

УДК 579.66

БАКТЕРИИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С УНИКАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ**А.Ю. Максимов^{1,2}, А.В. Шилова¹, В.В. Егорова¹, В.А. Щетко³, Ю.Г. Максимова^{1,2}**¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия³Государственное научное учреждение «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Введение. Экстремофильные микроорганизмы и продуцируемые ими соединения в настоящее время находятся в центре внимания исследователей. Уникальные физиологические и метаболические адаптации этих микроорганизмов позволяют производить с их помощью широкий спектр химических соединений, которые находят применение в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, медицине, фармакологии, полимерной, текстильной, бумажной, горнодобывающей и других отраслях [1–7]. Поиск и разработка новых ферментов, функционирующих в экстремальных условиях окружающей среды, в последние годы привлекают пристальное внимание научных сообществ.

Микроорганизмы, процветающие в условиях высокой щелочности, повсеместно распространены и населяют различные экологические ниши на Земле. Щелочная среда, подходящая для сообществ таких микроорганизмов, может быть создана определенными геологическими процессами или деятельностью человека. Экстремофильные бактерии, растущие при высоких pH, называются алкалофилами. Данные микроорганизмы интересны с фундаментальной точки зрения, в плане изучения механизмов адаптации бактерий к экстремальным значениям pH и взаимодействий в экосистеме, а также перспективны для биотехнологического применения.

Как упоминалось ранее, помимо природных процессов, деятельность человека также может создавать щелочную среду для обитания алкалофильных микроорганизмов. Однако работы, посвященные изучению микробиома таких искусственных щелочных биоценозов, немногочисленны [8]. Антропогенная среда эволюционирует в течение нескольких лет или десятилетий, что дает возможность наблюдать, как микробные сообщества быстро адаптируются к происходящим изменениям в окружающей среде.

Ферменты, синтезируемые данными микроорганизмами, как правило, обладают повышенной активностью и стабильностью в различных неблагоприятных условиях, в том числе при защелачивании и при высоких концентрациях соли [9–10]. Гидролитические ферменты, устойчивые к экстремальным условиям, представляют большой интерес для промышленности. В настоящее время широко применяемым классом гидролитических ферментов являются амилазы (КФ 3.2.1.1) [11–14]. Они используются преимущественно в пищевой промышленности: в хлебопечении, в переработке фруктовых соков, а также в обработке бумаги и текстиля, составляя около 25 % объема используемых промышленных ферментов. Щелочные амилазы сохраняют активность в диапазоне pH 8–11 и применяются в производстве моющих средств [15]. Помимо амилаз также возрастает практическое значение липаз (КФ 3.1.1). В последние несколько десятилетий липазы привлекают внимание учёных благодаря возможности получения с их помощью различных продуктов, представляющих интерес в промышленности. Они активны по отношению к широкому ряду субстратов, стабильны в органических растворителях, не требуют присутствия кофакторов. Липазы широко используются в биотехнологии, включая синтез биополимеров, биодизельного топлива, фармацевтических препаратов и других соединений, а также биодеструкцию техногенных загрязнителей [16]. Липазы, устойчивые к щелочной среде, востребованы в производстве моющих средств [17].

Таким образом, экстремофилы представляют большой биотехнологический интерес, обусловленный продукцией ферментов в широком диапазоне экстремальных условий. Актуальность исследования также обусловлена недостаточной изученностью бактерий щелочных антропогенных сред.

Цель исследования: изучить влияние кислотности среды и различных концентраций хлорида натрия на активность гидролитических ферментов наиболее перспективных штаммов, выделенных из содового шламохранилища, с оценкой их перспективности для биотехнологии.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись микроорганизмы, выделенные из содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод», расположенного на северо-западной окраине г. Березники Пермского края, на левом берегу Камского водохранилища (59.439618, 56.715197–59.427038, 56.746573). «Березниковский содовый завод» – российское предприятие химической промышленности, крупнейший производитель кальцинированной соды по методу Сольве. Твердые отходы и промышленные сточные воды, которые образуются при производстве, поступают в шламовый коллектор и в виде пульпы подаются в отстойник – шламонакопитель. Данная система имеет щелочную реакцию среды и высокую степень минерализации за счет содержания растворенных ионов (хлориды, сульфаты, натрий, калий, аммоний).

Для исследования использовали образцы водной среды, донных отложений и прибрежного грунта содового озера техногенного происхождения. Также исследованы образцы техногенного почвоподобного образования с территории старого шламохранилища, на которой происходит естественное восстановление плодородного слоя и растительного покрова. Последние образцы отбирали с поверхности, а также с глубины 5 и 10 см.

Выделение и учет численности алкалофильных и алкалотолерантных бактерий с активностью амилазы и липазы проводили методом предельных разведений на селективных средах в отсутствие экстремальных значений pH и на богатой среде при pH 11. Высев на среде с селективными субстратами в слабощелочных условиях (pH 8) создает условия для преимущественного роста гидролитически активных бактерий с амилазной и липазной активностью.

Пробы высевали на агаризованную среду Пфеннига следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0.3, KH_2PO_4 – 0.3, MgCl_2 – 0.3, CaCl_2 – 0.03, дрожжевой экстракт – 0.5, раствор микроэлементов по Липперту-Витману – 1 мл [18]. В качестве субстратов вносили до концентрации 1.5 %: крахмал растворимый ЗАО «ННПЦ ГИП», (Оболensk, Россия) для выделения амилаolitikов, твин-80 «FERAK», (Германия) – для липolitikов. Кислотность среды доводили 1 М раствором NaOH до 8 и инкубировали чашки при 30 °C.

Культуры, устойчивые к экстремальному защелачиванию среды, выделяли без селективных субстратов на богатой среде следующего состава (г/л): пептон – 10, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 1, Na_2CO_3 – 10, pH 11 [19].

Идентификацию изолятов до вида проводили методом секвенирования фрагмента гена 16S рПНК, амплифицированного в ПЦР-реакции с использованием универсальных праймеров 27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Температурный цикл состоял из начальной денатурации при 95 °C в течение 3 мин, 35 циклов амплификации (денатурация при 94 °C в течение 30 с, отжиг при 54 °C в течение 30 с и элонгация при 72 °C в течение 60 с) и окончательно элонгация при 72 °C в течение 3 мин. ПЦР-ампликоны анализировали электрофоретически в 1 % агарозном геле в трис-боратном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали маркеры 1 kb, ООО («СибЭнзим», Новосибирск). Визуализацию полос осуществляли путем окрашивания бромистым этидием с последующим документированием с использованием системы гелъдокументации BioDocAnalyze («Biometra», Германия). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием осуществляли с использованием смеси ферментов ExoSAPMix («Thermo Fisher Scientific», США). Секвенирующую реакцию проводили с праймером 27F и набором Big Dye Terminator v 3.1 («Thermo Fisher Scientific», США), в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рПНК проводили с использованием он-лайн сервиса EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

Для определения липолитической активности изолятов, выращенных на селективной среде с твин-80, проводили биохимическую реакцию с p-нитрофениллауратом, который под действием липазы расщеплялся с образованием окрашенного продукта p-нитрофенола. Активность липазы определяли по приросту оптической плотности среды при λ 405 нм, измеренной на спектрофотометре Ultraspec 3000 («GE Healthcare», США).

Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов для определения амилазы Альфа-Амилаза-Ольвекс ООО («Ольвекс Диагностикум», Россия). Реакция основана на гидролизе синтетического субстрата этилиден-р-нитрофенилмальтогептазиды с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению альфа-глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта р-нитрофенола.

Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при λ 405 нм на планшетном ридере Infinite M1000 («Тесан», Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 минуту.

Для оценки влияния концентрации хлорида натрия и pH на рост и активность наиболее перспективных изолятов варьировали pH среды Пфеннига, содержащей соответствующий источник углерода, в диапазоне от 6 до 11. Добавляли NaCl до концентрации 0.5; 5; 50; 100; 200 г./л, 4 мл среды инокулировали 50 мкл культуры (ОП540 1.0). О росте бактерий судили по увеличению биомассы (мг/мл), которую определяли гравиметрически. Для этого центрифугировали суспензию клеток, полученный осадок высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 70 °C и взвешивали на аналитических весах. Выживаемость бактерий оценивали методом КОЕ при высеве из десятикратных разведений.

Результаты и обсуждение. Из образцов материала содового шламохранилища изолированы чистые культуры алкалофильных и алкалотолерантных микроорганизмов, обладающих гидролитической активностью в отношении полисахаридов и липидов. Проведен скрининг на амилолитическую и липолитическую активность изолятов, выделенных на среде с pH 11 и pH 8. Бактерии, обладающие активностью липазы, выделены из всех образцов. Максимальная их численность установлена в образцах техногенных поверхностных образований шламохранилища (5.7×10^9 КОЕ/г), что связано с использованием поверхностно-активных веществ в цикле производства соды и их попаданием в промывные воды. Высокая липолитическая активность отмечена у культур бактерий *Pseudomonas peli*, *Pseudoxanthomonas mexicana* и *Pseudoxanthomonas putridarboris*, максимальная активность установлена для вида *P. peli*. Для данного изолята изучено влияние различных pH и концентраций NaCl в среде на ростовые характеристики и липолитическую активность.

Установлено, что данная культура активно растёт в диапазоне pH 7–10 и 0.5–50 г./л NaCl. Несмотря на устойчивость к экстремальным условиям, максимальное накопление биомассы культуры (1.2×10^6 КОЕ/г) отмечено при pH 7 и 5 г/л NaCl, что говорит об экстремотолерантности данной культуры. Однако при одновременном воздействии различных pH и концентраций хлорида натрия активность внеклеточной липазы росла с их увеличением и достигала максимального значения 12.6 мкмоль/л/мин при pH 11 (рис. 1).

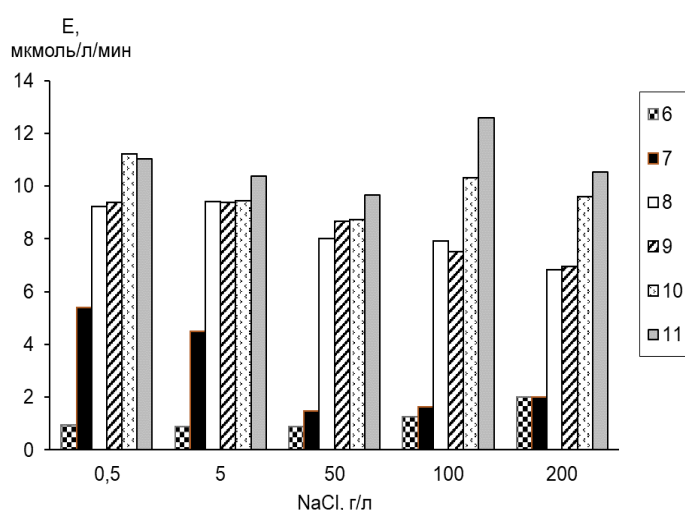


Рис. 1. Влияние pH и различных концентраций хлорида натрия на активность внеклеточных липаз *P. peli*

Также в этих средах обнаружено высокое содержание бактерий, утилизирующих полисахариды. Максимальная их численность установлена в образцах, отобранных с глубины 5 см (pH 8) с территории старого содового озера, имеющего растительный покров. Количество амилолитиков составило 3.31×10^9 КОЕ/г. Максимальная активность внеклеточной амилазы обнаружена у изолята 16-ДБ, идентифицированного как *Microbacterium kitamiense*, выделенного на богатой среде с pH 11. Активность амилазы этого штамма составляла 23.15 мкмоль/л/мин. Для данного изолята было изучено влияние pH и различных концентраций хлорида натрия на рост и амилазную активность. Диапазон роста данного изолята находился в пределах pH 7–11 и 0.5–100 г./л NaCl.

Исследована жизнеспособность *M. kitamiense* при разных значениях pH и концентрации NaCl. Максимальное количество жизнеспособных клеток выявляли при 5 г/л NaCl и pH 10 (рис. 2, а). Определена активность внеклеточных амилаз *M. kitamiense* при разных значениях pH и с различными концентрациями соли (рис. 2, б). Наибольшая активность амилазы (48.21 мкмоль/л/мин) была отмечена в культуре, выращенной при 100 г./л NaCl и pH 11.

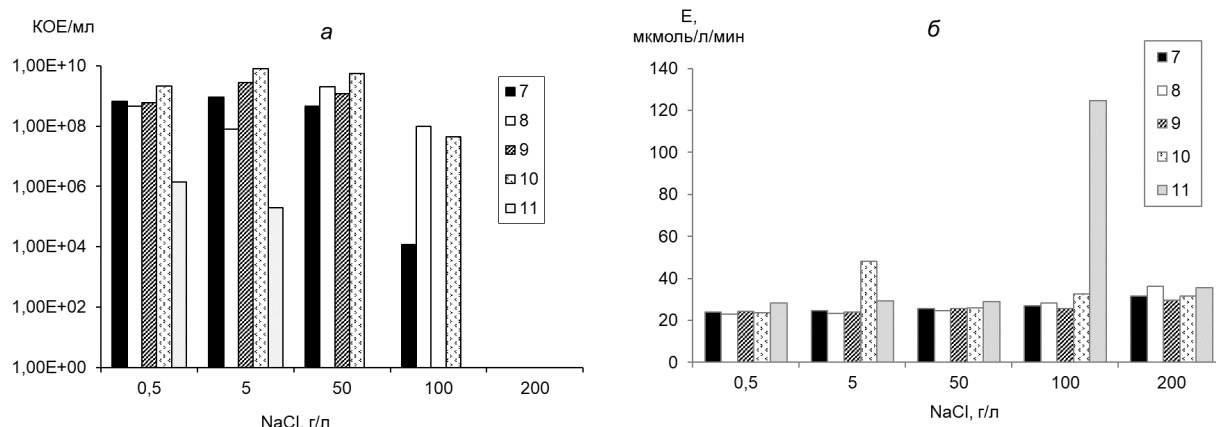


Рис. 2. Влияние pH и различных концентраций хлорида натрия на жизнеспособность (а) и активность внеклеточных амилаз (б) *M. kitamiense*

Таким образом, максимальная активность липазы была обнаружена у гамма-протеобактерий родов *Pseudomonas* и *Pseudoxanthomonas*. Липолитическая активность штамма *Pseudomonas peli* проявляется в интервале концентраций соли в среде от 0,5 до 200 г./л и изменяется незначительно. Показано, что высокая активность проявляется в широком интервале pH: от 8 до 11 с максимумом при pH 11. При этом для роста *P. peli* оптимальным значением pH было 10. Это согласуется с данными литературы, из которых известно, что липазы псевдомонад, как правило, наиболее активны в щелочной среде [20].

Лучшими продуцентами щелочной амилазы являлись актинобактерии рода *Microbacterium* – *M. kitamiense*. Их практическая значимость возрастает в связи с тем, что большинство известных амилаз наиболее активны в нейтральной и кислой среде [21, 22]. Однако ранее описаны амилазы, активные в щелочной среде, характерные также для представителя рода *Microbacterium*. В частности, у *Microbacterium foliorum* также была обнаружена амилаза с максимумом активности в щелочной области – при pH 9 [23]. Интересными и полезными особенностями культуры *M. kitamiense*, селекционированной в нашей работе, являются проявление высокой активности внеклеточной амилазы в диапазоне pH от 7 до 11, в широком диапазоне концентрации соли (до 200 г./л), с максимумом при pH 11 и концентрации соли 100 г./л. Интересным фактом является повышенная выживаемость бактерий при сочетании высокой концентрации соли и pH 10, что может быть связано с активацией мембранных транспортных процессов в щелочной среде.

Заключение. Таким образом, из образцов содового шламохранилища г. Березники были выделены и идентифицированы бактерии-продуценты гидролитических ферментов. Изолированные культуры проявляли свойства алкалотолерантных бактерий, хорошо растущих в интервале pH от 7 до 11 и алкалофилов, максимум роста которых наблюдался при pH около 10. Показано, что в техногенных щелочных средах с высокой степенью минерализации развиваются гетерогенные бактерии – продуценты гидролаз, адаптированные к уникальным экстремальным условиям среды. Селекционированы перспективные культуры алкалотолерантных бактерий, обладающие гидролазными активностями, способные активно расти в широком диапазоне pH, при этом их ферменты устойчивы в щелочной среде, характерной для многих производственных процессов. Данные культуры представляют интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых к высоким значениям pH и минерализации среды.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Литература

- Margesin R and Schinner F 2001 Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology *Extremophiles* **5(2)** 73–83
- Litchfield C D 2011 Potential for industrial products from the halophilic Archaea *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **38(10)** 1635–1647
- Yin J, Chen J C, Wu Q and Chen G Q 2015 Halophiles, coming stars for industrial biotechnology *Biotechnology advances* **33(7)** 1433–1442
- Charlesworth J C and Burns B P 2015 Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea *Archaea* 1–7
- Waditee-Sirisattha R, Kageyama H and Takabe T 2016 Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology *AIMS Microbiol* **2(1)** 42–54
- Singh A and Singh A K 2017 Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential *Biotechnology letters* **39(12)** 1793–1800
- Zhang X, Lin Y and Chen G Q 2018 Halophiles as chassis for bioproduction *Advanced Biosystems* **2(11)** 1–12
- Kevbrin VV 2019 Isolation and cultivation of alkaliphiles vol 172, ed G Mamo, B Mattiasson Ed. by Mamo G., Mattiasson B. (Cham: Springer) p 53–84
- Morozkina E V, Slutskaia E S, Fedorova T V, Tugay T I, Golubeva L I and Koroleva O V 2010 Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological applications *App. biochemistry and microbiology* **46(1)** 5–20
- Oren A 2010 Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms *Environ. Technol* **31(8–9)** 825–834
- Paula M and Perola O 2010 Application of microbial α -amylase in industry *Brazilian Journal of Microbiology* **4 (41)** 850–861
- Yen Y C, Chun S C, Ummirul M K and Kavitha M 2013 Application of Statistical Experimental Design for Optimization of Novel α -amylase Production by *Anoxybacillus* Species *Journal of Biological Science* **7(13)** 605–613
- Serebrova S Yu 2006 Prospects for the use of enzyme preparations in gastroenterology *Russian medical journal "Diseases of organs digestion"* **1** 23–26
- Fariha H 2006 Industrial applications of microbial lipases *Enzyme and Microbial Technology* **2(39)** 235–251
- Sarethy I P, Saxena Y, Kapoor A, Sharma M, Sharma S K, Gupta V and Gupta S 2011 Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology *Microbiol. Biotechnol.* **38(7)** 69–790
- Bezborodov A M and Zagustina N A 2014 Lipases in Catalysis Reactions in Organic Synthesis (Review) *Prikl. biochemistry and microbiology* **50(4)** 347–373
- Hasan F, Shah A A, Javed S and Hameed A. 2010 Enzymes used in detergents: lipases *Afr. J. Biotechnol* **9(31)** 4836–4844
- Randagurueva A A and Lavrentyeva E V 2009 Extracellular protease activity in natural samples of thermal springs in the Baikal region *Bulletin of the Irkutsk State University. Ser. Earth sciences* **2(2)** 162–166
- Atlas R.M. 1993 *Handbook of Microbiological Media* ed L C Parks (USA: CRC press) p 1079
- Rios N S, Pinheiro B B, Pinheiro M P, Bezerra R M, Sousa dos Santos J C and Gonçalves LRB 2018 Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications *Process Biochem* **75** 99–120
- Mc Tighe M A, Kelly C T, Doyle E M, Fogarty W M 1995 The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370 *Enzyme Microb. Technol.* **17(6)** 570–573
- Febriani, Rayyana, Ulya M, Oesman F, Akhmaloka and Iqbalsyah T M 2019 Low molecular weight alkaline thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. nov. *Heliyon* **5** e02171
- Kuddus M, Roohi, Saima, and Ahmad I Z 2012 Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya *J. Gen. Engineer. Biotechnol* **10 (1)** 151–159