

Оптимизация условий иммобилизации микробных клеток при создании биопрепаратов для биodeградации углеводов

© 2021. А. А. Самков, к. б. н., доцент, Н. Н. Волченко, к. б. н., доцент, А. А. Худокормов, к. б. н., доцент, С. М. Самкова, м. н. с., Э. В. Карасева, к. б. н., профессор, Кубанский государственный университет, 350040, Россия, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, e-mail: andreysamkov@mail.ru

Для нефтеокисляющей актинобактерии *Rhodococcus erythropolis* F1 (ВКМ Ас-2271) методом полного факторного эксперимента исследована эффективность адсорбционной иммобилизации на поверхности сорбента нефтепродуктов в зависимости от pH среды иммобилизации, концентрации Al^{3+} , продолжительности контакта суспензии клеток и носителя. Экспериментально доказана толерантность ростовой и углеводородокисляющей активности родококков к выбранным факторам в используемых диапазонах значений. Определены условия иммобилизации, обеспечивающие прирост доли адсорбционно иммобилизованных клеток *R. erythropolis* F1 с 34,0 до 69,7%. Условия обеспечивали прирост адгезии пяти штаммов актинобактерий с варьированием показателя гидрофобности от 10 (*Rhodococcus* sp. J12) до 88% (*Rhodococcus* sp. J8). Моделирование биodeградации нефти в морской и пресной воде с использованием иммобилизованных клеток *R. erythropolis* F1 показало большую эффективность снижения концентрации углеводов по сравнению с клетками и носителем (сорбентом нефтепродуктов), вносимыми по отдельности.

Ключевые слова: актинобактерии, адсорбция, нефтеокисляющие бактерии, *Rhodococcus*, биodeградация, иммобилизация, биопрепарат.

Optimization of the conditions of microbial cells immobilization for the creation of hydrocarbons-degrading biopreparations

© 2021. A. A. Samkov ORCID: 0000-0002-9347-8470, N. N. Volchenko ORCID: 0000-0002-8012-6644, A. A. Khudokormov ORCID: 0000-0001-8212-3941, S. M. Samkova ORCID: 0000-0002-3565-3728, E. V. Karaseva ORCID: 0000-0002-9079-1007, Kuban State University, 149, Stavropolskaya St., Krasnodar, Russia, 350040, e-mail: andreysamkov@mail.ru

The dependence of the efficiency of adsorption on the oil sorbent surface on the pH of the immobilization medium, Al^{3+} concentration and the duration of contact of the suspension of cells with carrier, was investigated for oil-oxidizing actinobacteria *Rhodococcus erythropolis* F1 (BKM Ac-2271) by the full factorial experiment method. Tolerance of growth and hydrocarbon-oxidizing activity of rhodococci to selected experimental factors in the used ranges of values was experimentally proved. The optimized conditions of immobilization providing the increase of *R. erythropolis* F1 immobilized cells proportion from 34.0 to 69.7% are obtained. A similar increase was also found for five different strains of genera *Rhodococcus* and *Gordonia*, significantly distinguishing in terms of cell surface hydrophobicity (hydrophobicity index vary from 10% in the case of *Rhodococcus* sp. J12 up to 88% in case of *Rhodococcus* sp. J8). Modeling of biodegradation of crude oil in sea and freshwater conditions using immobilized *R. erythropolis* F1 cells has shown greater hydrocarbon concentration reduction efficiency in comparison with free non-immobilised cells and empty carrier, applied separately.

Keywords: actinobacteria, adsorption, oil-oxidizing bacteria, *Rhodococcus*, biodegradation, immobilization, biological preparation.

Образующиеся в ходе обращения с нефтепродуктами (НП) отходы относятся, как правило, к III либо IV классам опасности. В зависимости от состава углеводородов, используют разные подходы к обезвреживанию. Значительная часть отходов, отличающихся относительно невысоким содержанием НП, обезвреживается биологическим способом, одним из преимуществ которого является оптимизированная логистика обращения с опасными отходами, минимизирующая объёмы транспортировки как самих отходов (возможность работы *in situ*), так и средств работы с ними [1, 2]. Используемые препараты обеспечивают реализацию катаболического потенциала микроорганизмов-деструкторов [3, 4]. Актинобактерии, в том числе родококки, активно используются в экологической биотехнологии [5–7]. Первое поколение биопрепаратов представляло собой жидкие микробные культуры – водный раствор, содержащий клетки и остатки среды культивирования. Данная форма наиболее дешёва в производстве, однако характеризуется относительно малым сроком хранения и увеличенными транспортными издержками из-за большого содержания воды. Частично эти недостатки решаются сгущением биомассы в препаратах в форме пасты. Наибольшая концентрация биологического агента с наибольшим сроком хранения достигается в сухих биопрепаратах. Однако они представляют собой свободные клетки, подверженные конвективному переносу из зоны биоремедиации, как было экспериментально доказано ранее [8], а также имеющие другие недостатки, снижающие их эффективность. Известно, что иммобилизованные на различных поверхностях микробные клетки формируют биоплёнки и являются важнейшей формой существования бактерий как в природных, так и в искусственных микробиоценозах [9], аналогично микромицетам, рост распространением гиф позволяет им проникать в почвенные поры и расти, пока есть доступные источники питания [10]. Клетки микроорганизмов-биодеструкторов могут быть иммобилизованы на специально подготовленном носителе, обеспечивающем пространственное закрепление в зоне биоремедиации, оптимальное минеральное питание и сорбцию НП из окружающих отходов. Эти факторы обеспечивают преимущество в эффективности иммобилизованных клеток по сравнению со свободными, в особенности на песчаных грунтах [8]. Внесение иммобилизованных клеток упрощено по сравнению со вне-

сением клеточных суспензий и возможно без привлечения сложных технических средств.

При создании иммобилизованных биопрепаратов эффективность адгезии клеток на поверхности носителя обеспечивает значительную часть преимуществ. Оптимизация процесса основывается на использовании общих принципов адсорбционной иммобилизации микробных клеток [11, 12]. Использование актинобактерий, в частности, родококков, продиктовано их большой деструкционной эффективностью в различных условиях, в том числе, в морской среде [13, 14].

Целью работы является оптимизация условий адсорбционной иммобилизации нефтеокисляющих бактерий из клеточной суспензии на сорбент, для получения иммобилизованного биопрепарата. Оптимизация необходима для исключения стадии сгущения клеточной биомассы после глубинного культивирования. В качестве факторов были выбраны время экспонирования, как ключевой технологический параметр, определяющий себестоимость, а также легко обеспечиваемое в производственных условиях изменение pH в кислую сторону и внесение катионов алюминия, для которых известно положительное влияние на адгезию микроорганизмов [11].

Объекты и методы исследования

В работе использовали актинобактерии родов *Rhodococcus* и *Gordonia* из коллекции кафедры генетики, микробиологии и биотехнологии Кубанского государственного университета, способные с разной степенью эффективности утилизировать различные НП, а также ряд индивидуальных углеводородов. В качестве носителя клеток был взят сорбент НП «Эколан», представляющий собой термически обработанные древесные опилки.

Для определения адгезии клеток носитель «Эколан» экспонировали в суспензии отмытых фосфатным буфером (pH 4,8–8,0) микробных клеток на протяжении от 1 до 47 ч, после чего носитель с иммобилизованными клетками отделяли фильтрованием через мелкую сетку с диаметром ячеек около 0,1 мм, и гравиметрически определяли процентную долю убыли концентрации биомассы в фильтрате по сравнению с концентрацией до контакта с носителем.

Для измерения показателя гидрофобности использовали модифицированную методику [15]: суспензию отмытых клеток с известной оптической плотностью смешивали в течение

15 мин с хлороформом в соотношении 4:1 в пробирке объёмом 10 мл при 150 об./мин в горизонтальном положении, после часового экспонирования в неподвижном состоянии в вертикальном положении измеряли оптическую плотность водной фазы. Показатель гидрофобности определяли по формуле (1):

$$ПГ = 100 - [ОП_1 \cdot 100 / ОП_0], \quad (1)$$

где ПГ – показатель гидрофобности (%), ОП₀ – исходная оптическая плотность суспензии клеток, ОП₁ – оптическая плотность суспензии после смешивания с хлороформом.

Для определения пределов толерантности родококков к пониженным значениям pH и высоким концентрациям Al³⁺ отмытые клетки ресуспендировали в фосфатных буферах с заданными значениями pH и концентрациями Al³⁺. После двухсуточного экспонирования при комнатной температуре в статических условиях, высевам по Коху проверяли количество жизнеспособных клеток. Выживаемость определяли как процентную долю от количества клеток в контроле, где клетки инкубировали в буфере при pH 7,2.

Для проверки влияния повышенных концентраций Al³⁺ и пониженных значений pH на углеводородокисляющую активность, клетки, инкубированные в минеральной среде следующего состава (г/л) [16]: KNO₃ – 4; Na₂HPO₄ · 12H₂O – 1,4; KH₂PO₄ – 0,6; MgSO₄ · 7H₂O – 0,8 в присутствии различных концентраций Al³⁺, либо клетки, инкубированные в фосфатных буферах, с различными значениями pH отмывали дважды минеральной основой среды. После внесения гексадекана и трёх суток культивирования в колбах на качалках измеряли количество остаточных углеводов, определяли степень их деструкции.

Для оптимизации условий адгезии клеток использовали полный факторный эксперимент (ПФЭ) по схеме 2³ [17], где в качестве факторов, варьирующих в двух уровнях, были выбраны pH среды, концентрация Al³⁺ и время контакта суспензии клеток с носителем. На основании значений функции отклика – относительной адгезии клеток, методом [17] вычисляли коэффициенты регрессии, на основании которых, при линейных членах уравнения, проводили эксперимент по крутому восхождению.

Моделирование биodeградации нефти в морской и пресной природной воде осу-

ществляли в течение 2 месяцев в статических условиях в объёме 400 мл. Нефть вносили в количестве 10,0 г, обеспечивающем формирование плёнки толщиной не менее 1 мм на поверхности воды в используемом сосуде. Клетки использовали в виде суспензии, либо иммобилизованные на сорбенте НП. В качестве контроля вносили сорбент без клеток, либо дистиллированную воду. По окончании эксперимента в сосудах определяли убыль остаточных углеводов.

Концентрацию НП определяли гравиметрическим методом. Экстракцию проводили гексаном. Деструкцию выражали как процентную убыль углеводов. Для визуализации иммобилизованных на поверхности носителя клеток использовали растровый электронный микроскоп РЭМ JSM-7500 F JEOL.

Эксперименты проводили в трёхкратной повторности, статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 2007. Рассчитывали показатели: среднее ± ошибка среднего ($M \pm m$) и проводили оценку достоверности различий по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Для оптимизации условий адсорбционной иммобилизации микробных клеток использовали штамм *R. erythropolis* F1 (ВКМ Ас-2271), который в исходных условиях иммобилизации обладал показателем адгезии к используемому носителю – 34,7%.

Факторами, влияние которых учитывали в ходе ПФЭ по схеме 2³, служили: pH среды (x_1) [18], концентрация катионов Al³⁺ (x_2), связываемых микробной биомассой [19], и продолжительность инкубирования носителя в суспензии клеток (x_3). Нулевые значения факторов, шаги варьирования, а также верхние и нижние значения признаков приведены в таблице 1.

Интервал варьирования значений pH был выбран с учётом предварительно экспериментально определённых пределов толерантности данного штамма (табл. 2).

Выбор рабочей концентрации катионов алюминия вели с учётом возможного негативного действия высоких концентраций (270 мг/л и более) данных ионов. При этом, учитывали экспериментальные данные по влиянию концентрации катионов алюминия на жизнеспособность и деструкцию гексадекана штаммом *R. erythropolis* F1 (табл. 3). Известно, что

Таблица 1 / Table 1

Уровни факторов и шаги варьирования ПФЭ 2³ для оптимизации условий адгезии клеток
Levels of factors and steps of variation of FFE 2³ for optimization of cell adhesion conditions

Фактор Factor	Уровни факторов / Levels of factors			Шаги варьирования λ Steps of variation λ
	–	0	+	
x_1 – pH (-lg[H ⁺])	5,40	6,70	8,00	1,30
x_2 – [Al ³⁺], мг/л / mg/L	2,7	14,85	27,00	12,15
x_3 – время, ч / time, h	1,00	24,00	47,00	23,00

Таблица 2 / Table 2

Влияние pH на выживаемость и деструкционную активность *R. erythropolis* F1
Effect of pH on the survival and destruction activity of *R. erythropolis* F1

pH	Выживаемость клеток, % Cell survival, %	Деструкционная активность, % Destructive activity, %
4,8	67,3±2,9	57,9±2,9
5,4	81,8±3,2	68,0±1,7
6,0	83,1±2,9	72,7±2,0
6,6	90,4±4,1	77,6±1,5
7,2	99,1±2,0	86,8±3,1
8,0	89,5±3,7	74,3±4,5
6,7 (контроль / control)	100,0	92,2±3,8

Таблица 3 / Table 3

Влияние концентрации Al³⁺ на выживаемость и деструкционную активность *R. erythropolis* F1
Effect of Al³⁺ concentration on survival and destruction activity of *R. erythropolis* F1

[Al ³⁺], мг/л [Al ³⁺], mg/L	Выживаемость клеток, % Cell survival, %	Деструкционная активность, % Destructive activity, %
2	98,7±4,1	83,5±3,5
4	98,1±5,4	84,4±3,4
8	96,5±5,8	80,1±2,3
16	95,9±5,1	83,8±3,4
32	93,1±4,1	79,9±2,6
64	92,9±4,9	81,4±1,5
128	91,9±2,3	76,2±2,9
0 (контроль / control)	100,0	92,2±3,8

микробная биомасса, в том числе микромицетов, является эффективным биосорбентом катионов металлов [20], при этом Al³⁺ наименее токсичен.

Минимальная продолжительность иммобилизации, при которой происходило полное смачивание носителя, составляла 1 ч при работе шейкера 60 об./мин. Результаты ПФЭ 2³ – средние значения адгезии клеток, в зависимости от сочетания факторов (табл. 1) и соответствующих уровней их варьирования (верхний/нижний), приведены на рисунке 1.

Коэффициенты регрессии вычисляли по стандартному алгоритму [17]. Получено уравнение регрессии (2):

$$y = 26,37 - 8,64x_1 - 7,08x_2x_3 + 4,10x_1x_2x_3 + 4,03x_2 + 2,95x_1x_2 - 1,73x_3. \quad (2)$$

Анализ коэффициентов регрессии при линейных членах уравнения позволяет судить о положительном влиянии увеличения концентрации протонов и ионов Al³⁺ на показатель адгезии клеток, а в случае увеличения продолжительности экспонирования – об отрицательном. При оптимальном в рамках данного факторного эксперимента сочетании факторов удалось достоверно увеличить процентную долю адгезировавшихся клеток с 34,8 до 49,2% (рис. 1).

Вторая часть алгоритма оптимизации методом ПФЭ – эксперимент по крутому восхождению [17] был сведён до варьирования одного фактора – концентрации Al³⁺ по причине невозможности дальнейшего понижения pH ввиду снижения выживаемости и деструкционной активности клеток *R. erythropolis* F1 (табл. 2), а также по причи-

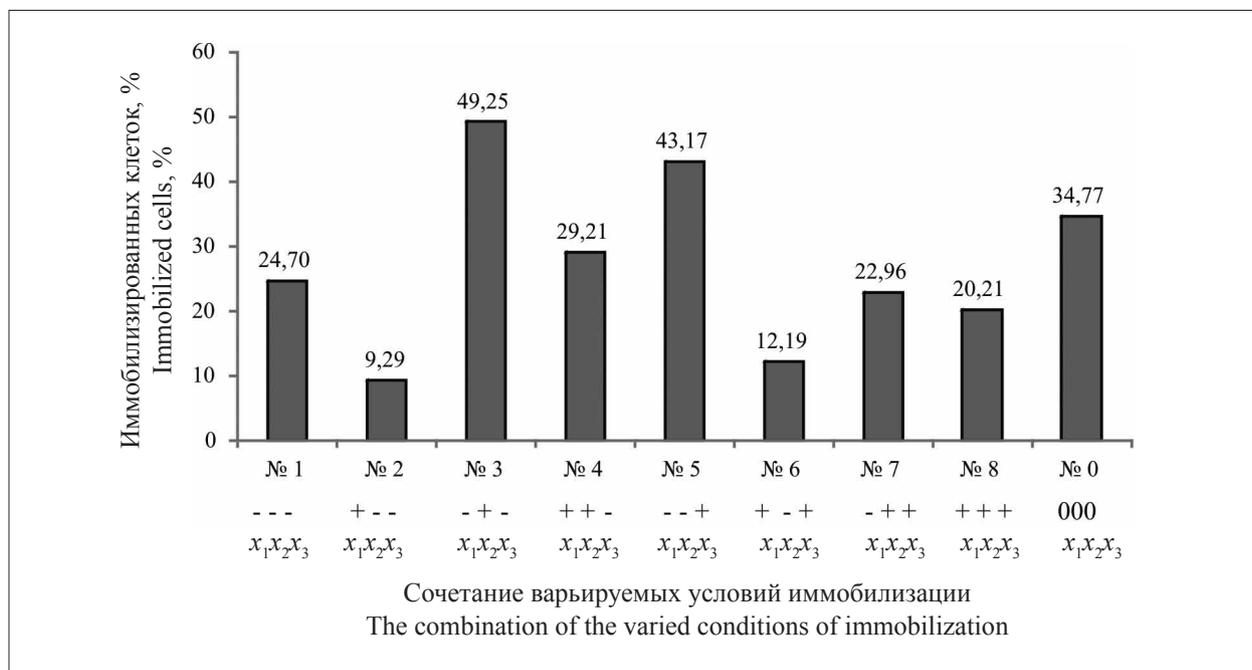


Рис. 1. Влияние сочетаний условий иммобилизации на адгезию клеток
Fig. 1. Effect of combinations of immobilization conditions on cell adhesion

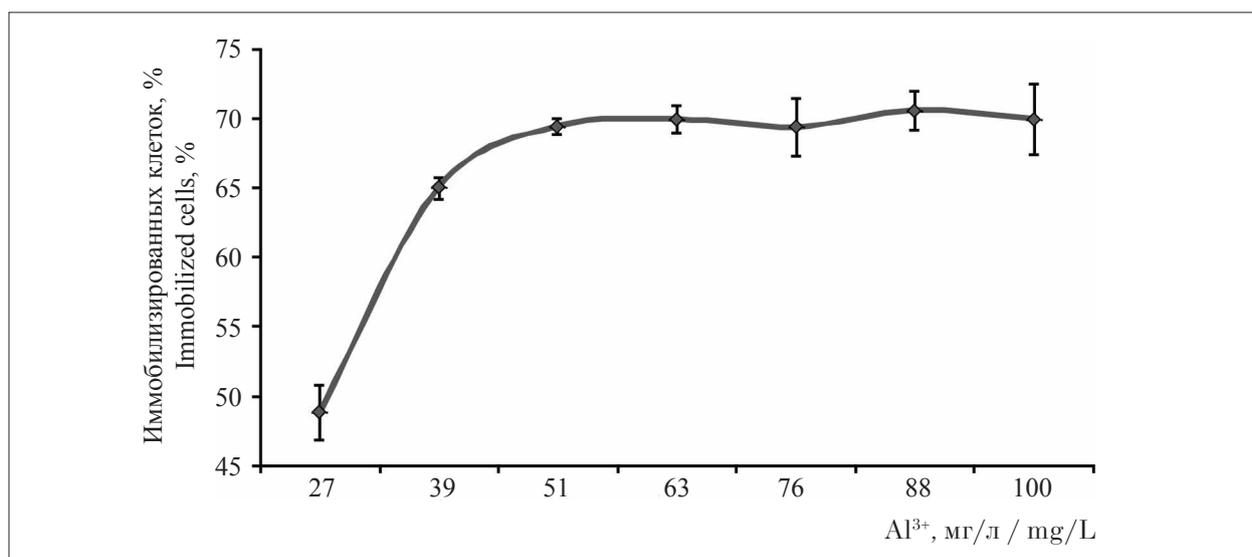


Рис. 2. Доля адгезированных клеток в зависимости от концентрации Al³⁺ в среде
Fig. 2. Percentage of adherent cells depending on Al³⁺ concentration in media

не отсутствия полного смачивания используемого гидрофобного сорбента суспензией клеток при экспонировании в жидкости менее одного часа. Начальной точкой был выбран вариант сочетания условий № 3 (рН – 5,4; [Al³⁺] – 27 мг/л, время экспонирования – 1 ч) из схемы ПФЭ 2³ (рис. 1, табл. 1), показавший максимальный прирост показателя адгезии. Единица варьирования λ для фактора [Al³⁺] была оставлена равной 12,15 мг/л. Увеличивали концентрацию [Al³⁺] до значения 100 мг/л.

Зависимость адгезии клеток *R. erythropolis* F1 от концентрации Al³⁺ показана на рисунке 2. Положительное влияние увеличения содержания катионов алюминия отмечается до значения 51,3 мг/л, после чего адгезия стабилизируется, оставаясь на уровне 70% при дальнейшем нарастании содержания Al³⁺ до 99,9 мг/л. Достоверные различия показателя адгезии для концентраций 39,15 и 51,30 мг/л позволяют считать значение фактора, равное 51,3 мг/л, оптимальным в данных условиях.

Таким образом, оптимальными условиями для адсорбционной иммобилизации клеток *R. erythropolis* F1 на носитель «Эколан» являются pH 5,4, концентрация Al^{3+} , равная 51,3 мг/л, и продолжительность экспонирования 1 ч. В случае оптимизированных условий имеет место адсорбция 69,7% клеток из 50 мл суспензии с оптической плотностью 0,6 условных единиц на 2 г носителя. Для исходных неоптимизированных условий адсорбция составляла 34,7%.

Эффективность применения оптимизированных для *R. erythropolis* F1 условий адсорбционной иммобилизации проверяли на выборке штаммов нефтеокисляющих актинобактерий с разными показателями гидрофобности клеток. Это было связано с известной ключевой ролью первичного гидрофобного взаимодействия в системе «поверхность носителя – поверхность клетки» [11, 21, 22]. Штамм *R. erythropolis* F1 обладал показателем гидрофобности (ПГ) 24%. Известно, что ПГ родококков сильно влияет на их адгезию [23]. Были взяты следующие штаммы с разными показателями гидрофобности: *Rhodococcus*

sp. J12 – 10%, *Gordonia* sp. Z4 – 29%, *Rhodococcus* sp. B4 – 43%, *Gordonia* sp. Z3 – 71%, *Rhodococcus* sp. J8 – 88%.

Для всех пяти штаммов было обнаружено увеличение адгезии клеток в оптимизированных условиях по сравнению с контролем (рис. 3).

Оптимизированные условия – пониженное значение pH (5,4), а также присутствие ионов Al^{3+} (в форме хелатообразующих соединений) достоверно увеличивали адгезию клеток всех исследованных штаммов к используемому носителю «Эколан». При этом, величина адгезии исследованных культур, варьируя в зависимости от штамма, была связана с показателем гидрофобности.

Оптимизированные условия адгезии обеспечивают формирование однослойной биоплёнки родококков на поверхности сорбента – термически обработанных древесных опилок (рис. 4). Таким образом, обеспечивается достаточно полное заполнение имеющихся сайтов адгезии на данном носителе. Видно, что распределение иммобилизованных клеток носит очаговый характер, что говорит о роли,

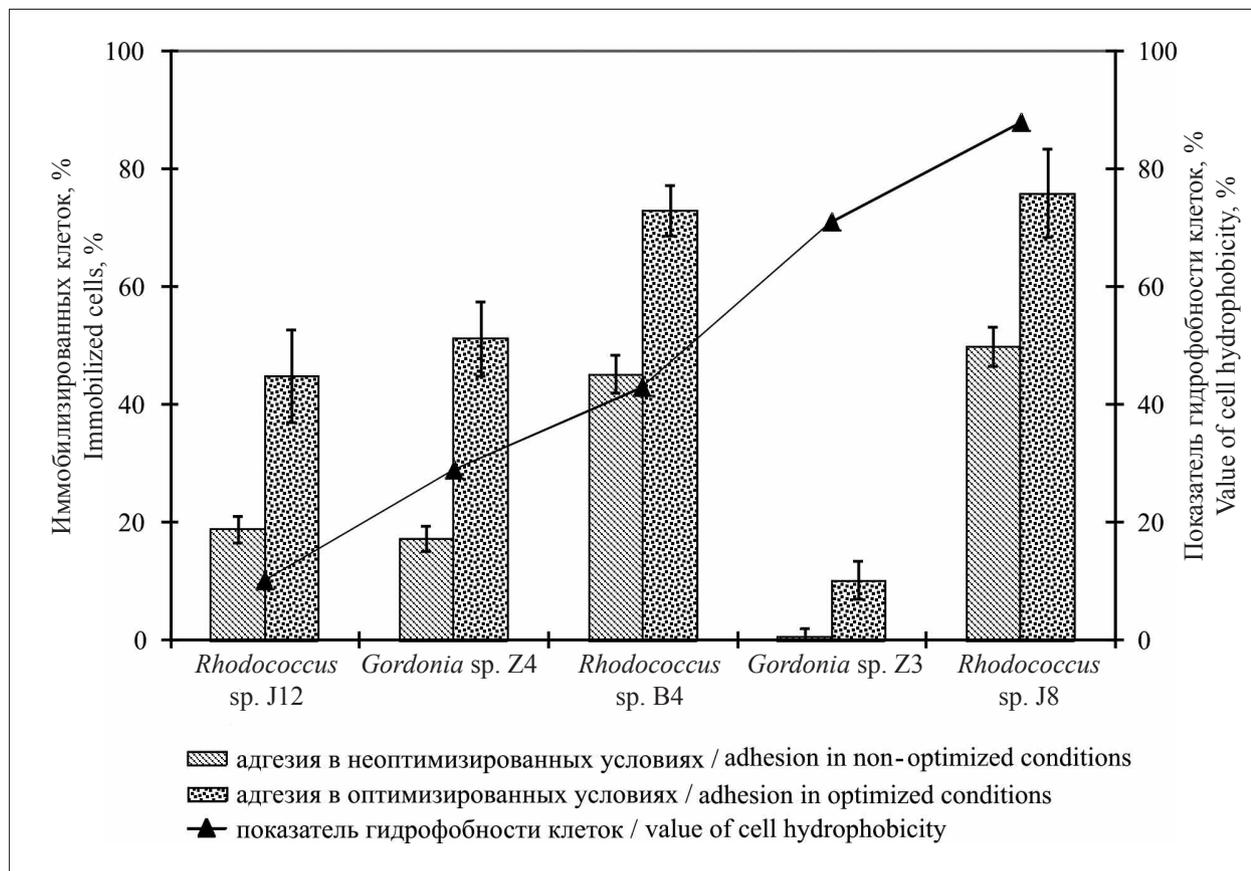


Рис. 3. Адгезия нефтеокисляющих актинобактерий с различными показателями гидрофобности клеток в зависимости от условий иммобилизации
 Fig. 3. Adhesion of oil-oxidizing actinobacteria with different cell hydrophobicity levels depending on immobilization conditions

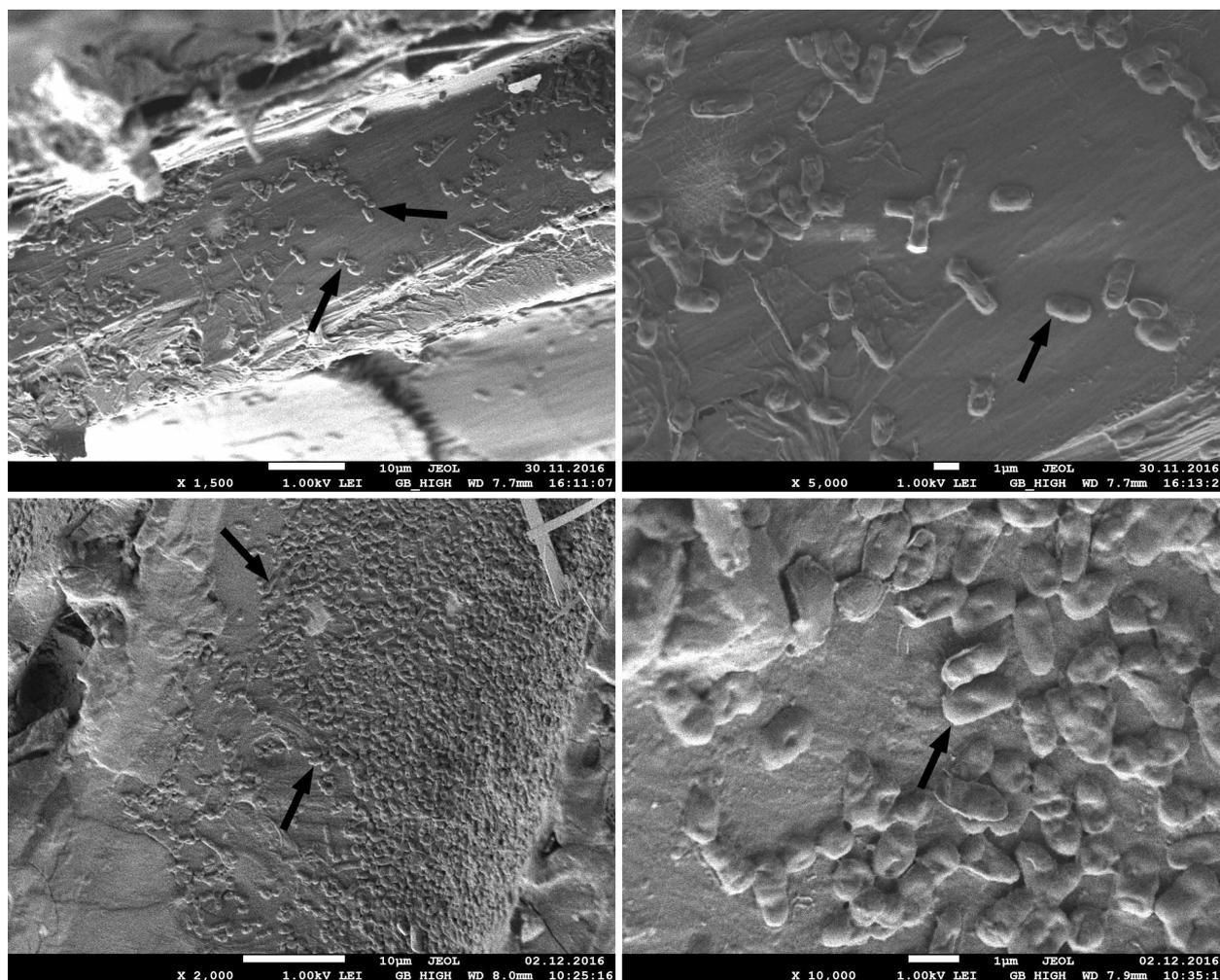


Рис. 4. Клетки *R. erythropolis* F1 (указаны стрелками), иммобилизованные на поверхности сорбента нефтепродуктов в исходных (верхний ряд) и оптимизированных (нижний ряд) условиях
Fig. 4. *R. erythropolis* F1 cells (indicated by arrows), immobilized on the surface of the oil sorbent under initial (upper row) and optimized (lower row) conditions

по-видимому, гидрофобного взаимодействия между клетками, а также между клетками и носителем.

Для сравнения эффективности иммобилизованных оптимизированным способом клеток, свободных клеток и чистого сорбента, в лабораторных условиях моделировали биодеградацию нефтяного загрязнения морской и пресной воды.

Внесение сорбента как с клетками, так и без них, обеспечило частичное разрушение нефтяной плёнки на поверхности морской воды сразу после её обработки. Однако в случае сорбента без клеток после двух месяцев инкубации в статических условиях, достоверно отличающейся от контроля, убыли НП отмечено не было (рис. 5).

В случае морской воды, иммобилизованные клетки обеспечили деструкцию 38,8% нефти, что достоверно ($p < 0,05$) превышало показатель деструкции для свободных клеток –

24,1%. Аналогичная картина имела место в случае пресной воды, процент убыли углеводов достигал 42,3%. Солёность воды достоверно не влияла на повышенную эффективность использования иммобилизованных клеток по сравнению со свободными.

Таким образом, для иммобилизованных в оптимизированных условиях и свободных клеток *R. erythropolis* F1 показана способность утилизировать плавающую на поверхности воды нефть. Отмечено преимущество иммобилизованных клеток перед неиммобилизованными при биоремедиации нефтезагрязнённой водной среды, отличающейся дефицитом биогенных элементов, прежде всего азота и фосфора, который лимитирует биодеградацию [24].

Заключение

Экспериментально подтверждена возможность использования катионов алюминия,

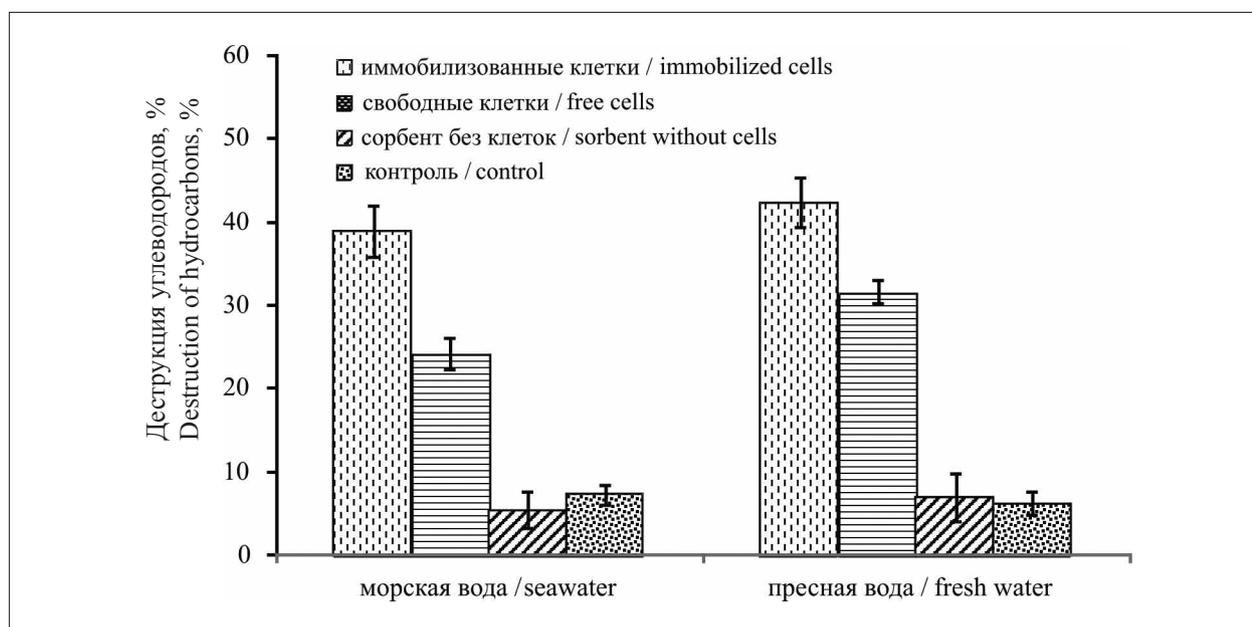


Рис. 5. Деградация углеводородов нефти штаммом *R. erythropolis* F1 в водной среде
 Fig. 5. Degradation of black oil hydrocarbons by *R. erythropolis* F1 strain in aqueous conditions

а также снижения рН для усиления адсорбционной иммобилизации прокариотических микроорганизмов на твёрдом носителе. Для актинобактерий родов *Rhodococcus* и *Gordonia*, адсорбируемых на сорбенте «Эколан», взятом в качестве носителя, определена оптимальная концентрация Al^{3+} в среде иммобилизации – 51,3 мг/л, а также пониженное значение рН – 5,4, обеспечивающие повышение адгезии в использованных экспериментальных условиях при отсутствии ингибирования жизнеспособности клеток, а также их деструкционной активности в отношении углеводородов.

Прирост адгезии в оптимизированных условиях зависит от показателя адгезии микроорганизмов, формирующих монослой на поверхности носителя «Эколан» и варьирует от 52 (*Rhodococcus* sp. B4) до 200% (*Rhodococcus* sp. J8).

При утилизации сырой нефти в условиях морской и пресной водной среды иммобилизованные клетки *R. erythropolis* F1 имеют большую эффективность, деструкция составила 33,8 и 42,3% соответственно по сравнению со свободными клетками, для которых деструкция составила 24,1 и 31,9%, а также сорбентом без клеток (5,3 и 6,8% соответственно). Таким образом, пространственное объединение углеводородного субстрата, клеток биодеструкторов, адсорбированных на поверхности «Эколана», содержащего остаточные количества биогенных элементов из среды иммобилизации, обеспечивает преимущество иммобилизованной системы.

References

1. Karaseva E.V., Girich I.E., Khudokormov A.A., Aleshina N.Yu., Karasev S.G. Bioremediation of oil-polluted chernozem soil // *Biotechnology in Russia*. 2005. No. 2. P. 88–96.
2. Danilets V.M., Karaseva E.V., Samkov A.A., Samkova S.M., Khudokormov A.A., Aleshina N.Yu., Kalitka S.A., Karpov V.G. Complex biotechnology for danger wastes storages liquidation and recultivation in oil and gas industry infrastructure // *Zashchita okruzhayushchey sredy v neftegazovom komplekse*. 2011. No. 8. P. 13–20 (in Russian).
3. Koronelli T.V. Principles and methods of intensification of biological destruction of hydrocarbons in the environment (review) // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1996. No. 6. P. 579–585 (in Russian).
4. Karaseva E.V., Samkov A.A., Karasev S.G., Sychev V.Yu. Preparation for microbiological cleaning of oil sludge and oil contaminated soil // Patent RU 2317162 C1. Application: 2006115032/13, 02.05.2006. Date of publication: 20.02.2008. Bull. No. 5 (in Russian).
5. Quek E., Ting Y.P., Tan H.M. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products // *Bioresource Technology*. 2006. V. 97. No. 1. P. 32–38. doi: 10.1016/j.biortech.2005.02.031
6. Otroshko D.N., Volchenko N.N., Samkov A.A., Khudokormov A.A. Selection of plants and microorganisms for further application in rhizoremediation // *Theoretical and Applied Ecology*. 2016. No. 2. P. 86–92 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2016-2-086-092
7. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K., Krivoruchko A.V., Korshunova I.O., Peshkur T.A., Cun-

- ningham C.J. Oilfield wastewater biotreatment in a fluidized-bed bioreactor using co-immobilized *Rhodococcus* cultures // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2017. V. 5. No. 1. P. 1252–1260. doi: 10.1016/j.jece.2017.01.043
8. Samkov A.A., Karaseva E.V. Interrelation of convective transport of oil-oxidizing microorganisms with cell hydrophobicity and bioremediation efficiency // *Biotechnology in Russia*. 2007. No. 4. P. 97–107.
9. Maksimova Y.G., Maksimov A.Y., Demakov V.A. Biofilms of nitrile-hydrolyzing bacteria: dynamics of growth, resistance to toxic substances, and biotechnological potential // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. V. 52. No. 8. P. 739–749. doi: 10.1134/S0003683816080068
10. Pozdnyakova N.N., Balandina S.A., Turkovskaya O.V. Degradative activity of fungi towards oil hydrocarbons under high temperature // *Theoretical and Applied Ecology*. 2019. No. 4. P. 69–75 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2019-4-069-075
11. Sinitsyn A.P., Raynina E.I., Lozinskiy V.I., Stasov S.D. Immobilized microbial cells. Moskva: Izdatelstvo MGU, 1994. 288 p. (in Russian).
12. Maksimova Y.G., Gorbunova A.N., Zorina A.S., Maksimov A.Y., Ovechkin G.V., Demakov V.A. Transformation of amides by adhered rhodococcus cells possessing amidase activity // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015. V. 51. No. 1. P. 64–69. doi: 10.1134/S0003683814060106
13. Chen C.H., Whang L.M., Pan C.L., Yang C.L., Grace Liu P.W. Immobilization of diesel-degrading consortia for bioremediation of diesel-contaminated groundwater and seawater // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2017. V. 124. P. 62–72. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.07.001
14. Vergeynst L., Wegeberg S., Aamand J., Lassenc P., Gosewinkel U., Fritt-Rasmussen J., Gustavson K., Mosbech A. Biodegradation of marine oil spills in the Arctic with a Greenland perspective // *Science of the Total Environment*. 2018. V. 626. P. 1243–1258. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.173
15. Serebryakova E.V., Darmov I.V., Medvedev N.P., Alekseev S.A., Rybak S.I. Evaluation of the hydrophobicity of bacterial cells by measuring their adherence to chloroform drops // *Microbiologiya*. 2002. V. 71. No. 2. P. 237–239.
16. Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M., Kolotilova N.N. Workshop on microbiology. Moskva: Izdatelskiy tsentr “Akademiya”, 2005. 608 p. (in Russian).
17. Maksimov V.N. A multifactor experiment in biology. Moskva: Izdatelstvo MGU, 1980. 280 p. (in Russian).
18. Busalmen J.P., De Sanchez S.R. Influence of pH and ionic strength on adhesion of a wild strain of *Pseudomonas* sp. to titanium // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2001. V. 26. No. 5. P. 303–308. doi: 10.1038/sj.jim.7000133
19. Gutnick D.L., Bach H. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 54. No. 4. P. 451–460. doi: 10.1007/s002530000438
20. Skugoreva S.G., Kantor G.Ya., Domrachev L.I. Biosorption of heavy metals by micromycetes: Specificity of the process, mechanisms, kinetics // *Theoretical and Applied Ecology*. 2019. No. 2. P. 14–31 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2019-2-014-031
21. Kim Y.H., Cho J.H., Lee Y.W., Lee W.K. Development of a carrier for adhesion of nitrifying bacteria using a thermodynamic approach // *Biotechnology Techniques*. 1997. V. 11. No. 11. P. 773–776.
22. Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivorutchko A.B., Philp J.C., Cunningham C.J. Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber* // *Bioresource Technology*. 2008. V. 99. No. 6. P. 2001–2008. doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.024
23. Iwabuchi N., Sunairi M., Anzai H., Morisaki H., Nakajima M. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus* // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003. V. 30. No. 1–2. P. 51–60. doi: 10.1016/S0927-7765(03)00036-5
24. Sharma S.L., Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus* sp. // *Biodegradation*. 2000. V. 11. No. 5. P. 289–294. doi: 10.1023/a:1011185806974