

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет**

на правах рукописи

ЛИНЬКОВА ЮЛИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**ДЕСТРУКЦИЯ АМИНОАРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
АНАЭРОБНЫМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2011 г.

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Нетрусов Александр Иванович

кандидат биологических наук, доцент

Котова Ирина Борисовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Ножевникова Алла Николаевна

кандидат химических наук

Емашова Наталия Александровна

Ведущая организация:

Институт биохимии и

физиологии микроорганизмов

имени Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Защита состоится _____ 2011 года в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан _____ 2011 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета, к.б.н.



Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. С развитием новых химических технологий в биосферу поступает большое количество токсичных и устойчивых соединений, уровень которых возрастает с каждым годом. Аминоароматические соединения, используемые в производстве лекарственных препаратов и лакокрасочных материалов, содержатся в сточных водах предприятий химической и фармацевтической промышленности (Carmona et al., 2009). Аминоароматические вещества являются также продуктами восстановления азокрасителей в анаэробных условиях (Емашова и др., 2005), причём некоторые имеют природное происхождение. Например, 2-аминобензойная кислота (**2-АБК**) – предшественник синтеза алкалоидов в растениях, а 4-АБК (4-аминобензойная кислота, витамин H₁) используется кишечной микробиотой для синтеза фолиевой кислоты.

В настоящее время нагрузка на естественные процессы самоочищения биосферы является избыточной, и параллельно с незначительной деструкцией ксенобиотиков идёт их постепенное накопление в окружающей среде. Значительная роль в деградации таких загрязнений принадлежит микроорганизмам (Остроумов, 1986; Щербакова, 2000; Diaz, 2004). Микроорганизмы являются важным звеном в круговороте веществ в биосфере, выполняя в основном роль редуцентов. Анаэробные микроорганизмы, обладающие способностью трансформировать большое количество органических и неорганических субстратов, принимают активное участие во всех биологических циклах (круговороте углерода, азота, серы и других элементов). В естественных условиях анаэробные микроорганизмы, входящие в состав микробных консорциумов, осуществляют функции деструкции сложных органических веществ, обеспечивая самоочищение экосистем.

Деструкция (амино)ароматических соединений зачастую происходит более эффективно в анаэробных условиях, т.к. в присутствии кислорода многие из них полимеризуются, что затрудняет дальнейшую минерализацию, либо образуют токсичные промежуточные продукты (Савельева, 2003). В связи с этим актуальны исследования, направленные на получение микробных сообществ, способных осуществлять процесс минерализации (амино)ароматических ксенобиотиков в отсутствие кислорода. В настоящее время результаты исследований по биодеградации загрязнений учитываются при разработке различных очистных сооружений. Для очистки почв, атмосферы, сточных вод используются биореакторы различных технологических типов: аэробный, анаэробный и гибридный, включающий анаэробную и аэробную стадии (Deriell et al., 1999). Как правило, в реакторах используются естественно сложившиеся консорциумы микроорганизмов. В таких консорциумах наблюдается комбинация катаболических возможностей, благодаря чему

происходит полное разрушение вещества, недоступное чистым культурам микроорганизмов из-за термодинамических ограничений.

В настоящее время получены как микробные ассоциации, так и чистые культуры бактерий, разлагающие эти соединения в условиях сульфат- (Schnell, Schink, 1992) и нитратредукции (Tschech, Fuchs, 1987), изучены биохимические особенности расщепления ароматического кольца (Head, 1998; Harwood et al., 1999; Schink et al., 2000; Boll, 2005; Heider, 2007; Fuchs, 2008; Хоменков и др., 2008; Carmona et al., 2009). Значительно меньше работ посвящено изучению деструкции аминокромоароматических соединений в условиях метаногенеза при отсутствии внешних акцепторов электронов.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было изучение способности микробных сообществ к деструкции аминокромоароматических кислот в анаэробных условиях. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Получение метаногенных микробных сообществ, способных расщеплять аминокромоароматические субстраты до CH_4 и CO_2 ;
2. Определение функциональных возможностей выделенных сообществ и влияния ряда факторов на процесс биодеградациии;
3. Определение биохимического пути деструкции аминокромоароматических кислот и идентификация интермедиатов процесса;
4. Изучение микробного состава выделенных сообществ, разлагающих аминокромоароматику в анаэробных условиях;
5. Выделение чистых культур микроорганизмов, осуществляющих различные этапы деструкции аминокромоароматических веществ в изучаемых сообществах.

Научная новизна и практическая значимость работы. Была продемонстрирована способность анаэробных микробных сообществ различного происхождения к разложению как исходных аминокромоароматических субстратов, так и других ароматических веществ и азокрасителей. Показана возможность деструкции аминокромоароматических соединений сообществами, выделенными из донных отложений естественных водоёмов, которые ранее не подвергались массивному воздействию аминокромоароматических ксенобиотиков. Определены ароматические интермедиаты начальных стадий трансформации аминокромоароматики сообществами, полученными из различных источников биоматериала. Показано влияние ряда факторов на скорость и эффективность процесса биодеградациии этих субстратов.

Проведено сравнение выделенных микробных консорциумов по таким параметрам, как видовое разнообразие (число морфотипов), активность биодеструкции аминокромоароматических субстратов, стабильность активности, течение самого процесса деградациии. Был

проанализирован состав микробных сообществ различного происхождения, определены функциональные возможности выделенных консорциумов и выявлены представители различных физиологических групп. Из двух метаногенных сообществ был выделен ряд чистых культур, участвующих в процессе деструкции ароматических аминов на стадии брожения.

Понимание сути процессов в биоремедиации природных сред и в очистке стоков позволяет предсказывать поведение микробных сообществ на разных этапах деструкции и управлять процессом очистки. Результаты исследований по микробной деградации загрязнений представляют собой научную основу для биотехнологического процесса обработки стоков, их необходимо учитывать при прогнозировании судьбы поллютантов в окружающей среде и разработке различных очистных сооружений.

Публикации и апробация работы. По результатам работы опубликовано 12 печатных работ, из них 3 - статьи в рецензируемых журналах. Основные положения и результаты работы были представлены на Всероссийском симпозиуме “Биотехнология микробов” (Москва, 2004), Международной конференции “Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды” (Саратов, 2005), 12-й международной Пущинской школе-конференции молодых учёных “Биология-наука 21 века” (Пущино, 2008), 4-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Экологические проблемы промышленных городов” (Саратов, 2009), XI и XVI Международных конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2004 и 2009), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009), VI Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2010).

Структура и объём работы: Материалы диссертации изложены на 170 страницах машинописного текста и включают 85 рисунков и 21 таблицу. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», который содержит 35 отечественных и 178 иностранных наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе были исследованы накопительные культуры, полученные из анаэробных илов двух очистных сооружений и донных отложений естественных водоемов. Базовым служил режим культивирования при pH 7, 30°C, в статических условиях в темноте в анаэробной минеральной среде, содержащей 100 мг/л дрожжевого экстракта, микроэлементы и резазурин (индикатор анаэробных условий). Анаэробные условия создавали с помощью замены азотом газовой фазы в закрытых резиновыми пробками флаконах объёмом 120 мл, а также внесения восстановителя – 0,278

г/л $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$. В качестве (амино)ароматических субстратов использовали 2-,3- и 4-аминобензойные кислоты (2-,3-,4-АБК), 5-аминосалициловую кислоту (5-АСК), бензойную кислоту (БК), 2-гидроксibenзиловый спирт (2-ГБС), бензиловый спирт (БС), салициловую кислоту (СК).

Для определения деградации аминоксроматики накопительными культурами содержание ароматических соединений в среде измеряли с помощью спектрофотометрического сканирования (Shimadzu UV-1202, Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм, а также высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) в обращенных фазах на колонках ChromSpher C18 2x10 см ("Chrompack", Нидерланды) по поглощению при 230 нм. Концентрацию органических кислот и спиртов определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Varian Metacarb 67H (300x6,5 мм; "Merck", ФРГ). Содержание газов измеряли на газовом хроматографе Shimadzu GC-2014 (Япония) с двумя колонками. Разделение водорода и метана проводили на колонке Molsieve 2 м x 3 мм, температура детектора -100°C, газ-носитель – гелий. CO_2 измеряли на том же хроматографе, температура детектора 33°C, газ-носитель – гелий, колонка - Poraplot Q C37554, 25 м x 0,53 мм ("Chrompack", Varian Inc., США).

Содержание белка в культуральной жидкости накопительных культур определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Аммоний-ион определяли по стандартному методу Несслера (Лурье, 1984). Анализ содержания лактата проводили электрохимически с использованием биосенсоров первого поколения на основе L-лактатоксидазы. АРІ-тесты для лактобацилл (BioMerieux, Франция) проводили согласно рекомендациям.

Для выделения чистых культур применяли натуральные и минеральные жидкие или агаризованные среды общего назначения (МПА, голодный агар, базовую минеральную среду), селективные среды для разных групп микроорганизмов (сульфатредукторы, микроорганизмы-гидролитики, использующие целлюлозу, анаэробные азотфиксаторы из рода *Clostridium*, олиготрофные микроорганизмы, БГКП), а также базовую анаэробную агаризованную среду, содержащую различные добавки. Культивирование осуществляли как в анаэробных, так и в аэробных условиях. Для части посевов использовали предварительный прогрев биологического материала.

Выделение ДНК из чистых культур и первичную очистку проводили модифицированным фенол-хлороформным методом (Маниатис и др., 1984; Нетрусов и др., 2005). Полученные образцы ДНК дополнительно подвергали очистке с помощью миниколонок "Wizard DNA clean-up system" (Promega Corporation, Madison, США) по методике, приведенной в руководстве с поставляемым набором.

ПЦР-амплификацию генов 16S рРНК проводили с универсальными праймерами 8-27F(5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') согласно протоколу Lane (1991). Очистку ПЦР-продуктов выполняли с помощью миниколонок "Wizard PCRPreps" («Promega», США) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-продукты, полученные при амплификации с праймерами 8-27F и 1492R (для чистых культур), очищали и секвенировали. Секвенирование проводили с использованием набора реактивов "BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя.

Сравнительный анализ последовательностей генов 16S рРНК осуществляли с помощью данных и программного обеспечения Ribosomal Database Project – RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов микроорганизмов с помощью программы CLUSTALW v 1.75. Построение бескорневых филогенетических деревьев исследуемых бактерий производили с помощью методов, реализованных в пакете программ TREECONW (<http://biocwww.uia.ac.be/u/yvdp/treeconw.html>, Van de Peer, De Wachter, 1994). Автор выражает глубокую признательность и благодарность д.б.н. Туровой Т.П. за помощь в проведении филогенетического анализа.

ПЦР-продукты, полученные при амплификации с праймерами 338F (GC) (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') и 518F(GC) (5'-GCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGTGBCAGCMGCCGCG GTAA-3') (для сообществ), разделяли методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) в 8% полиакриламидном геле, содержащем линейный градиент (30-70%) ДНК-денатурантов (мочевина и формамид). Электрофорез проводили при 60°C при напряжении 70 В 20 ч. После электрофореза гели окрашивали раствором красителя SYBR(R) Gold (разведение 1:10 000) в течение 40 мин. Наиболее чёткие полосы, содержащие фрагменты ДНК, извлекали из геля и впоследствии проводили реамплификацию ДНК-фрагментов, используя праймеры 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3') и 515F (5'-GTGBCAGC MGCCGCGGTAA-3').

Морфологические особенности микроорганизмов в образцах исследовали методами фазово-контрастной и световой (микроскоп Биолам-2, ЛОМО, Россия) микроскопии препаратов живых и термически фиксированных окрашенных фуксином клеток, соответственно, а также сканирующей электронной микроскопии. Микрофотографии с использованием фазового контраста получали с использованием микроскопа Leica DMR HC

(Wetzlar, ФРГ), оборудованного цифровой камерой Leica DC 250. Подготовку препаратов для сканирующей электронной микроскопии проводили по стандартной методике (Нетрусов и др., 2005) и просматривали на электронном сканирующем микроскопе «Hitachi S - 405 A» (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Накопительные культуры, использующие в своём метаболизме аминокислоты. Анаэробные накопительные культуры, расщепляющие аминокислоты, получали из активных метаногенных илов различного происхождения путём длительной адаптации к соответствующим аминокислотным субстратам (более 3 лет на момент начала экспериментов). В работе использовали несколько источников биопроб: мезофильный флокулярный ил очистных сооружений Курьяновской станции аэрации (ил КСА), анаэробный ил очистных сооружений пивоваренного завода “Efes Pilsener” (ил EP), донные отложения реки Джамна (Индия), донные отложения содового озера Цайдам (Бурятия). В качестве субстратов использовали 2-, 3-, 4-АБК и 5-АСК. После практически полного исчезновения в культуральной жидкости внесённой порции начального субстрата в культивационные сосуды вносили шприцем новые порции того же аминокислотного вещества, после чего начинался следующий цикл потребления аминокислоты.

Мезофильный флокулярный ил очистных сооружений Курьяновской станции аэрации (ил КСА) представлял собой чёрные мелкие частицы, состоящие из тонких палочек разной длины, мелких прямых палочек и скоплений кокков разного размера. Анаэробные культуры O4 и P2 были получены из данного ила путём адаптации к 2-АБК (культура O4) и смеси 2-АБК+4-АБК (культура P2) в течение длительного периода (более 9 лет). Лаг-период активности перед первым циклом потребления составлял 50 и 70 сут соответственно.

Аминобензойные кислоты являлись единственным источником углерода и энергии в сообществе. Средняя скорость потребления 2-АБК культурой O4 составляла 0,03 мМ /сут, культура P2 разрушала 2-АБК со скоростью 0,03 мМ/сут, 4-АБК – со скоростью 0,15 мМ/сут. Микроскопическая картина обоих сообществ была представлена мелкими кокками, расположенными как в скоплениях, так и отдельно, короткими толстыми палочками, а также крупными фрагментированными палочками, появление которых было связано с концом цикла потребления аминокислотного субстрата и образованием биогаза. В сообществе P2 встречались также крупные кокки и мелкие изогнутые палочки.

Активный метаногенный ил очистных сооружений пивоваренного завода “Efes Pilsner” состоял из тёмных гранул, включающих 11 типов палочек и 3 типа кокков, с

преобладанием крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек и коккобацилл, лежащих попарно. Анаэробная накопительная культура ЕР была получена путём адаптации ила к 2-АБК в течение долгого промежутка времени (более 5 лет). 2-АБК являлась единственным источником углерода и энергии в сообществе. Первый цикл потребления субстрата для данной культуры длился 38 сут, из них 14 сут продолжался лаг-период. Последующие циклы потребления начинались без адаптационного периода, культура потребляла 2-АБК со средней скоростью 0,06-0,08 мМ/сут. Микроскопический анализ сообщества ЕР показал наличие кокков, как в цепочках, так и отдельно, коротких толстых палочек; фрагментированных палочек с прямыми концами средней длины и в конце цикла потребления субстрата - длинных тонких изогнутых нитей.

Донные отложения реки Джамна (Индия) представляли собой чёрные хлопья, состоящие из мелких кокков, коккобацилл и палочек разной формы и размера. Базовым служил режим культивирования при рН 7, 30°C, в статичных условиях в темноте. В ряде экспериментов варьировали значения различных параметров культивирования (рН, освещённости, температуры). При базовом режиме культивирования накопительные культуры наиболее активно разрушали 2-АБК, причем первый цикл ее потребления длительностью 135 сут начался с довольно длительного (54 сут) лаг-периода. Следующий цикл деградации 2-АБК проходил уже без лаг-периода и завершился за 25 сут.

Донные отложения содового озера Цайдам, для которого характерно высокое содержание минеральных солей (общая минерализация 14 г/л), представляли собой зеленовато-серые крупные рыхлые хлопья, состоящие из скоплений мелких и крупных кокков и палочек разной длины и формы. Из всех использованных нами субстратов наиболее активно в базовом режиме культивирования происходила деструкция накопительной культурой 2-АБК. Ее потребление началось спустя 35 сут, средняя скорость использования субстрата в цикле составила 0,22 мМ/сут. В варианте, культивируемом при базовых условиях и расщепляющем 2-АБК, в середине цикла преобладали мелкие палочки, были немногочисленные длинные прямые тонкие палочки.

Культуры, выделенные из илов очистных сооружений, являлись наиболее активными из всех использованных в работе. Они с высокой скоростью и в течение длительного времени потребляли аминокислотный субстрат и образовывали конечные продукты (биогаз), скорость потребления субстрата от цикла к циклу не изменялась. При пересевах и масштабировании эти анаэробные сообщества не теряли своей активности.

Для культур, полученных из естественных водоёмов, был характерен довольно продолжительный лаг-период, тогда как некоторые культуры, полученные из неадаптированных илов очистных сооружений, начинали потреблять субстрат практически

без лаг-периода. Видовое разнообразие в культурах, выделенных из неадаптированного ила, вследствие непродолжительного воздействия аминокроароматических веществ было богаче, чем в длительно адаптированных накопительных культурах О4 и Р2, однако активность деградации и её стабильность была выше у культур О4 и Р2.

В зависимости от обсуждаемых характеристик все использованные нами в работе культуры можно расположить в виде следующих рядов (в порядке возрастания) (табл.1).

Таблица 1.

Основные свойства анаэробных сообществ в сравнении.

| Характеристика сообщества | Сообщества (в порядке возрастания) |
|--|------------------------------------|
| Видовое разнообразие/Число морфотипов | О4, Р2 < Цайдам < Джамна < ЕР |
| Стабильность активности | ЕР < Джамна < Цайдам < О4, Р2 |
| Активность | Цайдам, Джамна < ЕР < О4, Р2 |
| Длительность потребления аминокроароматики | ЕР < Джамна, Цайдам < О4 < Р2 |

Итак, наиболее активными и стабильными, хотя и менее разнообразными по компонентному составу вследствие длительного селективного воздействия аминокроароматических субстратов оказались сообщества О4 и Р2, выделенные из ила КСА и длительное время находящиеся в контакте с аминокроароматикой.

2. Общая характеристика процесса биодегградации. Нами показано, что независимо от источника биологического материала процесс потребления аминокроароматического субстрата протекает в несколько стадий. Для всех сообществ в начале первого цикла потребления субстрата был характерен определённый лаг-период (адаптационный период), в течение которого происходит пространственная организация сообщества, изменение его трофических связей и активизация ферментных систем, участвующих в разложении ароматических субстратов до конечных продуктов (Kotova et al., 2005). Время адаптации и длительность цикла минерализации исходного аминокроароматического субстрата (табл. 2) в разных вариантах накопительных культур различались, но последовательность появления, состав основных интермедиатов и конечных продуктов оставались неизменными: в качестве промежуточных продуктов всегда образовывались CO_2 , H_2 и NH_4^+ , затем бензоат, ацетат, конечными продуктами деструкции являлись CH_4 и CO_2 (рис.1). В качестве интермедиатов процесса фиксировали также следовые количества лактата, бутирата и этанола, а также следы водорода (в начале цикла потребления).

Таблица 2.

Накопительные культуры, расщепляющие аминокислотные субстраты.

| Вариант | Исходный ил | Параметры культивирования, субстрат | Лag-период активности биоразложения (сут) | Средняя скорость деградации (мМ/сут) в цикле потребления субстрата | Стабильность активности (возраст культуры/число циклов потребления) |
|---------|-------------|-------------------------------------|---|--|---|
| О4 | КСА | t° = 30°C, pH = 6,5-7,5, 2-АБК | 10 | 0,03 | Высокая (9 лет 9 мес/355) |
| P2 | КСА | t° = 30°C, pH = 6,5-7,5, 4-АБК | 10-14 | 0,03 | Высокая (3 года 7 мес/129) |
| ЕР | ЕР | t° = 30°C, pH = 6,5-7,5, 2-АБК | 7-14 | 0,08 | Средняя (5 лет 6 мес/39) |
| Ц | Ц | t = 30°C, pH=7,0, 2-АБК | 35 | 0,22 | Средняя (2 года/18) |

В сообществах, активно разлагающих аминокислоты, наблюдали значительное «обеднение» компонентного состава и смену доминирующих видов микроорганизмов.

При деструкции аминокислот различные фазы процесса сопровождались изменениями микроскопической картины микробных сообществ. На примере микробного консорциума ЕР, расщепляющего 2-АБК, наблюдали сукцессию сообщества в течение цикла потребления (рис. 2). В начале цикла потребления в культуре присутствовали палочки, короткие и средней длины, а также небольшое количество кокков (рис.2, А, Б). Начало метаногенеза всегда было связано с появлением в сообществе длинных палочек или нитей, окружённых кокками (рис.2, В, Г). Эти длинные палочки (нити) могут располагаться как отдельно, так и быть включёнными в скопления (агрегаты) клеток. Клетки в составе агрегатов в активной накопительной культуре часто бывают ослизнены.

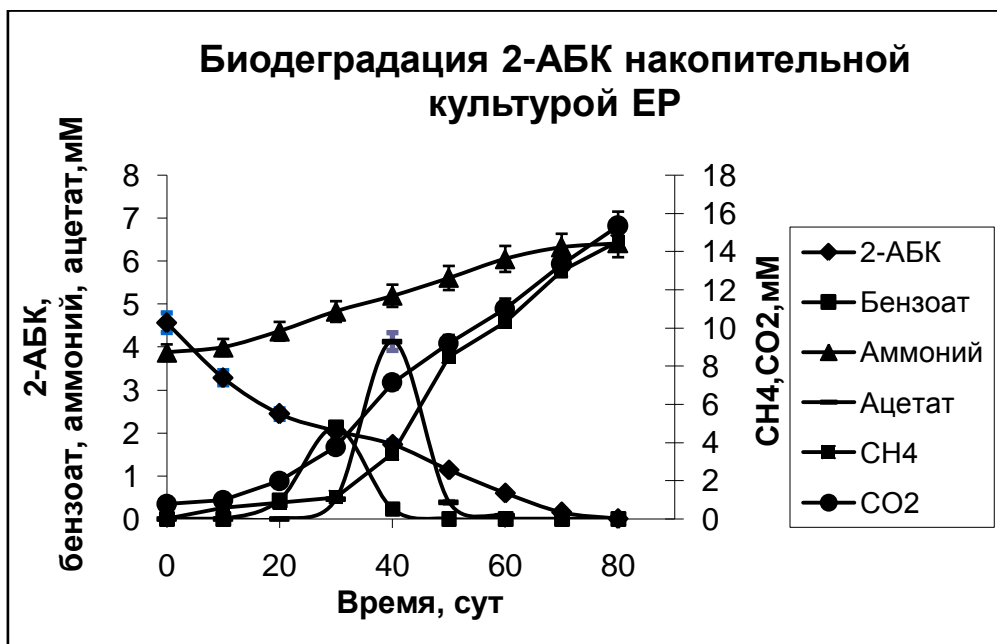


Рис.1. Типичная картина появления промежуточных и конечных продуктов при биодеградации аминоксарики на примере накопительной культуры ЕР, разрушающей 2-АБК.

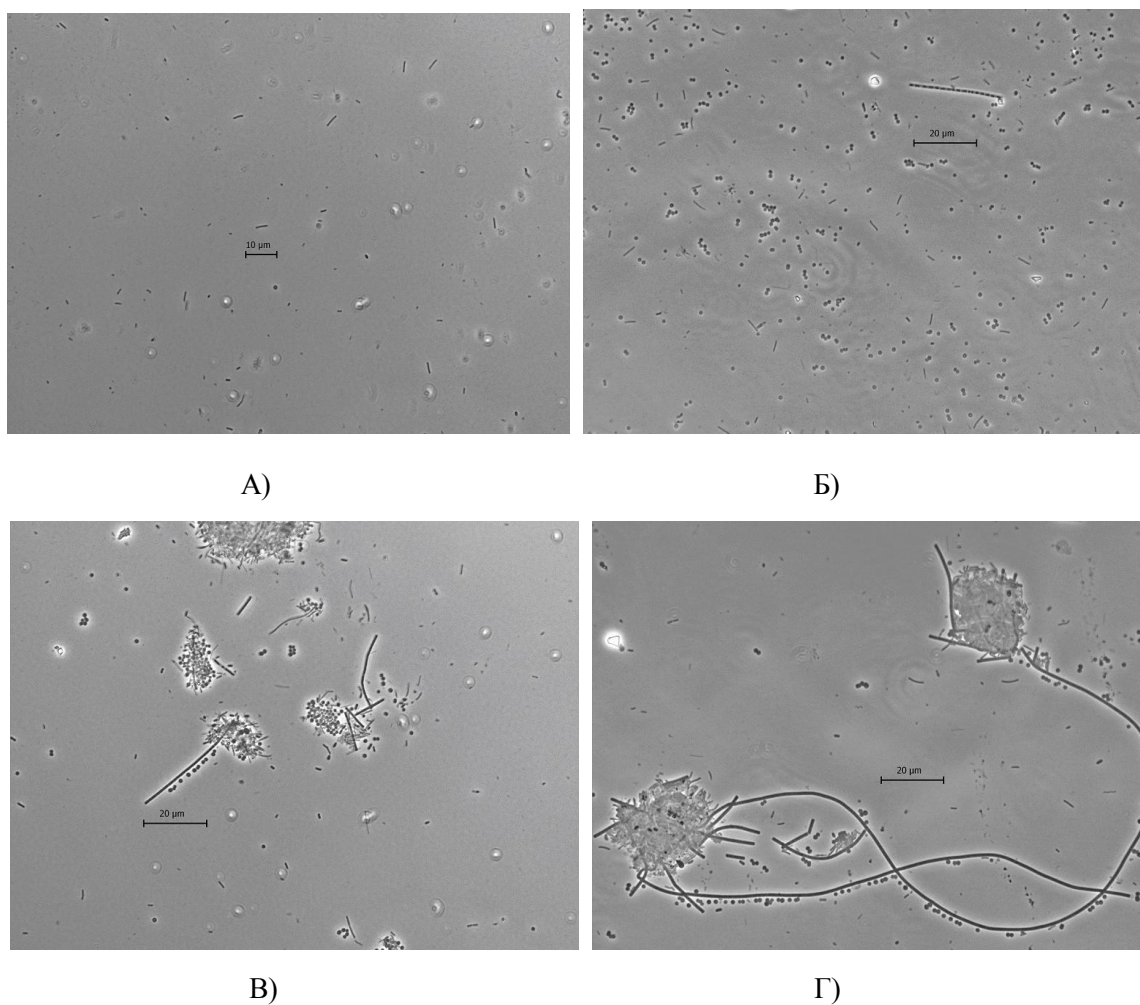


Рис. 2. Изменение микроскопической картины сообщества ЕР в течение цикла потребления 2-АБК (световая микроскопия с фазово-контрастным устройством, $\times 1200$). А - нулевая точка, Б - 2-е сут, В, Г - 6-8-е сут цикла.

Для накопительной культуры ЕР, расщепляющей 2-АБК, было исследовано влияние пирувата и глюкозы как дополнительных источников углерода и энергии на процесс деструкции аминокислотных веществ. Внесение в накопительную культуру пирувата до конечной концентрации 20 мМ приводило к увеличению скорости деструкции 2-АБК в 2,5 раза, в присутствии глюкозы (2 г/л) скорость процесса биодegradации 2-АБК сообществом ЕР также увеличивалась в 1,5-1,7 раза (рис.3).

Для определения роли небиологических факторов (физико-химических параметров) в процессе дегradации ксенобиотиков был проведён ряд экспериментов. В опыте с автоклавированным илом было показано, что начальная стадия потребления субстрата связана с адсорбцией вещества на частицах ила. При сравнении активности «живых» и подвергнутых автоклавированию при 1 ати различных анаэробных илов было показано, что уже в течение первых суток концентрация субстрата уменьшалась на 10-20% от исходной. Однако в дальнейшем «живой» ил потреблял аминокислотное соединение полностью с образованием промежуточных и конечных продуктов, в том числе и при повторном введении субстрата.

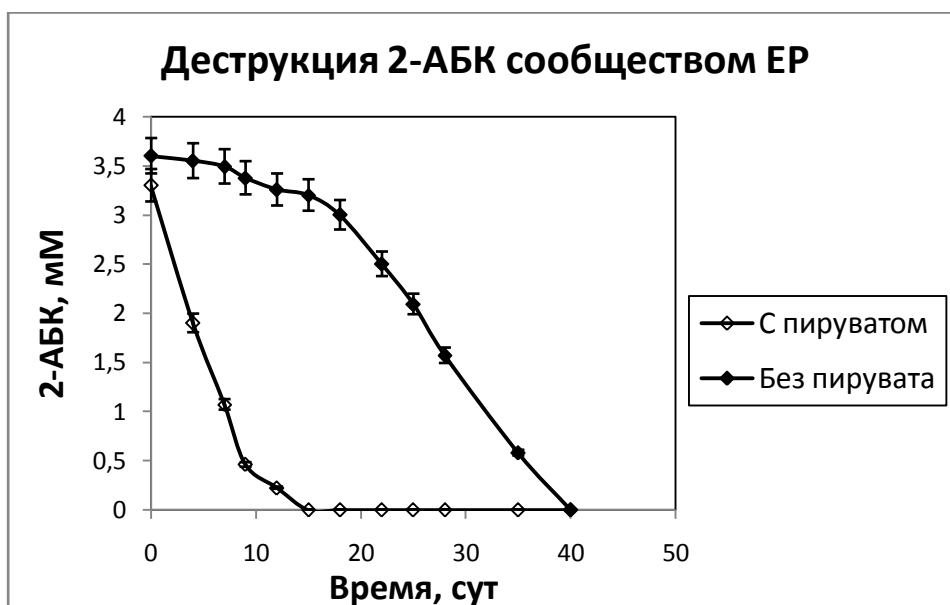


Рис.3. Расщепление 2-АБК сообществом ЕР/2-АБК в присутствии и отсутствии пирувата.

Изменение гидродинамических условий также влияет на процесс дегradации субстрата и на формирование микробных агрегатов, приводя к изменению морфологических характеристик сообщества. Образование структурированных микробных агрегатов в статичных условиях происходит намного быстрее, чем в условиях перемешивания, они крупнее, но их количество меньше. Изменение гидродинамических условий влечёт за собой

и изменение микроскопической картины стабильных накопительных культур, потребляющих 2-АБК.

В эксперименте по определению влияния начальных параметров культивирования (температуры, освещенности, рН и химической природы субстрата) на процесс деградации субстрата, морфологические и физиологические характеристики сообщества были использованы илы естественных водоёмов. Выбор именно этих илов для эксперимента по варьированию комплекса физико-химических параметров культивирования был обусловлен тем, что в естественных местообитаниях колебание физико-химических факторов является обычной ситуацией, тогда как в очистных сооружениях условия культивирования гораздо более стабильны и контролируемы. Для накопительных культур из донных осадков задавали разные сочетания четырех факторов: 1) температуры – комнатная переменная, 30°C, 55°C; 2) рН - 7 и 9, 3) субстрата - 2-АБК, 4-АБК, 3-АБК, 5-АСК и 4) освещенности – на свету и в темноте. В результате комбинаций всех факторов получили около 100 вариантов, различающихся по степени использования аминокислотного субстрата. Благоприятными для процесса деградации аминокислот оказались 30°C или комнатная переменная температура. При повышенной температуре (55°C) активного потребления аминокислотного субстрата не происходило. Выделены только две накопительные культуры, в которых показано медленное использование аминокислот при 55°C. Активные накопительные культуры, потребляющие аминокислотный субстрат, имели рН не выше 8,5. Наиболее «биодegradабельным» субстратом для микробных ассоциаций оказалась 2-АБК. 3-АБК выделенные нами культуры практически не потребляли. В условиях освещенности только в отдельных случаях процесс также мог идти более активно, чем в темноте.

Для активно разлагающих аминокислоты анаэробных микробных сообществ было отмечено селективное действие аминокислотных веществ и существенное снижение морфологического разнообразия микроорганизмов по сравнению с исходным консорциумом (например, для накопительной культуры ЕР, разрушающей 2-АБК, с 14 морфотипов до 5), что свидетельствует о возможной токсичности аминокислот для микроорганизмов, осуществляющих неметаногенные стадии процесса биоразложения.

3. Интермедиаты процесса биодеструкции аминокислот и возможности использования сообществами других ароматических субстратов. Для активных сообществ, полученных из различных источников биоматериала, нами были идентифицированы ароматические интермедиаты биодеструкции аминокислот. Ранее при исследовании деградации аминокислотных соединений продукт первичной трансформации 5-АСК метаногенным сообществом, полученным из ила очистных

сооружений свиноводческого комплекс, был определён как 2-ГБС (Savelieva et al., 2003). Продукт трансформации 5-АСК в сообществе, выделенном из ила озера Цайдам, был также идентифицирован нами как 2-ГБС, превращающийся последовательно в бензоат. Продуктом первичной биоконверсии 2-АБК является бензиловый спирт.

Реальные сточные воды зачастую содержат несколько загрязняющих компонентов и продуктов их трансформации, поэтому для определения потенциальных метаболических возможностей культуры, продемонстрировавшие наибольшую активность в процессе деструкции аминокислот (O4, P2, EP), были проверены на способность к деструкции интермедиатов анаэробной биоконверсии аминокислот (бензилового спирта, бензойной кислоты, 2-гидроксибензилового спирта), а также салициловой кислоты и широко применяющегося в текстильной промышленности кислотного азокрасителя Acid Orange 6, при восстановлении которого образуются ароматические амины (табл.3).

Довольно активное, практически без лаг-периода потребление бензилового спирта с образованием CH_4 и CO_2 в качестве конечных продуктов происходило во всех трёх сообществах. Наиболее значительная деграция имела место в сообществах O4 и P2, ранее подвергшихся более длительному воздействию аминокислотного субстрата, чем вариант EP. Бензойную кислоту с образованием CH_4 и CO_2 потребляли накопительные культуры O4 и EP, причем вариант EP отличался большей активностью. В качестве промежуточных продуктов регистрировали ацетат и следы этанола. Незначительное потребление 2-гидроксибензилового спирта (0,34 мМ) с образованием CH_4 и CO_2 происходило только в варианте EP (табл.3).

Токсичность выявленных нами промежуточных продуктов трансформации аминокислот определяли при помощи стандартного метода (Donlon et al., 1995), учитывающего изменение активности ацетокластического метаногенеза анаэробной биомассы. Было показано, что токсичность ароматических веществ уменьшается в ряду: 2-ГБС > бензиловый спирт > бензойная кислота > салициловая кислота.

Таблица 3.

Использование ароматических субстратов сообществами O4, P2 и EP, адаптированными к аминокислотам.

| Культура | Субстрат | Скорость потребления (мМ/сут) | Интермедиаты | Конечные продукты |
|----------|---------------------|-------------------------------|--|----------------------------|
| O4 | 2-АБК (основной) | 0,03 | Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH_4^+ | CH_4, CO_2 |

| | | | | |
|----|---------------------|-------|---|-----------------------------------|
| | АО6 | 0,25 | Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол | CH ₄ , CO ₂ |
| | БС | 0,167 | Бензоат, ацетат, этанол (следы) | CH ₄ , CO ₂ |
| | БК | 0,071 | Ацетат, этанол (следы) | CH ₄ , CO ₂ |
| | 2-ГБС | — | — | — |
| | СК | — | — | — |
| P2 | 4-АБК (основной) | 0,03 | Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺ | CH ₄ , CO ₂ |
| | АО6 | 0,22 | Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол | CH ₄ , CO ₂ |
| | БС | 0,040 | Бензоат, ацетат, этанол (следы) | CH ₄ , CO ₂ |
| | БК | — | — | — |
| | 2-ГБС | — | — | — |
| | СК | — | — | — |
| EP | 2-АБК (основной) | 0,08 | Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺ | CH ₄ , CO ₂ |
| | АО6 | 0,12 | Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол | CH ₄ , CO ₂ |
| | БС | 0,022 | Бензоат, ацетат, этанол | CH ₄ , CO ₂ |
| | БК | 0,113 | Ацетат, этанол (следы) | CH ₄ , CO ₂ |
| | 2-ГБС | 0,002 | H ₂ (следы), бензоат, ацетат, этанол (следы) | CH ₄ , CO ₂ |
| | СК | — | — | — |

Для культуры EP было изучено влияние пирувата на процесс деструкции и других ароматических субстратов (бензойной кислоты, бензилового спирта, салициловой кислоты, 2-гидроксибензилового спирта, бензальдегида, пирогаллола, резорцинола и флороглюцинола). Так, внесение 20 мМ пирувата в среду культивирования стимулировало процесс биодegradации как основного субстрата, так и других использованных ароматических веществ. Некоторые вещества (салициловую кислоту, пирогаллол, бензальдегид) накопительная культура EP оказалась способна разлагать только в присутствии пирувата как дополнительного источника углерода и энергии. Внесение пирувата ускоряло минерализацию как основного, так и других ароматических субстратов в 2-60 раз по сравнению с ростом на (амино)ароматическом веществе как единственном

источнике углерода и энергии. Параллельно с деструкцией ароматического субстрата сообщество сбрасывало пируват, образуя ацетат, пропионат, формиат, бутират и лактат в качестве промежуточных продуктов.

Анализ интермедиатов деструкции 2-АБК и 5-АСК с большой долей вероятности позволяет говорить о реализации бензоил-КоА-пути деструкции аминокислот (Heider, Fuchs, 1997) полученными микробными сообществами.

Как известно, существуют различные пути анаэробной конверсии ароматических веществ, где в качестве центрального интермедиата могут выступать не только бензоат, но и резорцинол или флороглюцинол (Heider, Fuchs, 1997). Для проверки возможности реализации альтернативных путей деструкции аминокислот было изучено потребление сообществом ЕР, изначально адаптированным к 2-АБК, флороглюцинола, резорцинола и его аналога пирогаллола. Отсутствие потребления флороглюцинола и резорцинола данным сообществом указывает на то, что в заданных условиях эти пути не реализуются.

С учётом всех идентифицированных нами интермедиатов можно предложить следующую последовательность реакций разложения 2-АБК:

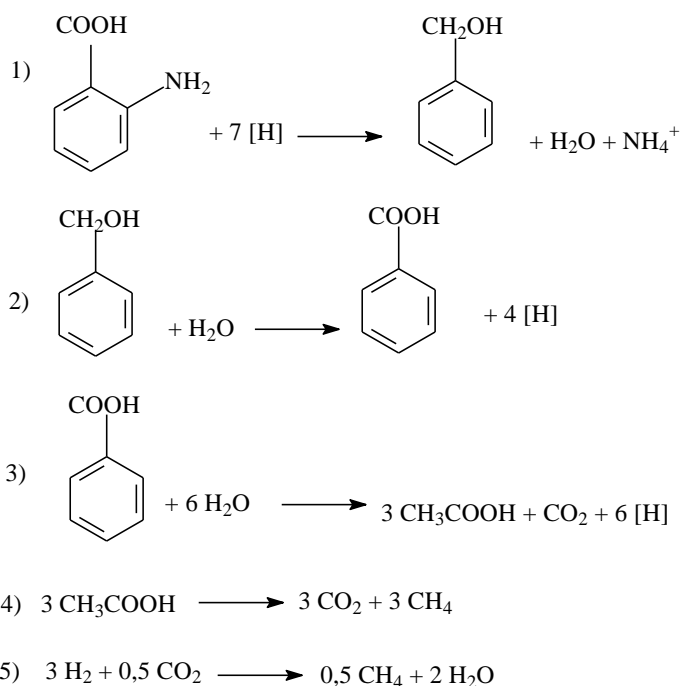


Схема деструкции 5-АСК отличается от вышеприведённой схемы только на первых этапах (5-АСК трансформируется сначала в 2-ГБС, затем в бензоат, последующие стадии деструкции совпадают с таковыми для процесса разложения 2-АБК).

4. Анализ компонентного состава сообщества. Анаэробные микробные сообщества, использованные в нашей работе, являются хорошо сбалансированными системами с облигатными связями между микроорганизмами-членами сообщества, что приводит к значительным трудностям при выделении чистых культур микроорганизмов прямым

высевом на питательные среды. Высевы сообществ O4, P2 и EP на селективные среды, проведённые с целью выявления различных функциональных групп микроорганизмов, входящих в состав сообщества, а также демонстрации потенциальных функциональных возможностей сообществ в реальных меняющихся условиях (например, в настоящих сточных водах), показали присутствие в сообществах сульфатредукторов, целлюлозолитических и олиготрофных микроорганизмов. Для определения общей численности гетеротрофных микроорганизмов, присутствующих в анаэробных сообществах, и количественных соотношений разных морфологических типов были проведены также высевы активных анаэробных культур на богатые и минеральные плотные питательные среды в анаэробных и аэробных условиях, выявившие присутствие в значительных количествах факультативных анаэробов.

При исследовании роли беспоровых микроорганизмов в процессе деструкции и пространственной организации сообщества проводили кипячение образцов на водяной бане в течение 10 мин. Исключение метаногенных микроорганизмов и неспорообразующих синтрофов из анаэробных сообществ приводило к изменению как промежуточных продуктов, так и структуры микробного сообщества.

Для оценки филогенетического положения микроорганизмов, зависящих друг от друга в сложной пищевой цепи (сети) и зачастую некультивируемых, использовали DGGE-метод анализа (Diaz et al., 2006) неадаптированного ила EP и активного сообщества EP, разрушающего 2-АБК. При разделении методом DGGE продуктов амплификации ДНК были получены DGGE-профили двух исследованных культур. Секвенирование реамплифицированных и очищенных ДНК-фрагментов, экстрагированных из DGGE-полос, и филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рДНК выявили преобладание как в исходном иле, так и в накопительной культуре некультивируемых представителей филогенетической группы *Bacteroidetes*, а также присутствие представителей родов *Bacillus*, *Moraxella*, *Lactobacillus*, *Methanosaeta* и *Methanosarcina*. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов в накопительной культуре было меньше, чем для исходного неадаптированного ила, что свидетельствует о селективном воздействии аминокислотных веществ на микробное сообщество, приводящее к снижению количества видов в нём.

5. Чистые культуры. Из двух метаногенных сообществ, активно разрушающих аминокислотные субстраты, были выделены 5 чистых культур микроорганизмов, участвующих в процессе деструкции аминокислотных соединений.

Штамм Tsaydam-5-ASA.

Из микробного сообщества Tsaydam-5-ASA, разлагающего 5-АСК до биогаза, была выделена чистая культура *Pseudomonas aeruginosa*. Клетки изолята представляли собой грамотрицательные прямые или слегка изогнутые подвижные палочки, не образующие спор. Данный штамм хотя и не принимает непосредственного участия в процессе деструкции аминокислотных соединений, однако при определённых условиях может происходить трансформация аминокислот данным штаммом либо другим нитратредуцирующим микроорганизмом по схеме, предложенной ранее (Савельева, 2003). Помимо этого, по литературным данным, псевдомонады в составе сообщества могут как опосредованно стимулировать процесс деструкции аминокислотных кислот (синтез внеклеточных ПАВ, увеличивающих эффективность биодеструкции 5-АСК, Воробьёв и др., 2007; Семёнова и др., 2011), так и выполнять функции защиты других членов микробного сообщества от стрессорных воздействий (Николаев, 2011).

У исследуемого штамма бактерий была определена значительная часть (1435 нуклеотидов) последовательности гена 16S рРНК, что соответствует позициям с 52 по 1492 по номенклатуре *E. coli*. Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм относится к филуму *Gamma*proteobacteria и близок к микроорганизмам рода *Pseudomonas*. Более точное филогенетическое положение исследуемого штамма среди ближайших представителей данного рода представлено на рис. 4.

Выделенный штамм был идентифицирован и систематизирован как *P. aeruginosa* Tsaydam-5-ASA.

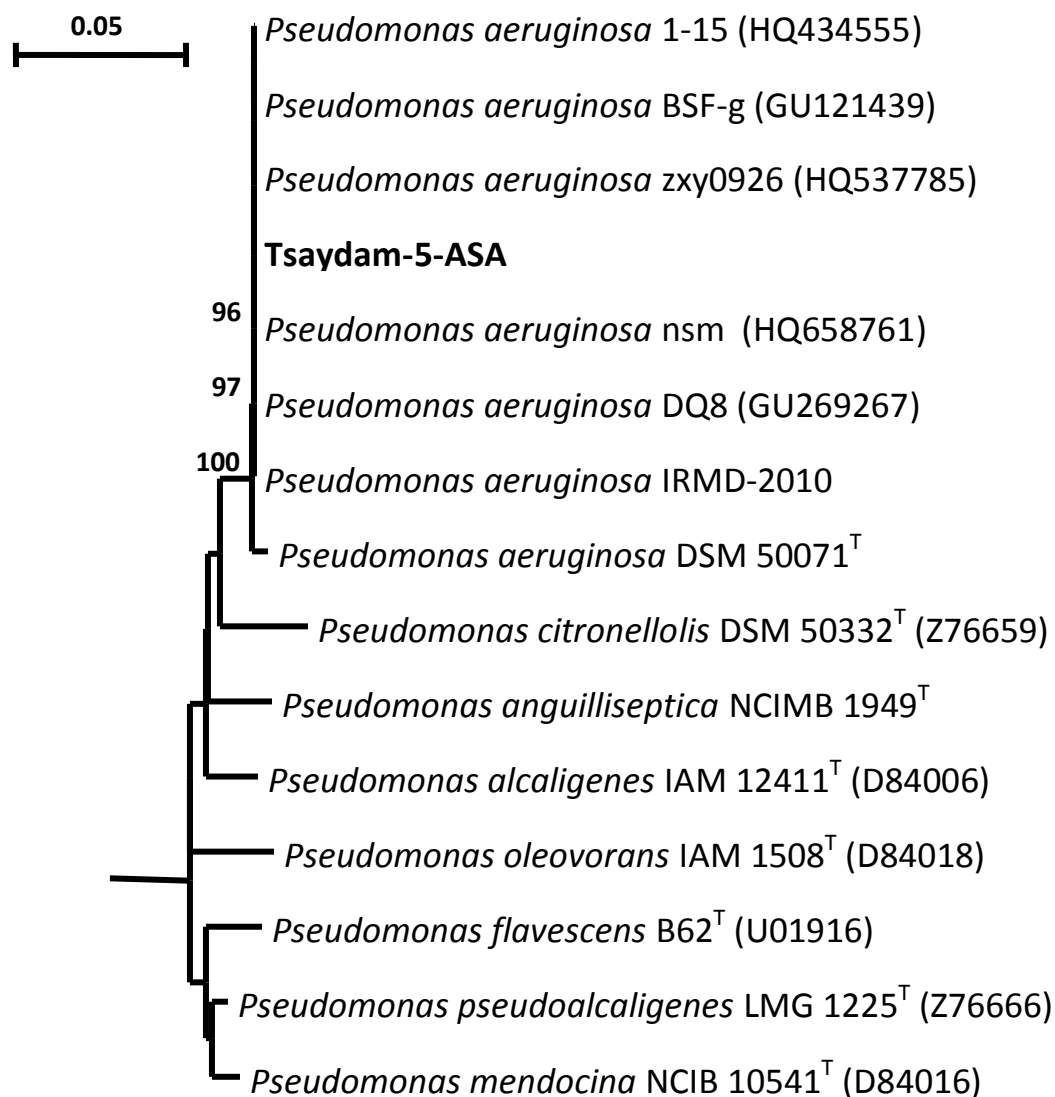


Рис.4. Филогенетическое положение штамма *Tsaydam-5-ASA* среди видов рода *Pseudomonas*.

Штамм EP-ABA

Из накопительной культуры EP-2-ABK был выделен штамм *Bacillus subtilis* EP-ABA. Клетки штамма представляли собой грамположительные подвижные палочки среднего размера. В условиях нитратредукции ранее была описана возможность деструкции фталата микроорганизмами, относящимися к роду *Bacillus* (Ahring, Taylor, 1981), однако изменений концентраций внесённых ароматических субстратов в условиях нашего эксперимента обнаружено не было. Выделенный штамм обладает бродильным типом метаболизма, и внесение в сообщество дополнительных количеств его клеток приводило к увеличению количества образующихся летучих продуктов, в том числе ацетата, служащего субстратом метаногенеза.

По данным литературы для *B.subtilis* показана способность продуцировать защищающие клетки от стрессорных воздействий внеклеточные факторы - адаптогены, обладающие перекрёстным действием (т.е. действием на клетки микроорганизмов других видов, Николаев, 2011). Одной из функций *B.subtilis* в выделенных нами ассоциациях может быть защита других микроорганизмов-членов сообщества от воздействия неблагоприятных факторов и поддержание его стабильного функционирования.

У исследуемого штамма была определена значительная часть (1495 нуклеотидов) последовательности гена 16S рНК, что соответствует позициям с 15 по 1501 по номенклатуре *E. coli*. Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм относится к филуму *Firmicutes* и близок к бактериям рода *Bacillus*. Более точное филогенетическое положение исследуемого штамма среди ближайших представителей данного рода отражено на рис.5.

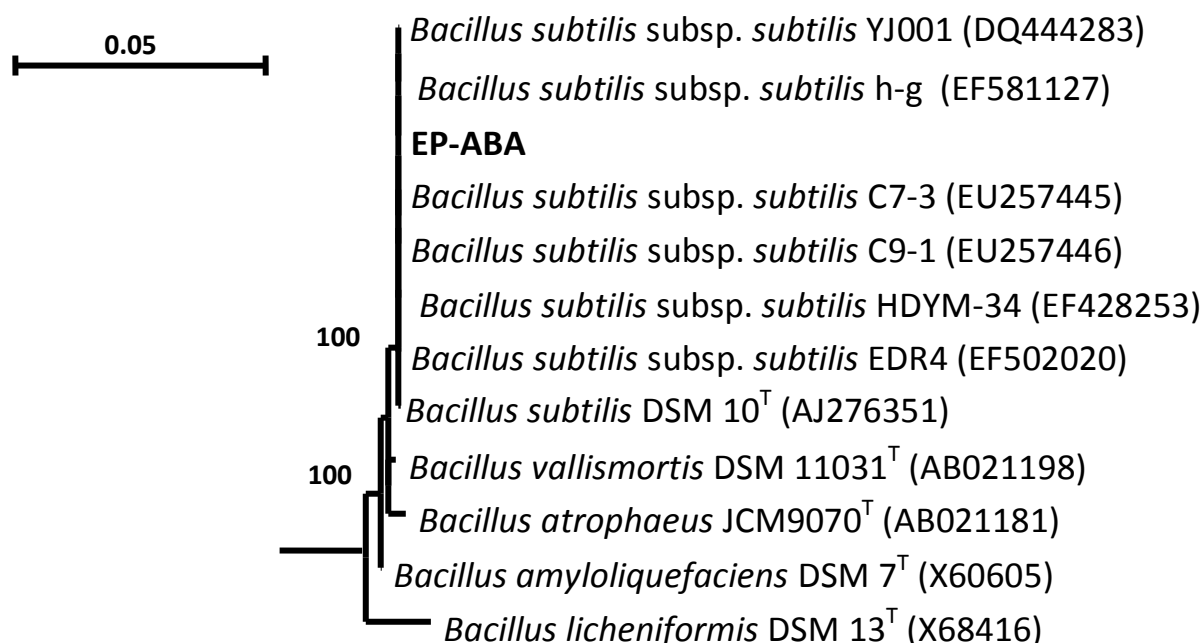


Рис.5. Филогенетическое положение штамма EP-ABA среди видов рода *Bacillus*.

Штамм EP-ABA2

Штамм *Moraxella osloensis* EP-ABA2 был выделен из сообщества EP, расщепляющего 2-АБК. Клетки представляли собой мелкие грамтрицательные неподвижные палочки. Согласно литературным данным, представители этого рода способны к деструкции бензоата (Berry et al., 1987) и *n*-крезола (Bossert, Young, 1986) в условиях нитратредукции, а также *n*-нитрофенола (Spain, Gibson, 1991) и нафталинсульфонокислот (Wittich et al., 1988) в аэробных условиях. В условиях нашего эксперимента изменений концентраций внесённых

ароматических субстратов не наблюдали. Представители рода *Moraxella* способны осуществлять смешанное брожение (Asano et al., 1988). Внесение клеток штамма в сообщество приводило к увеличению количества образующихся кислот, в том числе ацетата, служащего субстратом метаногенеза.

У исследуемого штамма была определена значительная часть (1485 нуклеотидов) последовательности гена 16S рРНК, что соответствует позициям с 11 по 1505 по номенклатуре *E. coli*. Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм относится к филуму *Gammaproteobacteria* и близок к микроорганизмам рода *Moraxella*. Более точное филогенетическое положение исследуемого штамма среди ближайших представителей данного рода представлено на рис.6.

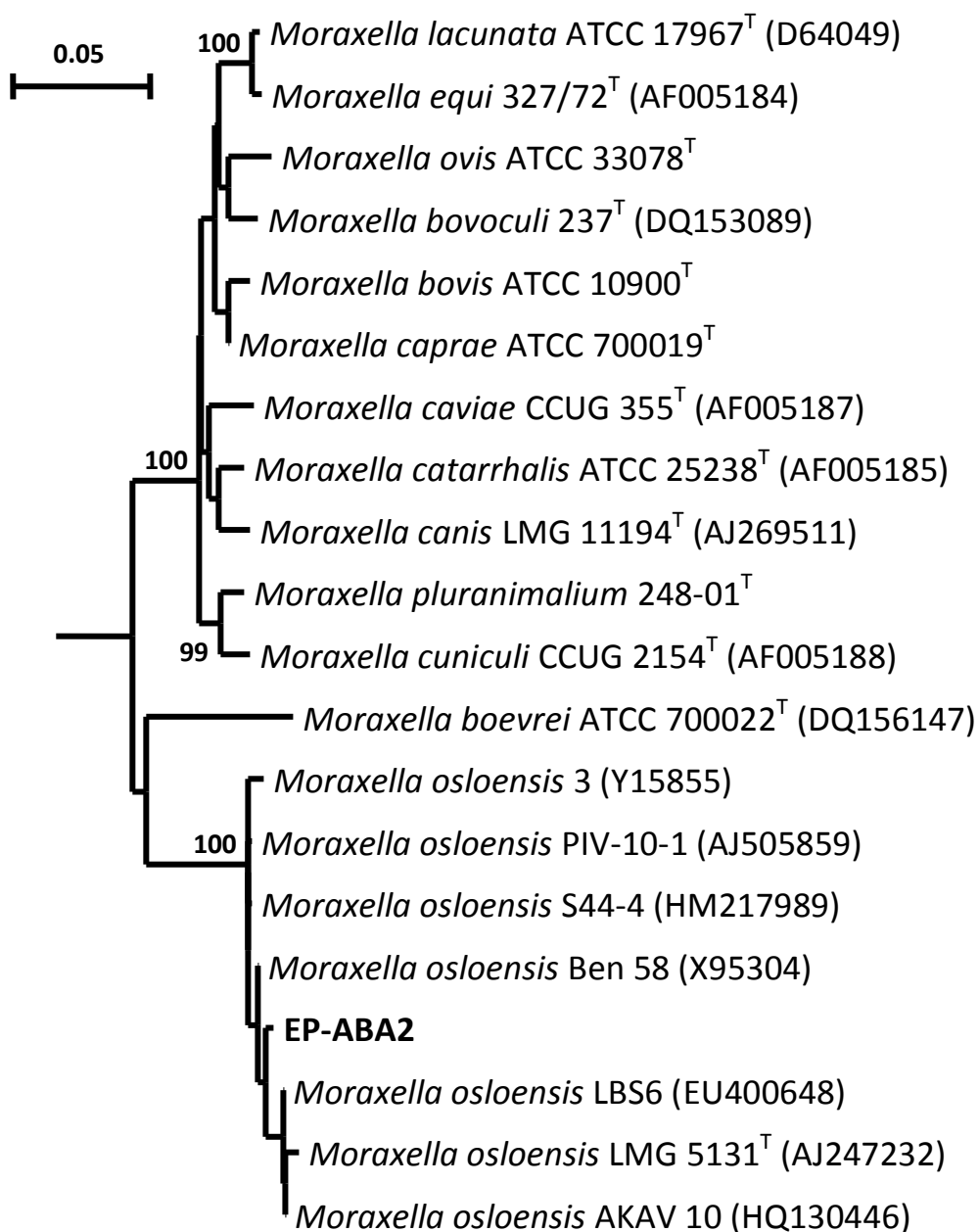


Рис.6. Филогенетическое положение штамма EP-ABA2 среди видов рода *Moraxella*.

Штаммы L-43.1 и L-34.

Штаммы *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* L-34 и *L.rhamnosus* L-43.1 были выделены из метаногенных сообществ Tsaydam-5-ASA и EP-2-АБК, соответственно и идентифицированы по результатам АРІ-тестов. Нами была проведена проверка способности выделенных штаммов лактобацилл к деструкции аминокромоароматических субстратов, а также восстановлению двух пищевых азокрасителей. Ни одна из культур в условиях эксперимента не разлагала ароматические амины и азокрасители в качестве единственного источника углерода и энергии, однако обе осуществляли сбразивание линейных интермедиатов процесса до лактата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биодеградацию различных веществ, загрязняющих окружающую среду, изучают уже несколько десятилетий, однако имеющиеся литературные данные по деструкции аминокромоароматических соединений довольно немногочисленны и отрывочны.

Возможность разрушения ароматических веществ донными осадками природных водоёмов, не загрязнённых соответствующими веществами, ранее была продемонстрирована различными авторами (Ye et al., 1992; Haggblom et al., 1993; Edwards, Grbic-Galic, 1994; Becker et al., 2001). Однако биодеградация именно аминокромоароматических веществ сообществами, выделенными из подобных мест обитания, впервые была показана в нашей лаборатории. Начальная стадия потребления субстрата зачастую связана с действием небиологических факторов, заключающихся в адсорбции вещества на частицах ила (Wu et al., 1993; Fu, Viraragharan, 2001), причём вещества, отличающиеся по химическому строению, по-разному адсорбируются на поверхности клеток (Fu, Viraragharan, 2001), однако для аминокромоароматических соединений такие сведения отсутствовали. Нами было также показано, что в случае 2- и 4-АБК химическая природа субстрата не влияла на степень его адсорбции.

В данной работе впервые было показано влияние гидродинамических условий на процесс деградации аминокромоароматического субстрата и морфологические характеристики микробного сообщества, определены оптимальные начальные параметры культивирования для сообществ, разрушающих аминокромоароматический субстрат. Для ароматических интермедиатов (2-ГБС, СК, БС) была определена токсичность, сведения о которой по отношению к метаногенным консорциумам в литературе отсутствуют. Были также определены интермедиаты деструкции аминокромоароматики и предложена схема разложения 2-АБК и 5-АСК выделенными консорциумами.

Результаты проверки возможности осуществления альтернативных путей деградации (Heider, Fuchs, 1997) использованных в работе аминокислотных веществ, а также природа и последовательность появления промежуточных продуктов свидетельствовали о реализации бензоил-КоА-пути деструкции в микробных консорциумах.

Несмотря на преобладание некультивируемых микроорганизмов в изучаемых консорциумах, нами были выделены в чистые культуры и идентифицированы до вида несколько микроорганизмов. Штамм *P.aeruginosa* Tsaydam-5-ASA хотя и не принимает непосредственного участия в процессе деструкции аминокислотных соединений, однако при определённых условиях может опосредованно стимулировать процесс деструкции аминокислотных кислот (Савельева, 2003) и выполнять функции защиты от стрессорных воздействий других членов микробного сообщества (Николаев, 2011). Остальные выделенные штаммы - *Lactobacillus rhamnosus* и *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *Bacillus subtilis*, *Moraxella osloensis*, выделенные из сообществ EP-2-АБК и Tsaydam-5-ASA, участвуют в процессе биоразрушения аминокислотных субстратов, входя в «бродительный» блок анаэробных микробных сообществ и осуществляя сбраживание линейных интермедиатов – продуктов деструкции аминокислотных кислот. Одной из функций, выполняемых выделенными штаммами, является также поддержание условий анаэробно-метаногенного сообщества, что способствует стабилизации процесса при метаногенной биодеструкции субстратов.

Таким образом, представленные в работе данные позволяют лучше понять механизмы биоконверсии аминокислотных веществ до безвредных минеральных соединений, существенно расширяют знания о структурно-функциональной организации микробных сообществ, как из естественных мест обитания, так и из искусственно созданных человеком очистных сооружений.

ВЫВОДЫ

1. Выделены и изучены анаэробные микробные сообщества, стабильно и с высокой активностью расщепляющие изомеры аминокислотной кислоты и 5-аминосалициловую кислоту до CH_4 и CO_2 .
2. Показано влияние на процесс биодеструкции ряда физико-химических факторов: адсорбции, перемешивания, температуры и pH культивирования, освещённости, природы и токсичности аминокислотного субстрата, присутствия легкоусваиваемых источников углерода и энергии.

3. Идентифицированы продукты первичной трансформации: для 2-АБК и салициловой кислоты - бензиловый спирт, для 5-АСК - 2-гидроксibenзиловый спирт.
4. Определены основные интермедиаты процесса и установлено их соответствие бензоил-КоА-пути деструкции аминокроароматических соединений в выделенных метаногенных сообществах.
5. Из метаногенных сообществ различного происхождения выделено и идентифицировано до вида 5 чистых культур микроорганизмов, участвующих в процессе деструкции аминокроароматики.
6. Установлено селективное воздействие аминокроароматических субстратов на микробное сообщество, выражающееся в снижении биоразнообразия и последовательной смене доминирующих морфотипов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Линькова Ю.В.**, Есакова А.А., Дьяконова А.Т., Намсараев Б.Б., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Проверка способности анаэробных микробных сообществ к разрушению аминокроароматических ксенобиотиков // Экология и промышленность России. 2011. №1. С.29-33.
2. **Линькова Ю.В.**, Куликова И.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Деградация азокрасителей и ароматических аминов метаногенными микробными сообществами из илов очистных сооружений // Вода: химия и экология. 2011. №7. С.51-58.
3. **Линькова Ю.В.**, Дьяконова А.Т., Гладченко М.А., Калюжный С.В., Котова И.Б., Стамс А., Нетрусов А.И. Метаногенная деструкция (амино)ароматических веществ анаэробными микробными сообществами // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т.47. №5. С.558-565.

Тезисы конференций

1. **Линькова Ю.В.**, Дьяконова А.Т., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Структура анаэробных микробных сообществ, потребляющих аминокроароматические субстраты // "Биотехнология микробов". Тезисы докладов Всероссийского симпозиума. Москва, МГУ, 20-23 октября 2004 г. М: МАКС Пресс, 2004. С.54.
2. **Линькова Ю.В.**, Дьяконова А.Т., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Анаэробные сообщества микроорганизмов, разрушающие аминокроароматические соединения // "Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды". Материалы международной конференции. Саратов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 14-16 сентября 2005 г. Саратов: Изд-во Научная книга, 2005. С.32.

3. **Линькова Ю.В.**, Дьяконова А.Т., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Деструкция некоторых ароматических соединений анаэробными микробными сообществами // 12-я международная Пушкинская школа-конференция молодых учёных “Биология-наука 21 века”. Тезисы докладов. Пушкино, 10-14 ноября 2008 г. С. 268-269.
4. **Линькова Ю.В.**, Дьяконова А.Т. Деструкция ароматических веществ метаногенными микробными сообществами // Международная конференция “Ломоносов-2009”. Тезисы докладов. Москва, МГУ, 13-18 апреля 2009 г.М.: МАКС Пресс, 2009. С.161.
5. **Линькова Ю.В.**, Дьяконова А.Т., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Метаногенные микробные сообщества, разрушающие ароматические соединения // “Экологические проблемы промышленных городов”. Материалы 4-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Саратов, СГТУ, 7-8 апреля 2009 г. С. 38-39.
6. Куликова И.А., Дьяконова А.Т., **Линькова Ю.В.**, Котова И.Б., Нетрусов А.И. Разрушение двух пищевых азокрасителей анаэробными микробными сообществами различного происхождения // ”Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов”. Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, 24-27 декабря 2009 г. М.: МАКС Пресс, 2009. С.99.
7. **Линькова Ю.В.**, Дьяконова А.Т., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Деструкция аминокислот ароматических кислот анаэробными микробными сообществами // “Экосистемы. Организмы. Инновации-11”. Труды научной конференции. Москва, МГУ им.М.В.Ломоносова, биологический факультет, 24 июня 2009 г. М.: МАКС Пресс, 2010. С.58.
8. **Линькова Ю.В.**, Котова И.Б., Куликова И.А., Дьяконова А.Т., Нетрусов А.И. Особенности физиологии анаэробных микробных сообществ, использующих аминокислоты ароматические вещества // “Актуальные аспекты современной микробиологии”. Материалы VI молодежной школы-конференции с международным участием. Москва, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 25-27 октября 2010 г. М.: МАКС Пресс, 2010. С.41.
9. **Линькова Ю.В.**, Куликова И.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Биодеструкция трёх азокрасителей анаэробными микробными сообществами // “Автотрофные микроорганизмы (к 85-летию со дня рождения академика РАН Е.Н.Кондратьевой)”. Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, 23-26 декабря 2010. М.: МАКС Пресс, 2010. С. 60.