

УДК 579.222 : 579.66

Ю.Г.МАКСИМОВА<sup>1,2,\*</sup>, А.Ю.МАКСИМОВ<sup>1,2</sup>, В.А.ДЕМАКОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, 614990

e-mail: maks@iegm.ru

## Биопленки нитрилгидролизующих бактерий: динамика роста, устойчивость к токсичным веществам и биотехнологический потенциал

В процессе культивирования штаммов *Rhodococcus ruber* gt1, *Pseudomonas fluorescens* C2, *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rh. erythropolis* 11-2 в присутствии носителей получены моно- и смешанные биопленки этих бактерий. Изучены трансформация алифатических и ароматических нитрилов биопленками нитрилгидролизующих бактерий, а также динамика роста биопленок *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2 и их устойчивость к токсичным субстратам и продуктам гидролиза нитрилов. Показано, что биомасса биопленки *P. fluorescens* C2 и общее содержание АТФ в культуре достигают максимума через 1 сут роста, тогда как у *Rh. ruber* gt1 — через 3–4 сут. Биопленки как *Rh. ruber* gt1, так и *P. fluorescens* C2 более устойчивы к воздействию высоких концентраций акриламида и акрилонитрила и обладают большими адаптивными способностями, чем планктонные клетки.

*Ключевые слова:* амидаза, биопленки, нитрилаза, нитрилгидратаза, нитрилгидролизующие бактерии.

Согласно современным представлениям, подавляющее большинство прокариот в природе существуют в прикрепленном состоянии — в виде биопленок, как ассоциированное с поверхностью сообщество микроорганизмов, обычно заключенное во внеклеточный матрикс [1]. Интерес к изучению биопленок микроорганизмов первоначально был связан с медицинскими проблемами, возникающими из-за бактериальной колонизации медицинского оборудования, имплантантов и катетеров, а также с повышенной устойчивостью биопленок к антибиотикам, биоцидам и клеткам иммунной системы [2, 3]. Тем не менее, устойчивость био-

пленок к факторам окружающей среды играет положительную роль в системах очистки сточных вод или загрязненных почв. Кроме того, биопленки промышленно значимых микроорганизмов могут являться самоиммобилизованным биокатализатором, сохраняющим жизнеспособность в течение длительного времени, что особенно актуально при воздействии токсичных субстратов и продуктов [4–6].

Нитрилутилизирующие бактерии обладают большим биотехнологическим потенциалом и в течение нескольких десятилетий успешно используются для производства акриламида из акрило-

---

Максимова Юлия Геннадьевна, Максимов Александр Юрьевич, Демаков Виталий Алексеевич.

*Список сокращений:* АА — акриламид; АК — акриловая кислота; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ДМСО — диметилсульфоксид; КОЕ — колониеобразующая единица; НА — никотинамид; НАК — нитрил акриловой кислоты; НК — никотиновая кислота; ОП — оптическая плотность; среда LB — среда Лурия—Бергани; УЗ — ультразвук.

\* Автор для переписки.

нитрила и никотинамида из 3-цианопиридина [7—10]. Ряд работ посвящен иммобилизации клеток нитрилутилизующих бактерий с целью улучшения свойств биокатализатора, его активности и стабильности при многократном и долговременном использовании. Чаще всего иммобилизацию осуществляют за счет включения клеток или их компонентов в структуру гелей: альгината кальция и бария [11—13], κ-каррагинана [14], агар и агарозы [15], поливинилового спирта [16], полиакриламида [17]. Были также получены активные биокатализаторы на основе клеток нитрилутилизующих бактерий, адсорбированных на углеродных носителях [18, 19]. Получение гетерогенного биокатализатора обычно основано на искусственной иммобилизации клеток суспензии, предварительно выращенной до стационарной фазы, тогда как потенциал биопленок (их повышенная устойчивость к высоким концентрациям токсичных веществ, возможность долговременного функционирования) в полной мере не используется.

Целью работы явилось изучение динамики роста биопленок нитрилгидролизующих бактерий, трансформации алифатических и ароматических нитрилов монопленками и смешанными биопленками, а также влияния на клетки биопленок токсичных субстратов и продуктов гидролиза нитрилов в сравнении с планктонными клетками.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Формирование биопленок нитрилгидролизующих бактерий и их визуализация.** Биопленки штаммов *Rhodococcus ruber* gt1 (ИЭГМ 612, Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов, акроним ИЭГМ, [www.iegmr.ru/iegmcol/index.html](http://www.iegmr.ru/iegmcol/index.html)), обладающих нитрилгидролизующей активностью, *Pseudomonas fluorescens* C2 (ВКМ В-2597Д), содержащих нитрилазу, *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rh. erythropolis* 11-2 с выраженной амидазной активностью были выращены на минеральной среде N следующего состава, г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  — 3,75;  $\text{NaCl}$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 0,01;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,005; pH 7,2 ± 0,2 (все соли производства «Реахим», Россия). Источником углерода для штаммов *Rh. ruber* gt1, *P. fluorescens* C2 и *Rh. erythropolis* 11-2 служила глюкоза («Реахим») в конечной концентрации 0,1%. В качестве источника азота использовали хлорид аммония («Реахим») в концентрации 0,05% для *Rh. ruber* gt1 и ацетонитрил («Криохром», Россия) ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{CN}$ ) в концентрации 0,5 и 0,05% для *P. fluorescens* C2 и *Rh. erythropolis* 11-2, соответственно. Для *A. faeca-*

*lis* 2 источником и азота, и углерода служил 0,1 М ацетамид (Fluka, США). Ростовые субстраты асептически добавляли в автоклавированную и охлажденную до 25° среду, содержащую 1 г углеродных носителей или 1 дм<sup>2</sup> полиэтиленовой пленки. Бактериальные штаммы культивировали на качалке с частотой вращения 120 об/мин при температуре 30°. В качестве носителей использовали волокнистые адсорбенты марок «Карбопон» и «Урал ТМ-4» (карбонизированные углеродные вязкозные волокна) и «Карбопон-В-актив» (активированные вязкозные углеродные волокна) («Химволокно», Светлогорское, Беларусь), а также полиэтилен высокой плотности в виде пленки (Россия).

Биопленку, выращенную на носителях, визуализовали с помощью светового микроскопа DM LS (Leica, Германия) с фазовым контрастом и сканирующего электронного микроскопа MIRA 3 (TESCAN, Чехия) при ускоряющем напряжении 10 кВ. Электронно-микроскопический анализ образцов выполнен в демонстрационно-методическом центре TESCAN (Санкт-Петербург).

Для анализа жизнеспособности клеток биопленки выращивали в чашках Петри на предметных стеклах (25×75 мм), погруженных в синтетическую минеральную среду N, инокулированную клетками соответствующего штамма. Биопленки бактерий и суспендированные клетки обрабатывали красителем LIVE/DEAD® (Syto 9/пропидиум иодид) BacLight™ Bacterial Viability Kits (Invitrogen, США) из расчета 3 мкл смеси красителя на 1 мл физиологического раствора (0,85%-ный NaCl, «Реахим»), инкубировали в темноте в течение 20 мин и просматривали в световом микроскопе DM LS (Leica) с флуоресценцией.

**Получение смешанных биопленок нитрилгидролизующих бактерий.** Получение смешанных биопленок *Rh. ruber* gt1 и *Rh. erythropolis* 11-2. В среду N (100 мл) с 0,1% глюкозы в качестве источника углерода и 0,05% ацетонитрила в качестве источника азота вносили по 5 мл  $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$  КОЕ/мл суспензии родококков обоих штаммов и культивировали в присутствии носителей Карбопона и полиэтиленовой пленки высокой плотности при 30° с перемешиванием на качалке (130 об/мин).

**Получение смешанных биопленок *Rh. ruber* gt1 и *A. faecalis* 2.** В среду N (100 мл), содержащую 0,1% глюкозы в качестве источника углерода для штамма *Rh. ruber* gt1 и 0,1 М ацетамид для штамма *A. faecalis* 2, а также 0,1 М хлорид аммония в качестве источника азота, вносили 1 мл инокулята *Rh. ruber* gt1 ( $1,3 \cdot 10^9$  КОЕ/мл) и 0,5 мл *A. faecalis* 2 ( $1,0 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл) и культивировали в присутствии носителей Карбопона и полиэтилена

высокой плотности при 30° с перемешиванием на качалке (130 об/мин). На 7-е сутки культивирования подсчитывали количество жизнеспособных клеток планктона при посеве на агаризованную среду Луриа—Бертани (LB); колонии различали по окраске. Биопленки обрабатывали ультразвуком пятикратно в течение 1 мин при 37 кГц в ультразвуковой ванне Elma Ultrasonic 30S (Elma, Германия), высевали клетки на среду LB и готовили препараты для фазово-контрастной световой микроскопии.

**Трансформация акрилонитрила и 3-цианопиридина биопленками нитрилгидролизующих бактерий.** Суспензию, полученную при гетерофазном культивировании штаммов, отделяли от носителя с биопленкой, центрифугировали 20 мин при 10000 g, ресуспендировали в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,2, «Реахим») и центрифугировали повторно. Носитель промывали 30 мл фосфатного буфера и проводили трансформацию субстратов отдельно биопленкой и планктонными клетками. Контролем служила суспензия, выращенная без носителей. Проводили трансформацию 200 мМ раствора 3-цианопиридина (Sigma-Aldrich, США) и 1,3 М раствора акрилонитрила в 10 мл фосфатного буфера при постоянном перемешивании на качалке с частотой вращения 120 об/мин и температуре 30°. Трансформацию осуществляли, используя всю биомассу, выращенную в виде суспензии и в виде биопленок в течение 7 сут в 100 мл среды в условиях, указанных выше. Клетки контрольной суспензии, выращенной без носителя, ресуспендировали в 20 мл фосфатного буфера и проводили трансформацию таких же концентраций субстратов. Последние вносили в реакционную смесь одновременно. Время реакции в зависимости от активности штамма составляло 24 ч для конверсии нитрилазой *P. fluorescens* C2 и 3 ч для трансформации нитрилгидратазой *Rh. ruber* gt1. В отобранных пробах (1 мл) реакцию останавливали, добавляя 50 мкл концентрированной соляной кислоты, концентрацию субстратов и продуктов ферментативной реакции определяли с помощью ВЭЖХ.

Содержание акрилонитрила, акриламида и акриловой кислоты анализировали путем ВЭЖХ на хроматографе LC-10 (Shimadzu, Япония) с колонкой Synergi 4u Hydro-RP 80A (250 Ч 4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 25 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  («Реахим»); скорость потока составляла 0,75 мл/мин при температуре 25°; детекцию проводили при длине волны 200 нм. Концентрацию 3-цианопиридина, никотинамида и никотиновой кислоты в пробах определяли путем ВЭЖХ на ко-

лонке Luna 5u C18 (2) 100A (250 × 4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали раствор 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 25% ацетонитрила, скорость потока составляла 0,5 мл/мин при температуре 25°, детекцию проводили при длине волны 200 нм.

**Определение динамики роста биопленок *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2.** Подсчет количества клеток биопленки связан с определенными затруднениями, вызванными необходимостью механического отделения клеток от носителя без потери их жизнеспособности для последующего посева на твердую питательную среду и определения КОЕ. Поэтому для оценки пленкообразования часто используют косвенный метод, например, окраску кристаллическим фиолетовым с экстракцией красителя спиртом или уксусной кислотой. Кристаллический фиолетовый — это основной краситель, который связывается с отрицательно заряженными молекулами поверхности клетки и полисахаридами внеклеточного полимерного матрикса.

С этой целью в лунки полистирольного 96-луночного планшета вносили среду N (150 мкл) и инокулировали суспензией нитрилгидролизующих бактерий (10 мкл,  $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$  КОЕ/мл). Один раз в сутки планктонные клетки удаляли из лунок декантацией, отмывали биопленку 200 мкл фосфатного буфера дважды и окрашивали 0,1%-ным раствором кристаллического фиолетового [20—22] в течение 40 мин в темноте. Затем удаляли краситель, пробу отмывали однократно фосфатным буфером и экстрагировали краситель 96%-ным спиртом (200 мкл). Биопленкообразование оценивали по оптической плотности раствора красителя при 540 нм на планшетном ридере Tecan infinite M200 pro (Tecan, Швейцария). Так как краситель окрашивает и живые, и мертвые клетки, а также полисахаридный матрикс, этот метод не позволяет оценить количество жизнеспособных клеток, а дает представление лишь о массе биопленки в целом [24].

Поэтому для оценки динамики роста нитрилгидролизующих бактерий был использован еще один метод, позволяющий оценить количество жизнеспособных клеток [23, 24], что особенно актуально, когда клетки прикреплены к субстрату [25, 26]. Для этого применяли биолюминесцентный метод, основанный на реакции окисления D-люциферина люциферазой светляков, которое происходит в присутствии АТФ и сопровождается свечением с интенсивностью, пропорциональной содержанию АТФ. На основании используемых методов была рассчитана корреляция показателей, отражающих количество биомассы и жизнеспособность биопленок. Определяли общее количест-

во АТР и рассчитывали количество АТР на лунку. Один раз в сутки планктонные клетки удаляли из лунок декантацией, отмывали биопленку 200 мкл фосфатного буфера дважды и вносили 100 мкл ДМСО для экстракции АТР из лунок. После 15 мин экспозиции на льду пробы отбирали, замораживали и хранили при  $-18^{\circ}$ . Концентрацию АТР определяли, используя стандартный набор реактивов (АТР Bioluminescent Assay Kit, Sigma). Пробы разводили в 10 раз, смешивали 100 мкл образца с 100 мкл реагента, содержащего люциферин и люциферазу светляков. Измерение люминесценции осуществляли на планшетном ридере Tecan infinite M200 pro (Tecan); концентрацию АТР определяли по калибровочному графику.

**Влияние акрилонитрила, акриламида и акриловой кислоты на планктонные клетки и биопленки нитрилгидролизующих бактерий.** Биопленки *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2 выращивали в лунках 96-луночного полистирольного планшета, как описано выше. Супернатант отделяли от четырехсуточных биопленок и переносили в пустые лунки. Биопленки промывали 150 мкл фосфатного буфера дважды, вносили 150 мкл буфера, в который добавляли акрилонитрил до конечной концентрации 1,3 М, акриламид до концентрации 1,7 М и акриловую кислоту до концентрации 1,3 М. Те же концентрации токсичных веществ вносили в суспензию планктонных клеток. После 20 мин экспозиции раствор с биопленок удаляли декантацией, а суспензию центрифугировали в планшетах при 2464 g. Супернатант удаляли, к биопленкам и осадку клеток добавляли 100 мкл ДМСО. Через 15 мин пробы отбирали, замораживали и хранили при  $-18^{\circ}$ . Концентрацию АТР определяли, как описано выше.

Для оценки жизнеспособности биопленки и отцентрифугированную при 2464 g суспензию клеток промывали 150 мкл стерильного фосфатного буфера однократно, вносили 100 мкл буфера и обрабатывали ультразвуком пятикратно в течение 1 мин при 37 кГц, поместив планшеты в ультразвуковую ванну Elma Ultrasonic 30S (Elma, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) при посеве из разведений на агаризованную среду LB.

**Статистическая обработка результатов.** Средние значения полученных данных определяли по результатам не менее, чем трех независимых опытов. При статистической обработке оценивали стандартное отклонение и доверительные интервалы; достоверность различий определяли с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости

$p < 0,05$ . Анализ результатов проводили с помощью стандартных пакетов лицензионных программ MS Excel 2003 и Statistica.

Вид распределения исследуемых признаков определяли с использованием критериев Колмогорова—Смирнова и Шапиро—Уилка. Для исследования связи двух признаков в случае нормального распределения вычисляли коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ): при этом статистическую достоверность рассчитывали при уровне значимости  $p = 0,05$ . При распределении признаков, отличном от нормального, вычисляли непараметрический коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $R$ ); при этом достоверными считали связи при  $p < 0,05$ . Степень корреляции оценивали в зависимости от значения коэффициента Спирмена:  $|R| < 0,3$  — слабая корреляция;  $0,3 < |R| < 0,70$  — умеренная корреляция;  $|R| > 0,70$  — сильная корреляция.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

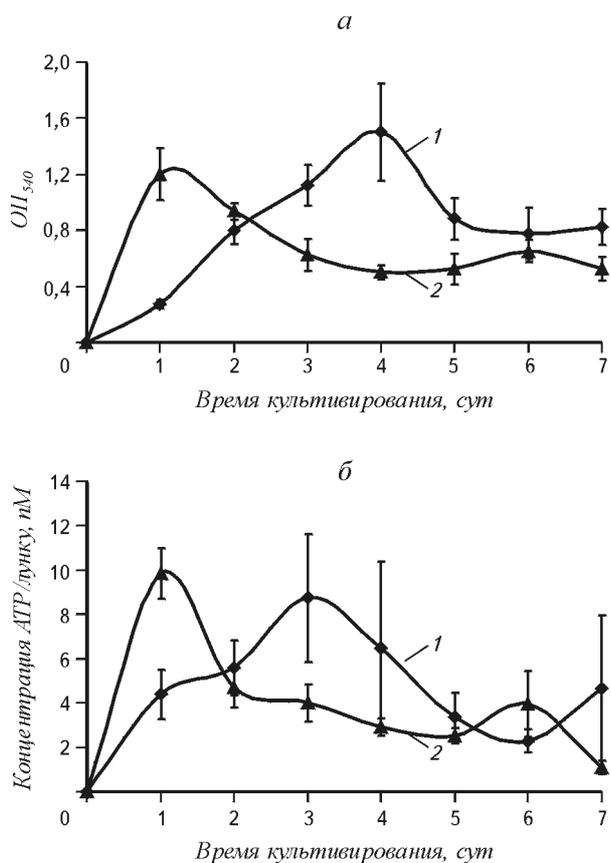
### Динамика роста биопленок

#### *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2

При посуточной окраске биопленок *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2 и измерении оптической плотности (ОП) экстрагированного красителя было определено, что максимальное накопление биомассы биопленки *P. fluorescens* C2 достигается уже через 1 сут роста, тогда как биопленки *Rh. ruber* gt1 — на четвертые сутки (рис. 1, а). После 1 сут роста количество биомассы биопленки *P. fluorescens* C2 постепенно снижается, но полного разрушения биопленки к 7-м суткам роста не наблюдается.

При оценке динамики роста биопленок по содержанию внутриклеточного АТР наблюдали сходство кривых роста, полученных при использовании обоих методов (см. рис. 1, б). Так, максимальное количество АТР экстрагировалось из суточных биопленок *P. fluorescens* C2 и трехсуточных биопленок *Rh. ruber* gt1. К 7-м суткам количество АТР в биопленках *P. fluorescens* C2 снижалось более значительно, чем ОП экстрагированного раствора красителя. Следовательно, к 7-м суткам количество жизнеспособных клеток *P. fluorescens* C2 падало, тогда как общая масса биопленки, состоящая из живых, неживых клеток и полимерного матрикса, уменьшалась незначительно.

При посуточном определении ОП экстрагированного красителя кристаллического фиолетового и концентрации внутриклеточного АТР у *Rh. ruber* gt1 отмечается умеренная корреляция этих параметров ( $r = 0,513$ ;  $p = 0,05$ ). У *P. fluorescens* C2



**Рис. 1.** Динамика роста биопленок *Rh. ruber* gt1 (1) и *P. fluorescens* C2 (2), оцененная на основании: а — измерения ОП экстрагированного красителя кристаллического фиолетового; б — общего содержания АТФ

при распределении значений, отличным от нормального, между ними отмечается достоверно высокая корреляция ( $R=0,821$ ;  $p=0,02$ ). Таким образом, несмотря на то, что значения, полученные методом окраски кристаллическим фиолетовым, отражают массивность биопленки без учета жизнеспособных клеток, между величинами, определяющими биопленкообразование, и содержанием внутриклеточной АТФ наблюдается корреляция от умеренной до высокой, что дает возможность остановиться на одном из вышеперечисленных способов учета динамики роста биопленки в зависимости от поставленных задач.

### Трансформация акрилонитрила и 3-цианопиридина биопленками нитрилгидролизующих бактерий

Было показано, что суммарная продукция акриламида при трансформации акрилонитрила, состоящая из продукции планктонными клетками

и биопленками *Rh. ruber* gt1, выращенными на полиэтилене, достоверно не отличается от контрольной, полученной при трансформации того же количества акрилонитрила суспензионной культурой (рис. 2, а). В то же время, при конверсии 3-цианопиридина планктонные клетки и биопленки *Rh. ruber* gt1 на карбонизированных углеродных волокнах Урал ТМ-4 образуют суммарно большее количество никотинамида, чем контрольная суспензия, тогда как продукция никотинамида планктоном и биопленками на полиэтилене при трансформации этого субстрата была равна контрольной (см. рис. 2, б). Количество образованной акриловой кислоты при трансформации акрилонитрила биопленками и планктоном *P. fluorescens* C2 с использованием всех носителей было ниже, чем в контроле (рис. 3, а) и только при трансформации 3-цианопиридина продукция никотиновой кислоты планктоном и биопленками на полиэтилене была равна таковой в контроле (см. рис. 3, б). Наименьшее количество продукта — как акриламида и акриловой кислоты, так и никотинамида и никотиновой кислоты — было получено при трансформации соответствующих субстратов биопленками, выращенными на активированных углеродных волокнах Карбопон-В-актив. Этот факт может объясняться природой самого носителя, который в большей степени адсорбирует продукты реакции, чем другие используемые материалы. Наибольшее количество продукта получено при трансформации алифатических и ароматических субстратов биопленками, выращенными на полиэтилене и в ряде случаев на Урале ТМ-4.

Методом фазово-контрастной световой микроскопии были визуализированы биопленки, сформированные на полиэтилене (рис. 4, а, б). По-видимому, гидрофобная поверхность полиэтилена является подходящей для адгезии клеток микроорганизмов, имеющих как большей частью гидрофобную (*Rh. ruber* gt1), так и главным образом гидрофильную поверхность (*P. fluorescens* C2), обеспечивая первичное неспецифическое взаимодействие клетки и поверхности, за которым следует инициация образования биопленки. Так как бактериальные клетки имеют различные структуры гидрофильной и гидрофобной природы, таким образом обеспечивается оптимальное взаимодействие между гетерогенной поверхностью бактериальной клетки и носителем [27].

Известно, что трансформация нитрилов с образованием соответствующих кислот может протекать как по одноэтапному нитрилазному пути, так и в две стадии, включающие гидратацию до амидов нитрилгидратазой и последую-

ший гидролиз амидазой до карбоновой кислоты [10]. Не все штаммы имеют одинаково активные нитрилгидратазу и амидазу, так как нитрилгидролизующие бактерии биотехнологического значения нередко бывают селекционированы в направлении увеличения либо нитрилгидратазной, либо амидазной активности. В данном случае было бы целесообразно создание гетерогенного биокатализатора для трансформации нитрилов в соответствующие карбоновые кислоты на основе нескольких штаммов, один из которых обладает высокой нитрилгидратазной, а другой — выраженной амидазной активностью [28]. Наиболее экономичным в данном случае представляется их совместное гетерофазное культивирование в присутствии носителя с целью получения смешанной биопленки этих штаммов. Эта возможность была изучена при совместном культивировании в присутствии углеродного волокнистого материала Карбопона и полиэтилена двух штаммов родококков, один из которых обладал высокой нитрилгидратазной активностью без проявления амидазной активности (*Rh. ruber* gt1), другой — выраженной амидазной активностью (*Rh. erythropolis* 11-2). Во втором варианте штамм, проявляющий амидазную активность, был грамотрицательным (*A. faecalis* 2).

При росте смешанной культуры *Rh. erythropolis* 11-2 и *Rh. ruber* gt1 первый образовал в 5 раз меньше колоний при посеве из планктона ( $1,7 \cdot 10^8$  против  $9,1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл). Для определения биокаталитической способности биопленок была проведена 48-часовая трансформация 1,3 М раствора акрилонитрила (рис. 5, а, б).

Из данных рис. 5 видно, что смешанные биопленки, состоящие из штаммов с высокой нитрилгидратазной и выраженной амидазной активностью, оказались недостаточно эффективны в реакции гидролиза нитрилов до карбоновых кислот. Этот вывод верен для смесей из представителей как одного, так и разных видов бактерий, отличающихся предпочтениями по питательному субстрату. Возможно, что причиной этой неэффективности в первом случае является конкуренция за субстрат, а во втором — более низкая адгезия клеток одного из штаммов на изученных носителях.

В данном случае биопленки были образованы в основном штаммом *Rh. ruber* gt1, который осуществлял трансформацию НАК до акриламида, причем образование акриламида прикрепленными и планктонными клетками в сумме достоверно превышало его образование контрольной суспензией, выращенной без носителя. Продук-

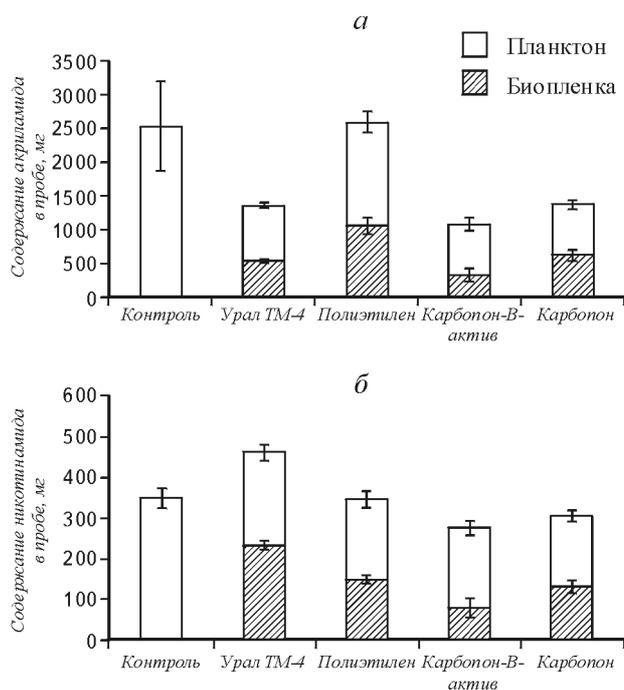


Рис. 2. Образование акриламида (а) и никотинамида (б) биопленками и планктонными клетками *Rh. ruber* gt1 в реакции трансформации акрилонитрила и 3-цианопиридина, соответственно. Контроль — планктонная культура

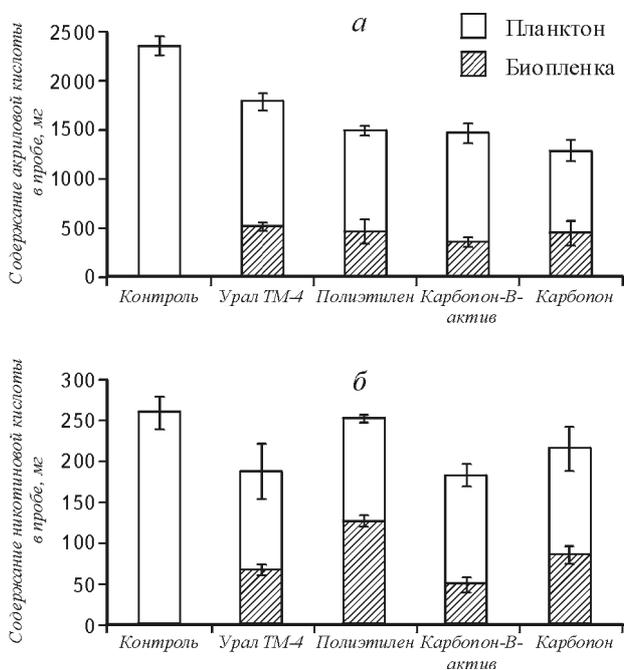
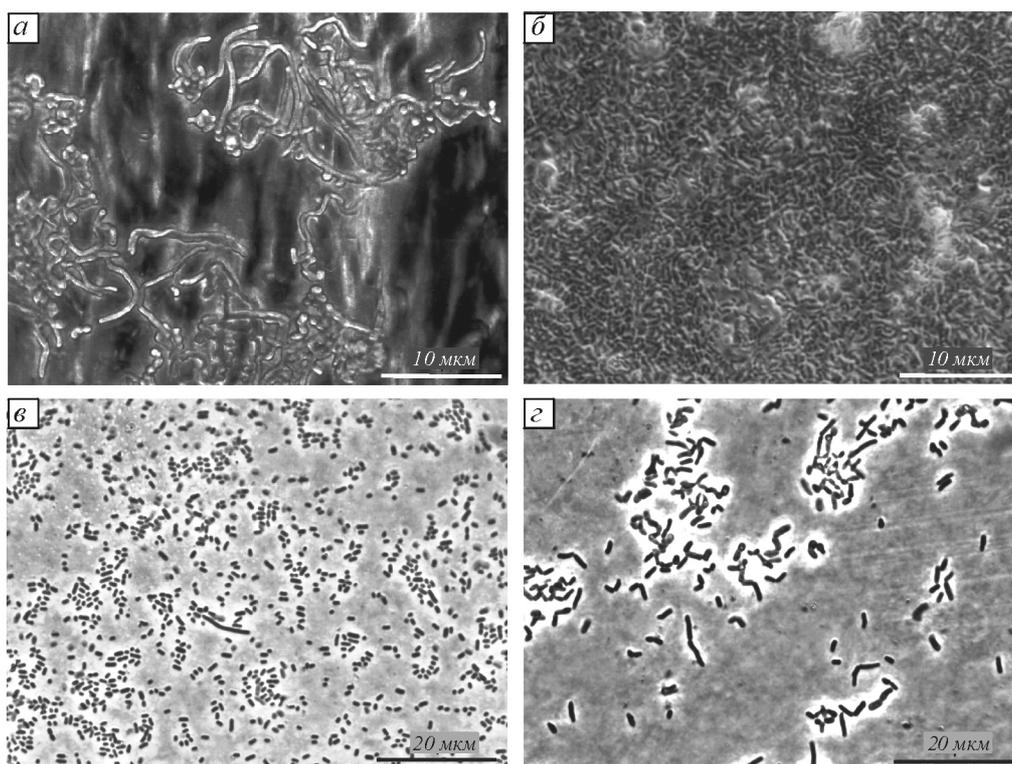
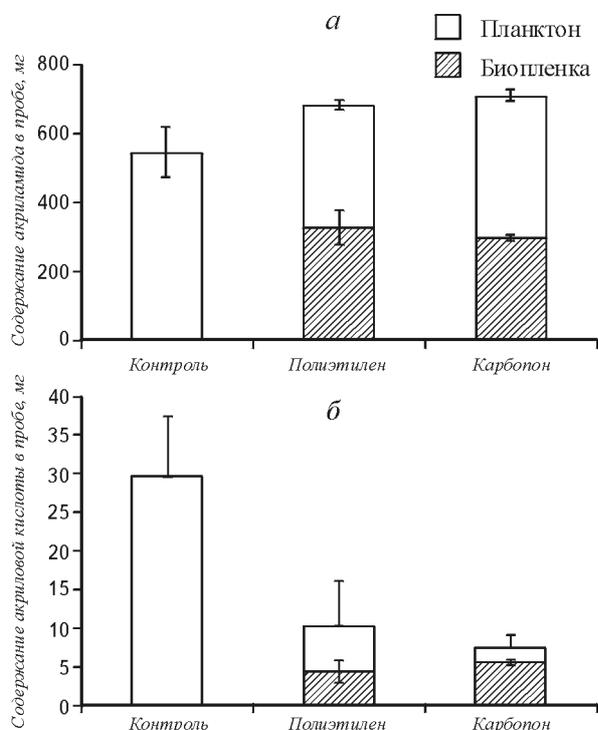


Рис. 3. Образование акриловой (а) и никотиновой (б) кислоты биопленками и планктонными клетками *P. fluorescens* C2 в реакции трансформации акрилонитрила и 3-цианопиридина, соответственно. Контроль — планктонная культура



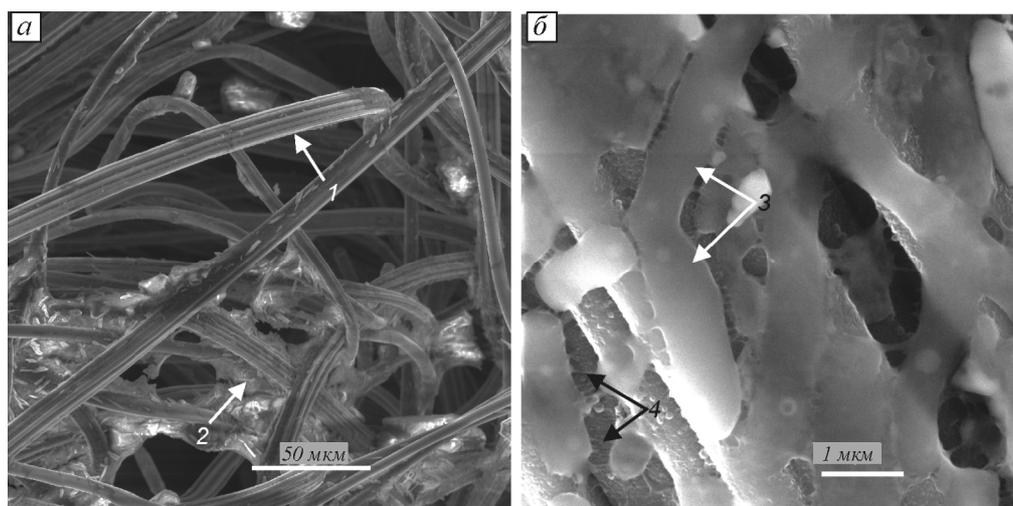
**Рис. 4.** Визуализация биопленок *Rh. ruber* gt1 (а) и *P. fluorescens* C2 (б), а также клеток смешанных биопленок *Rh. ruber* gt1 / *A. faecalis* 2 (в) и *Rh. erythropolis* 11-2 / *Rh. ruber* gt1 (г). а и б — биопленки, выращенные на полиэтилене; в и г — биопленки, выращенные на полиэтилене, были обработаны УЗ, клетки посеяны на агар ЛВ и изучены под микроскопом с фазовым контрастом



**Рис. 5.** Трансформация акрилонитрила до акрамида (а) и акриловой кислоты (б) смешанными биопленками *Rh. erythropolis* 11-2 и *Rh. ruber* gt1 в течение 48 ч. Контроль — смешанная планктонная культура

тивность *Rh. erythropolis* 11-2 при гетерофазном культивировании была значительно ниже, чем при культивировании в суспензии без носителей, о чем можно судить по образованию акриловой кислоты из акриламида. Таким образом, формирование биопленок смешанными культурами одного рода бактерий в данном случае происходило с преобладанием одного вида над другим, а именно, *Rh. ruber* gt1 над *Rh. erythropolis* 11-2.

Во втором варианте смешанная суспензия содержала  $1,1 \cdot 10^{11}$  КОЕ/мл *Rh. ruber* gt1 и  $8,6 \cdot 10^{11}$  КОЕ/мл *A. faecalis* 2. Более интенсивный рост *Rh. ruber* gt1, отличающийся на два порядка от такового в присутствии *Rh. erythropolis* 11-2, вероятно, связан с использованием разных источников углерода при росте совместно с *A. faecalis* 2, не потребляющего глюкозу в качестве источника питания. Отсутствие конкуренции за источники питания приводит к интенсивному росту и второго штамма — *A. faecalis* 2. Смешанные биопленки, образованные *Rh. ruber* gt1 и *A. faecalis* 2 на Карбопоне, были визуализированы в сканирующем электронном микроскопе (рис. 6, а, б). Биопленки на углеродном волокне заполняли межволоконное пространство, а на крупном плане были заметны тяжи (см. рис. 6, б, г) полимерного вещества меж-



**Рис. 6.** Визуализация смешанных биопленок *Rh. ruber* gt1 и *A. faecalis* 2, выращенных на Карбопоне, в электронном сканирующем микроскопе: *a* — общий вид; *б* — отдельные клетки; 1 — углеродное волокно; 2 — биопленка; 3 — бактериальные клетки; 4 — тяжи полимерного вещества

ду клетками и волокном. V-образно делящиеся клетки с высокой долей вероятности могут являться родококками, тогда как палочки меньшего размера — бактериями *Alcaligenes* sp. (см. рис. 6, б). При посеве на среду LB клеток смешанной биопленки методом световой фазово-контрастной микроскопии показано присутствие мелких коротких палочек и удлиненных клеток, более чем в 10 раз превышающих размеры большинства бактерий (см. рис. 4, в). В препарате же, полученном из выращенных на агаризованной среде LB клеток смешанной биопленки *Rh. ruber* gt1 и *Rh. erythropolis* 11-2, отмечено присутствие V-образно делящихся клеток разного диаметра, характерных для родококков (см. рис. 4, г).

Проведена 48-часовая трансформация 200 мМ раствора 3-цианопиридина клетками планктона и биопленки. Показано, что за 48 ч трансформации 3-цианопиридина контрольной суспензией весь образовавшийся никотинамид трансформируется в никотиновую кислоту амидазой *A. faecalis* 2, тогда как биопленки в основном образуют никотинамид, и лишь малое его количество конвертируется в никотиновую кислоту (рис. 7, а, б). Следовательно, несмотря на то, что при совместном культивировании *Rh. ruber* gt1 и *A. faecalis* 2 в суспензии эти микроорганизмы нарастают интенсивно, в биопленке преобладают клетки *Rh. ruber* gt1, о чем можно судить по эффективной трансформации цианопиридина с образованием только никотинамида, а не никотиновой кислоты. Возможно, это связано с лучшей адгезией клеток родококков на волокнистом углеродном материале и полиэтилене.

### Влияние токсичных субстратов и продуктов гидролиза нитрилов на планктонные клетки и биопленки *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2

Изучено влияние акрилонитрила (НАК), акриламида (АА) и акриловой кислоты (АК) на клетки четырехсуточной культуры *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2, находящиеся в суспензии и в биопленке. Показано, что при 20-минутном воздействии 1,7 М раствора АА на планктонные клетки *Rh. ruber* gt1 содержание АТФ в клетках снижается более, чем наполовину по сравнению с контролем, тогда как концентрация АТФ в клетках биопленки относительно контроля достоверно возрастает (рис. 8, а). Введение раствора НАК в концентрации 1,3 М не приводит к достоверному снижению содержания АТФ в клетках планктона, тогда как в клетках биопленки оно значительно возрастает (более чем в 2 раза) по сравнению с контролем. При этом титр клеток планктона *Rh. ruber* снижается при воздействии НАК и АА с  $(1,60 \pm 0,19) \cdot 10^9$  до  $(8,34 \pm 3,27) \cdot 10^8$  и  $(3,89 \pm 0,20) \cdot 10^8$  КОЕ/мл, соответственно. Воздействие токсичных веществ на клетки биопленки *Rh. ruber* gt1 также приводит к снижению количества культивируемых клеток — с  $(7,50 \pm 0,30) \cdot 10^9$  до  $(1,24 \pm 0,19) \cdot 10^9$  после воздействия НАК и до  $(0,89 \pm 0,35) \cdot 10^8$  КОЕ/мл после воздействия АА. В этом случае расхождение данных, полученных АТФ-метрией и методом КОЕ, можно объяснить стрессовым состоянием клеток, выражающимся в разобщении энергетического и конструктивного обмена, в результате которого происходит накопление АТФ в клетке [29].

БИОПЛЕНКИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ: ДИНАМИКА РОСТА

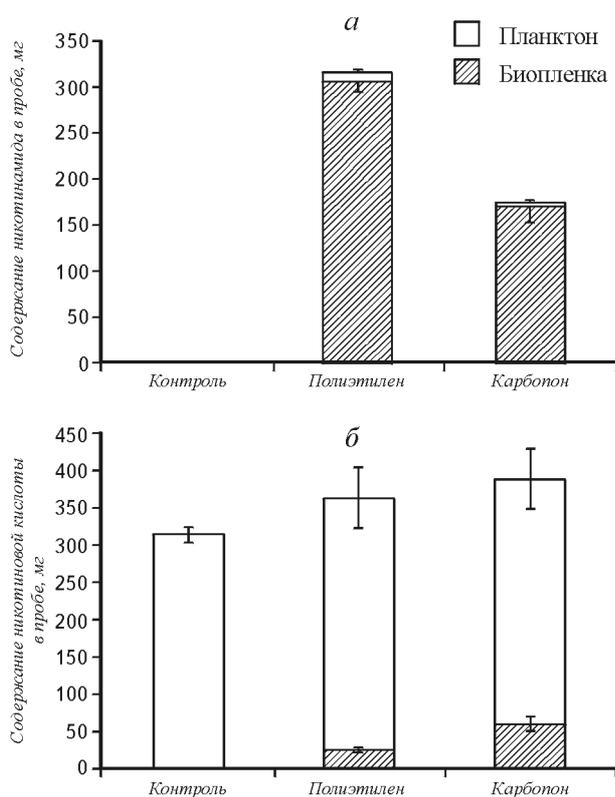


Рис. 7. Трансформация 3-цианопиридина до никоти-  
намида (а) и никотиновой кислоты (б) смешанными био-  
пленками *Rh. ruber gt1* и *A. faecalis 2*

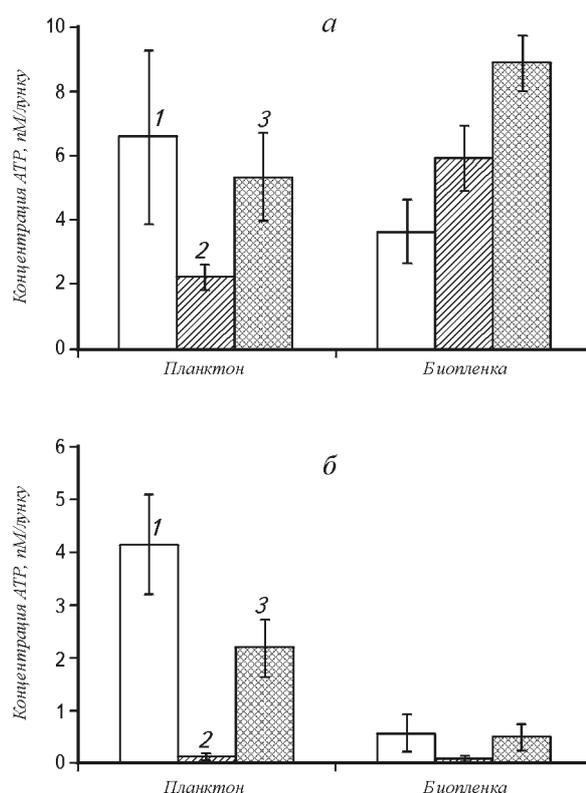


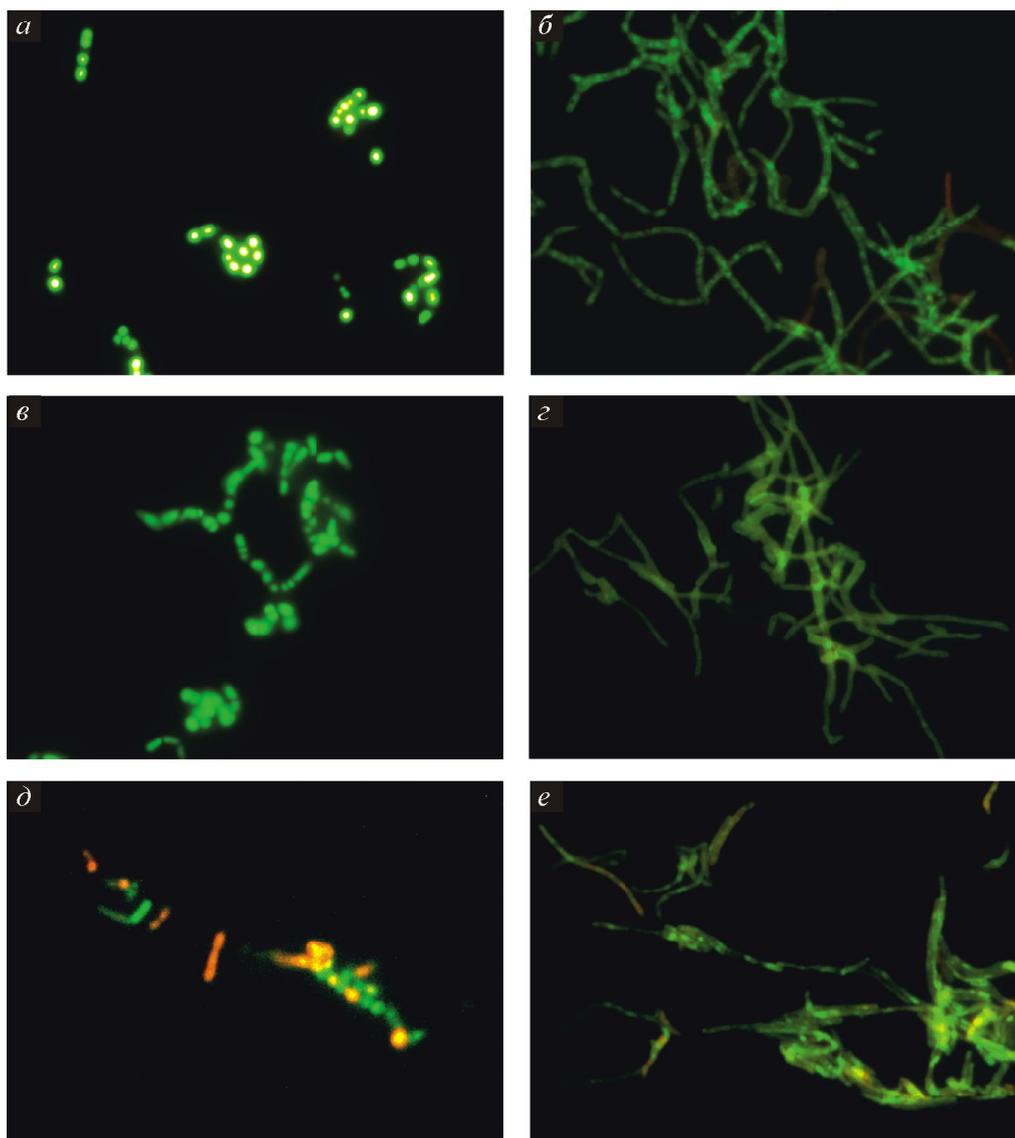
Рис. 8. Влияние внесения токсичных субстратов и  
продуктов гидролиза нитрилов на планктонные и прикре-  
пленные клетки *Rh. ruber gt1* (а) и *P. fluorescens C2* (б): 1 — кон-  
троль; 2 — акриламид (а) / акриловая кислота (б); 3 — акрило-  
нитрил; время контакта с токсином 20 мин

Одновременно с воздействием НАК на клетки про-  
исходит его гидролиз, сопровождающийся накоп-  
лением АА; таким образом, это воздействие явля-  
ется многофакторным, включающим эффект ток-  
сичного субстрата и продукта.

При воздействии 1,3 М раствора АК на  
клетки *P. fluorescens C2* происходит резкое паде-  
ние концентрации АТР как в клетках планктона,  
так и в биопленке, что, вероятно, связано не толь-  
ко с токсичностью этого соединения, но и со сни-  
жением рН среды, которое приводит к гибели кле-  
ток (см. рис. 8, б). НАК в концентрации 1,3 М при-  
водит к 50%-му снижению содержания АТР в  
планктонных клетках, тогда как в клетках био-  
пленки оно не изменяется по сравнению с контро-  
лем. При оценке жизнеспособности методом  
КОЕ были подтверждены данные АТР-метрии:  
снижение количества жизнеспособных клеток  
при воздействии НАК в планктоне *P. fluorescens*  
*C2* составило  $(3,37 \pm 0,53) \cdot 10^7$  КОЕ/мл против  
 $(2,78 \pm 0,83) \cdot 10^8$  КОЕ/мл в контроле. Титр клеток  
биопленки не снизился: после воздействия НАК  
число КОЕ/мл составляло  $(2,44 \pm 1,09) \cdot 10^9$  против

$(2,48 \pm 0,35) \cdot 10^9$  в контроле. После воздействия  
АК ни планктон, ни биопленка при высеве коло-  
ний не образовывали.

Для качественной оценки жизнеспособнос-  
ти клеток биопленок, выращенных на предметном  
стекле, и суспензии нитрилгидролизующих бакте-  
рий окрашивали красителем LIVE/DEAD® после  
воздействия токсичных субстратов и продуктов  
трансформации нитрилов и визуализовали в свето-  
вом микроскопе с флуоресценцией (рис. 9, 10).  
На основании этого метода можно заключить, что  
воздействие акриламида на планктонные клетки  
*Rh. ruber gt1* не приводило к потере жизнеспособ-  
ности, так как не наблюдалось клеток с повреж-  
денной мембраной, окрашенных в красный цвет  
(см. рис. 9). Следует отметить, что четырехсуточ-  
ная суспензия *P. fluorescens C2* уже содержала зна-  
чительное количество нежизнеспособных клеток  
(см. рис. 10, а), что, скорее всего, связано с особен-  
ностями роста данного микроорганизма. Воздейс-  
твие 1,3 М раствора НАК на культуру *P. fluo-  
rescens* приводило к полной потере жизнеспособ-  
ности и лизису части клеток суспензии, что следу-



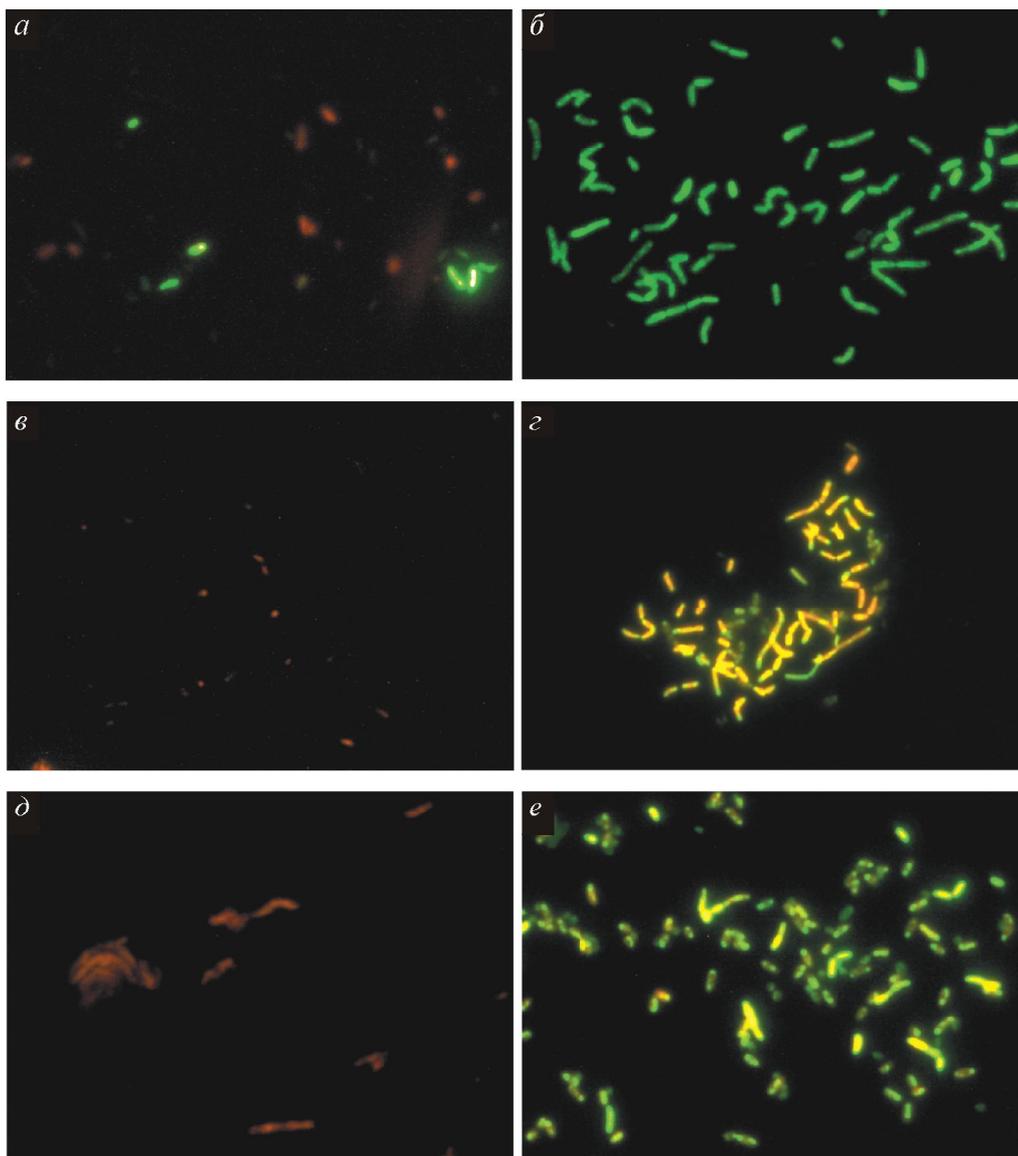
**Рис. 9.** Оценка жизнеспособности планктонных клеток (*a, в, д*) и клеток биопленок (*б, г, e*) *Rh. ruber* gt1 с помощью флуоресцирующей метки LIVE/DEAD® (зеленое окрашивание — жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной, красное окрашивание — нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной): *a, б* — контроль; *в, г* — воздействие акриламида; *д, e* — воздействие акрилонитрила

ет из наблюдаемой картины при окраске флуоресцентной меткой. В то же время, клетки биопленки остаются практически полностью жизнеспособными, что коррелирует с данными АТР-метрии (см. рис. 10).

Воздействие АК, связанное не только с высокой токсичностью этого соединения, но и со снижением pH среды до низких значений, приводит к лизису большей части клеток суспензии, а отдельные клетки, сохранившие четкие очертания, судя по окраске, имеют нарушенную мембрану (см. рис. 10). Клетки биопленки, наоборот, в значительной степени сохраняются, но имеют промежуточ-

ную окраску, что не дает возможности делать однозначные выводы об их потенциальной жизнеспособности на основании данного метода. Результаты АТР-метрии и посев клеток на агаризованную среду LB после воздействия АК говорят о потере жизнеспособности не только суспендированных клеток, но и клеток биопленки.

Полученные данные еще раз подтверждают, что физиологическое состояние клеток биопленок существенно отличается от состояния планктона. Биопленки как *Rh. ruber* gt1, так и *P. fluorescens* C2 оказались более устойчивы к воздействию высоких концентраций токсичных субстратов и



**Рис. 10.** Оценка жизнеспособности планктонных клеток (а, в, д) и биопленок (б, г, е) *P. fluorescens* C2 с помощью флюоресцирующей метки LIVE/DEAD®: а, б — контроль; в, г — воздействие акриловой кислоты; д, е — воздействие акрилонитрила

продуктов, обладая большими адаптивными способностями, чем планктонные клетки.

Таким образом, образованные в процессе культивирования в присутствии носителя биопленки нитрилгидролизующих бактерий могут служить гетерогенным биокатализатором гидролиза нитрилов, причем монопленки являются предпочтительными для этого процесса по сравнению со смешанными биопленками. Изучение динамики роста биопленок как с использованием окраски клеток кристаллическим фиолетовым, так и путем анализа общего содержания АТФ позволяет выбрать оптимальные условия культивирования для получения наиболее массивной и жизнеспособной био-

пленки. Показана устойчивость биопленок *Rh. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2 к воздействию токсичных субстратов и продуктов гидролиза нитрилов.

Авторы выражают благодарность сотруднику демонстрационно-методического центра TESCAN (Санкт-Петербург) канд. физ.-мат. наук М.В. Лукашовой за помощь в электронно-микроскопическом анализе образцов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания на научно-исследовательскую работу № 6.2635.2014/К.

Получено 11.09.15

## ЛИТЕРАТУРА

- Monds, R.D. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review / R.D. Monds, G.A. O'Toole // Trends Microbiol. — 2008. — V. 17(2). — P. 73—87.
- Jain, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci / A. Jain, A. Agarwal // J. Microbiol. Meth. — 2009. — V. 76. — P. 88—92.
- Izano, E.A. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms / E.A. Izano, S.M. Shah, J.B. Kaplan // Microbial Pathogenesis. — 2009. — V. 46. — P. 207—213.
- Gross, R. Microbial biofilms: new catalysts for maximizing productivity of long-term biotransformations / R. Gross, B. Hauer, K. Otto, A. Schmid // Biotechnol. Bioeng. — 2007. — V. 98. — P. 1123—1134.
- Rosche, B. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? / B. Rosche, X.Z. Li, B. Hauer, A. Schmid, K. Buehler // Trends Biotechnol. — 2009. — V. 27(11). — P. 636—643.
- Halan, B. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses / B. Halan, K. Buehler, A. Schmid // Trends Biotechnol. — 2012. — V. 30(9). — P. 453—465.
- Kobayashi, M. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over / M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada // Trends Biotechnol. — 1992. — V. 10. — P. 402—408.
- Banerjee, A. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects / A. Banerjee, R. Sharma, U.C. Banerjee // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 60. — P. 33—44.
- Mylerova, V. Synthetic applications of nitrile-converting enzymes / V. Mylerova, L. Martinkova // Curr. Org. Chem. — 2003. — V. 7. — P. 1—17.
- Дебабов В.Г. Биокаталитический гидролиз нитрилов / В.Г. Дебабов, А.С. Яненко // Обзорный журнал по химии. — 2011. — Т. 1. — № 4. — С. 376—394.
- Hann, E.C. 5-Cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas chlororaphis* B23 / E.C. Hann, A. Eisenberg, S.K. Fager, N.E. Perkins, F.G. Gallagher, S.M. Cooper, J.E. Gavagan, B. Stieglitz, S.M. Hennessey, R. DiCosimo // Bioorg. Medicin. Chemistry. — 1999. — V. 7. — P. 2239—2245.
- Graham, D. Nitrile biotransformations using free and immobilized cells of a thermophilic *Bacillus* spp. / D. Graham, R. Pereira, D. Barfield, D. Cowan // Enzyme Microbiol. Technol. — 2000. — V. 26. — P. 368—373.
- Dias, J.C.T. Bioconversion of nitriles by *Candida guilliermondii* CCT 7207 cells immobilized in barium alginate / J.C.T. Dias, R.P. Rezende, V.R. Linardi // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — V. 56. — P. 757—761.
- Dias, J.C.T. Biodegradation of acetonitrile by cells of *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 immobilized in alginate, κ-carrageenan and citric pectin / J.C.T. Dias, R.P. Rezende, V.R. Linardi // Braz. J. Microb. — 2001. — V. 31. — P. 61—66.
- Colby, J. Immobilization of *Rhodococcus* AJ270 and use of entrapped biocatalyst for the production of acrylic acid / J. Colby, D. Snell, G.W. Black // Monatshefte für Chemie. — 2000. — V. 131. — P. 655—666.
- Bauer, A. Polyvinyl alcohol-immobilized whole-cell preparations for the biotransformation of nitriles / A. Bauer, N. Layh, C. Syldatk, A. Willetts // Biotechnol. Lett. — 1996. — V. 18. — P. 343—348.
- Chen, J. Biosynthesis of p-methoxyphenylacetic acid from p-methoxyphenylacetonitrile by immobilized *Bacillus subtilis* ZJB-063 / J. Chen, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen // Proc. Biochem. — 2008. — V. 43. — P. 978—983.
- Максимов А.Ю. Иммунизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью / А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова, М.В. Кузнецова, В.Ф. Олонцев, В.А. Демаков // Приклад. биохим. микробиол. — 2007. — Т. 43. — № 2. — С. 193—198.
- Максимова Ю.Г. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах / Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков, С.В. Козлов, Г.В. Овечкина, В.Ф. Олонцев // Биотехнология. — 2010. — № 4. — С. 51—58.
- Peeters, E. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates / E. Peeters, H.J. Nelis, T. Coenye // J. Microbiol. Methods. — 2008. — V. 72. — P. 157—165.
- Reisner, A. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* / A. Reisner, K.A. Krogfelt, B.M. Klein, E.L. Zechner, S. Molin // J. Bacteriol. — 2006. — V. 188(10). — P. 3572—3581.
- O'Toole, G.A. Microtiter dish biofilm formation assay // J. Vis. Exp. — 2011. — V. 47. — P. 2437.
- Ludwicka, A. Bioluminescent assay for measurement of bacterial attachment to polyethylene / A. Ludwicka, L.M. Switalski, A. Lundin, G. Pulverer, T. Wadström // J. Microbiol. Methods. — 1985. — V. 4. — P. 169—177.
- Efremenko, E.N. An approach to the rapid control of oil spill bioremediation by bioluminescent method of intracellular ATP determination / E.N. Efremenko, R.E. Azizov, A.A. Raveva, V.M. Abbasov, S.D. Varfolomeyev // Int. Biodeterior Biodeg. — 2005. — V. 56. — P. 94—100.
- Andrews, C.S. A comparison of the use of an ATP-based bioluminescent assay and image analysis for the assessment of bacterial adhesion to standard HEMA and biomimetic soft contact lenses / C.S. Andrews, S.P. Denyer, B. Hall, G.W. Hanlon, A.W. Lloyd // Biomaterials. — 2001. — V. 22. — P. 3225—3233.
- Lehocky, M. Adhesion of *Rhodococcus* sp. S3E2 and *Rhodococcus* sp. S3E3 to plasma prepared Teflon-like and organosilicon surfaces / M. Lehocky, P. Sta'hel, M. Koutny, J. Čech, J. Institoris, A. Mraček // J. Materials Proc. Technol. — 2009. — V. 209. — P. 2871—2875.
- Bos, R. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity / R. Bos, H.C. van der Mei, J.

Gold, H.J. Busscher // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — V. 189. — P. 311—315.

28. *Kohyama, E.* Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms / E. Kohyama, A. Yoshimura, D. Aoshima, T. Yoshida, H. Kawamoto, T. Nagasawa // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V. 72(3). — P. 600—606.

29. *Ткаченко А.Г.* Роль транспорта путресцина и калия в регуляции топологического состояния ДНК в процессе адаптации *Escherichia coli* к температурному стрессу / А.Г. Ткаченко, М.Р. Пшеничных, О.Я. Салахетдинова, Л.Ю. Нестерова // Микробиология. — 1998. — Т. 67. — № 5. — С. 601—606.

Yu. G. MAKSIMOVA<sup>1,2,\*</sup>, A. Yu. MAKSIMOV<sup>1,2</sup>,  
and V. A. DEMAКOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The Institute for Ecology and Genetics of Microorganisms, Russ. Acad., Sci., Ural branch, 614081, Perm' Russia

<sup>2</sup>The Perm' State National Research University, 614990, Perm' Russia

e-mail: maks@iegm.ru

### Biofilms of Nitrile-Hydrolyzing Bacteria: Dynamics of Growth, Resistance to Toxic Substances and Biotechnological Potential

Mono- and mixed bacterial biofilms have been obtained during the *Rhodococcus ruber* gt1, *Pseudomonas fluorescens* C2,

*Alcaligenes faecalis* 2, and *Rh. erythropolis* 11-2 growth in the presence of carriers. The transformation of aliphatic and aromatic nitriles by the biofilm of nitrile-hydrolyzing bacteria, as well as the growth dynamics of *Rh. ruber* gt1 and *P. fluorescens* C2 biofilms and their resistance to toxic substrates and products of the nitrile hydrolysis were studied. It was shown that *P. fluorescens* C2 biofilm mass and total ATP content reached a peak after a day of growth, whereas the same for *Rh. ruber* gt1 was observed after 3—4 days of culturing. The biofilms of *Rh. ruber* gt1 and *P. fluorescens* C2 were shown to be more resistant to the effects of high concentrations of acrylamide and acrylonitrile and to have greater adaptive capacity than planktonic cells.

*Key words:* amidase, biofilm, nitrilase, nitrile-hydrolyzing bacteria, nitrile hydratase.

---

\* Author for correspondence.