термографии и составляет от $-2,50 \cdot 10^{-3}$ до $-0,19 \cdot 10^{-3}$ Дж/м². Эти значения в $36-2 \cdot 10^8$ раз превышают таковые, опубликованные в литературе. Выявлено, что $\Delta G_{\text{адг}}$ на 3–13 порядков меньше продукции тепла Q_{прод} как для родококков, так и для бактерий *S. sanguinis* (таблица 15). По данным литературы (Chen *et al.*, 2003; Bayouhd *et al.*, 2009; Carniello *et al.*, 2018), $\Delta G_{\text{адг}}$ варьирует в пределах от -19 до -2 кТ, или $8 \cdot 10^{-21} - 8 \cdot 10^{-20}$ Дж. Умножая эти значения на $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^9$ (количество прикрепленных клеток на 1 см²), получается $8 \cdot 10^{-16} - 8 \cdot 10^{-11}$ Дж/см². Если бы в нашей работе продукция тепла по данным термометрических измерений и показатели $\Delta G_{\text{адг}}$ совпали, то последние были бы равны Q_{прод} и составляли около $8 \cdot 10^{-3}$ Дж/см². Очевидно, что предположения об энергетическом эффекте адгезии по данным контактных углов не соответствуют результатам прямых измерений. Показатель $\Delta G_{\text{адг}}$ отражает степень сродства двух поверхностей на основании только их физико-химических свойств (степени гидрофобности и заряда) и не учитывает множество факторов, например, вклад в адгезионный процесс формы клеток, ультраструктурных особенностей клеточной поверхности, наличия

неровностей на поверхности подложки (Hori, Matsumoto, 2010; James *et al.*, 2017; Carniello *et al.*, 2018).

Высокий экзотермический эффект адгезии родококков подтверждается также сравнением с термодинамическими показателями метаболизма бактерий. По данным литературы, тепловой эффект метаболизма составляет следующие значения: $Q_{\text{прод}}=5$ Дж, $Q=4 \cdot 10^{-4}$ Вт (разные бактериальные и грибные культуры, 7 ч роста) (Braissant *et al.*, 2010); $Q_{\text{общ}}=0,35-0,43$ Дж, $Q=3 \cdot 10^{-5}$ Вт (*E. coli*, 28 ч роста в присутствии глюкозы или лактозы) (Braissant *et al.*, 2010); $Q_{\text{общ}}=5,74-6,74$ Дж (*S. sanguinis*, после 48 ч воздействия дезинфектантов) (Astasov-Frauenhoffer *et al.*, 2011); $Q_{\text{прод}}=5$ Дж, $Q=4 \cdot 10^{-5}-21 \cdot 10^{-5}$ Вт (разные бактериальные культуры, окисление щавелевой кислоты в течение 30–200 ч) (Bravo *et al.*, 2011).

Выраженный экзотермический эффект адгезии родококков свидетельствует о прочном необратимом прикреплении клеток. По данным спектрофотометрии, степень удержания родококков на поверхности подложек составляет $\geq 83\%$, при этом прочно связанные клетки не смываются детергентами и 1М NaCl. Низкий (56% прочно связанных клеток от общего числа прикрепленных клеток) процент удержания клеток выявлен лишь в отношении подложек на основе отходов кукурузных початков, к которым родококки слабо (19%) прикрепляются (см. рисунок 23). По данным других авторов, родококки настолько прочно прикрепляются к твердым поверхностям, что их невозможно отделить детергентами (Masák *et al.*, 2005; Lehocký *et al.*, 2009).

Глава 6. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ АДГЕЗИЮ РОДОКОККОВ

6.1. Гликолипидные биосурфактанты – основной молекулярный фактор адгезии родококков

Основными молекулярными факторами, регулирующими адгезию родококков в присутствии жидких углеводов, являются поверхностно-активные комплексы на основе гликолипидных биосурфактантов. Адгезивная активность *Rhodococcus* пропорциональна ($R_{\text{Пирсона}}=0,92$, $p=0,03$) продукции биосурфактантов (рисунок 31). 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 16).

На рисунке 32 приведена силовая кривая, полученная при измерении силы адгезии модифицированного биосурфактантами зонда АСМ к полистиролу. Сила адгезии *Rhodococcus*-биосурфактантов к твердой подложке составляет в среднем $0,495 \pm 0,010$ 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).

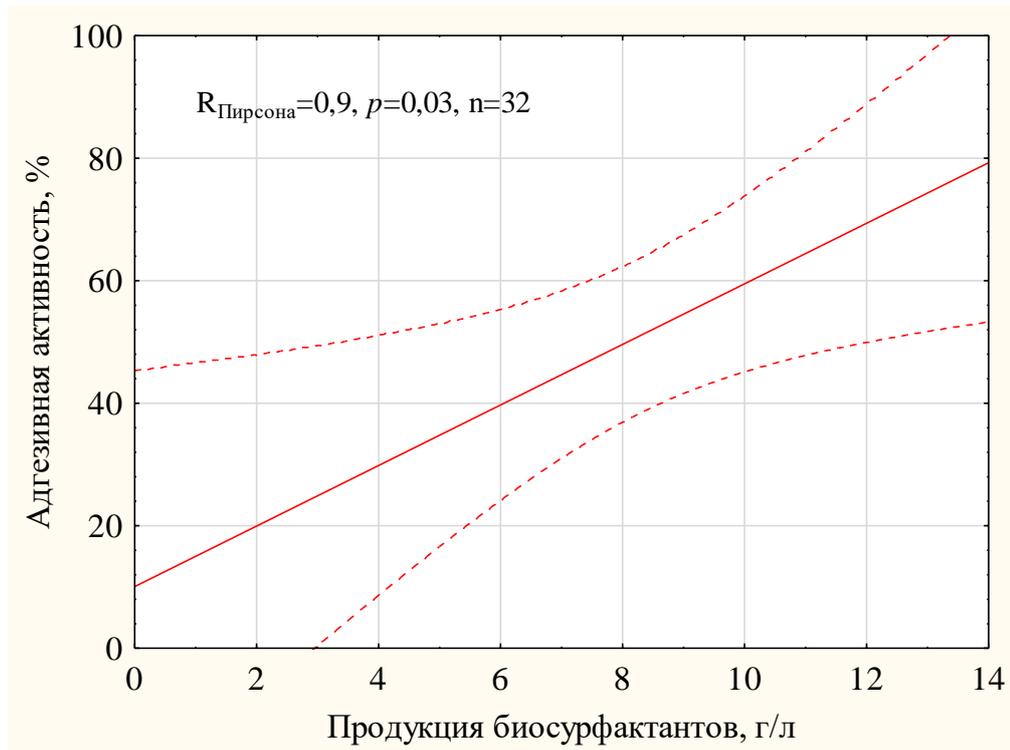


Рисунок 31 – Адгезивная активность родококков в отношении полистирола и продукция клетками гликолипидных биосурфактантов в присутствии 3 об. % *n*-гексадекана. Приведена линия регрессии с границами доверительного интервала (уровень надежности 95%), *n* – количество исследованных штаммов

Таблица 16 – Эмульгирующая и адгезивная активности Тп5-мутантов *R. ruber* ИЭГМ 231

Кол-во Тп5-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

Примечание. *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.

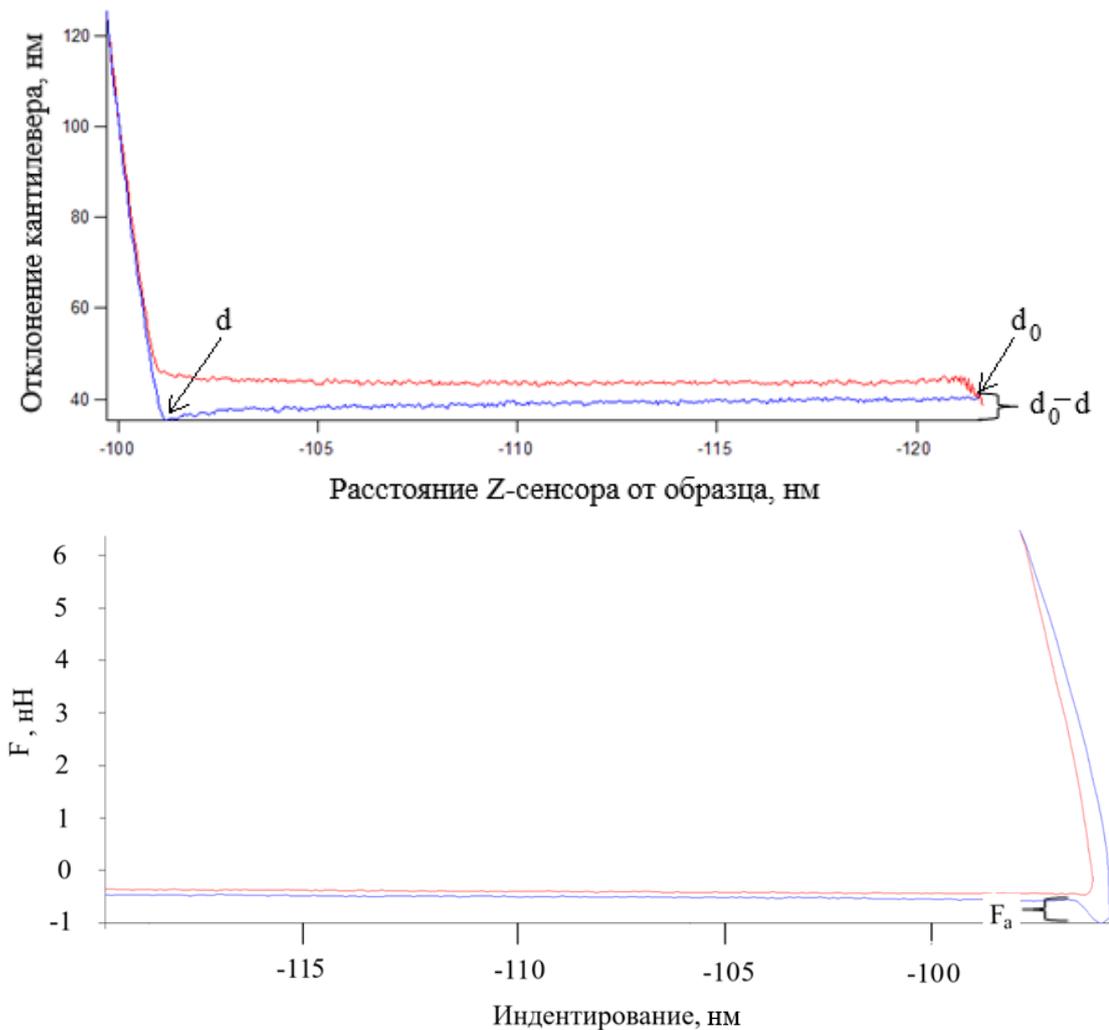


Рисунок 32 – Силовая кривая модифицированного *Rhodococcus*-биосурфактантами зонда АСМ к полистиролу. Силовая кривая приведена в единицах силы и отклонения (деформации) кантилевера. Разницу в значениях деформации кантилевера d_0-d использовали для расчета силы адгезии F_a . Траектория движения кантилевера: красная линия – кривая подвода, синяя линия – кривая отвода

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 33). Характер структур зависит от концентрации *Rhodococcus*-биосурфактантов. С увеличением

количества молекул биосурфактантов на подложке образуется меньше мицелл, начинают преобладать тяжи и затем везикулы. При очень высокой (5 вес. %) концентрации биосурфактантов на поверхности подложки формируется равномерная кондиционирующая пленка (см. рисунок 26). При этом присутствие биосурфактантов на твердой поверхности даже в небольших (0,01–1 мг/л) количествах приводит к 2-х–3-кратному увеличению числа прикрепленных родококков по сравнению с немодифицированной поверхностью (рисунок 34). Использование биосурфактантных комплексов в концентрации >1 мг/л не сопровождается дальнейшим усилением адгезии (рисунок 34), что может быть обусловлено образованием соответствующих тяжей и везикул, заполнением ими доступной площади и отсутствием дополнительных сайтов связывания клеток (Adamczyk *et al.*, 2005).

Установлено, что *Rhodococcus*-биосурфактанты изменяют физико-химические свойства подложек. Благодаря амфифильной природе биосурфактанты могут контактировать с твердой поверхностью гидрофобной (остатки миколовых кислот), либо гидрофильной (остатки трегалозы) частями молекул. Это может приводить к гидрофилизации или гидрофобизации подложки. Так, адсорбция биосурфактантов на поверхности полистирола увеличивает гидрофильность этого материала. Об этом свидетельствует увеличение в 2,5, 4,0 и 5,0 раз таких показателей, как γ^{AB} , краевой угол смачивания *n*-гексадеканом и γ^+ соответственно, и уменьшение на 5,9 мДж/м² неполярного компонента γ^{LW} (таблица 17).

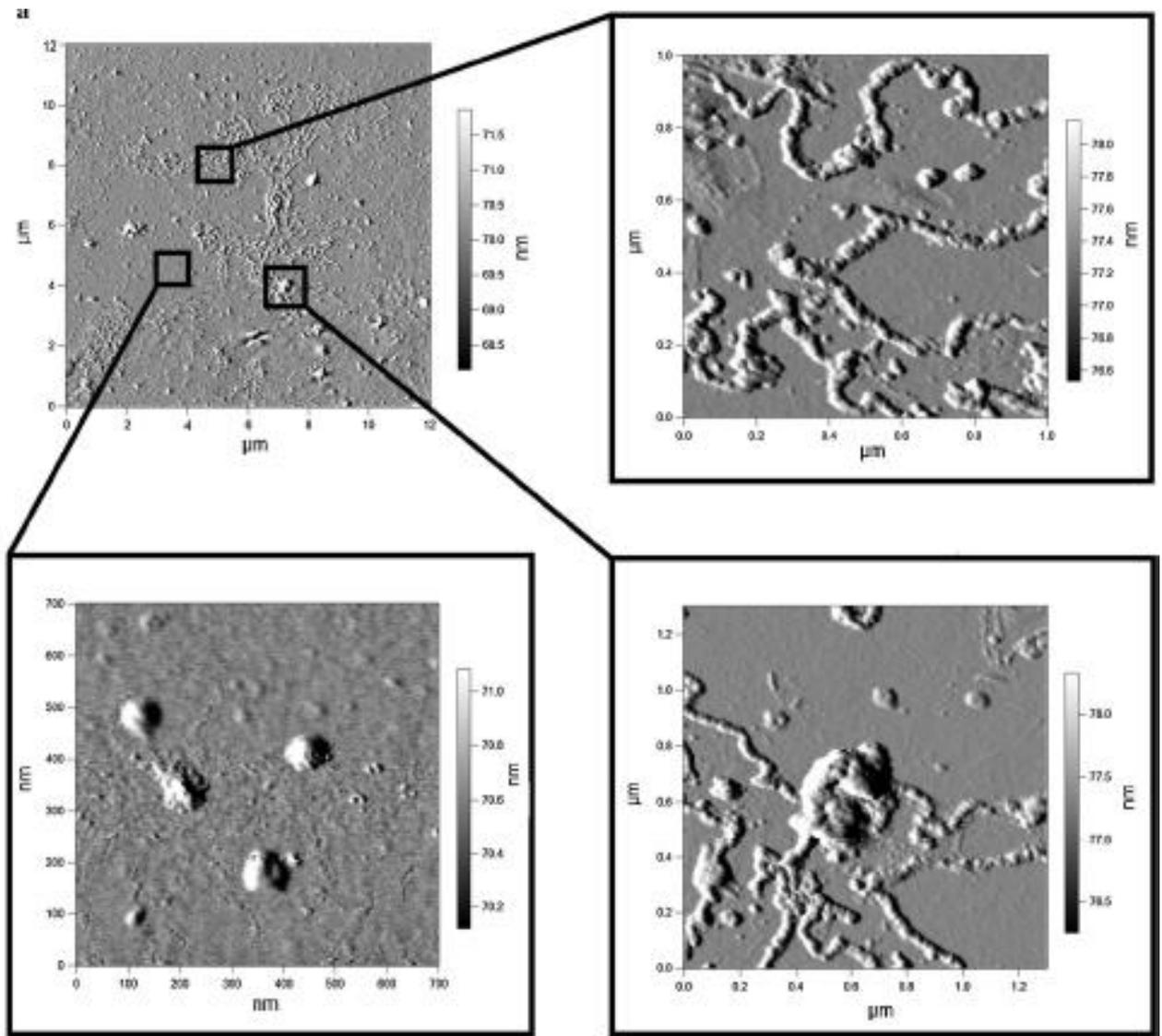


Рисунок 33 – АСМ-изображение поверхности стекла с нанесенными на него *Rhodococcus*-биосурфактантами

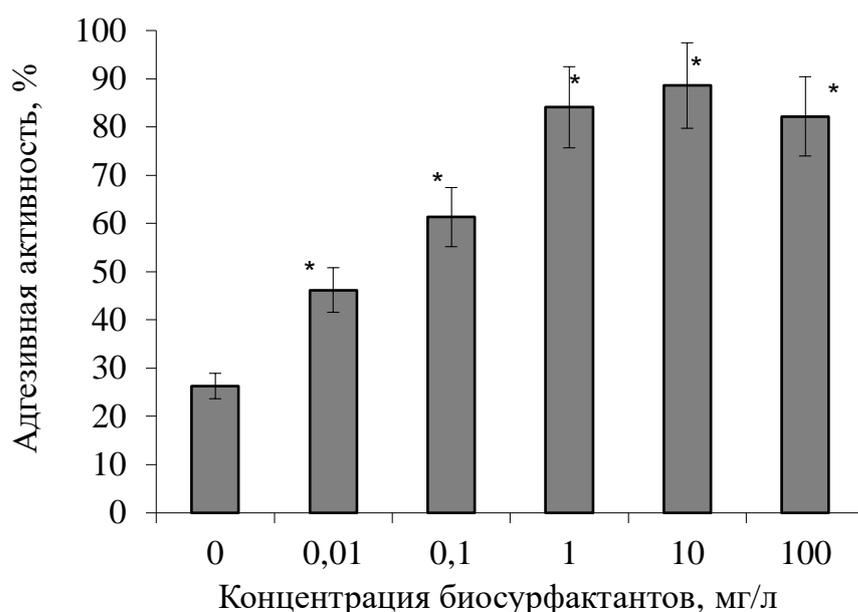


Рисунок 34 – Адгезивная активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 в зависимости от концентрации гликолипидных биосурфактантов на поверхности полистирола. *Статистически достоверно ($p < 0,05$) от немодифицированного полистирола

Таблица 17 – Влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов на физико-химические свойства подложек

96-луночные полистироловые микропланшеты

Модификация поверхности	Краевой угол смачивания, °				Свободная поверхностная энергия, мДж/м ²				
	Вода	Глицерин	<i>n</i> -Гексадекан	ДМСО	γ	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^-	γ^+
Нет	88 ± 2	79 ± 1	10 ± 2	51 ± 1	29,1	27,1	2,0	4,0	0,3
Биосурфактанты, 100 мг/л	86 ± 2	75 ± 2	41 ± 2*	51 ± 1	27,2	21,2	5,0	4,3	1,5

Опилки древесных пород

Модификация поверхности	Угол смачивания водой, °	Расположение в системе <i>n</i> -гексадекан/вода	Водопоглощающая способность, г H ₂ O/г	Адсорбция <i>n</i> -гексадекана, %
Нет	67 ± 5	Вода	2,55 ± 0,15	5 ± 2
Биосурфактанты, 5 вес. %	86 ± 6*	Межфазное пространство	1,54 ± 0,02*	32 ± 3*

Примечание. *Статистически достоверно ($p < 0,05$) от немодифицированной подложки.

Поверхность обработанной биосурфактантами полистирольной поверхности становится положительно заряженной ($\gamma^+=1,5$ мДж/м²), что может способствовать контакту с отрицательно заряженными бактериальными клетками. Увеличение компонента γ^+ требует объяснения. В структуре трегалозомоно- и димиколатов, основных функциональных компонентов биосурфактантов родококков, отсутствуют положительно заряженные функциональные группы, такие как аминогруппы, и в большом количестве присутствуют группы с отрицательным зарядом – гидроксигруппы (Kuyukina, Ivshina, 2019b). Таким образом, ожидается, что обработка биосурфактантами должна сопровождаться увеличением γ^- . Биосурфактантные комплексы, использованные в работе, не являются химическими чистыми веществами. Они получены в результате экстракции полярных липидов из верхнего гидрофобного слоя бактериальной культуры и помимо гликолипидов содержат (1) остаточный углеводород, *n*-декан или *n*-гексадекан, на котором выращивали родококки, (2) неполярные липиды (в основном миристиновая, пальмитиновая и олеиновая кислоты), (3) фосфолипиды и (4) белки (Kuyukina *et al.*, 2001). Последние два компонента содержат в своем составе аминогруппы, при этом суммарное количество белков и фосфолипидов лишь в два раза меньше такового гликолипидов, соответственно они могут вносить значительный вклад в изменение физико-химических свойств модифицированной твердой поверхности.

Адсорбция *Rhodococcus*-биосурфактантов на поверхности исходно гидрофильных древесных опилок, наоборот, приводит к гидрофобизации данного материала. Нативные древесные опилки располагаются в воде, практически не адсорбируют *n*-гексадекан, имеют высокую (2,55 г Н₂О/г) водопоглощающую способность и небольшой (67°) угол смачивания водой (вода растекается). Древесные опилки с кондиционирующей пленкой из гликолипидных биосурфактантов располагаются в системе *n*-гексадекан/вода на границе раздела двух жидкостей, адсорбируют до 32% *n*-гексадекана, обладают пониженной (1,54 г Н₂О/г) водопоглощающей способностью и большим (86°) краевым углом смачивания водой (таблица 17).

Следует отметить, что микробные сурфактанты не используются для модификации поверхностных свойств подложек с целью усиления к ним адгезии. Такие исследования проведены впервые. В основном исследуются биосурфактанты с высокими показателями гидрофильно-липофильного баланса, их используют для гидрофилизации материалов медицинского и промышленного назначения (силиконовый каучук, полистирол, сталь, тефлон) с целью предотвращения микробной адгезии (Rodrigues *et al.*, 2006; Shakerifard *et al.*, 2009; Zeraik, Nitschke, 2010).

6.2. Липидные компоненты клеточной стенки родококков как возможные адгезины

Нейтральные липиды обуславливают показатели гидрофобности клеток и влияют на способность родококков к агрегации. Повышение количества общих клеточных липидов в 2–4 раза приводит к двукратному увеличению степени гидрофобности родококков и инициирует образование ими клеточных агрегатов (таблица 18). Адгезивная активность *Rhodococcus* в отношении твердых поверхностей не зависит от содержания общих липидов. Хотя выявлено незначительное (на 15%) увеличение количества клеток на подложке в среде с *n*-гексадеканом (условия, способствующие синтезу липидных компонентов), эта тенденция не подтверждается при статистическом анализе (таблица 18).

Характерным липидным компонентом клеточной стенки родококков являются миколовые кислоты – 2-алкил-3-гидрокси разветвленные жирные кислоты, отвечающие за формирование внешнего липидного барьера непроницаемости и липофильные свойства клеток (Gibson *et al.*, 2003). В таблице 19 представлены результаты сравнения разных штаммов родококков по степени адгезии к полистиролу и содержанию в клетках миколовых кислот. В анализе использовали клетки, выращенные предварительно в среде с 3 об. % *n*-гексадекана. В этих условиях углеводородокисляющие актинобактерии характеризуются максимально высокой продукцией миколовых кислот (Kuyukina, Ivshina, 2019a). Как видно из таблицы 19, ОП₄₉₄ нм экстрактов сложных эфиров миколовых кислот,

полученных из лизатов родококков, составляет от 2,008 до 2,567 и статистически достоверно не отличается между разными штаммами. Коэффициент корреляции $R_{\text{Спирмена}}$ между адгезивными свойствами родококков и содержанием миколовых кислот составляет 0,65 при $p=0,38$.

Таблица 18 – Агрегация и адгезия родококков к твердым поверхностям в зависимости от содержания клеточных липидов

Штаммы	Условия культивирования	Липиды, мг/г АСВ клеток	Степень гидрофобности, $M(NH_4)_2SO_4^*$	Агрегация	Адгезия к подложке ^{**} , мг АСВ клеток/г
<i>R. rhodochrous</i> (4 штамма)	LB	18 ± 4	0,4	–	$19,0 \pm 3,4$
	3 об. % <i>n</i> -гексадекана	$72 \pm 15^{***}$	0,2 ^{***}	+	$22,5 \pm 4,8$
<i>R. ruber</i> (5 штаммов)	5 г/л глюкозы	434 ± 81	0,8–1,0	–	$32,0 \pm 5,1$
	3 об. % <i>n</i> -гексадекана	$708 \pm 120^{***}$	0,2–0,6 ^{***}	+	$37,5 \pm 5,3$

Примечание. * 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 19 – 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	$2,079 \pm 0,270$	56 ± 6
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 185	$2,448 \pm 0,367$	52 ± 6
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 186	$2,008 \pm 0,241$	46 ± 5
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 188	$2,567 \pm 0,308$	78 ± 9
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 212	$2,613 \pm 0,261$	82 ± 7
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 29	$2,451 \pm 0,294$	48 ± 5
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 219	$2,460 \pm 0,271$	44 ± 5
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 325	$2,037 \pm 0,204$	37 ± 3
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 328	$2,532 \pm 0,279$	59 ± 5

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

Полученные по нейтральным липидам данные подтверждают, что агрегация родококков зависит от гидрофобных свойств клеток, тогда как адгезивная активность родококков в отношении твердых поверхностей не зависит от степени гидрофобности клеток. Как показано выше, липиды могут концентрироваться в специфических придаточных структурах клеток родококков и выполнять в их составе роль молекул адгезии.

6.3. Роль поверхностных белков в адгезии родококков.

Предполагаемые адгезины белковой природы

По нашим данным, инкубация родококков в присутствии протеиназы К у 14 штаммов приводит к снижению их адгезивной активности в отношении полистирола на 11–55%, у 4 штаммов выявлено увеличение на 22–100% их адгезивной активности в отношении полистирола, у остальных исследованных штаммов не обнаружено статистически достоверных отличий в адгезии клеток, культивируемых в присутствии протеиназы К и без нее (таблица 20). Это свидетельствует о том, что поверхностные белки участвуют в адгезионном процессе родококков. У штаммов, для которых выявлено снижение адгезивной активности после инкубации с протеиназой К, поверхностные белки выполняют функцию адгезинов, облегчающих закрепление клеток на твердой поверхности. У штаммов, для которых характерно снижение адгезивной активности после обработки протеиназой К, поверхностные белки действуют, как антиадгезины, препятствуя адгезии. В исследованиях Т. Møretrø с соавт. (2015) обработка клеток родококков с помощью протеиназы К приводила к снижению их способности агрегировать с клетками *A. calcoaceticus*, при этом не все исследованные штаммы родококков были чувствительны к этой процедуре. По-видимому, степень участия поверхностных белков в адгезии родококков является штаммовым признаком.

Таблица 20 – Изменение адгезивной активности родококков в отношении полистирола после обработки клеток протеиназой К (0,2 мкг/мл) в течение 3 ч

Штамм	Адгезивная активность, %	
	до обработки клеток протеиназой К	После обработки клеток протеиназой К
Поверхностные белки усиливают адгезионную способность родококков		
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 20	9 ± 0	6 ± 0*
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 271	85 ± 1	70 ± 2*
<i>R. fascians</i> ИЭГМ 34	16 ± 0	12 ± 0*
<i>R. fascians</i> ИЭГМ 170	14 ± 0	11 ± 0*
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 31	25 ± 1	21 ± 0*
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 33	28 ± 6	18 ± 1*
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 717	13 ± 0	10 ± 0*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 225	8 ± 0	6 ± 0*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 233	11 ± 1	8 ± 0*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 235	11 ± 2	5 ± 1*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 236	10 ± 0	7 ± 0*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 238	18 ± 1	10 ± 4*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 334	7 ± 1	4 ± 0*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 342	36 ± 1	32 ± 1*
Поверхностные белки снижают адгезионную способность родококков		
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 185	6 ± 0	13 ± 1*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 73	4 ± 1	7 ± 0*
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231	68 ± 2	83 ± 6*
<i>Rhodococcus</i> sp. ИЭГМ 69	9 ± 1	12 ± 0*
Поверхностные белки не влияют на адгезионную способность родококков		
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 186	14 ± 1	11 ± 1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 188	10 ± 4	14 ± 8
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 192	4 ± 0	4 ± 1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 212	4 ± 0	5 ± 1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 265	4 ± 1	4 ± 1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 266	5 ± 1	5 ± 1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 268	14 ± 2	11 ± 0
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 269	11 ± 1	11 ± 0

Штамм	Адгезивная активность, %	
	До обработки клеток протеиназой К	После обработки клеток протеиназой К
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 487	5 ± 1	6 ± 1
<i>R. fascians</i> ИЭГМ 39	12 ± 1	12 ± 1
<i>R. fascians</i> ИЭГМ 278	12 ± 2	15 ± 2
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 28	14 ± 1	15 ± 1
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 29	22 ± 0	22 ± 1
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 57	56 ± 1	54 ± 0
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 61	17 ± 4	14 ± 6
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 246	14 ± 1	14 ± 1
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 716	21 ± 2	23 ± 2
<i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 267	11 ± 1	14 ± 2
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 63	9 ± 2	6 ± 0
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 64	10 ± 1	11 ± 0
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 646	3 ± 0	3 ± 0
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647	10 ± 0	10 ± 0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 65	12 ± 1	13 ± 7
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 77	4 ± 0	3 ± 0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 84	3 ± 1	3 ± 0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 172	3 ± 1	3 ± 0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 219	4 ± 1	3 ± 0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 223	7 ± 2	8 ± 0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 224	6 ± 3	7 ± 2
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 241	3 ± 0	3 ± 0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 323	7 ± 1	7 ± 1
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 325	11 ± 0	12 ± 2
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 326	5 ± 0	6 ± 1
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 328	14 ± 2	12 ± 2
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 438	10 ± 1	9 ± 2
<i>Rhodococcus</i> sp. ИЭГМ 27	17 ± 0	17 ± 1

Примечание. Представлены данные для растущих в среде LB клеток.
 *Показатели адгезии, полученные при инкубации родококков в присутствии протеиназы К, статистически достоверно ($p < 0,05$) отличаются от таковых при инкубации родококков без протеиназы К.

Установлено, что адгезивная активность родококков, выращенных в присутствии ингибиторов белкового синтеза (эритромицина и олеандомицина), в отношении твердых поверхностей коррелирует с данными показателями, определенными в экспериментах с протеиназой К. Показано, что предварительное культивирование штамма *R. ruber* ИЭГМ 238 в присутствии 0,4–6,3 мкг/мл эритромицина и 1,6–12,5 мкг/мл олеандомицина приводит к снижению адгезивной активности данного штамма в отношении полистирола в 2–4 раза (рисунок 35). Для клеток ИЭГМ 238 также выявлено снижение их адгезивной активности после обработки протеиназой К (таблица 20). Это подтверждает участие поверхностных белков в адгезии клеток *R. ruber* ИЭГМ 238. В отношении штамма *R. ruber* ИЭГМ 328, наоборот, не выявлено влияния антибиотиков на адгезивные свойства клеток. Хотя отмечено двукратное снижение адгезивной активности штамма ИЭГМ 328 в отношении полистирола после обработки клеток олеандомицином в высокой (12,5 мкг/мл) концентрации, однако при остальных концентрациях данного антибиотика и при использовании эритромицина изменения адгезивных свойств клеток не наблюдается (рисунок 35). Протеиназа К также не влияет на адгезивную активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 328 (таблица 20). У данного штамма белки, по-видимому, не вносят существенный вклад в адгезию.

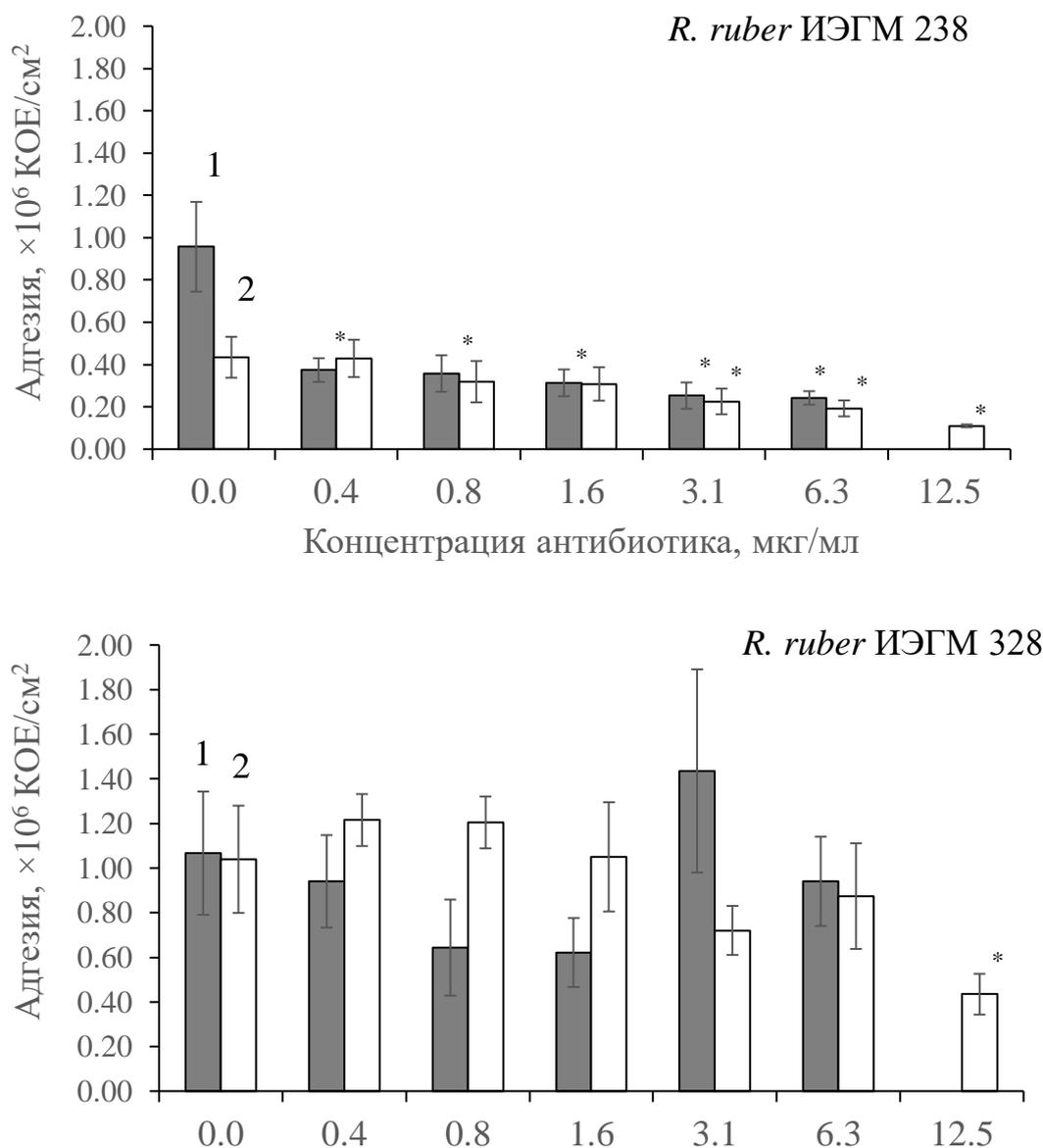


Рисунок 35 – Влияние антибиотиков – ингибиторов белкового синтеза на адгезивную активность родококков в отношении полистирола. Варианты опыта: 1 – эритромицин, 2 – олеандомицин. *Статистически достоверно ($p < 0,05$) от контроля (среда без антибиотиков)

Для поиска генетических детерминант, кодирующих возможные факторы адгезии белковой природы у углеводородокисляющих родококков, использовали полногеномную аннотированную нуклеотидную последовательность штамма *R. ruber* ИЭГМ 231. Этот штамм был выбран для полногеномного секвенирования в связи с его высоким метаболическим и биотехнологическим потенциалом. Бактерии *R. ruber* ИЭГМ 231 способны использовать пропан, *n*-бутан и жидкие

алканы C12–C17 в качестве единственного источника углерода и энергии, конвертировать арилалкилсульфиды в оптически чистые сульфоксиды, трансформировать бета-ситостерол в терапевтически перспективный стигмаст-4-ен-3-он, характеризуются высокой продукцией гликолипидных биосурфактантов (представлены трегалозомоно- и димиколатами), обладают высокой устойчивостью к солям тяжелых металлов, способны аккумулировать ионы молибдена и никеля (http://www.iegmc.ru/strains/rhodoc/ruber/r_ruber231.html).

В результате биоинформатического анализа в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 выявлено 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*). Две последовательности, RHRU231v1_350028 и RHRU231v1_160016, гомологичны таковым генам, кодирующим у актинобактерий белки с подтвержденной функцией адгезии. Ген RHRU231v1_350028 (*hbhA*) кодирует синтез гепаринсвязывающего гемагглютиниона HbhA. Фрагмент данного гена длиной 281 п.н. (самое короткое выравнивание из списка) на 73% сходен с генами *hbhA* патогенных актинобактерий *M. bovis* и *M. tuberculosis*. Ген RHRU231v1_160016 (*glcB*) аннотирован как кодирующий малатсинтазу G. Он имеет 75% сходства с геном малатсинтазы GlcB *M. tuberculosis* (таблица 21). Одна из функций этого белка – адгезия клеток *M. tuberculosis* к гликопротеинам внеклеточного матрикса (ламинину, фибронектину), что обеспечивает удержание микобактерий в межклеточном пространстве эпителия слизистых оболочек человека (Kinhikar *et al.*, 2006).

Таблица 21 – Сходство между генами, кодирующими адгезины* у разных актинобактерий, и гомологичными последовательностями в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231

Запрашиваемая последовательность (query): вид/штамм, идентификационный номер в NCBI, длина, начало–конец выравнивания, кодируемый белок	Референсная последовательность (subject) в геноме <i>R. ruber</i> ИЭГМ 231: положение в геноме, длина, начало–конец выравнивания, кодируемый белок	Степень сходства (identity), количество одинаковых нуклеотидов/ длина выравнивания, %
<i>R. ruber</i> , gene ID 61543227, 9395 п.н., 1–9396 п.н., нерибосомный пептид-синтезирующий белок с консервативным доменом AidA	RHRU231v1_750149, 9387 п.н., 4186882–4196268 п.н., микобактинсинтетаза В	9342/9396 (99)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, gene ID 885713, 2225 п.н., 42–2169 п.н., малатсинтаза GlcB (ламининсвязывающий адгезин)	RHRU231v1_160016, 2265 п.н., 432081–434211 п.н., малатсинтаза G	1617/2153 (75)
<i>R. ruber</i> , gene ID 61546940, 1430 п.н., 1–1431 п.н., консервативный белок с неизвестной функцией из семейства DUF4185 с консервативным доменом AidA	RHRU231v1_360067, 1431 п.н., 1389420–1387990 п.н., консервативный экспортируемый белок с неизвестной функцией	1411/1431 (99)
<i>R. qingshengii</i> , gene ID 48579707, 3248 п.н., 1032–2799 п.н., фактор инициации трансляции IF-2 с консервативным доменом MSCRAMM_SdrC	RHRU231v1_420158, 3210 п.н., 1984937–1986698 п.н., рибонуклеаза E	1380/1789 (77)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, gene ID 885946, 1877 п.н., 1–1572 п.н., шаперон DnaK/белок теплового шока 70	RHRU231v1_330031, 1845 п.н., 1018246–1019817 п.н., шаперон DnaK	1323/1576 (84)
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , gene ID 29429128, 3032 п.н., 807–2378 п.н., рибонуклеаза Rne/Rng с консервативным доменом MSCRAMM_SdrC	RHRU231v1_420158, 3210 п.н., 1984937–1986484 п.н., рибонуклеаза E	1228/1590 (77)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, gene ID 887877, 1619 п.н., 6–1576 п.н., шаперонин GroEL (Cpn60.2)	RHRU231v1_470084, 1617 п.н., 2574276–2575843 п.н., шаперонин GroEL (Cpn60) – большая субъединица GroESL	1178/1573 (75)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, gene ID 887877, 1619 п.н., 6–1583 п.н., шаперонин GroEL (Cpn60.2)	RHRU231v1_330196, 1626 п.н., 1189611–1191179 п.н., шаперонин GroEL (Cpn60) – большая субъединица GroESL	1072/1590 (67)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, gene ID 887877, 1619 п.н., 6–1520 п.н., шаперонин GroEL (Cpn60.2)	RHRU231v1_30055, 1602 п.н., 67198–68706 п.н., шаперонин GroEL (Cpn60) – большая субъединица GroESL	988/1540 (64)

Запрашиваемая последовательность (query): вид/штамм, идентификационный номер в NCBI, длина, начало–конец выравнивания, кодируемый белок	Референсная последовательность (subject) в геноме <i>R. ruber</i> ИЭГМ 231: положение в геноме, длина, начало–конец выравнивания, кодируемый белок	Степень сходства (identity), количество одинаковых нуклеотидов/ длина выравнивания, %
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), gene ID 1099467, 2579 п.н., 73–1316 п.н., интегральный мембранный транспортный белок с консервативным доменом MSCRAMM_SdrC	RHRU231v1_380047, 1596 п.н., 1518712–1519961 п.н., предполагаемый MFS-транспортер	835/1264 (66)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, gene ID 885946, 1877 п.н., 337–1410 п.н., шаперон DnaK/белок теплового шока 70	RHRU231v1_960083, 1881 п.н., 5850715–5851782 п.н., шаперон DnaK	758/1088 (70)
<i>R. ruber</i> , gene ID 61546940, 1430 п.н., 403–1415 п.н., консервативный белок с неизвестной функцией из семейства DUF4185 с консервативным доменом AidA	RHRU231v1_580002, 1545 п.н., 3290199–3291208 п.н., консервативный экспортируемый белок с неизвестной функцией	729/1031 (71)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, gene ID 887924, 1181 п.н., 239–1056 п.н., 5'-3'-экзонуклеаза с консервативным доменом аутопортнерного адгезина MisL	RHRU231v1_120003, 975 п.н., 358894–358086 п.н., 5'-3'-экзонуклеаза	585/822 (71)
<i>R. ruber</i> , gene ID 61544446, 563 п.н., 1–545 п.н., 30S рибосома-связывающий белок RbfA с консервативным доменом аутопортнерного адгезина BigA	RHRU231v1_430099, 537 п.н., 2103942–2104486 п.н., рибосома-связывающий фактор A	542/545 (99)
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> , gene ID 60905871, 2066 п.н., 769–1547 п.н., HAMP-домен-связывающий белок (сигнальный белок, содержит консервативный домен MSCRAMM_SdrC)	RHRU231v1_470238, 1674 п.н., 2721755–2722533 п.н., сенсорная гистидинкиназа MtrB	532/803 (66)
<i>Actinomyces oris</i> , gene ID 60661979, 2012 п.н., 1273–1905 п.н., лейциламинопептидаза с консервативным доменом MSCRAMM_SdrC	RHRU231v1_920024, 1509 п.н., 5393397–5392765 п.н., предполагаемая цитозольная аминопептидаза	458/644 (71)

Запрашиваемая последовательность (query): вид/штамм, идентификационный номер в NCBI, длина, начало–конец выравнивания, кодируемый белок	Референсная последовательность (subject) в геноме <i>R. ruber</i> ИЭГМ 231: положение в геноме, длина, начало-конец выравнивания, кодируемый белок	Степень сходства (identity), количество одинаковых нуклеотидов/ длина выравнивания (%)
<p><i>R. ruber</i>, gene ID 61543227, 9395 п.н., нерибосомный пептид-синтезирующий белок с консервативным доменом AidA: 2733–3255 п.н., 2746–3167 п.н., 4007–4380 п.н.</p> <p><i>R. ruber</i>, gene ID 61543227, 9395 п.н., 7464–7981 п.н., нерибосомный пептидсинтезирующий белок с консервативным доменом AidA</p> <p><i>Streptomyces rimosus</i>, gene ID 57900092, 2528 п.н., 1044–1456 п.н., субъединица ПА переносчика сахаров фосфотрансферазной системы с консервативным доменом MSCRAMM_SdrC</p> <p><i>M. bovis</i> AF2122/97, gene ID 1091523, 599 п.н., 178–456 п.н. + <i>M. tuberculosis</i>, gene ID 886272, 599 п.н., 178–456 п.н., гепаринсвязывающий гемагглютинин HbhA</p>	<p>RHRU231v1_750140, 7737 п.н., микобактинсинтетаза В:</p> <p>4179071–4179596 п.н., 4175958–4176382 п.н., 4180318–4180692 п.н.</p> <p>RHRU231v1_470001, 18366 п.н., 2474880–2475400 п.н., микобактинсинтетаза В</p> <p>RHRU231v1_430177, 2043 п.н., 2181851–2181430 п.н., фруктозо-специфичный компонент ПА фосфотрансферазной системы переноса сахаров</p> <p>RHRU231v1_350028, 840 п.н., 1256180–1256458 п.н., гепаринсвязывающий гемагглютинин HbhA</p>	<p>391/540 (72)</p> <p>330/444 (74)</p> <p>291/385 (76)</p> <p>390/533 (73)</p> <p>296/442 (67)</p> <p>205/281 (73)</p>

Примечание. *В том числе белки с гипотетической функцией адгезии. Все гены имели хромосомную локализацию. Количество пробелов (gaps) в выравниваемых последовательностях составляло 0–11%.

Сходство генов RHRU231v1_350028 и RHRU231v1_160016 с идентичными генами, кодирующими адгезины у патогенных актинобактерий, не означает, однако, что продукты этих генов отвечают за адгезию *R. ruber* ИЭГМ 231 к белкам внеклеточного матрикса у человека, являются факторами вирулентности данного штамма и свидетельствуют о патогенных свойствах *R. ruber*. Участие белков HbhA и малатсинтазы G *R. ruber* ИЭГМ 231 в патологических процессах не описано, их функции, как адгезинов, являются гипотетическими, предложенными на основе сравнения с описанными генами. Функция

малатсинтазы GlcB *M. tuberculosis*, как адгезина, является видовой особенностью. Так, в клетках микобактерий другого вида, *Mycobacterium smegmatis*, белок GlcB располагается в цитоплазме, где выполняет непосредственно биосинтетическую функцию образования малата из глиоксилата и ацетил-КоА. Белок GlcB *M. tuberculosis*, в отличие от такового *M. smegmatis*, способен прикрепляться к клеточной стенке и экспортироваться во внеклеточное пространство, что, возможно, и обеспечивает ему дополнительную функцию адгезии (Kinhikar *et al.*, 2006).

Другие 13 кодирующих последовательностей попали в список генов, потенциально отвечающих за синтез адгезинов у *R. ruber* ИЭГМ 231, на основании обнаружения в гомологичных генах других актинобактерий консервативных доменов, таких как MSCRAMM_SdrC (6 последовательностей) и домены аутотранспортерных адгезинов AidA (5 последовательностей), BigA (1 последовательность) и MisL (1 последовательность) (таблица 21). SdrC – это лиганд-связывающий белок *Staphylococcus aureus* из семейства микробных поверхностных компонентов узнавания адгезивных молекул матрикса (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMM), суперсемейства связанных с клеточной стенкой белков (cell-wall anchored proteins, CWA). Адгезины семейства MSCRAMM имеют строгую последовательность доменов, включающую от N- к С-концу сигнальный домен, А-область с иммуноглобулин G-подобными N-доменами, В-повторы, область с дипептидными повторами серина и аспартата, домен для заякоривания белка в клеточной стенке с характерным мотивом LPTEG, трансмембранный домен, цитоплазматический домен (Barbu *et al.*, 2010). AidA – аутотранспортерный адгезин размером порядка 100 кДа, располагающийся в наружной мембране клеточной стенки протеобактерий (*E. coli*, в частности), экспортируемый из клетки по V типу секреции и отвечающий за адгезию к энтероцитам, агрегацию, биопленкообразование, синтез клеточной стенки/мембраны, везикулярный транспорт веществ (Ravi *et al.*, 2007; Christie, 2019). Адгезины BigA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=380185>) и MisL

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=237940>) синтезируются бактериями *S. enterica* и отвечают за их колонизацию в желудочно-кишечном тракте.

Описанные гены с консервативными доменами не аннотированы у *R. ruber* ИЭГМ 231, как отвечающие за синтез адгезинов. Кодлируемые этими генами продукты представляют собой белки с разными функциями: нерибосомные пептидсинтезирующие белки для синтеза сидерофоров, факторы инициации трансляции, нуклеазы, транспортеры, аминопептидазы, рибосомо-связывающие факторы, сенсорные белки, экспортируемые белки с неизвестной функцией (таблица 21). Обнаружение консервативных доменов адгезинов может быть связано с тем, что кодируемые этими генами продукты, как и адгезины, имеют области связывания с цитоплазматической мембраной либо клеточной стенкой, и эти области достаточно универсальны и ультраконсервативны вне зависимости от функции белка и таксономической принадлежности прокариотного организма.

Оставшиеся 5 кодирующих последовательностей *R. ruber* ИЭГМ 231 из таблицы 20 аннотированы как шапероны DnaK/белки теплового шока 70 и шаперонины GroEL. Они гомологичны (64–84% сходства, выравнивание от 1088 до 1590 п.н.) идентичным генам *M. tuberculosis*. Шаперонины – это белки “домашнего хозяйства”, участвующие в укладке других белков. Шапероны, включая белки теплового шока, участвуют в восстановлении третичной и четвертичной структуры белков, препятствуют агрегации молекул белков друг с другом. Показано, что в капсульном материале *M. tuberculosis* в больших количествах содержатся белки Cpn60.2 (GroEL) и DnaK (Hsp70). Известно, что капсула имеет значение при контакте *M. tuberculosis* с макрофагами. Экспериментально подтверждена адгезивная функция шаперонина Cpn60.2 в отношении макрофагов: данный шаперонин специфически связывается с рецепторами CD43 на поверхности макрофагов (Hickey *et al.*, 2009, 2010).

Обнаружение генов шаперонов и шаперонинов в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231, обладающих высоким сходством с такими же генами патогенных микобактерий, закономерно. Шаперонины и белки теплового шока обнаруживаются у всех

прокариотов. Их сходство свидетельствует скорее о родстве микобактерий и родококков, чем позволяет судить о спектре функций этих белков. Здесь же можно отметить тот факт, что кроме генов *M. bovis* и *M. tuberculosis* в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 не найдено генов адгезинов других патогенных актинобактерий. Одна из возможных причин – это доскональная изученность, по сравнению даже с другими патогенными актинобактериями, фенотипических и генотипических особенностей *M. tuberculosis* и близкородственных видов, что связано с высокой социальной значимостью туберкулеза и разработками в области получения вакцины БЦЖ. Изучены многие гены *M. tuberculosis*, установлена их роль в патогенезе туберкулеза, к этим генам есть аннотации. Еще одна причина – это отсутствие, в целом, в геноме *R. ruber* генов, гомологичных таковым кодирующим факторы вирулентности у патогенных актинобактерий. Паразитический образ жизни требует выработки у патогенов целого комплекса специфических приспособлений, которые подвергаются жесткому естественному отбору; кодирующие их гены достаточно быстро эволюционируют, и становится проблематичным найти гомологию с генами других бактерий.

Кроме последовательностей, представленных в таблице 21, в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 найдено еще 33 коротких последовательности длиной от 33 до 122 п.н., имеющие 70–88% сходства с фрагментами генов других актинобактерий, аннотированных как отвечающие за синтез (гипотетических) адгезинов. Анализ этих последовательностей не приведен в работе, т.к. полученные выравнивания слишком короткие (менее 1/10 от длины гена) и не представляются репрезентативными.

В геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 обнаружено два гена, кодирующих дигидролипоилдегидрогеназы LpD и AcoD. Ген *lpd* располагается в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 с 1200359 по 1201942 п.н. и имеет длину 1404 п.н., что соответствует 468 аминокислотам в конечном белке. Последовательность аминокислот в белке LpD на 100% идентична таковой в титансвязывающей дигидролипоамиддегидрогеназе *R. ruber* GIN1 (Siegmann *et al.*, 2009). Как отмечалось выше, это единственный описанный белковый адгезин непатогенных

родококков, он участвует в адгезии *R. ruber* GIN1 к диоксиду титана и угольным частицам (Gertler *et al.*, 2003; Siegmann *et al.*, 2009; Dayan *et al.*, 2017). Следует отметить, что штамм *R. ruber* ИЭГМ 231 при росте в среде LB проявляет высокую (68%) адгезивную активность в отношении полистирола, что может быть связано с экспрессией белка Lpd (одно из возможных объяснений высоких показателей адгезии, растущих в LB клеток отдельных штаммов родококков).

Глава 7. РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АДГЕЗИИ *RHODOCOCCUS*. ПОЛУЧЕНИЕ РАБОТАЮЩИХ ПРОТОТИПОВ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ

7.1. Метод количественной оценки адгезии родококков на основе инфракрасной термографии

В результате проведенных исследований 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). Недостатки метода – чувствительность к колебаниям температуры окружающей среды, влияние самой камеры на результаты измерений, рассеивание теплового излучения. На рисунке 36 показано, как на температурные показатели влияет отражение объектива. Самая теплая (красная) зона – участок образца непосредственно под объективом камеры. При этом видно, что лунки микропланшета с клетками нагреты сильнее, чем лунки без клеток (абиотический контроль), даже в зоне тепловой проекции объектива, то есть возникает нарушение градиента температур. Эффект отражения объектива инфракрасной камеры от поверхности адсорбента не может быть полностью устранен. Частично данный эффект может быть уменьшен за счет постановки камеры под небольшим углом. Компьютерное моделирование распределения температур на поверхности микропланшета с учетом расположения лунок с клетками и отражения объектива позволяет достаточно точно спрогнозировать изменения температуры в процессе адгезии. Теоретически рассчитанные температурные показатели не более, чем на $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, отличаются от экспериментально полученных значений. Таким образом,

при правильно подобранных условиях эксперимента и алгоритмов обработки данных, ИКТ может использоваться для прямой бесконтактной детекции тепла, вырабатываемого бактериями в процессе их жизнедеятельности.

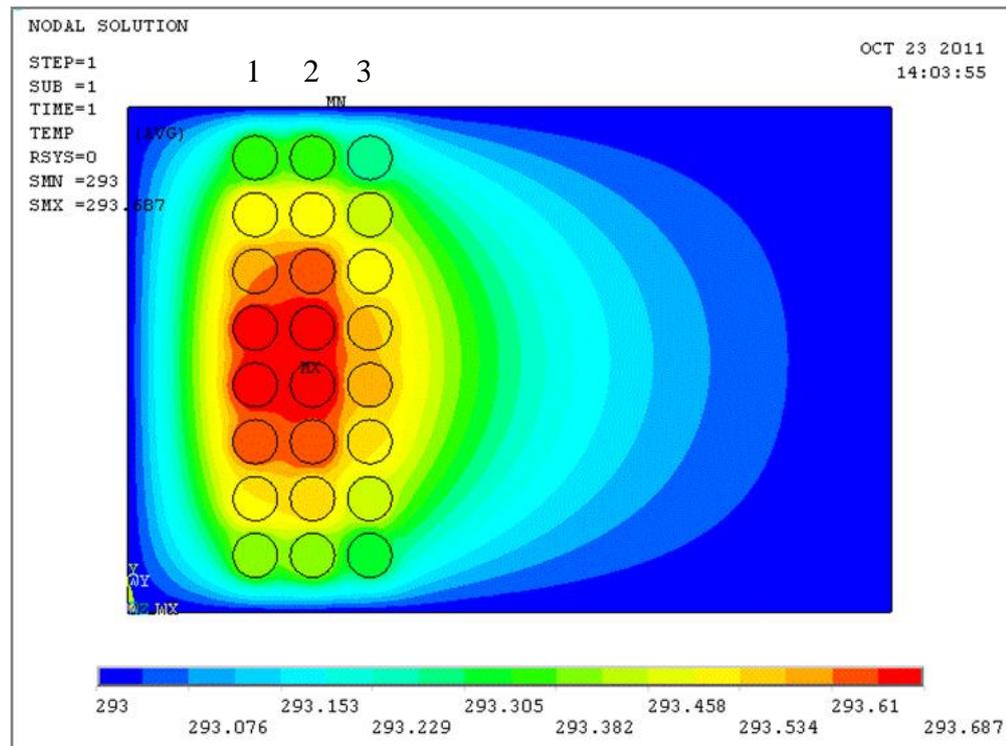


Рисунок 36 – Распределение температур на поверхности 96-луночного полистиролового микропланшета с клетками *R. ruber* ИЭГМ 342 по данным инфракрасной термографии. Варианты опыта: 1–2 – клеточная суспензия, 3 – стерильный 0,5% NaCl. Остальная часть планшета – пустые лунки.

В отличие от инфракрасной камеры, платиновые термометры сопротивления работают в режиме погружного действия и детектируют тепло, связанное не с инфракрасным излучением, а со столкновением/движением молекул в среде. Это контактный метод, малочувствительный к фоновым колебаниям температуры. При использовании термометров практически не происходят потери тепла, однако они не могут применяться для измерения температуры на поверхности подложек, их погружают в среду, контактирующую с подложкой. Термометрия с помощью платиновых термометров сопротивления

PR100 применяется в данной работе в качестве референтного метода по отношению к ИКТ.

Установлено, что температуры, измеренные с помощью инфракрасной камеры, на 1–2 К выше таковых, детектируемых с помощью термометров PR100, при этом температурные флуктуации, разница температур между бактериальной суспензией и абиотическим контролем и характер изменения температуры сходные (рисунок 37). Расхождение в значениях температур может быть связано с разным механизмом действия и различиями в условиях экспериментов. Как уже отмечалось выше, инфракрасная камера детектирует тепловое излучение (электромагнитное излучение в диапазоне длин волн 800–1400 нм), при этом на детектор попадает излучение от всего образца, т.к. сканирование происходит по всей площади подложки. Образцы для ИКТ помещают в термоизоляционный контейнер, чтобы минимизировать рассеяние теплового излучения. Принцип действия термометров сопротивления основан на измерении интенсивности движения молекул в жидкости: чем быстрее они двигаются, тем чаще сталкиваются с платиновой проволокой, тем больше энергии ей передают, в результате она нагревается и изменяется ее электрическое сопротивление. При этом термометры измеряют температуру локально, в небольшом объеме жидкости вокруг себя, и абсолютные значения детектируемой энергии могут быть меньше, чем при ИКТ. В отношении условий эксперимента, измерение температур с помощью термометров PR100 всегда проводят без использования термоизоляционного контейнера. Таким образом, два различных по принципу действия метода выдают разные абсолютные значения температур, однако детектируют одинаковые ее изменения. Использование термометров PR100 подтверждает данные, полученные с помощью ИКТ.

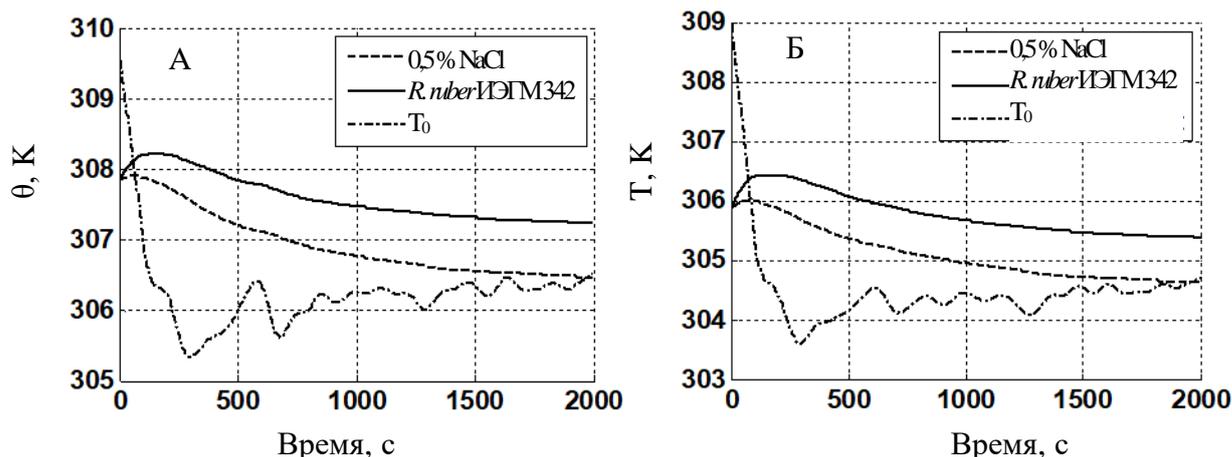


Рисунок 37 – Динамика изменения температуры в 96-луночных полистироловых микропланшетах с клетками *R. ruber* ИЭГМ 342. Метод детекции тепла: А – инфракрасная термография, Б – прецизионная термометрия с использованием платиновых термометров сопротивления PR100. Условные обозначения: θ – средняя температура в лунке планшета, К; T – экспериментальная температура по данным прецизионной термометрии, К; T_0 – фоновая температура (температура пустых лунок микропланшета), К.

Установлено, что при внесении в культуральный микропланшет 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, неинкулированные лунки сразу же начинают остывать, и через 35 мин (2000 с) температура достигает фоновых значений (рисунок 37). 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 графиком изменения тепловой мощности адгезии Q (Вт), показанным на рисунке 38. Тепловая мощность максимальна ($1,8 \cdot 10^{-3}$ – $2,7 \cdot 10^{-3}$ Вт) в начале эксперимента, то есть в начальный момент контакта клеток и подложки. Величина Q сразу же

начинает снижаться, при этом снижение происходит поэтапно: быстро в течение первых 100 с и медленно в течение последующих 400 с. Степень снижения составляет 6–9 раз. 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 (рисунок 37).

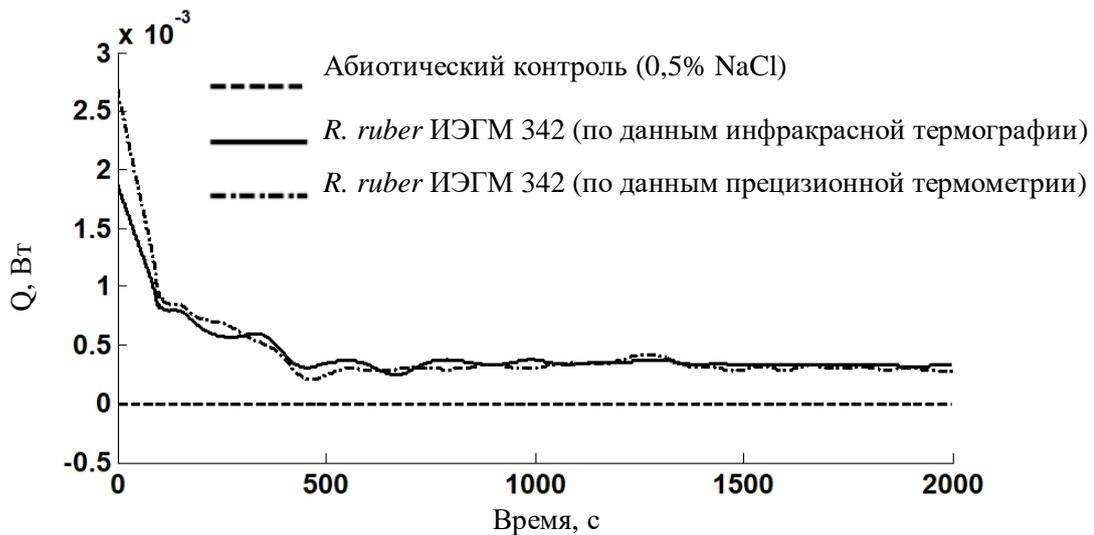


Рисунок 38 – Динамика изменения тепловой мощности адгезии клеток *R. ruber* ИЭГМ 342 к полистиролу

Разница температур между подложкой с прикрепленными клетками и без них может быть использована для определения типа расположения родококков. Как видно из таблицы 22, максимальные ($2,90\text{--}3,14\text{ }^{\circ}\text{C}$) показатели Δt характерны для монослойного расположения клеток, более низкие ($1,91\text{--}2,29\text{ }^{\circ}\text{C}$) значения Δt свидетельствуют о расположении клеток в виде скоплений, значения $\Delta t=1,38\text{ }^{\circ}\text{C}$ не позволяют судить о характере расположения. Величина Δt нелинейно зависит от количества прикрепленных клеток: значение $\Delta t=1,38\text{ }^{\circ}\text{C}$ обусловлено адгезией $2,1 \cdot 10^7$ КОЕ/см², $\Delta t=1,91\text{--}2,29\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответствует адгезии $18,0 \cdot 10^7\text{--}19,3 \cdot 10^7$ КОЕ/см², $\Delta t=2,90\text{--}3,14\text{ }^{\circ}\text{C}$ связано с адгезией $9,4 \cdot 10^7\text{--}14,0 \cdot 10^7$ КОЕ/см². При измерении температур на подложке в конце адгезионного процесса регистрируется тепло только от метаболических процессов. Очевидно, 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 22 – Прирост 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

Примечание. * 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 39). 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 39, 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 39).

Полученные по динамике адгезии клеток родококков данные согласуются с теорией молекулярной адсорбции Ленгмюра и уточненной на ее основе случайной секвенциальной теорией адсорбции коллоидных/взвешенных частиц (Кудряшева, Бондарева, 2019; Adamczyk *et al.*, 2005). В литературе известны сведения о зависимости микробной адгезии от концентрации микроорганизмов в суспензии, согласно которым количество прикрепленных клеток пропорционально исходной концентрации клеток в суспензии (C_0) до определенных пределов. Затем C_0 становится критической (насыщающей) концентрацией $C_{\text{крит}}$; при $C_0 \geq C_{\text{крит}}$ концентрация клеток на подложке не изменяется (Китова и др., 2004; Rochex *et al.*, 2004; Robledo-Ortíz *et al.*, 2010). Эта ситуация описывается классическим уравнением изотермы адсорбции Ленгмюра. Учитывая линейные размеры клеток родококков (в конце культивирования в среде LB это палочки длиной $(2,0 \pm 0,7)$ мкм и шириной $(0,5 \pm 0,2)$ мкм, встречаются делящиеся клетки V-образной формы), площадь контакта клеток с полистиролом в лунках 96-луночных культуральных микропланшетов (1,1, 1,8 или 2,2 см²), а также доступную площадь для покрытия клетками, составляющую 50% от общей площади носителя при ионной силе раствора 10^{-2} М (используемые в работе НФБ и 0,5% NaCl) и диаметре частиц >1 мкм (Adamczyk *et al.*, 2005), максимально возможная концентрация родококков на полистироле при условии их

монослойного расположения должна составлять $0,5 \cdot 10^8 - 1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/см². Эта величина достигается при исходной концентрации клеток в суспензии 10^{10} КОЕ/мл.

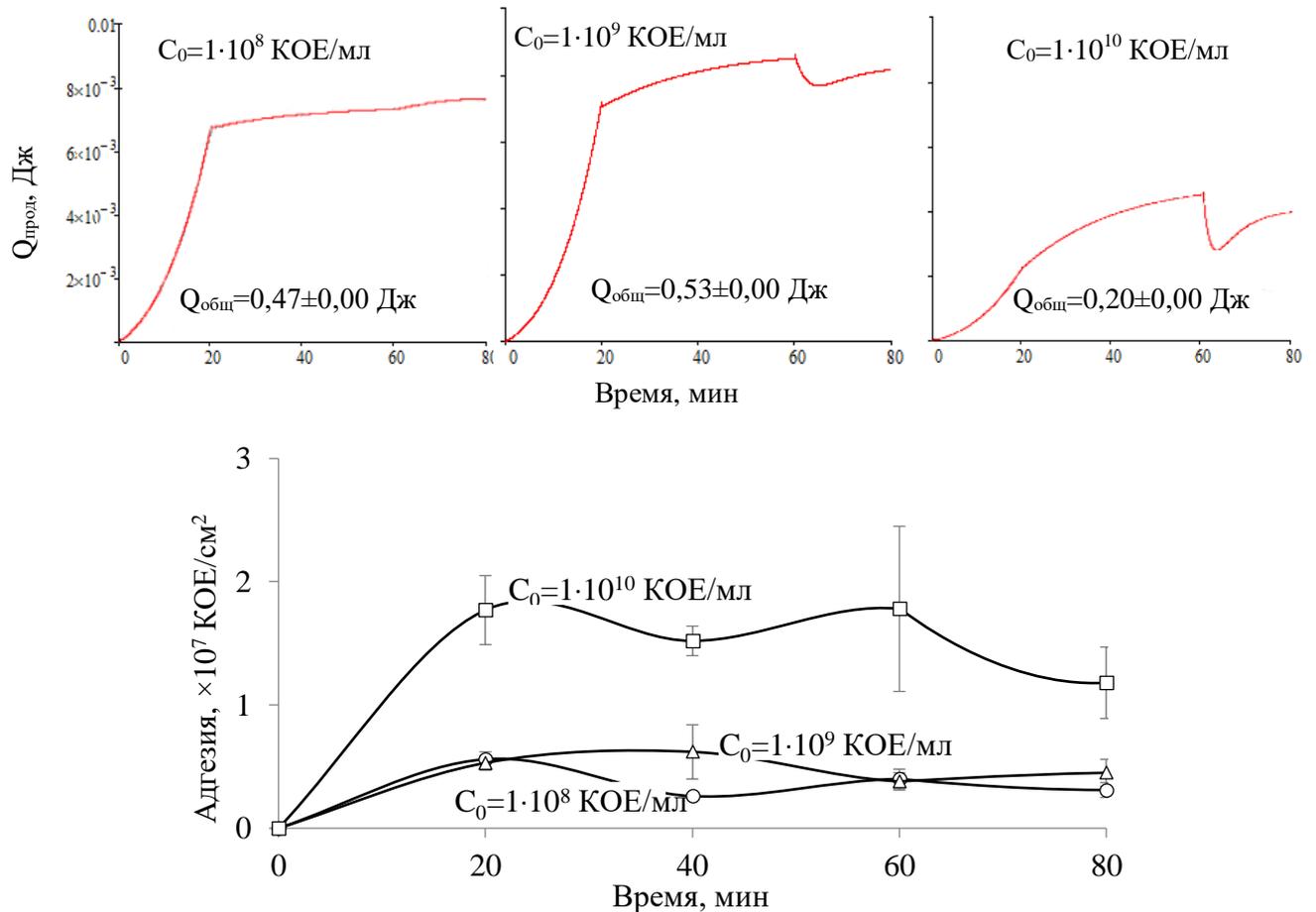


Рисунок 39 – Динамика изменения работы адгезии ($Q_{\text{прод}}$) и числа прикрепленных к полистиролу клеток *R. ruber* ИЭГМ 342 в зависимости от исходной концентрации клеток в суспензии C_0 . $Q_{\text{общ}}$ – суммарное количество тепла, выделившегося в процессе адгезии, Дж.

Адгезионный процесс условно можно разделить на две стадии: короткая стадия с выделением большого количества тепла и длинная стадия с постепенным выделением небольших количеств тепловой энергии. В момент первичного контакта значительная часть клеток прикрепляется к подложке практически одновременно, что сопровождается высвобождением большого количества энергии. Это первая стадия, ее продолжительность около 100 с. Именно в этот

временной промежуток наблюдаются повышение температуры в лунках микропланшета с бактериальной суспензией и максимальные значения тепловой мощности адгезии. Далее температура и показатель Q начинают снижаться, наступает вторая стадия. Поверхность подложки охлаждается в результате таких физических процессов, как теплообмен и испарение воды, которые достаточно интенсивны и преобладают над высвобождением энергии за счет адгезии. Высвобождение энергии продолжается, но менее интенсивно. Количество доступных сайтов связывания родококков с подложкой уменьшается, в единицу времени к ней прикрепляется меньше клеток, количество сайтов связывания уменьшается еще больше, и клеток прикрепляется еще меньше. Прикрепленные клетки продолжают связываться с подложкой. Многоочечная адгезия и заполнение всех сайтов на поверхности подложки – длительный процесс, который может продолжаться в течение нескольких суток (Adamczyk *et al.*, 2005). Первая и вторая стадии выделения тепла при адгезии не соответствуют первой и второй фазам адгезии, связанным с преодолением первичного и вторичного максимумов клетками при сближении с подложкой (Hori, Matsumoto, 2010; Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018). В экспериментах с полистироловыми микропланшетами родококки суспендированы в 0,5% NaCl – растворе с высокой ионной силой (Adamczyk *et al.*, 2005). В этих условиях не происходит преодоления энергетического барьера (Hori, Matsumoto, 2010; Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018).

Согласно динамике изменения работы адгезии $Q_{\text{прод}}$, после достижения постоянного значения тепловой мощности, продукция тепла продолжается еще на протяжении 60–80 мин (рисунок 39). При этом метаболические процессы могут вносить вклад в конечную разницу температур между бактериальной суспензией и абиотическим контролем. Можно предположить, что значение тепловой мощности $3 \cdot 10^{-4}$ Вт – это тепловая мощность метаболизма нерастущих клеток родококков, поскольку это значение остается неизменным до конца периода измерений. Между 100 и 500 с тепловая мощность адгезии еще высока и детектируется через показатели температуры, после 500 с к подложке

прикрепляется так мало клеток, что детектор, возможно, фиксирует только тепло от метаболических реакций.

7.2. Подбор оптимальных подложек для прикрепления клеток родококков

В качестве подложек для адгезии клеток родококков испытывали различные материалы органического и неорганического происхождения. Природные органические материалы (древесные опилки, представляющие собой отходы деревообрабатывающей промышленности, адсорбенты на основе остатков кукурузы и куриные перья – отходы сельского хозяйства, обрезки кожи – отходы кожевенного производства) – относительно доступные, дешевые, биоразлагаемые. Неорганические материалы (керамзит и КВУ) не разлагаются и относятся к категории высоко инертных материалов, что гарантирует отсутствие их влияния на природные экосистемы в случае использования в биоремедиации.

Как видно из рисунка 40, подложки различаются по продолжительности адгезии и количеству прикрепленных клеток, тогда как динамика адгезии имеет сходный характер независимо от материала подложки и подобна таковой при адгезии родококков к полистиролу. Продолжительность адгезии родококков к большинству подложек составляет 2–3 сут, при использовании минеральных адсорбентов (керамзит, КВУ) адгезия завершается в течение 1 сут, дольше всего (6 сут) родококки закрепляются на поверхности прокипяченных куриных перьев. Продолжительность адгезии родококков к полистиролу при тех же условиях ($C_0=1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) составляет всего 20 мин. Такое несоответствие может быть связано с несколькими факторами: (1) в микропланшетах выражены капиллярные эффекты (образование малоподвижного, связанного слоя воды) и не так интенсивно происходит перемешивание по сравнению с перемешиванием в колбах; (2) разное количество доступных сайтов связывания клеток, обусловленное различиями в площади контакта клеток и адсорбента. В случае полистироловых микропланшетов суммарная площадь контакта меньше и, следовательно, меньше число сайтов связывания клеток, чем в вариантах опыта с диспергированными адсорбентами. Увеличенное количество сайтов связывания

приводит к тому, что они дольше заполняются клетками, это способствует увеличению длительности процесса адгезии.

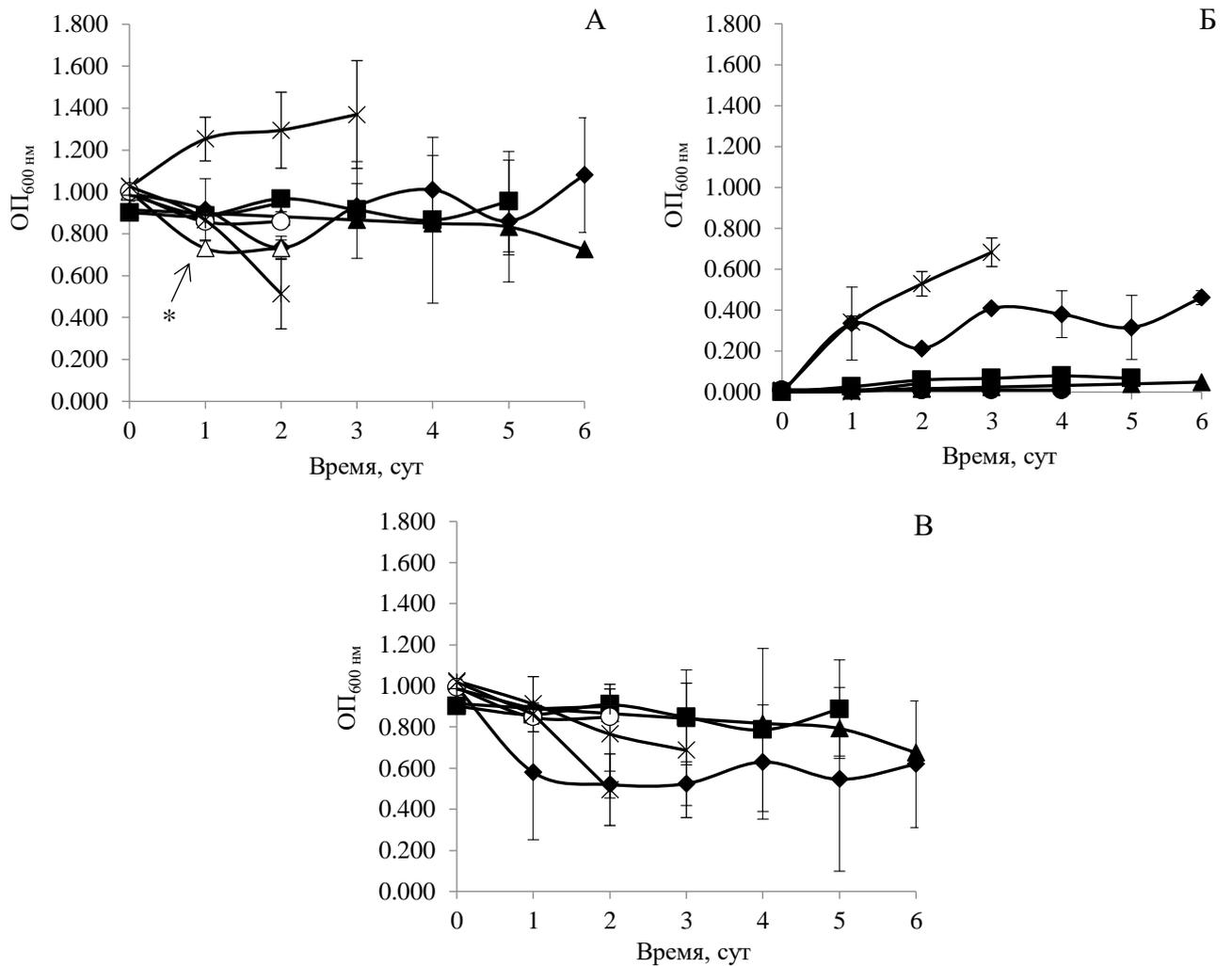


Рисунок 40 – Динамика адгезии родококков к немодифицированным подложкам. Представлены графики изменения $OP_{600\text{ nm}}$: А – клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 и ИЭГМ 346 (средние значения по двум штаммам) в присутствии подложки, Б – неинокулированного НФБ с подложкой (контроль), В – клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 и ИЭГМ 346 в присутствии подложки с учетом контроля ($B = A - B$). Обозначения: ◆ – древесные опилки, ■ – куриные перья (дезинфекция этанолом), ▲ – куриные перья (дезинфекция кипячением), × – кожаные отходы, + – кукурузный адсорбент Loss Trol ХТС, * – кукурузный адсорбент Loss Trol ХТФ, ○ – керамзит, Δ – КВУ, * – стационарные условия адгезии.

Материалы на основе древесных опилок, кожевенных отходов и КВУ разрушаются при перемешивании. Этот процесс сопровождается значительным (на 0,683 опт. ед.) увеличением показателя $OP_{600\text{ нм}}$ буферного раствора в контроле (рисунок 40Б). КВУ разрушается практически полностью в течение 1 сут, в случае кожевенных отходов после 3 сут среда становится темно-коричневой, и для этих носителей дальнейшие спектрофотометрические измерения оказываются невозможны. В этой связи адгезия родококков к КВУ и адсорбентам на основе кожевенных отходов может происходить только в стационарных условиях. В случае древесных опилок эффект разрушения носителя выражен менее сильно и не регистрируется после 1 сут.

Выявлено поэтапное повышение числа клеток родококков на модифицированных подложках. В течение 1–2 сут на них закрепляется от 48 до 74% клеток, затем скорость адгезии существенно снижается. На древесных опилках и кожевенных отходах, обработанных 10 вес. % силиконовой эмульсии в последние сутки даже наблюдается резкое увеличение скорости адгезии (рисунок 41). В случае равноценности сайтов связывания клеток изменение числа прикрепившихся родококков должно носить экспоненциальный характер на протяжении всего процесса, график адгезии не должен иметь дополнительных точек перегиба, кроме выхода на плато. В случае неравноценности сайтов связывания клеток на графиках появляются точки перегиба, свидетельствующие об изменении скорости адгезии. Показано влияние поверхностно-модифицирующих агентов на механическую прочность подложек. Как видно из рисунка 41Б, $OP_{600\text{ нм}}$ в НФБ с модифицированными древесными опилками без клеток в конце эксперимента не превышает 0,164, тогда как при использовании нативных опилок этот показатель составляет 0,461.

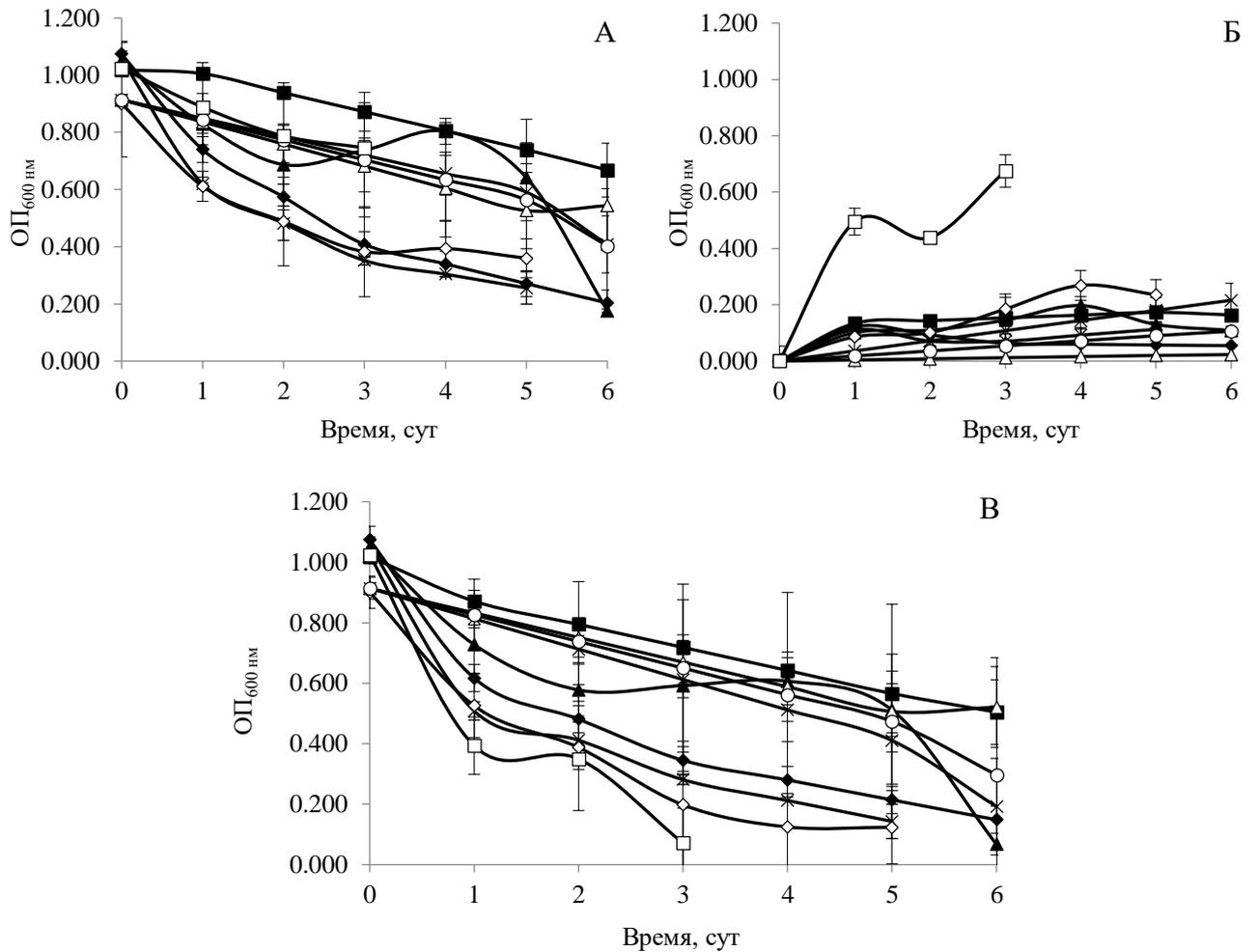


Рисунок 41 – **Динамика адгезии родококков к модифицированным подложкам.** Представлены графики изменения $OP_{600\text{ nm}}$ для: А – клеток в присутствии подложки, Б – неинкулированного НФБ с подложкой (контроль), В – клеток в присутствии подложки с учетом контроля ($V = A - B$). Условные обозначения: ■ – древесные опилки + 10 вес. % олифы, ▲ – древесные опилки + 10 вес. % силиконовой эмульсии, ◆ – древесные опилки + 10 вес. % смеси парафинов, * – древесные опилки + 10 вес. % *n*-гексадекана, ◇ – куриные перья (дезинфекция этанолом) + 10 вес. % олифы, × – куриные перья (дезинфекция этанолом) + 10 вес. % силиконовой эмульсии, △ – куриные перья (дезинфекция кипячением) + 10 вес. % олифы, ○ – куриные перья (дезинфекция кипячением) + 10 вес. % силиконовой эмульсии, □ – кожаные отходы + 10 вес. % силиконовой эмульсии.

Для стабилизации эмульсий поверхностно-модифицирующих агентов в воде использовали различные эмульгаторы. Применение ПВС для стабилизации водной эмульсии 10–20 вес. % олифы способствует увеличению числа прикрепленных родококков в 2 раза по сравнению с использованием раствора олифы в уайт-спирите (рисунок 42). При этом степень адгезии к модифицированным адсорбентам составляет $80\pm 2\%$, или $37,5\pm 1,6$ мг АСВ клеток/г, клетки прикрепляются в виде клеточных скоплений. Применение ПВС приводит к адсорбции олифы на материале подложки в виде капель. Кроме того, молекулы ПВС создают дополнительные сайты связывания родококков, о чем свидетельствует появление точки перегиба на 4-ые сутки (рисунок 42). Однако полученные с применением ПВС кондиционирующие пленки не отличаются высокой устойчивостью и в условиях перемешивания разрушаются, о чем свидетельствует увеличение $ОП_{600\text{ нм}}$ в контроле до значения 0,500 (рисунок 42). Использование других стабилизаторов эмульсий не оказывает видимых эффектов на способность модифицированных адсорбентов связывать родококки. Применение метилцеллюлозы даже, наоборот, приводит к тому, что родококки не прикрепляются к молифицированной подложке (рисунок 42), что может быть обусловлено образованием на подложке гидратной оболочки из метоксигрупп (Bunt *et al.*, 1995).

Использование смесей поверхностно-модифицирующих агентов, состоящих из полярных *Rhodococcus*-биосурфактантов и неполярных веществ (олифа, *n*-гексадекан), приводит к сокращению периода адгезии до 1 сут, но незначительно влияет на степень адгезии родококков (рисунок 43).

В качестве наиболее пригодной подложки для биокатализаторов выбраны древесные опилки, обработанные 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов. Они обладают 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, высокая (96%) удерживающая способность, монослойное равномерное расположение клеток, прочность покрытия, достаточно короткое (2–3 сут) время адгезии (рисунок 43).

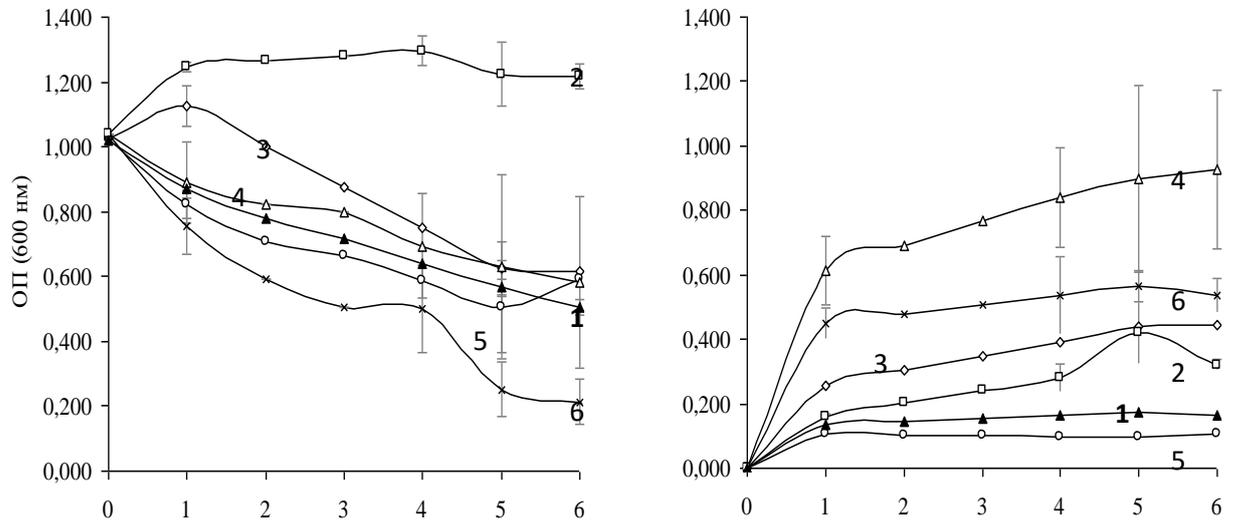


Рисунок 42 – Динамика адгезии родококков к древесным опилкам в зависимости от способа нанесения 20 вес. % олифы. Варианты опыта: слева – подложка с прикрепленными клетками, справа – подложка без клеток. Нанесение олифы в виде: 1 – раствора в уайт-спирите; 2 – водной эмульсии, стабилизированной метилцеллюлозой; 3 – водной эмульсии, стабилизированной Твином-80; 4 – водной эмульсии, стабилизированной карбоксиметилцеллюлозой; 5 – водной эмульсии, стабилизированной изопропанолом; 6 – водной эмульсии, стабилизированной ПВС.

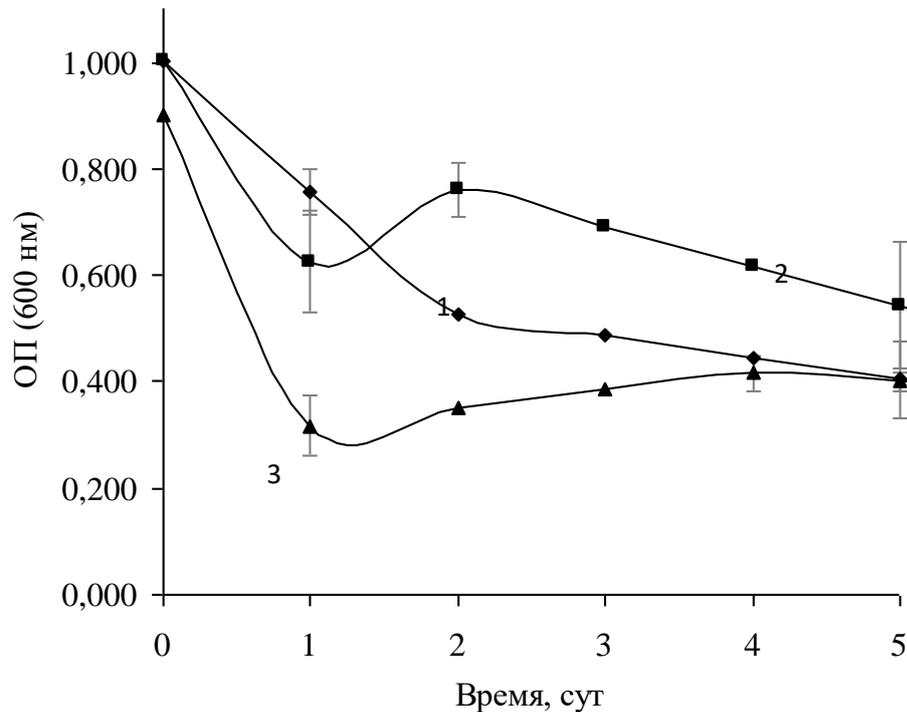


Рисунок 43 – Динамика адгезии родококков к древесным опилкам, обработанным с применением *Rhodococcus*-биосурфактантов. Поверхностно-модифицирующие агенты: 1 – 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактанты; 2 – 10 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактанты + 10 вес. % олифы; 3 – 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактанты + 10 вес. % *n*-гексадекан.

7.3. Биокатализаторы на основе прикрепленных клеток родококков для деградации нефтяных углеводородов

Получены прототипы биокатализаторов на основе прикрепленных клеток родококков. Они апробированы в процессах окисления индивидуальных углеводородов, их смесей и сырой нефти в водной и почвенной среде. На рисунке 44 представлены данные по убыли *n*-гексадекана и скорости его биodeградации прикрепленными клетками родококков. Данные показатели в 2–5 раз превышают либо не отличаются от аналогичных показателей планктонных клеток. Максимальная, $61,87 \pm 3,00$ мг/(л·ч), скорость биodeградации *n*-гексадекана выявлена в отношении клеток родококков, закрепленных на древесных опилках, обработанных *Rhodococcus*-биосурфактантами.

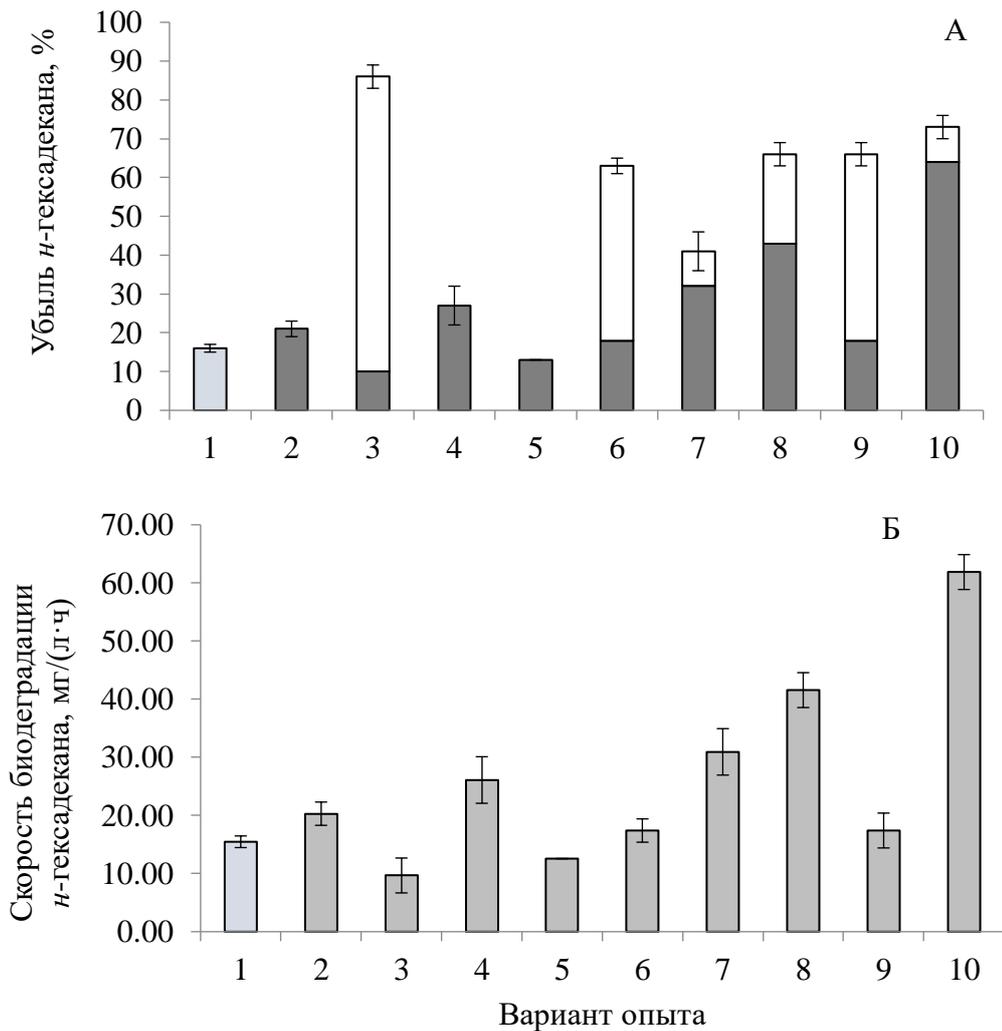


Рисунок 44 – **Биодеградация *n*-гексадекана планктонными и прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 в течение 10 сут.** Оцениваемые параметры: А – убыль *n*-гексадекана, В – скорость биодеградации *n*-гексадекана. Варианты опыта: 1 – планктонные клетки, 2–10 – клетки, прикрепленные к подложкам, таким 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 – биодеградация, II – адсорбция.

По нашим предположениям, убыль и скорость биодegradации углеводов планктонными и прикрепленными родококками могут зависеть от нескольких факторов, в частности, от величины общей площади контакта клеток с окисляемым веществом, количества клеток в замкнутой биокаталитической системе, удельной активности клеток, доступности углеводов, расположения клеток на подложке, гидродинамических условий. Такие факторы, как удельная активность, количество и расположение клеток уже обсуждались в работе. Удельная активность характеризует “метаболическую мощность” индивидуальных клеток. Чем больше таких эффективных “фабрик ферментов”=клеток в биокаталитической системе, тем быстрее и интенсивнее происходит процесс биодegradации. Однако положительный эффект от увеличения числа клеток имеет пределы. При большой плотности клеток, как в случае высококонцентрированных суспензий, культур планктонных клеток в стационарной фазе роста или клеток, прикрепленных к подложкам, обработанным *n*-гексадеканом или силиконовой эмульсией, образуются клеточные скопления, внутри которых индивидуальные клетки частично теряют метаболическую активность. Равномерное монослойное, достаточно свободное расположение клеток на подложке создает наиболее оптимальные условия для окисления углеводов. Важно сочетание факторов: высокая каталитическая активность отдельных клеток, монослойное расположение и максимально возможное при таком расположении количество клеток обеспечивают наиболее высокую скорость биодegradации. Количество прикрепленных клеток может быть увеличено путем получения более мелкодисперсной формы подложки или внесения ее в большем количестве, но это может повлиять на процессы перемешивания и аэрации и, наоборот, привести к снижению эффективности биодegradации. Ниже более детально обсуждается влияние таких факторов, как площадь контакта, доступность субстрата и гидродинамические условия.

Влияние площади контакта. Исходная площадь контакта планктонных клеток с углеводородом составляет примерно 180 см². Посчитан показатель следующим образом. Средние размеры отмытых от LB, находящихся в поздней

экспоненциальной-ранней стационарной фазах роста клеток составляют $0,5 \times 2,0$ мкм. Условно принимаем, что клетки имеют форму цилиндров. Считаем площадь цилиндра:

$$S_{\text{клетки}} = 2\pi r(h+r) = 2\pi \cdot 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ м} \cdot (2 \cdot 10^{-6} \text{ м} + 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ м}) = 3,5325 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2 \quad (21),$$

где $S_{\text{клетки}} = S_{\text{цилиндра}}$ – площадь одной клетки, м^2 ; r – радиус клетки, $0,25 \cdot 10^{-6}$ м; h – длина клетки = высота цилиндра, м. Число свободных клеток (N) составляет $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл ($\text{ОП}_{600 \text{ нм}}=1$) $\cdot 50$ мл (объем суспензии) = $5 \cdot 10^9$ КОЕ. Считаем, что клетки контактируют всей поверхностью с n -гексадеканом. Тогда общая площадь $S_{\text{общ}} = S_{\text{клетки}} \cdot N = 3,5325 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2 \cdot 5 \cdot 10^9 \text{ КОЕ} = 1,77 \cdot 10^{-2} \text{ м}^2$, при округлении это примерно 180 см^2 .

Площадь контакта клеток родококков, закрепленных на древесных опилках, с n -гексадеканом составляет 270 см^2 . Площадь отдельной частицы опилок (принимаем, что ее геометрическая форма соответствует параллелограмму) равна:

$$S_{\text{частицы}} = 2(ab+bc+ac) = 2 \cdot (3 \cdot 10^{-3} \text{ м} \cdot 1 \cdot 10^{-3} \text{ м} + 1 \cdot 10^{-3} \text{ м} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ м} + 3 \cdot 10^{-3} \text{ м} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ м}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ м}^2 \quad (22),$$

где a – длина отдельной частицы, $3 \cdot 10^{-3}$ м; b – ширина частицы, $1 \cdot 10^{-3}$ м; c – высота частицы, $0,5 \cdot 10^{-3}$ м. В 1 г сосновых древесных опилок содержится 2700 частиц. Отсюда $S_{\text{общ}} = 2700 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \text{ м}^2 = 2,7 \cdot 10^{-2} \text{ м}^2$.

Из теории катализа известно, что скорость гетерофазных процессов возрастает при увеличении площади контакта катализатора и субстрата (Зимон, 2006). Таким образом, наблюдается прямая пропорциональная зависимость между метаболической активностью родококков и площадью контакта поверхности “биокатализатора” с субстратом. Кроме того, планктонные клетки находятся достаточно плотно в межфазном пространстве и могут испытывать диффузионные затруднения при окислении n -гексадекана. Закрепленные на подложке клетки разобщены друг от друга в пространстве и получают более свободный доступ к углеводородному субстрату и кислороду.

Доступность субстрата. Адсорбция углеводородов на подложке может вносить существенный вклад в снижение их концентрации в среде культивирования. Так, материалы на основе куриных перьев адсорбируют от 45

до 76% *n*-гексадекана, убыль *n*-гексадекана при этом составляет 63–86% (рисунок 42). Нами, однако, не выявлено положительной корреляции между количеством адсорбированных углеводов и интенсивностью их окисления прикрепленными клетками. Более важным фактором представляется расположение подложки с прикрепленными клетками в двухфазной системе. Поверхностно-модифицирующие агенты не только могут усиливать процесс бактериальной адгезии, но и способствуют изменению степени гидрофобности подложек. Так, исходно гидрофильные подложки, располагающиеся в двухфазной системе углеводород/вода в водной фазе, после модификации располагаются на границе раздела двух фаз. Именно в межфазном пространстве происходит окисление углеводов.

Гидродинамические условия. Подложки на основе кожевенных отходов и нативные древесные опилки располагаются в воде. Однако скорость биодegradации *n*-гексадекана родококками, закрепленными на кожевенных отходах, в 2 раза меньше таковой родококками, закрепленными на необработанных опилках (см. рисунок 42). Кожевенные отходы неустойчивы к механическому воздействию и разрушаются при перемешивании на орбитальном шейкере, поэтому манипуляции с ними проводятся в стационарных условиях. Отсутствие перемешивания, по-видимому, отрицательно влияет на аэрацию и контакт клеток с углеводородным субстратом, что отражается на эффективности процесса биодegradации.

Нами отобрана наиболее оптимальная подложка для прикрепления родококков. Это древесные опилки, обработанные 5 вес. % *Rhodococcus*-биосурфактантов. Данная подложка обладает 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, максимальная ($61,87 \pm 3,00$ мг/(л·ч)) скорость биодegradации

n-гексадекана закрепленными на подложке клетками. В плане экономической целесообразности, *Rhodococcus*-биосурфактанты также имеют преимущества по сравнению, например, с олифой. Обработка древесных опилок биосурфактантами не будет приводить к существенным дополнительным трудозатратам и материальным вложениям в условиях непрерывного производства по получению биопрепаратов на основе родококков для биоремедиации. Такое производство может включать линию по получению биосурфактантов как компонента олеофильного биоудобрения (Куюкина, Ившина, 2002) и самостоятельного нефтеотмывающего агента (Kuyukina, Ivshina, 2019b).

Как видно из таблицы 23, нами получены работающие прототипы биокатализаторов на основе *Rhodococcus* spp., иммобилизованных на модифицированных древесных опилках. Отбор штаммов проводили на основании их адгезивной активности в отношении твердых поверхностей (см. таблицу 5). Полученные биокатализаторы способствуют деградации 34–77% модельной и сырой нефти, а также смеси ПАУ, в водной среде и почве при исходном уровне загрязнения 0,05–10 вес. % в течение 21–196 сут. Выявленный уровень биодеградации в 1,3–8,0 раз превышает таковой для биокатализаторов на основе планктонных клеток (таблица 23) и сопоставим или в 2–3 раза превышает эффективность биодеградации нефтяных углеводородов другими иммобилизованными микроорганизмами. По данным литературы, например, степень биодеградации сырой нефти, мазута и фенантрена с помощью микробных топливных элементов, бактериальных монокультур и специально подобранных микробных ассоциаций, включающих в том числе представителей рода *Rhodococcus*, иммобилизованных на поверхности полимеров, растительных отходов или в природных полимерных гелях, в почвенных и пресных водных средах составляет от 24 до 66% при исходном уровне загрязнения 0,01–1,6 вес. % через 10–66 сут (Morris *et al.*, 2012; Annie *et al.*, 2020; Catania *et al.*, 2020; Dou *et al.*, 2021; Naloka *et al.*, 2021).

Таблица 23 – Биодegradация углеводородных загрязнителей с помощью биокатализаторов на основе планктонных или прикрепленных клеток *Rhodococcus* spp.

Условия эксперимента	Загрязнитель	Уровень загрязнения, вес. %	Продолжительность биодegradации, 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.

Установлено, что численность углеводородокисляющих бактерий в загрязненной воде и почве после внесения прикрепленных родококков в 2–15 раз выше, чем в средах с планктонными клетками (рисунок 45). В модельной почве отмечается сильный рост внесенных планктонных клеток. Их численность увеличивается в 27 раз через 7 сут, тогда как для варианта с прикрепленными клетками данный показатель увеличивается лишь в 8 раз. Однако через 35 сут в варианте с планктонными клетками количество углеводородокисляющих бактерий снижается практически до исходного ($1 \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы) значения, тогда как в почве с иммобилизованным биокатализатором их численность сохраняется на высоком ($15 \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы) уровне. Следует отметить, что определенные показатели численности бактерий не совсем корректно отображают реальную численность в вариантах опыта с прикрепленными родококками. Родококки прочно прикрепляются к подложке и в иммобилизованном состоянии

не учитываются при высеве на твердые питательные среды. Так, в жидкой среде с модельной нефтью количество клеток в варианте опыта с иммобилизованным биокатализатором в 2 раза превышает количество клеток в варианте опыта с планктонными клетками через 14 и 21 сут. При этом дыхательная активность иммобилизованной культуры более, чем в 3 раза превышает таковую культуры планктонных клеток. Полученная разница в показателях дыхательной активности и КОЕ, по-видимому, обусловлена тем, что прикрепленные клетки не учитываются при подсчете КОЕ. Очевидно также, что прикрепленные родококки растут в присутствии нефти, на подложке образуется биопленка, часть клеток переходит в планктонное состояние, новые планктонные клетки продолжают расти, и это приводит к увеличению общей численности углеводородокисляющих бактерий в среде. Присутствие в загрязненной среде подложки с прикрепленными родококками обеспечивает стабильный рост культуры углеводородокисляющих родококков и поддержание их высокой функциональной активности.

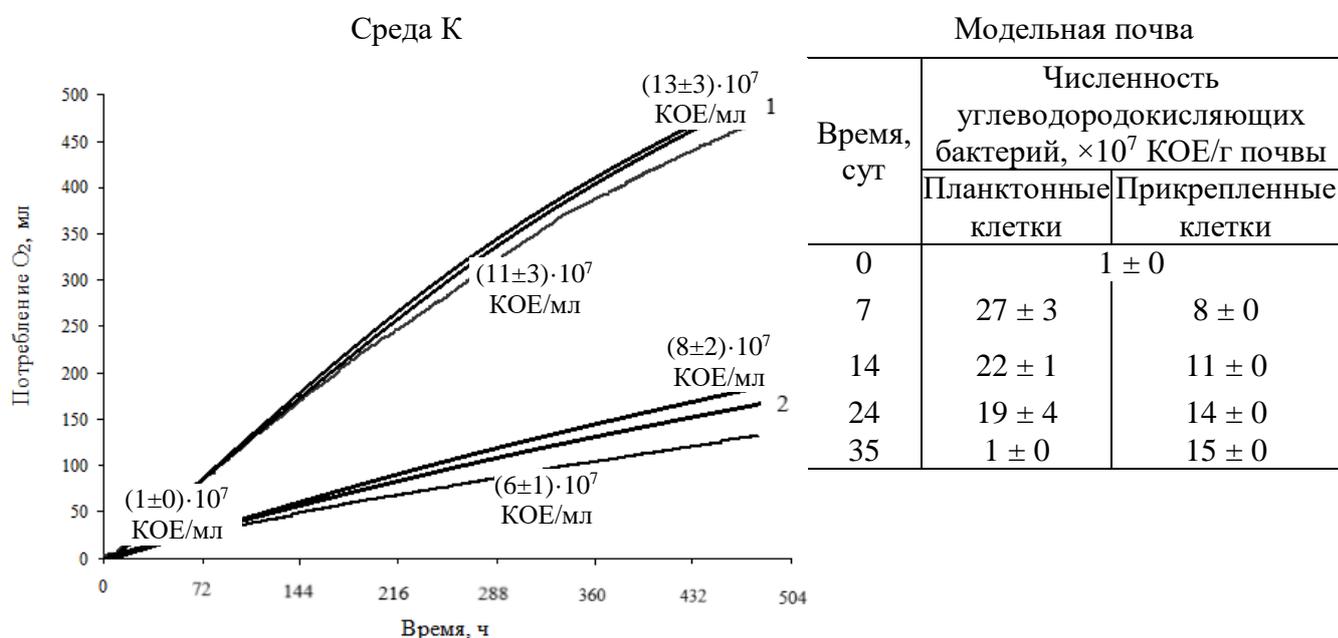


Рисунок 45 – Изменение дыхательной активности и численности углеводородокисляющих бактерий в процессе биодegradации модельной нефти с применением биокатализаторов на основе планктонных (1) и прикрепленных (2) клеток *R. ruber* ИЭГМ 231

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование адгезивных свойств углеводородокисляющих актинобактерий рода *Rhodococcus*. Определена роль адгезии в адаптации родококков к присутствию в среде углеводов. Экспериментально обосновано, что адгезия является универсальной ответной реакцией родококков на присутствие в среде газообразных, жидких и твердых углеводов и необходимым пусковым фактором процесса их окисления. Присутствие углеводов 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 действия 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 цитoadгезивные 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 (Тn5-мутагенез). 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.

Однако 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. Угледородоокисляющая 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 °C 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 клеточной 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 ($\Delta t = 0,60 - 3,14$ °C, $Q = 0,3 \cdot 10^{-3} - 2,7 \cdot 10^{-3}$ 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. Tn5-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, тяжелей 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 окружающей средой определять количество прикрепленных клеток, характер их

распределения на твердой поверхности и динамику адгезии родококков на начальных этапах прикрепления клеток. Показано, что $\Delta t=2,90-3,14$ °C соответствует адгезии $9,4 \cdot 10^7-14,0 \cdot 10^7$ КОЕ/см² и монослойному расположению клеток, $\Delta t=1,91-2,29$ °C соответствует адгезии $18,0 \cdot 10^7-19,3 \cdot 10^7$ КОЕ/см² и расположению клеток в виде скоплений, $\Delta t \leq 1,38$ °C соответствует адгезии $\leq 2,1 \cdot 10^7$ КОЕ/см² без определения типа расположения клеток; $Q_{\text{прод}}=7,2 \cdot 10^{-3}-8,2 \cdot 10^{-3}$ 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 соответствует 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 СОКРАЩЕНИЙ

АСВ – абсолютно сухой вес

АСМ – атомно-силовая микроскопия, атомно-силовой микроскоп

ВПВ – внеклеточные полимерные вещества

ДЛВО – теория Дерягина-Ландау-Вервея-Овербека

ИКТ – инфракрасная термография

ИНТ – йодонитротетразолиум фиолетовый

КВУ – каталитический волокнистый углерод

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, конфокальный лазерный сканирующий микроскоп

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛАМ - липоарабиноманнан

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

НФБ – натрий-фосфатный буфер

ОП – оптическая плотность

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

п.н. – пара нуклеотидов

ПВС – поли(виниловый спирт)

ЭПС – экзополисахариды

CDS – coding sequence = кодирующая последовательность

К – среда “Киевская”

LB – среда Лурия-Бертани (Luria-Bertani)

LBA – агаризованная среда LB

LLPE – жидкостная экстракция низкого давления (liquid low pressure extraction)

MATH – микробная адгезия к углеводородам (microbial adhesion to hydrocarbons)

MATS – микробная адгезия к растворителям (microbial adhesion to solvents)

OMP – белки наружной мембраны (outer membrane proteins)

RS – среда “*Rhodococcus-surfactant*”

SAT – метод солевой агрегации (salt aggregation test)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелян, В.А. Новый метод иммобилизации клеток микроорганизмов поперечной сшивкой / В.А. Абелян // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36, № 3. – С. 359–364.
2. Бухарин, О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин [и др.]. – М.: Медицина, 2005. – 367 с.
3. Васильченко, А.С. Исследование морфо-функциональной реакции бактерий на различные воздействия с использованием атомно-силовой микроскопии: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.03 / Васильченко Алексей Сергеевич. – 2012. – 123 с.
4. Веслополова, Е.М. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов / Е.М. Веслополова // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 2. – С. 279–284.
5. Выдрякова, Г.А. Формирование агрегированных структур светящимися бактериями в присутствии углеводов / Г.А. Выдрякова, Т.В. Кирпиченко, А.А. Лифантьева // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 282–284.
6. Глазачева, Л.Е. Клеточные приспособления *Rhodococcus rhodochrous* и *Rhodococcus ruber*, усваивающих пропан и *n*-бутан / Л.Е. Глазачева, И.Б. Ившина, А.А. Оборин // Микробиология. – 1990. – Т. 59, вып. 2. – С. 301–306.
7. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
8. Ефременко, Е.Н. Иммобилизованные клетки в биокатализаторах и биопленках: свойства и общие закономерности их изменения / Е.Н. Ефременко // Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы / Под ред. Ефременко Е.Н. – М.: РИОР, 2018. – С. 17–61.
9. Заварзин, Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А. Заварзин. – М.: Наука, 2003. – 348 с.

10. Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова. – М.: Книжный дом “Университет”, 2001. – 256 с.
11. Зимон, А.Д. Физическая химия / А.Д. Зимон. – М.: Агар, 2006. – 320 с.
12. Ившина, И.Б. Состояние и проблемы развития специализированных центров микробиологических ресурсов в России / И.Б. Ившина // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 551–560.
13. Ившина, И.Б. Большой практикум “Микробиология”: Учебное пособие / И.Б. Ившина. – М.: Проспект Науки, 2014. – 112 с.
14. Ившина, И.Б. Электронномикроскопическое изучение факультативных газоиспользующих *Rhodococcus rhodochrous* / И.Б. Ившина [и др.] // Микробиология. – 1982. – Т. 51, вып. 3. – С. 477–481.
15. Ившина, И.Б. Пропанокисляющие родококки / И.Б. Ившина, Р.А. Пшеничнов, А.А. Оборин. – Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. – 123 с.
16. Ившина, И.Б. Эффективное извлечение цезия клетками бактерий рода *Rhodococcus* / И.Б. Ившина, Т.А. Пешкур, В.П. Коробов // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 3. – С. 418–423.
17. Ившина, И.Б. Адаптационные механизмы выживания алканотрофных родококков, реализованные в неблагоприятных условиях среды / И.Б. Ившина, Т.Н. Каменских, Б.А. Анохин // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2007. – № 5(10). – С. 107–112.
18. Каталог штаммов региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. И.Б. Ившиной. – М.: Наука, 1994. – 163 с.
19. Киричук, О.П. Оценка активационных возможностей твердофазных поверхностей по скорости адгезии клеток крови / О.П. Киричук [и др.] // Трансляционная медицина. – 2019. – Т. 6, № 3. – С. 53–60.
20. Китова, А.Е. Деградация 2,4-динитрофенола свободными и иммобилизованными клетками *Rhodococcus erythropolis* HL PM-L / А.Е. Китова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 3. – С. 307–311.

21. Коваленко, Г.А. Имобилизованные нерастущие микроорганизмы и их лизаты для одноферментных биокаталитических процессов / Г.А. Коваленко, Л.В. Перминова, А.Б. Беклемишев // Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы / Под ред. Ефременко Е.Н. – М.: РИОР, 2018. – С. 61–96.
22. Коваленко, Г.А. Углеродные материалы как адсорбенты для биологически активных веществ и бактериальных клеток / Г.А. Коваленко [и др.] // Коллоидный журнал. – 1999. – Т. 61, № 6. – С. 787–795.
23. Коронелли, Т.В. Поверхностно-активные свойства некоторых штаммов углеводородокисляющих бактерий / Т.В. Коронелли, С.Г. Юферова // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 1990. – № 1. – С. 14–18.
24. Костина, Л.В. Аккумуляция солей тяжелых металлов клетками актинобактерий и использование *Rhodococcus*-биосурфактантов для извлечения тяжелых металлов из нефтезагрязненной почвы: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.03 / Костина Людмила Викторовна. – 2010. – 262 с.
25. Кудряшева, Н.С. Физическая и коллоидная химия: учебник и практикум для прикладного бакалавриата / Н.С. Кудряшева, Л.Г. Бондарева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 379 с.
26. Куюкина, М.С. Олеофильный биопрепарат, используемый для очистки нефтезагрязненной почвы / М.С. Куюкина, И.Б. Ившина // Патент на изобретение РФ № 2180276, опубл. 10.03.2002. – 5 с.
27. Максимова, Ю.Г. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью / Ю.Г. Максимова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 1. – С. 53–58.
28. Маркова, Ю.А. Регуляция формирования биопленок *Escherichia coli* (обзор) / Ю.А. Маркова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – Т. 54, № 54. – С. 3–15.
29. Медведева, Н.Г. Имобилизация уксуснокислых бактерий на углеродных волокнах и использование их для трансформации тиодигликоля / Н.Г. Медведева [и др.] // Биотехнология. – 2001. – № 5. – С. 51–57.

30. Мухутдинова, А.Н. Биодеструкция дротаверина гидрохлорида актинобактериями рода *Rhodococcus*: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.03 / Мухутдинова Анна Наилевна. – 2014. – 125 с.

31. Николаев, Ю.А. Внеклеточная протеаза как регулятор обратимой адгезии *Pseudomonas fluorescens* / Ю.А. Николаев, Н.С. Паников // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 5. – С. 629–634.

32. Николаев, Ю.А. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – 149–163 с.

33. Николаев, Ю.И. Регуляция адгезии клеток *Pseudomonas fluorescens* к стеклу летучими соединениями, выделяемыми культурой / Ю.И. Николаев, Д. Проссер, Р.И. Виттли // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 3. – С. 352–355.

34. Омарова, Е.О. Иммобилизация бактерий на полимерных матрицах для деградации нефти и нефтепродуктов / Е.О. Омарова [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2012. – № 1. – С. 28–35.

35. Пешкур, Т.А. Аккумуляция цезия актинобактериями рода *Rhodococcus*: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.03 / Пешкур Татьяна Александровна. – 2002. – 119 с.

36. Пиневич, А.В. Микробиология. Биология прокариотов: Учебник. В 3 т. Т. 1 / А.В. Пиневич. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2006. – 352 с.

37. Подорожко, Е.А. Композиция для получения носителя иммобилизованных микроорганизмов, расщепляющих углеводороды, и способ получения носителя / Е.А. Подорожко [и др.] // Патент на изобретение РФ № 2298033, опубл. 27.04.2007. – 11 с.

38. Рубцова, Е.В. Адгезия клеток родококков к жидким углеводородам и их производным: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.03 / Рубцова Екатерина Владиславовна. – 2011. – 188 с.

39. Рубцова, Е.В. Влияние условий культивирования на адгезивную активность родококков в отношении *n*-гексадекана / Е.В. Рубцова, М.С. Куюкина,

И.Б. Ившина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 5. – С. 452–459.

40. Санитарные правила и нормы СанПиН 1.2.3685-21 “Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания”. – Зарегистрировано в Минюсте России 29 января 2021 г. № 62296. – 987 с.

41. Серегина, Н.В. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии / Н.В. Серегина [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. 15, № 3. – С. 175–177.

42. Сироткин, А.С. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы / А.С. Сироткин, Г.И. Шагинурова, К.Г. Ипполитов. – Казань: Изд-во “Фэн” АН РТ, 2007. – 160 с.

43. Соляникова, И.П. Морфо-физиологические и биохимические характеристики штамма *Rhodococcus opacus* 1СР – деструктора бензоата – в стрессовых условиях / И.П. Соляникова [и др.] // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 2. – С. 188–200.

44. Сычев, К.С. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции / К.С. Сычев. – М.: Портал Anchem.Ru “Аналитика – мир профессионалов”, 2006. – 167 с.

45. Тарасова, Е.В. Биотрансформация бетулина актинобактериями рода *Rhodococcus*: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.03 / Тарасова Екатерина Владимировна. – 2014. – 136 с.

46. Тюмина, Е.А. Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.03 / Тюмина Елена Александровна. – 2019. – 182 с.

47. Федорович, В.В. Разработка феноменологической модели кинетики бактериальной адсорбции на низкоэнергетических поверхностях / В.В. Федорович [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2002а. – Т. 43, № 6. – С. 417–419.

48. Федорович, В.В. Исследование феноменологической модели кинетики бактериальной адсорбции на низкоэнергетических поверхностях / В.В. Федорович [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2002а. – Т. 43, № 6. – С. 420–424.
49. Abed, R.M.M. Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures / R.M.M. Abed, A. Al-Thukair, D. de Beer // FEMS Microbiology Ecology. – 2006. – V. 57, N. 2. – P. 290–301.
50. Acosta-González, A. The effect of oil spills on the bacterial diversity and catabolic function in coastal sediments: a case study on the Prestige oil spill / A. Acosta-González [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – V. 22, N. 20. – P. 15200–15214.
51. Adamczyk, Z. Irreversible adsorption of colloid particles on heterogeneous surfaces / Z. Adamczyk, K. Jaszczółt, B. Siwek // Applied Surface Science. – 2005. – V. 252, N. 3. – P. 723–729.
52. Aggarwal, R.K. Draft genome sequence of a versatile hydrocarbon-degrading bacterium, *Rhodococcus pyridinivorans* strain KG-16, collected from oil fields in India / R.K. Aggarwal [et al.] // Genome Announcements. – 2016. – V. 4, N. 1. – P. 1–2.
53. Agladze, K. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA / K. Agladze, X. Wang, T. Romeo // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187, N. 24. – P. 8237–8246.
54. Alamuri, P. Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis* / P. Alamuri [et al.] // Infection and Immunity. – 2010. – V. 78, N. 11. – P. 4882–4894.
55. Altamimi, M. Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cells / M. Altamimi, O. Abdelhay, R.A. Rastall // Anaerobe. – 2016. – V. 39. – P. 136–142.

56. Alves, P. Analysing the initial bacterial adhesion to evaluate the performance of antifouling surfaces / P. Alves [et al.] // *Antibiotics*. – 2020. – V. 9, N. 7. – Article 421. – 11 pp.
57. Amano, A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: Implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease / A. Amano. – *Journal of Periodontology*. – 2003. – V. 74, N. 1. – P. 90–96.
58. An, X. Treating organic cyanide-containing groundwater by immobilization of a nitrile-degrading bacterium with a biofilm-forming bacterium using fluidized bed reactors / X. An [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2018. – V. 237. – P. 908–916.
59. Anastasi, E. Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi* / E. Anastasi [et al.] // *Genome Biology and Evolution*. – 2016. – V. 8, N. 10. – P. 3140–3148.
60. Annie, G. Fate of crude oil in soil treated with *Pseudomonas putida* immobilized on coconut coirpith a lowcost biocarrier / G. Annie, A.M. Sheela, R. Ilamathi // *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. – 2020. – V. 29, N. 7. – P. 770–787.
61. Astasov-Frauenhoffer, M. Quantification of vital adherent *Streptococcus sanguinis* cells on protein-coated titanium after disinfectant treatment / M. Astasov-Frauenhoffer [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2011. – V. 22, N. 9. – P. 2045–2051.
62. Atrat, P. Interactions of *Mycobacterium fortuitum* with solid sterol substrate particles / P. Atrat [et al.] // *Journal of Basic Microbiology*. – 1991. – V. 31, N. 6. – P. 413–422.
63. Auta, H.S. Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment / H.S. Auta [et al.] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2018. – V. 127. – P. 15–21.
64. Avendaño-Herrera, R. Pseudo-membranes on internal organs associated with *Rhodococcus qingshengii* infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*) /

R. Avendaño-Herrera [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – V. 147, N. 1–2. – P. 200–204.

65. Baker, E.N. Self-generated covalent cross-links in the cell-surface adhesins of gram-positive bacteria / E.N. Baker, C.J. Squire, P.G. Young // *Biochemical Society Transactions*. – 2015. – V. 43, N. 5. – P. 787–794.

66. Banerjee, I. Antifouling coatings: Recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms / I. Banerjee, R.C. Pangule, R.S. Kane // *Advanced Materials*. – 2011. – V. 23, N. 6. – P. 690–718.

67. Barbu, E.M. β -Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC / E.M. Barbu [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2010. – V. 6, N. 1. – Article e1000726. – 11 pp.

68. von Bargen, K. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi* / K. von Bargen, A. Haas // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2009. – V. 33, N. 5. – P. 870–891.

69. von Bargen, K. Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor / K. von Bargen [et al.] // *Cellular Microbiology*. – 2019. – V. 21, N. 1. – P. 1–18.

70. Bastiaens, L. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers / L. Bastiaens [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66, N. 5. – P. 1834–1843.

71. Bayouth, S. Assessing bacterial adhesion using DLVO and XDLVO theories and the jet impingement technique / S. Bayouth [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2009. – V. 73, N. 1. – P. 1–9.

72. Bej, A.K. Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica / A.K. Bej, D. Saul, J. Aislabie // *Polar Biology*. – 2000. – V. 23. – P. 100–105.

73. Bellon-Fontaine, M.-N. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells / M.-N. Bellon-Fontaine, J. Rault, C.J. van Oss // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 1996. – V. 7, N. 1–2. – P. 47–53.

74. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 5: the Actinobacteria / Ed. by W. Whitman [*et al.*]. – New York: Springer-Verlag, 2012. – 2083 pp.
75. Berne, C. Bacterial adhesion at the single-cell level / C. Berne [*et al.*] // Nature Reviews. – 2018. – V. 16. – P. 616–627.
76. Biofilms: characterization, applications and recent advances / Ed. by J. Henderson. – New York: Nova Science Publishers, 2016. – 330 pp.
77. Bisht, D. Adhesion molecules facilitate host-pathogen interaction and mediate *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis / D. Bisht, L.S. Meena // Indian Journal of Medical Research. – 2019. – V. 150, N. 1. – P. 23–32.
78. Boks, N.P. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces / N.P. Boks [*et al.*] // Microbiology. – 2008. – V. 154, N. 10. – P. 3122–3133.
79. Bouchez-Naïtali, M. Biosurfactants, a help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains / M. Bouchez-Naïtali, J.P. Vandecasteele // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – V. 24, N. 9. – P. 1901–1907.
80. Braissant, O. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities / O. Braissant [*et al.*] // FEMS Microbiology Letters. – 2010. – V. 303, N. 1. – P. 1–8.
81. Bravo, D. Use of an isothermal microcalorimetry assay to characterize microbial oxalotrophic activity / D. Bravo [*et al.*] // FEMS Microbiology Ecology. – 2011. – V. 78, N. 2. – P. 266–274.
82. Bunt, C.R. The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* evaluated by the BATH and HIC methods / C.R. Bunt, D.S. Jones, I.G. Tucker // International Journal of Pharmaceutics. – 1995. – V. 113, N. 2. – P. 257–261.
83. Busalmen, J.P. Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to nonpolarized and polarized thin films of gold / J.P. Busalmen, S.R. de Sánchez // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – V. 67, N. 7. – P. 3188–3194.

84. Cai, Y.-M. Non-surface attached bacterial aggregates: a ubiquitous third lifestyle / E.-M. Cai // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – Article 557035. – 18 pp.
85. Cappelletti, M. Degradation of alkanes in *Rhodococcus* / M. Cappelletti, S. Fedi, D. Zannoni // *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs 16 / Ed. by H. Alvarez. – Basel: Springer Nature Switzerland, 2019a. – P. 137–171.
86. Cappelletti, M. Genomics of *Rhodococcus* / M. Cappelletti, J. Zampolii, D. Zannoni // *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs 16 / Ed. by H. Alvarez. – Basel: Springer Nature Switzerland, 2019b. – P. 23–60.
87. Cappelletti, M. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds / M. Cappelletti [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 104. – P. 8567–8594.
88. Carniello, V. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth / V. Carniello [et al.] // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2018. – V. 261. – P. 1–14.
89. de Carvalho, C.C.C.R. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 / C.C.C.R. de Carvalho, M.M.R. da Fonseca // *FEMS Microbiology and Ecology*. – 2005a. – V. 51, N. 3. – P. 389–399.
90. de Carvalho, C.C.C.R. Preventing biofilm formation: Promoting cell separation with terpenes / C.C.C.R. de Carvalho, M.M.R. da Fonseca // *FEMS Microbiology and Ecology*. – 2007. – V. 61, N. 3. – P. 406–413.
91. Carvalho, M.F. A GAC biofilm reactor for the continuous degradation of 4-chlorophenol: Treatment efficiency and microbial analysis / M.F. Carvalho [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – V. 57, N. 3. – P. 419–426.
92. de Carvalho, C.C.C.R. *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents / C.C.C.R. de Carvalho [et al.] // *Microscopy Research and Technique*. – 2004. – V. 64, N. 3. – P. 215–222.

93. de Carvalho, C.C.C.R. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* / C.C.C.R. de Carvalho [et al.] // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – V. 5. – Article 103. – 13 pp.
94. Casutt-Meyer, S. Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword / S. Casutt-Meyer [et al.] // *PLOS ONE*. – 2010. – V. 5, N. 12. – P. 1–9.
95. Catania, V. Innovative, ecofriendly biosorbent-biodegrading biofilms for bioremediation of oil- contaminated water / V. Catania [et al.] // *New Biotechnology*. – 2020. – V. 58. – P. 25–31.
96. Ceniceros, A. Genome-based exploration of the specialized metabolic capacities of the genus *Rhodococcus* / A. Ceniceros [et al.] // *BMC Genomics*. – 2017. – V. 18. – Article 593. – 16 pp.
97. Chand, D. Treatment of simulated wastewater containing toxic amides by immobilized *Rhodococcus rhodochrous* NHB-2 using a highly compact 5-stage plug flow reactor / D. Chand [et al.] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – V. 20, N. 7. – P. 679–686.
98. Chang, Y.T. Variability of communities and physiological characteristics between free-living bacteria and attached bacteria during the PAH biodegradation in a soil/water system / Y.T. Chang, J.F. Lee, H.P. Chao // *European Journal of Soil Biology*. – 2007. – V. 43, N. 5-6. – P. 283–296.
99. Chaudhury, P. Versatile cell surface structures of archaea / P. Chaudhury, T.E.F. Quax, S.-V. Albers // *Molecular Microbiology*. – 2018. – V. 107, N. 3. – P. 298–311.
100. Chen, G. Equilibrium and kinetic adsorption of bacteria on alluvial sand and surface thermodynamic interpretation / G. Chen, M. Rockhold, K.A. Strevett // *Research in Microbiology*. – 2003. – V. 154, N. 3. – P. 175–181.
101. Chen, X.A. Enhanced plasmid stability and production of hEGF by immobilized recombinant *E. coli* JM101 / X.A. Chen [et al.] // *Biochemical Engineering Journal*. – 2006. – V. 28, N. 3. – P. 215–219.

102. Chen, Z. Recent advances in biological functions of thick pili in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / Z. Chen [*et al.*] // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – V. 11. – Article 241. – 10 pp.
103. Cheremnykh, K.M. Bioconversion of ecotoxic dehydroabiatic acid using *Rhodococcus* actinobacteria / K.M. Cheremnykh [*et al.*] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2018. – V. 346. – P. 103–112.
104. Chizzotti, M.L. Protein turnover and infrared thermography in Nellore bulls classified for residual feed intake / M.L. Chizzotti [*et al.*] // *Energy and protein metabolism and nutrition is sustainable animal protection* / Ed. by J.W. Oltjen. – Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2013. – P. 125–126.
105. Choi, E.J. Cytochrome c adsorption to supported, anionic lipid bilayers studied via atomic force microscopy / E.J. Choi, E.K. Dimitriadis // *Biophysical Journal*. – 2004. – V. 87, N. 5. – P. 3234–3241.
106. Christie, P.J. The rich tapestry of bacterial protein translocation systems / P.J. Christie // *Protein Journal*. – 2019. – V. 38, N. 4. – P. 389–408.
107. Claudino, M.J.C. Immobilization of mycobacterial cells onto silicone – Assessing the feasibility of the immobilized biocatalyst in the production of androstenedione from sitosterol / M.J.C. Claudino [*et al.*] // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99, N. 7. – P. 2304–2311.
108. Cloarec, O. Improvement of UV spectrophotometry methodology for the determination of total polycyclic aromatic compounds in contaminated soils / O. Cloarec [*et al.*] // *Analytica Chimica Acta*. – 2002. – V. 453. – P. 245–252.
109. Corno, G. Antibiotics promote aggregation within aquatic bacterial communities / G. Corno [*et al.*] // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – V. 5. – P. 1–9.
110. Creason, A.L. Use of whole genome sequences to develop a molecular phylogenetic framework for *Rhodococcus fascians* and the *Rhodococcus* genus / A.L. Creason [*et al.*] // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – V. 5. – P. 1–12.
111. Cuello, O.H. *Rhodococcus globerulus* keratitis after laser *in situ* keratomileusis / O.H. Cuello [*et al.*] // *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. – 2002. – V. 28, N. 12. – P. 2235–2237.

112. Dayan, A. The involvement of coordinative interactions in the binding of dihydrolipoamide dehydrogenase to titanium dioxide – Localization of a putative binding site / A. Dayan [*et al.*] // *Journal of Molecular Recognition*. – 2017. – V. 30, N. 8. – Article e2617. – 11 pp.
113. De Greve, H. Combining sites of bacterial fimbriae / H. De Greve, L. Wyns, J. Bouckaert // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2007. – V. 17. – P. 506–512.
114. De Maio, F. PE_PGRS3 of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically expressed at low phosphate concentration, and its arginine-rich C-terminal domain mediates adhesion and persistence in host tissues when expressed in *Mycobacterium smegmatis* / F. De Maio [*et al.*] // *Cellular Microbiology*. – 2018. – V. 20, N. 12. – Article e12952. – 14 pp.
115. Deng, Y. Cell surface properties of five polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains / Y. Deng [*et al.*] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 86, N. 6. – P. 1933–1939.
116. Dorobantu, L.S. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity / L.S. Dorobantu [*et al.*] // *Langmuir*. – 2008. – V. 24, N. 9. – P. 4944–4951.
117. Dorobantu, L.S. Analysis of force interactions between AFM tips and hydrophobic bacteria using DLVO theory / L.S. Dorobantu [*et al.*] // *Langmuir*. – 2009. – V. 15, N. 12. – P. 6968–6976.
118. Dou, R. Bacterial communities and functional genes stimulated during phenanthrene degradation in soil by bio-microcapsules / R. Dou [*et al.*] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2021. – V. 212. – Article 111970. – 9 pp.
119. Egorova, D.O. Bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil by the new *Rhodococcus wratislaviensis* strain Ch628 / D.O. Egorova [*et al.*] // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2017. – V. 228. – Article 183. – 16 pp.
120. El-Kirat-Chatel, S. The importance of force in microbial cell adhesion / S. El-Kirat-Chatel [*et al.*] // *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. – 2020. – V. 47. – P. 111–117.

121. Fernandes, P.J. Construction of *Rhodococcus* random mutagenesis libraries using Tn5 transposition complexes / P.J. Fernandes, J.A.C. Powell, J.A.C. Archer // *Microbiology*. – 2001. – V. 147, N. 9. – P. 2529–2536.
122. Gallardo-Moreno, A.M. Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene / A.M. Gallardo-Moreno [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68, N. 5. – P. 2610–2613.
123. Garrido-Sanz, D. Comparative genomics of the *Rhodococcus* genus shows wide distribution of biodegradation traits / D. Garrido-Sanz [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8, N. 5. – Article 774. – 16 pp.
124. Genus *Rhodococcus* [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://lpsn.dsmz.de/genus/rhodococcus> [23.06.2021].
125. Geoghegan, M. The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion / M. Geoghegan [et al.] // *Faraday Discussions*. – 2008. – V. 139. – P. 85–103.
126. Gertler, G. A TiO₂-binding protein isolated from *Rhodococcus* strain GIN-1 (NCIMB 40340) – purification, properties and potential applications / G. Gertler [et al.] // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. – 2003. – V. 34, N. 12. – P. 1138–1144.
127. Gilan, I. Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* C208 / I. Gilan, A. Sivan // *FEMS Microbiology Letters*. – 2013. – V. 342, N. 1. – P. 18–23.
128. Goethals, K. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians* / K. Goethals [et al.] // *Annual Review of Phytopathology*. – 2001. – V. 39. – P. 27–52.
129. Goordial, J. Cold adaptive traits revealed by comparative genomic analysis of the eurypsychrophile *Rhodococcus* sp. JG3 isolated from high elevation McMurdo Dry Valley permafrost, Antarctica / J. Goordial [et al.] // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2016. – V. 92, N. 2. – P. 1–11.
130. Habib, S. Evaluation of conventional and response surface level optimisation of *n*-dodecane (*n*-C12) mineralisation by psychrotolerant strains isolated

from pristine soil at Southern Victoria Island, Antarctica / S. Habib [*et al.*] // *Microbial Cell Factories*. – 2018. – V. 17, N. 1. – P. 1–21.

131. Haiko, J. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence / J. Haiko, B. Westerlund-Wikström // *Biology*. – 2013. – V. 2. – P. 1242–1267.

132. Hamedi, J. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria / J. Hamedi, F. Mohammadipanah // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – V. 42, N. 2. – P. 157–171.

133. Han, A. Bacterial adhesion mechanisms on dental implant surfaces and the influencing factors / A. Han [*et al.*] // *International Journal of Adhesion and Adhesives*. – 2016. – V. 69. – P. 8–71.

134. Handley, P.S. Association of a novel high molecular weight, serine-rich protein (SrpA) with fibril-mediated adhesion of the oral biofilm bacterium *Streptococcus cristatus* / P.S. Handley [*et al.*] // *Oral Microbiology and Immunology*. – 2005. – V. 20, N. 3. – P. 131–140.

135. Hassanshahian, M. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances) / M. Hassanshahian [*et al.*] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2013. – V. 73, N. 1. – P. 300–305.

136. Hatzinger, P.B. Aerobic treatment of N-nitrosodimethylamine in a propane-fed membrane bioreactor / P.B. Hatzinger [*et al.*] // *Water Research*. – 2011. – V. 45, N. 1. – P. 254–262.

137. Hauser-Gerspach, I. Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to glass surfaces measured by isothermal microcalorimetry (IMC) / I. Hauser-Gerspach [*et al.*] // *Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials*. – 2008. – V. 85, N. 1. – P. 42–49.

138. He, Z. Individual or synchronous biodegradation of di-n-butyl phthalate and phenol by *Rhodococcus ruber* strain DP-2 / Z. He, C. Niu, Z. Lu // *Journal of Hazardous Materials*. – 2014. – V. 273. – P. 104–109.

139. Heller, M.C. Identification of immunologically relevant genes in mare and foal dendritic cells responding to infection by *Rhodococcus equi* / M.C. Heller,

K.A. Jackson, J.L. Watson // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2010. – V. 136, N. 1–2. – P. 144–150.

140. Henneberger, R. New insights into the lifestyle of the cold-loving SM1 euryarchaeon: Natural growth as a monospecies biofilm in the subsurface / R. Henneberger [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72, N. 1. – P. 192–199.

141. Hickey, T.B.M. *Mycobacterium tuberculosis* Cpn60.2 and DnaK are located on the bacterial surface, where Cpn60.2 facilitates efficient bacterial association with macrophages / T.B.M. Hickey [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2009. – V. 77, N. 8. – P. 3389–3401.

142. Hickey, T.B.M. *Mycobacterium tuberculosis* employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface / T.B.M. Hickey [et al.] // *Cellular Microbiology*. – 2010. – V. 12, N. 11. – P. 1634–1647.

143. Hill, A.J. Micellar solubilization of naphthalene and phenanthrene from nonaqueous-phase liquids / A.J. Hill, S. Ghoshal // *Environmental Science and Technology*. – 2002. – V. 36, N. 18. – P. 3901–3907.

144. Hinsa, S.M. Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD / S.M. Hinsa, G.A. O'Toole // *Microbiology*. – 2006. – V. 152. – P. 1375–1383.

145. Ho, A. Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology / A. Ho, D.P. Di Lonardo, P.L.E. Bodelier // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2017. – V. 93. – Article fix006. – 14 pp.

146. Hori, K. Adhesion of bacteria / K. Hori // *Biofilm and Materials Science* / Ed. by H. Kanematsu, D.M. Barry. – Basel: Springer International Publishing Switzerland, 2015. – P. 23–34.

147. Hori, K. Bacterial adhesion: From mechanism to control / K. Hori, S. Matsumoto // *Biochemical Engineering Journal*. – 2010. – V. 48, N. 3. – P. 424–434.

148. Huber, B. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility / B. Huber [et al.] // *Microbiology*. – 2001. – V. 147, N. 9. – P. 2517–2528.

149. Hwang, C.Y. *Rhodococcus aerolatus* sp. nov., isolated from subarctic rainwater / C.Y. Hwang [*et al.*] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2015. – V. 65, N. 2. – P. 465–471.
150. Ishii, S. Effect of cell appendages on the adhesion properties of a highly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. Tol 5 / S. Ishii [*et al.*] // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2006. – V. 70, N. 11. – P. 2635–2640.
151. Ishii, S. Formation of filamentous appendages by *Acinetobacter* sp. Tol 5 for adhering to solid surfaces / S. Ishii [*et al.*] // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2008. – V. 105, N. 1. – P. 20–25.
152. Ivshina, I.B. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species / I.B. Ivshina [*et al.*] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1998. – V. 14, N. 5. – P. 711–717.
153. Istvan, P. Draft genome sequences of *Rhodococcus* sp. strains YH1 and T7, isolated from explosive-contaminated environments / P. Istvan, Z. Ronen // Microbiology Resource Announcements. – 2020. – V. 9, N. 22. – Article e00097-20. – 1 pp.
154. Ivshina, I.B. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 / I.B. Ivshina [*et al.*] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – V. 28, N. 10. – P. 2997–3006.
155. Ivshina, I.B. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* / I.B. Ivshina [*et al.*] // Current Microbiology. – 2015. – V. 70, N. 3. – P. 307–314.
156. Ivshina, I.B. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 / I.B. Ivshina [*et al.*] // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – Article 9159. – 13 pp.
157. Iwabuchi, N. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus* / N. Iwabuchi [*et al.*] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2003. – V. 30, N. 1–2. – P. 51–60.

158. James, S.A. Atomic force microscopy studies of bioprocess engineering surfaces – imaging, interactions and mechanical properties mediating bacterial adhesion / S.A. James, N. Hilal, C.J. Wright // *Biotechnology Journal*. – 2017. – V. 12, N. 7. – Article 1600698. – 11 pp.

159. de Jesus, M.C. Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity / M.C. de Jesus [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – V. 192. – P. 1430–1440.

160. Jézéquel, K. Soil bioaugmentation by free and immobilized bacteria to reduce potentially phytoavailable cadmium / K. Jézéquel, T. Lebeau // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99, N. 4. – P. 690–698.

161. Jones, A.L. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil / A.L. Jones [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2004. – V. 54, N. 2. – P. 407–411.

162. Junter, G.-A. Immobilized viable microbial cells: From the process to the proteome... or the cart before the horse / G.-A. Junter, T. Jouenne // *Biotechnology Advances*. – 2004. – V. 22, N. 8. – P. 633–658.

163. Junter, G.-A. Immobilized-cell physiology: Current data and the potentialities of proteomics / G.-A. Junter [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2002. – V. 31, N. 3. – P. 201–212.

164. Kamaguchi, A. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible co-aggregation with *Prevotella intermedia* / A. Kamaguchi [et al.] // *Microbiology*. – 2003. – V. 149, N. 5. – P. 1257–1264.

165. Kämpfer, P. *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces / P. Kämpfer [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – V. 63. – P. 1024–1029.

166. Kämpfer, P. *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. / P. Kämpfer [et al.] //

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2014. – V. 64. – P. 755–761.

167. Khan, M.M.T. Experimental and theoretical examination of surface energy and adhesion of nitrifying and heterotrophic bacteria using self-assembled monolayers / M.M.T. Khan [*et al.*] // Environmental Science and Technology. – 2011. – V. 45. – P. 1055–1060.

168. Khanuja, S.P.S. Quick and sensitive method of quantifying mycolic acid to develop anti-microbial agents and a diagnostic kit thereof / S.P.S. Khanuja [*et al.*] // Patent US 6833249 B2, published 21.12.2004. – 11 pp.

169. Kim, D. Benzylic and aryl hydroxylations of *m*-xylene by *o*-xylene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain DK17 / D. Kim [*et al.*] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V. 86, N. 6. – P. 1841–1847.

170. Kim, D. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways / D. Kim [*et al.*] // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – V. 28, N. 7. – P. 1037–1051.

171. Kinhikar, A.G. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin / A.G. Kinhikar [*et al.*] // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 60, N. 4. – P. 999–1013.

172. Kinnby, B. Plasminogen coating increases initial adhesion of oral bacteria *in vitro* / B. Kinnby, L.E. Chávez de Paz // Microbial Pathogenesis. – 2016. – V. 100. – P. 10–16.

173. Konishi, M. Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15, lacking the phytopathogenic *fas* genes, produces a novel glucotriose lipid biosurfactant / M. Konishi [*et al.*] // Marine Biotechnology. – 2014. – V. 16, N. 4. – P. 484–493.

174. Kluge, B. Detection of soil microbial activity by infrared thermography (IRT) / B. Kluge [*et al.*] // Soil Biology and Biochemistry. – 2013. – V. 57. – P. 383–389.

175. Krishnan, V. Pilins in gram-positive bacteria: a structural perspective / V. Krishnan // IUBMB Life. – 2015. – V. 67, N. 7. – P. 533–543.

176. Kuyukina, M.S. Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina // *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs 16 / Ed. by H. Alvarez. – Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2019a. – P. 231–270.
177. Kuyukina, M.S. Production of trehalolipid biosurfactants by *Rhodococcus* / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina // *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs 16 / Ed. by H. Alvarez. – Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2019b. – P. 271–298.
178. Kuyukina, M.S. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction / M.S. Kuyukina [et al.] // *Journal of Microbiological Methods*. – 2001. – V. 46, N. 2. – P. 149–156.
179. Kwak, B.S. An integrated photothermal sensing system for rapid and direct diagnosis of anemia / B.S. Kwak [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – V. 26. – P. 1679–1683.
180. Kwak, B.S. Quantitative analysis of sialic acid on erythrocyte membranes using a photothermal biosensor. / B.S. Kwak [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – V. 35. – P. 484–488.
181. Laczi, K. Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons / K. Laczi [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – V. 99, N. 22. – P. 9745–9759.
182. Larkin, M.J. Genomes and plasmids in *Rhodococcus* / M.J. Larkin, L.A. Kulakov, C.C.R. Allen // *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs 16 / Ed. by H. Alvarez. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010a. – P. 73–90.
183. Larkin, M.J. *Rhodococcus* / M.J. Larkin, L.A. Kulakov, C.C.R. Allen // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* / Ed. by K. Timmis. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010b. – P. 1839–1852.
184. Larsen, P. Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge / P. Larsen [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 74, N. 5. – P. 1517–1526.

185. Lehocký, M. Adhesion of *Rhodococcus* sp. S3E2 and *Rhodococcus* sp. S3E3 to plasma prepared Teflon-like and organosilicon surfaces / M. Lehocký [et al.] // Journal of Materials Processing Technology. – 2009. – V. 209, N. 6. – P. 2871–2875.
186. Lerda, D. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) factsheet / D. Lerda // JRC Technical Notes. – 2010. – V. 3. – P. 1–25.
187. Letek, M. The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: Cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions / M. Letek [et al.] // PLoS Genetics. – 2010. – V. 6, N. 9. – P. 1–17.
188. Li, J. Bioremediation of environmental endocrine disruptor di-*n*-butyl phthalate ester by *Rhodococcus ruber* / J. Li [et al.] // Chemosphere. – 2006. – V. 65, N. 9. – P. 1627–1633.
189. Li, X. Bioadsorption behavior of *Rhodococcus opacus* on the surface of calcium and magnesium minerals / X. Li [et al.] // JOM. – 2015. – V. 67, N. 2. – P. 382–390.
190. Liang, M.N. Measuring the forces involved in polyvalent adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to mannose-presenting surfaces / M.N. Liang [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – V. 97, N. 24. – P. 13092–13096.
191. Lopez, L.Y. Fundamental aspects of hematite flotation using the bacterial strain *Rhodococcus ruber* as bioreagent / L.Y. Lopez [et al.] // Minerals Engineering. – 2015. – V. 75. – P. 63–69.
192. Luz, A.P. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil / A.P. Luz [et al.] // Canadian Journal of Microbiology. – 2004. – V. 50, N. 5. – P. 323–333.
193. Ma, Q. Single-cell RNA sequencing of plant-associated bacterial communities / Q. Ma [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V. 10. – Article 2452. – 11 pp.
194. MacArthur, I. Comparative genomics of *Rhodococcus equi* virulence plasmids indicates host-driven evolution of the *vap* pathogenicity island / I. MacArthur [et al.] // Genome Biology and Evolution. – 2017. – V. 9, N. 5. – P. 1241–1247.

195. Martínková, L. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / L. Martínková [et al.] // Environment International. – 2009. – V. 35, N. 1. – P. 162–177.
196. Masák, J. Colonization of surfaces by phenolic compounds utilizing microorganisms / J. Masák [et al.] // Environment International. – 2005. – V. 31, N. 2. – P. 197–200.
197. Mattos-Guaraldi, A.L. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods / A.L. Mattos-Guaraldi, L.C.D. Formiga, A.F.B. Andrade // Current Microbiology. – 1999. – V. 38, N. 1. – P. 37–42.
198. Mattos-Guaraldi, A.L. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae* / A.L. Mattos-Guaraldi, L.C.D. Formiga, G.A. Pereira // Microbes and Infection. – 2000. – V. 2. – P. 1507–1512.
199. Meijer, W.G. *Rhodococcus equi* / W.G. Meijer, J.F. Prescott // Veterinary Research. – 2004. – V. 35. – P. 383–396.
200. de Mesquita, L.M.S. Interaction of a hydrophobic bacterium strain in a hematite-quartz flotation system / L.M.S. de Mesquita, F.F. Lins, M.L. Torem // International Journal of Mineral Processing. – 2003. – V. 71, N. 1–4. – P. 31–44.
201. Miao, Y. Profiling microbial community structures and functions in bioremediation strategies for treating 1,4-dioxane-contaminated groundwater / Y. Miao [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – V. 408. – Article 124457. – 12 pp.
202. Microbial biofilms / Ed. by H.M. Lappin-Scott, W. Costerton, J. Lynch. – Cambridge: Cambridge University Press, 2003. – 324 pp.
203. Mikolasch, A. Enrichment of aliphatic, alicyclic and aromatic acids by oil-degrading bacteria isolated from the rhizosphere of plants growing in oil-contaminated soil from Kazakhstan / A. Mikolasch [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – V. 99, N. 9. – P. 4071–4084.
204. Mitter, E.K. Impact of diesel and biodiesel contamination on soil microbial community activity and structure / E.K. Mitter, J.J. Germida, J.R. de Freitas // Scientific Reports. – 2021. – V. 11. – Article 10856. – 14 pp.

205. Mogensen, J.E. Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence / J.E. Mogensen [et al.] // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44, N. 11. – P. 4533–4545.
206. Moissl, C. *In situ* growth of the novel SM1 euryarchaeon from a string-of-pearls-like microbial community in its cold biotope, its physical separation and insights into its structure and physiology / C. Moissl [et al.] // *Archives in Microbiology*. – 2003. – V. 180. – P. 211–217.
207. Møretrø, T. Coaggregation between *Rhodococcus* and *Acinetobacter* strains isolated from the food industry / T. Møretrø [et al.] // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2015. – V. 61, N. 7. – P. 503–512.
208. Morimoto, E. Development of on-the-go soil sensor for rice transplanter // E. Morimoto [et al.] // *Engineering in Agriculture, Environment and Food*. – 2013. – V. 6. – P. 141–146.
209. Morris, J.M. Enhanced biodegradation of hydrocarbon-contaminated sediments using microbial fuel cells / J.M. Morris, S. Jin // *Journal of Hazardous Materials*. – 2012. – V. 213–214. – P. 474–477.
210. Mourenza, A. Mycoredoxins are required for redox homeostasis and intracellular survival in the actinobacterial pathogen *Rhodococcus equi* / A. Mourenza [et al.] // *Antioxidants*. – 2019. – V. 8, N. 11. – P. 1–15.
211. *Mycobacteria* protocols / Ed. by T. Parish, D.M. Roberts. – New York: Springer Science+Business Media (Humana Press), 2015. – 414 pp.
212. Naloka, K. Bioballs carrying a syntrophic *Rhodococcus* and *Mycolicibacterium* consortium for simultaneous sorption and biodegradation of fuel oil in contaminated freshwater / K. Naloka [et al.] // *Chemosphere*. – 2021. – V. 282. – Article 130973. – 10 pp.
213. Nassif, X. Gonococcal lipooligosaccharide: an adhesin for bacterial dissemination? / X. Nassif // *Trends in Microbiology*. – 2000. – V. 8, N. 12. – P. 539–540.

214. Ng, S. Severe cavitary pneumonia caused by a non-*equi Rhodococcus* species in an immunocompetent patient / S. Ng [et al.] // *Respiratory Care*. – 2013. – V. 58, N. 4. – P. 47–50.

215. Nilsson, L.M. Elevated shear stress protects *Escherichia coli* cells adhering to surfaces via catch bonds from detachment by soluble inhibitors / L.M. Nilsson [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72, N. 4. – P. 3005–3010.

216. Norde, W. Surface modifications to influence adhesion of biological cells and adsorption of globular proteins / W. Norde // *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science, NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry*, V. 228 / Ed. by J.P. Blitz, V.M. Gun'ko. – Heidelberg: Springer Netherlands, 2006. – P. 159–176.

217. Notification 6786-01-0213. Summary of the risk assessment of the genetically modified bacterial strain *Rhodococcus equi* RG2837 carried out by the German Competent Authority within the framework of a proposed deliberate release. – Berlin, 2012. – 10 pp.

218. Oder, M. The impact of material surface roughness and temperature on the adhesion of *Legionella pneumophila* to contact surfaces / M. Oder [et al.] // *International Journal of Environmental Health Research*. – 2015. – V. 25, N. 5. – P. 469–479.

219. Ofek, I. Bacterial adhesion / I. Ofek, E.A. Bayer, S. N. Abraham // *The Prokaryotes: Human Microbiology* / Ed. by E. Rosenberg [et al.] – Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. – P. 107–123.

220. van Oss, C.J. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces / C.J. van Oss, R.J. Good, M.K. Chaudhury // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1986. – V. 111. – P. 378–390.

221. Otto, M. Physical stress and bacterial colonization / M. Otto // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2014. – V. 38. – P. 1250–1270.

222. Pannier, A. Biological activity and mechanical stability of sol-gel-based biofilters using the freeze-gelation technique for immobilization of *Rhodococcus ruber* /

A. Pannier [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – V. 93. – P. 1755–1767.

223. Pátek, M. Stress response in *Rhodococcus* strains / M. Pátek, M. Grulich, J. Nešvera // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Article in press.

224. Pen, Y. Effect of extracellular polymeric substances on the mechanical properties of *Rhodococcus* / Y. Pen [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2015. – V. 1848, N. 2. – P. 518–526.

225. Preedy, E. Surface roughness mediated adhesion forces between borosilicate glass and gram-positive bacteria / E. Preedy [et al.] // *Langmuir*. – 2014. – V. 30, N. 31. – P. 9466–9476.

226. Prieto, M.B. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier / M.B. Prieto [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002a. – V. 58, N. 6. – P. 853–859.

227. Prieto, M.B. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite® in a packed-bed reactor / M.B. Prieto [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2002b. – V. 97, N. 1. – P. 1–11.

228. Qu, W. Surface thermodynamics and adhesion forces governing bacterial transmission in contact lens related microbial keratitis / W. Qu [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2011. – V. 358. – P. 430–436.

229. Ramaprasad, E.V.V. *Rhodococcus electrodiphilus* sp. nov., a marine electro active actinobacterium isolated from coral reef / E.V.V. Ramaprasad [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68, N. 8. – P. 2644–2649.

230. Ramsugit, S. *Mycobacterium tuberculosis* pili promote adhesion to and invasion of THP-1 macrophages / S. Ramsugit, M. Pillay // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – V. 67, N. 6. – P. 476–478.

231. Ramsugit, S. Pili of *Mycobacterium tuberculosis*: current knowledge and future prospects / S. Ramsugit, M. Pillay // *Archives of Microbiology*. – 2015. – V. 197, N. 6. – P. 737–744.

232. Ravi, M. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs / M. Ravi [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2007. – V. 120, N. 3–4. – P. 308–319.

233. Resch, A. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions / A. Resch [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71, N. 5. – P. 2663–2676.

234. Risk group database [Электронный ресурс] // Режим доступа: my.absa.org/tiki-index.php?page=Riskgroups&default%5bcontent%5d=rhodococcus [24.06.2021].

235. Ristow, L.C. The β 3-integrin ligand of *Borrelia burgdorferi* is critical for infection of mice but not ticks / L.C. Ristow [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2012. – V. 85, N. 6. – P. 1105–1118.

236. Roachford, O. Virulence and molecular adaptation of human urogenital mycoplasmas: a review / O. Roachford, K.E. Nelson, B.R. Mohapatra // *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. – 2019. – V. 33, N. 1. – P. 689–698.

237. Robledo-Ortíz, J.R. Bacterial immobilization by adhesion onto agave-fiber/polymer foamed composites / J.R. Robledo-Ortíz [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2010. – V. 101. – P. 1293–1299.

238. Rochex, A. Adhesion of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine to cellulose fibres / A. Rochex [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – V. 65. – P. 727–733.

239. Rodrigues, C.J.C. *Rhodococcus erythropolis* cells adapt their fatty acid composition during biofilm formation on metallic and non-metallic surfaces / C.J.C. Rodrigues, C.C.C.R. de Carvalho // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2015. – V. 91. – Article fiv135. – 11 pp.

240. Rodrigues, L. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A / L. Rodrigues [et al.] // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2006. – V. 46, N. 1. – P. 107–112.

241. Röttig, A. Analysis and optimization of triacylglycerol synthesis in novel oleaginous *Rhodococcus* and *Streptomyces* strains isolated from desert soil / A. Röttig [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2016. – V. 225. – P. 48–56.
242. Rubinsztein-Dunlop, S. Identification of two new *Helicobacter pylori* surface proteins involved in attachment to epithelial cell lines / S. Rubinsztein-Dunlop [et al.] // Journal of Medical Microbiology. – 2005. – V. 54. – P. 427–434.
243. Sadovskaya, I. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A / I. Sadovskaya [et al.] // Infection and Immunity. – 2005. – V. 73, N. 5. – P. 3007–3017.
244. Salameh, A.A. Real-time quantification of *Staphylococcus aureus* in liquid medium using infrared thermography / A.A. Salameh [et al.] // Infrared Physics and Technology. – 2012. – V. 55. – P. 170–172.
245. Salerno, M. AFM measurement of the stiffness of layers of agarose gel patterned with polylysine / M. Salerno [et al.] // Microscopy Research and Technique. – 2010. – V. 73, N. 10. – P. 982–990.
246. Sangal, V. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome / V. Sangal [et al.] // BMC Genomics. – 2015. – V. 16. – Article 765. – 15 pp.
247. Schreiberová, O. Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants / O. Schreiberová [et al.] // New Biotechnology. – 2012. – V. 30, N. 1. – P. 62–68.
248. Scoffield, J. Microbial biofilms / J. Scoffield, H. Wu // Encyclopedia of Microbiology (fourth edition) // Ed. by T.M. Schmidt. – New York, London, Oxford, Boston, San Diego: Academic Press, 2019. – P. 110–114.
249. Shakerifard, P. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon / P. Shakerifard [et al.] // Biofouling. – 2009. – V. 25, N. 6. – P. 533–541.
250. Sheng, H.M. Analysis of the composition and characteristics of culturable endophytic bacteria within subnival plants of the Tianshan Mountains, Northwestern

China / H.M. Sheng [*et al.*] // *Current Microbiology*. – 2011. – V. 62, N. 3. – P. 923–932.

251. Shokeen, B. Omics and interspecies interaction / B. Shokeen [*et al.*] // *Periodontology 2000*. – 2021. – V. 85. – P. 101–111.

252. Siegmann, A. The titanium binding protein of *Rhodococcus ruber* GIN1 (NCIMB 40340) is a cell-surface homolog of the cytosolic enzyme dihydrolipoamide dehydrogenase / A. Siegmann [*et al.*] // *Journal of Molecular Recognition*. – 2009. – V. 22, N. 2. – P. 138–145.

253. Sinha, R.K. Diversity of retrievable heterotrophic bacteria in Kongsfjorden, an Arctic fjord / R.K. Sinha [*et al.*] // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2017. – V. 48, N. 1. – P. 51–61.

254. Sivan, A. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber* / A. Sivan, M. Szanto, V. Pavlov // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – V. 72, N. 2. – P. 346–352.

255. Słotwińska, S.M. Host and bacterial adhesion / S.M. Słotwińska // *Polish Journal of Veterinary Sciences*. – 2013. – V. 16, N. 1. – P. 153–156.

256. Sokolovska, I. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1 / I. Sokolovska [*et al.*] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – V. 69, N. 12. – P. 7019–7027.

257. Sorongon, M.L. Hydrophobicity, adhesion, and surface-exposed proteins of gliding bacteria / M.L. Sorongon, R.A. Bloodgood, R.P. Burchard // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1991. – V. 57, N. 11. – P. 3193–3199.

258. Squeglia, F. A structural overview of mycobacterial adhesins: Key biomarkers for diagnostics and therapeutics / F. Squeglia [*et al.*] // *Protein Science*. – 2018. – V. 27, N. 2. – P. 369–380.

259. Stamler, R.A. First report of *Rhodococcus* isolates causing pistachio bushy top syndrome on ‘UCB-1’ rootstock in California and Arizona / R.A. Stamler [*et al.*] // *Plant Disease*. – 2015. – V. 99, N. 11. – P. 1468–1476.

260. Starks, A.M. Assembly of CS1 pili: the role of specific residues of the major pilin, CooA / A.M. Starks [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – V. 188, N. 1. – P. 231–239.
261. Stes, E. A successful bacterial coup d'état: How *Rhodococcus fascians* redirects plant development / E. Stes [et al.] // *Annual Review of Phytopathology*. – 2011. – V. 49. – P. 69–86.
262. Stes, E. The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians* / E. Stes [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2013. – V. 342. – P. 187–194.
263. Sutcliffe, I.C. The rhodococcal cell envelope: composition, organisation and biosynthesis / I.C. Sutcliffe, A.K. Brown, L.G. Dover // *Biology of Rhodococcus, Microbiology Monographs 16* / Ed. by H. Alvarez. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. – P. 29–71.
264. Svensäter, G. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans* / G. Svensäter [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2001. – V. 205, N. 1. – P. 139–146.
265. Takahashi, Y. Contribution of sialic acid-binding adhesin to pathogenesis of experimental endocarditis caused by *Streptococcus gordonii* DL1 / Y. Takahashi [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2006. – V. 74, N. 1. – P. 740–743.
266. Táncsics, A. *Rhodococcus sovatensis* sp. nov., an actinomycete isolated from the hypersaline and heliothermal Lake Ursu / A. Táncsics [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2017. – V. 67, N. 2. – P. 190–196.
267. Tang, G. O-polysaccharide glycosylation is required for stability and function of the collagen adhesin EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* / G. Tang, T. Ruiz, K.P. Mintz // *Infection and Immunity*. – 2012. – V. 80, N. 8. – P. 2868–2877.
268. Tapingkae, W. Whole cell immobilisation of *Natrinema gari* BCC 24369 for histamine degradation / W. Tapingkae [et al.] // *Food Chemistry*. – 2010. – V. 120, N. 3. – P. 842–849.

269. Tarasova, E.V. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation / E.V. Tarasova, V.V. Grishko, I.B. Ivshina // *Process Biochemistry*. – 2017. – V. 52. – P. 1–9.
270. Thomas, W. Catch-bond model derived from allostery explains force-activated bacterial adhesion / W. Thomas [*et al.*] // *Biophysical Journal*. – 2006. – V. 90. – P. 753–764.
271. Toda, K. Cell concentration dependence of dynamic viscoelasticity of *Escherichia coli* culture suspensions / K. Toda [*et al.*] // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1998. – V. 85, N. 4. – P. 410–415.
272. Usamentiaga, R. Infrared thermography for temperature measurement and non-destructive testing / R. Usamentiaga [*et al.*] // *Sensors*. – 2014. – V. 14. – P. 12305–12348.
273. Vadillo-Rodríguez, V. Relations between macroscopic and microscopic adhesion of *Streptococcus mitis* strains to surfaces / V. Vadillo-Rodríguez [*et al.*] // *Microbiology*. – 2004. – V. 150, N. 4. – P. 1015–1022.
274. Van Hamme, J.D. Bioavailability and biodegradation of organic pollutants — A microbial perspective / J.D. Van Hamme // *Biodegradation and Bioremediation (Soil Biology, V. 2)* / Ed. by A. Singh, O.P. Ward. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2004. – P. 37–56.
275. Vázquez-Boland, J.A. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what's in a name? / J.A. Vázquez-Boland, W.G. Meijer // *Molecular Microbiology*. – 2019. – V. 112, N. 1. – P. 1–15.
276. Vereecke, D. Functional genomics insights into the pathogenicity, habitat fitness, and mechanisms modifying plant development of *Rhodococcus* sp. PBTS1 and PBTS2 / D. Vereecke [*et al.*] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – Article 14. – 24 pp.
277. Viggor, S. Occurrence of diverse alkane hydroxylase *alkB* genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water / S. Viggor [*et al.*] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2015. – V. 101, N. 2. – P. 507–516.

278. Vinage, I. Biological waste gas treatment with a modified rotating biological contactor. I. Control of biofilm growth and long-term performance / I. Vinage, P.R. van Rohr // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2003a. – V. 26. – P. 69–74.

279. Vinage, I. Biological waste gas treatment with a modified rotating biological contactor. II. Effect of operating parameters on process performance and mathematical modeling / I. Vinage, P.R. van Rohr // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2003b. – V. 26. – P. 75–82.

280. Vuong, C. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress / C. Vuong [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – V. 187, N. 9. – P. 2967–2973.

281. Weathers, T.S. Enhanced biofilm production by a toluene-degrading *Rhodococcus* observed after exposure to perfluoroalkyl acids / T.S. Weathers, C.P. Higgins, J.O. Sharp // *Environmental Science and Technology*. – 2015. – V. 49. – P. 5458–5466.

282. Wells, T.J. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation / T.J. Wells [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 10, N. 3. – P. 589–604.

283. Wrenn, B.A. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure / B.A. Wrenn, A.D. Venosa // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1996. – V. 42, N. 3. – P. 252–258.

284. Wright, C.J. The application of atomic force microscopy force measurements to the characterisation of microbial surfaces / C.J. Wright, I. Armstrong // *Surface and Interface Analysis*. – 2006. – V. 38. – P. 1419–1428.

285. Wu, S. Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review / S. Wu [et al.] // *Biointerphases*. – 2018. – V. 13, N. 6. – Article 060801. – 11 pp.

286. Yajima, A.A. Identification of platelet receptors for the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic-acid-binding adhesion / A.A. Yajima, Y. Takahashi, K. Kohishi // *Microbiology and Immunology*. – 2005. – V. 49, N. 8. – P. 795–800.

287. Yam, K.C. Catabolism of aromatic compounds and steroids by *Rhodococcus* / K.C. Yam, R. van der Geize, L.D. Eltis // *Biology of Rhodococcus* / Ed. by H. Alvarez. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. – P. 133–169.
288. Yang, H.Y. Degradation of recalcitrant aliphatic and aromatic hydrocarbons by a dioxin-degrader *Rhodococcus* sp. strain p52 / H.Y. Yang [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – V. 21, N. 18. – P. 11086–11093.
289. Ye, J. Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation / J. Ye [et al.] // *Material Science and Engineering: C*. – 2017. – V. 78. – P. 738–747.
290. Yousef, F. *In silico* analysis of large microbial surface proteins / F. Yousef, M. Espinosa-Urgel // *Research in Microbiology*. – 2007. – V. 158. – P. 545–550.
291. Zampolli, J. Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus* / J. Zampolli [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 103, N. 3. – P. 1069–1080.
292. Zeraik, A.E. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity / A.E. Zeraik, M. Nitschke // *Current Microbiology*. – 2010. – V. 61, N. 6. – P. 554–559.
293. Zhang, Y. *Staphylococcus aureus* SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel “close, dock, lock and latch” mechanism for complement evasion / Y. Zhang [et al.] // *Biochemical Journal*. – 2017. – V. 474. – P. 1619–1631.
294. Zhang, P. Cationic conjugated polymers for enhancing beneficial bacteria adhesion and biofilm formation in gut microbiota / P. Zhang [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2020. – V. 188. – 1108152. – 7 pp.
295. Zhong, R. Simply and reliably integrating micro heaters/sensors in a monolithic PCR-CE microfluidic genetic analysis system / R. Zhong [et al.] // *Electrophoresis*. – 2009. – V. 30. – P. 1297–1305.