

На правах рукописи

ШИЛОВА Анна Владимировна

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ГИДРОЛИТИЧЕСКИЙ
ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА СОДОВОГО
ШЛАМОХРАНИЛИЩА**

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2021

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Максимова Юлия Геннадьевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор,
ведущий научный сотрудник, и.о.
заведующего лабораторией водной
микробиологии ФГБУН Института
клеточного и внутриклеточного симбиоза
УрО РАН
Немцева Наталия Вячеславовна

кандидат биологических наук,
заведующий научно-исследовательской
лабораторией антимикробной
резистентности Института экологической
и сельскохозяйственной биологии (Х-
ВИО) ФГАОУ ВО «Тюменский
государственный университет»
Васильченко Алексей Сергеевич

Ведущая организация: ФГБУН Институт биологии Уфимского
научного центра РАН (450054, г. Уфа,
просп. Октября, 69)

Защита состоится "10" декабря 2021 г. в 12 часов на заседании Диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан "___" _____ 2021г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и состояние вопроса

Места обитания, значительно отличающиеся по одному или нескольким физико-химическим параметрам от большинства экосистем, принято называть экстремальными, а населяющие их организмы – экстремофилами. Изучение биологического разнообразия экстремофильных микробных сообществ представляет интерес для фундаментальной микробиологии, так как многие обитающие в этих условиях микроорганизмы относятся к эволюционно древним ветвям бактерий и архей (Yadav et al., 2017; Gutiérrez et al., 2016; Likar et al., 2017; Andrew et al., 2017; Johnson et al., 2017). Именно они составляют основной генофонд, противостоящий изменениям окружающей среды и различным катаклизмам (Заварзин, 2004; Slobodkina et al., 2016; Bonch-Osmolovskaya, 2015; Namsaraev et al., 2010). Большой интерес вызывает изучение механизмов биохимической адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды, а также использование их биомассы и экстремоферментов в биотехнологии (Морозкина и др., 2010).

Выделенные из экстремальных экологических ниш микроорганизмы адаптированы к неблагоприятным факторам окружающей среды и обладают большим биотехнологическим потенциалом. Ферменты, синтезируемые данными микроорганизмами, как правило, обладают повышенной активностью и стабильностью в различных неблагоприятных условиях, в том числе при защелачивании и в присутствии высоких концентраций солей (Морозкина и др., 2010; Oren, 2010). Гидролитические ферменты, устойчивые к экстремальным условиям, представляют большой интерес для промышленности. Так, протеазы (КФ 3.4) находят широкое применение в качестве компонентов моющих средств, растворов для контактных линз, в производстве сыра и переработке мясных продуктов (Gupta et al., 2002; Sharma et al., 2017). Амилазы (КФ 3.2.1.1) 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 (Sarethy et al., 2011). Целлюлазы (КФ 3.2.1.4) применяются для модификации целлюлозосодержащих отходов (Jagtap, Rao, 2005), а щелочные целлюлазы являются компонентами моющих средств и используются в текстильной промышленности (Anish et al., 2007; Новожилов, Пошина, 2011). Во многих биокаталитических процессах используются липазы (КФ 3.1.1). 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 (Безбородов, Загустина, 2014). Липазы, устойчивые к щелочной среде, востребованы в производстве моющих средств (Hasan et al., 2010).

В настоящее время накоплена достаточно обширная информация, касающаяся биоразнообразия прокариотов содовых озер природного происхождения. Микробиота содовых озер исследуется во всем мире. Микробное разнообразие содовых озер в России, а также физиологию и адаптацию микроорганизмов-алкалофилов всесторонне исследуют микробиологи Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН (Москва) и Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ). Работы, посвященные изучению микробиома искусственных щелочных биоценозов, многочисленны. Так, изучено микробное разнообразие озера Калумет (юго-восток Чикаго, США), представляющего собой захоронения отходов с pH 12,8. В этой щелочной среде были обнаружены представители *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Firmicutes* (Roadcap et al., 2006).

Выделены штаммы факультативных алкалофилов с протеазной и амилазной активностями из золя щелочного диоксида кремния (Ren et al., 2014). Щелочные сточные воды также явились источником выделения алкалофильных бактерий, которые были отнесены к родам *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Natronobacterium*, *Neisseria*, *Pleisomonas*, *Pseudomonas* и *Sporosarcina* (Ali et al., 2009). В литературе описан единичный пример метагеномного исследования микробиома отходов производства карбоната натрия, получаемого из известняка и хлорида натрия по методу Сольве в г. Яниково (Польша). Главное отличие этого экотопа от исследуемого нами состоит во влажности содового шлама, который в шламохранилище г. Яниково представлен сухой массой, смачиваемой лишь атмосферными осадками.

Основным катионом в щелочных природных озерах является натрий, а в содовых шламохранилищах – кальций. В связи с этим исследования микробиома содовых шламохранилищ интересны в сравнении с уже накопленными данными по микробному разнообразию природных содовых озер.

Большой потенциал промышленного использования имеют гидролитические ферменты алкалофильных микроорганизмов. В настоящее время широко изучаются адаптационные механизмы алкалофилов, продуцирующих внеклеточные ферменты. Экстремоферменты изучаются на всех уровнях – от условий выращивания продуцента до их молекулярной структуры.

Недостаточная изученность микробного разнообразия щелочных высокоминерализованных биотопов антропогенного происхождения, в частности, содовых шламохранилищ, изменения микробиома в процессе осушения и восстановления этих территорий, биотехнологического потенциала бактериального сообщества бедных углеродным субстратом щелочных сред обуславливает актуальность диссертационного исследования.

Цель настоящего исследования – охарактеризовать филогенетическое разнообразие микробиома содового шламохранилища (г. Березники, Пермский край) и оценить биотехнологический потенциал выделенных экстремофильных и/или экстремотолерантных представителей домена *Bacteria*.

Задачи исследования:

1. Изучить филогенетическое разнообразие микробиоценоза действующей и старой карты содового шламохранилища г. Березники (Пермский край);
2. Выделить и идентифицировать бактериальные культуры с амилазной, липазной, протеазной и целлюлазной активностями;
3. Оптимизировать среду культивирования галоалкалотолерантного *Pseudomonas peli*, обладающего активной липазой;
4. Изучить морфологические и физиолого-биохимические особенности факультативного алкалофила *Bacillus aeuqororis* в условиях повышенной минерализации и широком диапазоне pH среды.

Научная новизна

Впервые охарактеризовано филогенетическое разнообразие бактериального сообщества различных сред содового шламохранилища: действующей карты, представляющей собой содовый шлам, дистиллерную жидкость и прибрежные техногенные поверхностные образования, и старой карты, на осушенных территориях которой происходит восстановление растительного покрова. Аналитическими методами показано преобладание кальция в виде осадков гидрокарбонатов и высокое содержание хлорид-ионов. Методом метагеномного секвенирования показано, что бактериальное сообщество представлено 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*, из которых доминирующее положение занимают *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Изучена сукцессия бактериального сообщества при восстановлении территорий старой карты шламохранилища и выявлены биомаркеры восстановления

природной среды после антропогенной нагрузки этого типа. Показано, что появление рода *Cellulomonas* связано с восстановлением растительного покрова, так как данные бактерии являются ассоциативными микроорганизмами растительных симбиозов. Увеличивается доля ацидобактерий и актинобактерий, что связано с приближением рН техногенных поверхностных образований к нейтральным значениям и появлением микроокружения, создаваемого ризосферой растений. Оценено α -разнообразие и выровненность бактериального сообщества сред содового шламохранилища.

Модифицирована методика выделения гидролитических алкалотолерантных и алкалофильных бактерий из высокощелочной среды антропогенного происхождения, предполагающая отсутствие двух лимитирующих факторов (селективного субстрата и высокого рН) в среде с целью получения более обширного материала для скрининга гидролитических активностей. Выделение бактерий из содового шламохранилища на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) позволило получить достаточное разнообразие алкалотолерантных и галотолерантных штаммов, способных гидролизовать крахмал, липиды, белки, целлюлозу, тогда как на богатой среде с рН 11 в отсутствие селективных субстратов были получены алкалофильные изоляты, обладающие сопоставимой гидролитической активностью.

Биохимическими методами изучен биотехнологический потенциал выделенных и идентифицированных бактериальных изолятов, устойчивых к щелочной среде и высокому содержанию солей, с различными гидролитическими активностями, в том числе липазной, протеазной, амилазной, целлюлазной.

Изучена морфология и определены морфометрические характеристики, уровень метаболической активности и внутриклеточный рН факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* в сравнении с нейтрофильным *Bacillus subtilis* в широком диапазоне рН среды и в присутствии 50 г/л хлорида натрия. Показана повышенная устойчивость *B. aequororis* в отличие от *B. subtilis* не только в щелочной, но и в кислой среде, а также установлено, что рН 11 внешней среды снижает отрицательное воздействие высокой минерализации (50 г/л NaCl) на клетки как алкалофильного, так и нейтрофильного штамма *B. subtilis* ATCC 6633.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные содержат новую информацию о филогенетическом разнообразии домена *Bacteria* в щелочных высокоминерализованных средах антропогенного происхождения (содовом шламохранилище), о его алкалофильных и алкалотолерантных представителях, обладающих гидролитическими активностями. Результаты метагеномных и бактериологических исследований расширяют знания о микробиологии экстремальных экологических ниш.

Выделено в чистую культуру 78 изолятов алкалотолерантных и алкалофильных бактерий. В результате скрининга на наличие гидролитических активностей среди бактериальных изолятов, изолированных из среды с повышенной щелочностью и минерализацией, выявлены штаммы-продуценты, обладающие амилазной, липазной, протеазной, целлюлазной активностями. Данные штаммы полезны для биотехнологий и могут служить источником ферментов, используемых в различных сферах народного хозяйства (химической промышленности, производстве детергентов, обработке целлюлозосодержащих отходов и других отраслях). Оптимизирована среда культивирования наиболее перспективного штамма *Pseudomonas peli* – продуцента липазы, активной в высоко щелочной среде. Идентифицировано 58 штаммов бактерий и последовательности 16S рРНК депонированы в GenBank. Полученные данные использованы в лекционном курсе для студентов магистратуры биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Бактериальные сообщества сред содового шламохранилища отличаются крайне низкими α -разнообразием и выровненностью. Доминирующими филумами микробиома действующей карты содового шламохранилища г. Березники (Пермский край) являются *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Индикатором восстановления природной среды после антропогенной нагрузки является появление рода *Cellulomonas*.

2. Для выделения чистых культур галоалкалотолерантных бактерий с гидролитическими активностями из высокоминерализованной щелочной среды целесообразно сочетать 2 подхода: 1) выделение на минеральной среде с рН 8 и селективными субстратами (твин-80, пептон, крахмал, целлюлоза) и 2) выделение на полноценной среде с рН 11.

3. Среда культивирования *Pseudomonas peli*, наиболее перспективного продуцента липазы, оптимизирована по источнику углерода и азота. Максимальный выход активной биомассы и увеличение липолитической активности достигнуты при росте на минеральной среде с 0,5% глицерина и 0,03% мочевины.

4. Факультативный алкалофил *Bacillus aequororis* 5-ДБ обладает устойчивостью и сохраняет метаболическую активность в среде как с высоким, так и с низким рН, его адаптация к крайним значениям рН и высокой концентрации хлорида натрия не сопровождается значительным изменением морфометрических параметров, при этом сочетание рН 11 и 50 г/л хлорида натрия в среде в меньшей степени оказывает негативное влияние на клетки за счет высокой концентрации ионов натрия.

Степень достоверности и апробация работы

Научные положения и выводы обоснованы, базируются на воспроизводимых экспериментальных данных, степень достоверности которых доказана статистическим анализом. Материалы диссертации доложены и обсуждены на II Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), IMWA Conference «Mine water: Technological and Ecological Challenges» (Пермь, 2019), Всероссийской конференции с международным участием «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019), III Всероссийской конференции по астробиологии «Экзобиология от прошлого к будущему» (Пушино, 2020), XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз–Россия 2020» (Пермь, 2020), XII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2021).

Публикации

Результаты проведенных исследований опубликованы в 14 научных работах: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 3 публикации в журналах, входящих в международные базы Scopus и/или Web of Science, а также 10 публикаций в других журналах и сборниках.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 169 страницах, содержит 14 таблиц и иллюстрирована 18 рисунками. Список литературы включает 251 наименований, из них 214 на иностранных языках.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора

Исследования выполнены при финансовой поддержке Государственного задания на тему «Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для экоценозов и практической деятельности человека», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290008-4, гранта РФФИ № 19-34-90103 «Биоразнообразие прокариотов щелочных биотопов антропогенного происхождения» и проекта международных исследовательских групп на базе

государственных образовательных учреждений или научных организаций Пермского края № С-26/507 «Получение препаратов для сельского хозяйства на основе клеток и ферментов микроорганизмов экстремальных экосистем», выполняемого при финансовой поддержке Правительства Пермского края.

Автором самостоятельно выполнена основная часть экспериментов, проведена их математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Подготовка к печати научных работ, отражающих результаты диссертационного исследования, осуществлена автором самостоятельно или при участии соавторов. Атомно-силовая микроскопия выполнена в лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Метагеномный анализ образцов выполнен в ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объект изучения микробного разнообразия. Отбор проб проводили в сентябре 2017 года на территории действующей и старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод». Для исследований микробиоты в действующем шламонакопителе были отобраны пробы воды (дистиллерной жидкости), донных отложений (содового шлама), техногенного поверхностного образования в прибрежной зоне и техногенного поверхностного образования с ризосферой растений. В почвоподобных образованиях осушенного шламохранилища пробы отбирали с поверхности, а также на глубине 5 и 10 см (в точке 59,4288° с.ш., 56,7297° в.д.).

Физико-химические методы исследования. Элементный состав образцов определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6300 SHIMADZU (Япония). Кислотность, содержание карбоната и гидрокарбоната, определяли в соответствии с ГОСТ 26423-85. Анализ хлоридов, сульфатов, фосфатов и нитратов проводили в соответствии с ПНД Ф 16.1:2.2.3:2.2.69-10. Ионный состав и степень минерализации анализировали с помощью системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М (Россия), в соответствии с руководством производителя.

Выделение микроорганизмов проводили методом прямого посева на агаризованную среду Пфеннига с рН 8, содержащую селективные субстраты (1,5%): пептон для выделения протеолитиков, крахмал растворимый – для амилолитиков, микрористаллическую целлюлозу – для целлюлолитиков, твин-80 – для липолитиков. Параллельно производили посев на богатой среде с рН 11 (Atlas, 1993) без селективных субстратов.

Определение ростовых характеристик. Бактериальный рост оценивали по изменению оптической плотности суспензии клеток при λ 540 нм на фотоэлектроколориметре КФК-3 с использованием кварцевой 1 см кюветы, также оптическую плотность суспензии определяли на планшетном ридере Infinite M1000 «Tecan», (Швейцария).

Удельную скорость роста (μ) рассчитывали по формуле (Ждан-Пушкина, 1983):

$$\mu = 1 / ОП_0 (\Delta ОП / \Delta t), \text{ ч}^{-1} \quad (1)$$

где ОП₀ – ОП₅₄₀ в момент времени t_0 ;

$\Delta ОП$ – изменение оптической плотности культуральной среды за время Δt , ч.

Урожай клеток бактерий определяли как разность между максимальной и исходной массой бактерий, выражали в г/л.

Экономический коэффициент потребления субстрата (Y) определяли по формуле:

$$Y = X / C \cdot 100, \% \quad (2)$$

где: X – количество образовавшейся биомассы, г/л;

C – количество потребленного субстрата, г/л

Молекулярно-генетический анализ. Препараты хромосомной ДНК бактерий получали фенольным методом, модифицированным для выделения ДНК из актиномицетов (Гловер, 1988). Идентификацию изолятов проводили методом секвенирования фрагмента гена 16S рРНК, 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'. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с использованием онлайн сервиса EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

Метагеномный анализ. Метагеномную ДНК выделяли из образцов материала шламохранилища согласно научно-методическим рекомендациям (Андронов и др., 2011), а также СТАБ-методом (Галиев, Цырульников, 2011). Метагеномный анализ исследуемых образцов по генам 16S рРНК проводили на платформах MiSeq и Ion Torrent PGM в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова, г. Москва. Приготовление библиотеки для секвенирования проводили в соответствии с инструкциями и протоколами для секвенаторов MiSeq Illumina и Ion Torrent PGM (Roche Kara Library Prep Kit Illumina 50 Rxn / Набор КАРА).

Расчет индексов биоразнообразия. Для исследуемой среды рассчитывали показатели α -разнообразия: индекс Шеннона и Симпсона. Меру выровненности рассчитывали по индексу Пиелу (Воронин, 2014, Чернов и др., 2015). Индексы разнообразия учитывали для двух таксономических уровней: родов и филумов.

Определение гидролитической активности, изолированных культур. Для определения липолитической активности изолятов, выращенных на селективной среде с твин-80, проводили биохимическую реакцию с p-нитрофениллауратом (Bulow, Mosbach, 1987). 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). Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при λ 405 нм на планшетном ридере Infinite M1000 «Tecan», (Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 минуту.

Измерение **целлюлозолитической активности** культур основано на колориметрическом определении редуцирующих сахаров, выделившихся после 24-часовой инкубации образцов с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Концентрацию глюкозы определяли с помощью коммерческого набора реактивов для определения глюкозы Глюкоза-8-Ольвекс ООО «Ольвекс Диагностикум», (Россия). Интенсивность окраски определяли фотометрически на планшетном ридере Infinite M1000 «Tecan», (Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 мин при λ 500 нм.

Протеазную активность оценивали по ширине зоны лизиса казеината натрия «Sigma-Aldrich», (Германия) вокруг штриха.

Изучение влияния концентрации хлорида натрия и pH среды на рост и гидролитическую активность наиболее перспективных штаммов. 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. Концентрация NaCl составляла 0,5; 5; 50; 100; 200 г/л. О росте бактерий судили по увеличению биомассы (мг/мл), выживаемость бактерий оценивали методом определения КОЕ при высеве на

твердую питательную среду из десятикратных разведений в физиологическом растворе. Активность гидролитических ферментов определяли вышеуказанным способом.

Оценка метаболической активности клеток. Для оценки метаболической активности клеток исследуемую культуру окрашивали препаратом PrestoBlue HS Cell Viability Reagent («Invitrogen», Thermo Fisher Scientific, США). Флуоресценцию измеряли на планшетном ридере Infinite M1000 «Tecan», (Швейцария) при λ возбуждения/эмиссии 560/590 нм. Условные единицы флуоресценции относили к плотности бактериальной культуры, измеренной при λ 600 нм.

Атомно-силовая микроскопия. Изучение морфологии клеток проводили с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) в лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50-90 кГц и константой жесткости 0,5-4,4 Н/м. Обработку микрофотографий проводили с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

Для определения линейных размеров клеток (длина, ширина, высота) и характеристики структуры поверхности клеток (шероховатости) получали двух- и трехмерные топографические изображения бактерий. Форма клетки была принята за эллипсоид и был вычислен объем клетки.

Определение внутриклеточного рН. Внутриклеточный рН у бактерий определяли с помощью флуоресцентного зонда 5 (и 6-)–карбоксифлуоресцеин сукцинимидилового эфира (сFDASE) (Breeuwer et al., 1996). Интенсивность флуоресценции измеряли при длинах волн возбуждения 490 и 440 нм, длине волны излучения 525 нм. В конце каждого анализа сигнал внеклеточной флуоресценции (фон) определяли путем фильтрации суспензии клеток через мембранный фильтр размером 0,22 мкм с последующим измерением.

Калибровочные кривые для бактериальных культур были построены на основании зависимости ОП490/ОП440 от рН. Внешний и внутренний рН уравнивали добавлением валиномицина (1 мкМ) и нигерицина (1 мкМ).

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета лицензионной программы MS Excel 2007. При статистической обработке определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего. Достоверность различий определяли с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Проводили множественный регрессионный анализ. Рассчитывали коэффициент детерминации R^2 , при $0,7 \leq R^2 \leq 1$ корреляционную связь считали высокой, при $0,4 \leq R^2 \leq 0,7$ средней, при $0 \leq R^2 \leq 0,4$ низкой. Корреляцию считали достоверной при уровне значимости при $p < 0,05$.

РЕУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Микробное разнообразие содового шламохранилища города Березники

Физико-химическая характеристика воды и грунтов содового шламохранилища. В образцах действующего содового шламохранилища рН воды составляет 11–12,6, отложений соды – 11. В пробах грунта старой карты содового шламохранилища кислотность варьировала в пределах 8–8,5, а рН грунта прибрежной части действующего шламохранилища составляла 7,5. Основным элементом изученных сред являлся кальций. Наименьшее количество кальция содержали образцы техногенных поверхностных образований прибрежной зоны действующего шламонакопителя и воды, наибольшее – донные отложения. Во всех остальных

образцах концентрация кальция в кислоторастворимых и ацетатно-аммонийных фракциях соответствовала 260–470 г/кг грунта. Количество магния возрастало с увеличением глубины отбора проб (13–17,6 г/кг). Концентрация натрия была максимальна в водной фазе и достигала 6 г/л. Также были обнаружены тяжелые металлы, в большем количестве присутствующие в техногенных поверхностных образованиях территории старой карты содового шламохранилища. Общей тенденцией является возрастание концентрации металлов в грунте восстанавливаемых территорий старой карты содового шламонакопителя по сравнению с действующим шламохранилищем. В образцах из действующего шламонакопителя и с поверхности осушенных территорий доминируют хлорид-ионы. Суммарное содержание хлорид-ионов в старой и новой карте составляло 9,3 и 74,7 г/кг соответственно. С увеличением глубины в образцах возрастало содержание карбонатов/гидрокарбонатов. В осадке шламохранилища отмечается также значительное содержание аниона SO_4^{2-} . Кроме того, следует отметить существенное снижение концентрации хлорид-ионов в образцах грунта старой карты шламохранилища с глубины 5 и 10 см по сравнению с поверхностью.

Определение численности бактерий с различной гидролитической активностью.

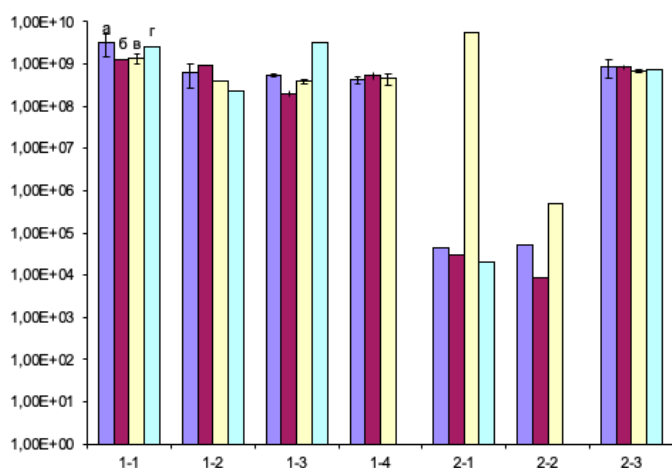


Рисунок 1. Количество КОЕ/г бактерий на среде с крахмалом (а), целлюлозой (б), твин-80 (в), пептоном (г). Образцы отобраны с территории старой карты шламонакопителя с глубины 5 см (1-1), 10 см (1-2), поверхности (1-3) и объединенная проба (1-4); из действующего шламохранилища: техногенные поверхностные образования (2-1), донные отложения (2-2) и ризосфера грунта прибрежной зоны (2-3)

Образцы с территории старой карты шламонакопителя характеризовались высоким содержанием микроорганизмов, обладающих амилолитической, целлюлолитической, протеолитической и липолитической активностью, максимальным на глубине около 5 см ($3,31 \times 10^9$ КОЕ/г амилолитиков, $2,63 \times 10^9$ КОЕ/г протеолитиков, $1,40 \times 10^9$ КОЕ/г липолитиков, $1,27 \times 10^9$ КОЕ/г целлюлолитиков). В осадке шламохранилища (рН 11) обнаружено незначительное количество микроорганизмов, утилизирующих твин-80, крахмал и целлюлозу, ($4,4 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ и $2,63 \times 10^4$ КОЕ/г соответственно). Однако в образцах прибрежной зоны, содержащих ризосферу растений (рН 8), количество микроорганизмов, утилизирующих крахмал, целлюлозу, твин-80 и пептон, повышалось до $8,4 \times 10^8$ КОЕ/г (рис. 1), что, очевидно, связано как с выделением биополимеров корнями растений, так и с менее экстремальными значениями рН. Также наблюдалось увеличение количества бактерий, обладающих липолитической активностью в образцах техногенных поверхностных образований действующей карты шламонакопителя (до $5,7 \times 10^9$ КОЕ/г).

При высеве на богатую среду с рН 11 в действующем шламохранилище наименьшее количество микроорганизмов обнаружено в осадке, где численность бактерий составляла $1,5 \times 10^4$ КОЕ/г. Увеличение микроорганизмов наблюдалось в образцах прибрежной зоны и в образцах, содержащих ризосферу растений: $4,6 \times 10^7$ и 2×10^7 КОЕ/г соответственно. Максимальное количество алкалофильных микроорганизмов было определено в образцах осушенного шламохранилища,

отобранных с глубины 5 и 10 см, численность составила $8,5 \times 10^7$ и $8,9 \times 10^7$ КОЕ/г. В образцах, отобранных с поверхности старой карты шламонакопителя, количество микроорганизмов составило $9,8 \times 10^6$ КОЕ/г.

Метагеномный анализ микробного сообщества содового шламоохранилища. Бактериальное сообщество, по данным метагеномного анализа, сформировано 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*. В результате сравнительного метагеномного анализа было показано, что в исследованных образцах содового шламоохранилища доминируют представители филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes* (рис. 2).

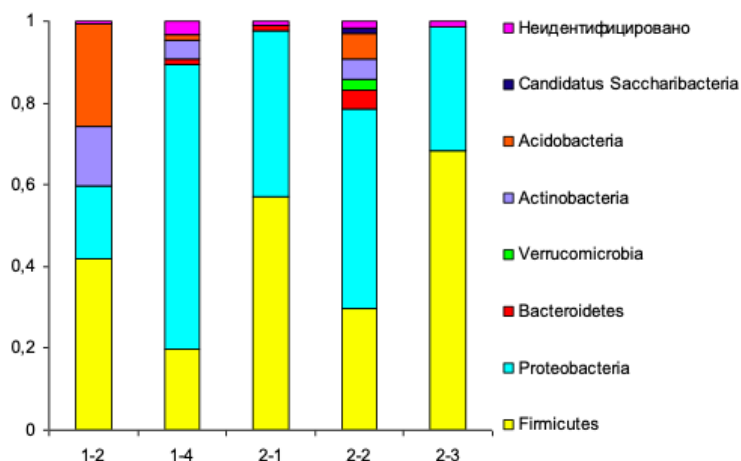


Рисунок 2 – Соотношение филумов домена *Bacteria* в образцах старого осушенного и действующего содового шламоохранилища. С территории старой карты образцы отобраны с глубины 10 см (1-2) и получена объединенная проба (1-4), с территории действующего шламоохранилища отобраны образцы техногенных поверхностных образований (2-1), донных отложений (2-2) и воды (2-3).

В воде и техногенных поверхностных образованиях действующего содового шламоохранилища преобладали представители филума *Firmicutes* (52,11% и 64,12% от общего числа прочтений соответственно). В осадках соды и в объединенном образце грунта старой карты содового шламоохранилища преобладали протеобактерии, в основном род *Acinetobacter*. В образце, взятом с глубины 10 см из грунта осушенных территорий, преобладали *Firmicutes* и *Acidobacteria*, а количество протеобактерий и актинобактерий было сопоставимо. Филогенетическое разнообразие микробиоценоза грунта старой карты содового шламонакопителя было более выражено по сравнению с образцами осадков, воды и поверхностных техногенных образований вблизи действующего содового шламоохранилища. В микробиоме объединенного образца грунта осушенного содового озера преобладали семейства *Moraxellaceae* и *Staphylococcaceae* (20–23%), а также *Pseudomonadaceae* и *Burkholderiaceae* (11–13%), тогда как на глубине 10 см в большей степени были представлены семейства *Streptococcaceae* и *Cellulomonadaceae* (рис. 3). Следует отметить, что бактерии семейства *Cellulomonadaceae* являются ассоциативными микроорганизмами растительных симбиозов, и их появление связано с восстановлением растительного покрова на этих территориях. В воде действующего шламонакопителя были обнаружены представители трех семейств: *Staphylococcaceae* (65%), *Moraxellaceae* (30%) и *Lachnospiraceae* (2%). В осадках соды и грунте прибрежной части стафилококки и моракселлы также преобладали, и филогенетическое разнообразие микроорганизмов увеличивалось по сравнению с водой.



Рисунок 3 – Соотношение семейств домена *Bacteria* в объединенной пробе (а) и на глубине 10 см (б) старой карты содового шламонакопителя и в техногенных поверхностных образованиях (в) и донных осадках (г) действующего шламохранилища.

Для оценки биологического разнообразия, выровненности и доминирования отдельных таксонов в структуре сообщества были рассчитаны индексы Шеннона, Пиелу и Симпсона (Таблица 1). Анализ полученных индексов показал, что исследуемые источники не отличаются высоким биоразнообразием. Наибольшее разнообразие домена *Bacteria* и более выравненное распределение бактериальных таксонов обнаружено в грунтах старой карты содового шламохранилища и твердого содового шлама, а наименьшее – в дистиллерной жидкости и поверхностных техногенных образованиях прибрежной зоны действующей карты шламохранилища.

Таблица 1

Биоразнообразие микроорганизмов в средах содового шламохранилища

	Индексы биоразнообразия и выровненности сообщества					
	Шеннона		Симпсона		Пиелу	
	Филумы			Роды		
1	1,26	0,36	0,64	1,43	0,30	0,73
2	0,78	0,52	0,40	0,89	0,48	0,45
3	0,42	0,80	0,23	1,16	0,39	0,59
4	0,88	0,57	0,45	1,83	0,17	0,94
5	1,39	0,28	0,71	1,49	0,28	0,76

Примечание: 1 – содовый шлам, 2 – дистиллерная жидкость, 3 – техногенные поверхностные образования в прибрежной зоне действующей карты содового шламохранилища, 4 – грунт старой карты содового шламохранилища, 5 – грунт старой карты содового шламохранилища, 10 см глубины

Также проведен множественный регрессионный анализ зависимости количества прочтений нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК отдельных филумов от концентрации металлов в образцах. Обнаружена высокая положительная корреляционная связь содержания представителей филума *Firmicutes* с концентрацией Ca, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Candidatus Saccharibacteria* – с концентрацией Na, *Actinobacteria* и *Acidobacteria* – с концентрацией Mg. Однако высокая положительная корреляционная связь была достоверна только для *Bacteroidetes* ($p=0,02$), что можно объяснить широкой распространенностью галофильности среди представителей этого филума.

2. Выделение и идентификация гидролитических алкалотолерантных бактерий содового шламохранилища

Выделение и идентификация алкалотолерантных бактерий, обладающих выраженными гидролитическими свойствами. Для поиска бактериальных культур использовали два подхода: выделение на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) и на богатой среде с рН 11 без селективных субстратов, так как объединение нескольких лимитирующих факторов при выделении чистых культур значительно сужает исходный материал для скрининга ферментативных активностей. В анализе использовали 58 штаммов бактерий, в том числе 48 были выделены на среде с селективными субстратами при рН 8, остальные 10 штаммов были выделены на богатой среде с рН 11. Методом ПЦР с использованием праймеров к гену 16S рРНК различных филогенетических групп бактерий и последующей секвенирующей реакцией оценивали состав микробного сообщества.

В условиях умеренно-щелочной среды выделены алкалотолерантные бактерии. Среди бактерий, изолированных из материала старого содового шламонакопителя, значительную часть составляли протеобактерии. Так, на средах с твин-80 и пептоном преобладали представители класса *Alphaproteobacteria* – главным образом *Ensifer morelensis*, *Gammaproteobacteria* – виды рода *Pseudoxanthomonas*, а также *Firmicutes*, класс *Bacilli*. На среде с крахмалом наблюдалось большее таксономическое разнообразие изолятов: были выделены культуры *Sphingopyxis panaciterrae* и *Ensifer morelensis*, относящиеся к классу *Alphaproteobacteria*, *Pseudomonas peli* (класс *Gammaproteobacteria*), *Microcella putealis* и *Arthrobacter ginsengisoli* (филум *Actinobacteria*, порядок *Micrococcales*), *Bacillus cereus* (филум *Firmicutes*, класс *Bacilli*) и *Pedobacter quisquiliarum* (филум *Bacteroidetes*, класс *Sphingobacteriia*). На среде с целлюлозой, являющейся наиболее сложно метаболизируемым субстратом из используемых, выделены культуры *Lysobacter prati* (класс *Gammaproteobacteria*), *Paenarthrobacter aurescens* (филум *Actinobacteria*, порядок *Micrococcales*), *Metabacillus indicus* (филум *Firmicutes*, класс *Bacilli*).

Из образцов с территории действующего шламохранилища изолировали преимущественно культуры актинобактерий, порядок *Micrococcales* (представители родов *Actinotalea*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Microbacterium*, *Microcella*, *Micrococcus*, *Paenarthrobacter*), а также *Firmicutes*; класс *Bacilli* (виды рода *Bacillus*).

При выделении на богатой среде с рН 11 не обнаружено существенных отличий между материалом действующей и старой карты содового шламохранилища по составу культивируемых микроорганизмов (Таблица 2). Большую часть изолятов составляли представители актинобактерий, в том числе выделены виды рода *Oerskovia* (филум *Actinobacteria*; порядок *Micrococcales*), а также бациллы *B. aequororis*, *B. halmapalus*, *B. zhangzhouensis*, которые не выделялись на средах с более низким рН и являются алкалофилами.

Таким образом, было показано, что в содовых шламонакопителях развиваются гидролитические бактерии, адаптированные к экстремальным условиям среды.

Скрининг гидролитической активности бактериальных изолятов из искусственной щелочной среды позволил выявить наиболее перспективные штаммы, обладающие как внеклеточными, так и связанными с клетками активностями амилазы (*Ensifer morelensis*, 30,32 мкмоль/(л·мин); *Paenisporsarcina quisquiliarum*, 20,03 мкмоль/(мг·мин); *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* 14,7 мкмоль/(л·мин) и 8,65 мкмоль/(мг·мин)), липазы (*Pseudomonas peli*, 0,83 мкмоль/(л·мин) и 2,97 мкмоль/(мг·мин)), протеазы (*Arthrobacter halodurans*, 12 мм; *Micrococcus aloeverae*, 10 мм) и целлюлазы (*Microbacterium pygmaeum*, 0,49 ммоль/(л·сут); *Lisobacter soli*, 0,47 ммоль/(л·сут); *Bacillus indicus*, 0,17 ммоль/(мг·сут)) (Таблица 3).

Достаточно высокая активность гидролитических ферментов у многих, выделенных из содового шламохранилища изолятов, вероятно, связана с дефицитом органического субстрата.

Таблица 2

Идентификация изолятов гидролитических бактерий, выделенных на богатой среде с pH 11

Изолят	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
1	2	3	4	5
Старая карта содового шламонакопителя				
3-ДБ	<i>Oerskovia paurometabola</i> , DSM14281 ^T AJ314821	99,86	748	MT872073
4-ДБ	<i>Brevibacterium pityocampae</i> , DSM21720 ^T EU484189	100	754	MT872074
5-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 ^T KC686697	99,87	758	MT875306
12-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 ^T KC686697	99,76	833	MT875307
13-ДБ	<i>Oerskovia enterophila</i> , DSM 43852 ^T MAQA01000098	100	845	MT872075
Действующее содовое шламохранилище				
7-ДБ	<i>Bacillus halmapalus</i> , DSM 8723 ^T KV917375	99,75	813	MT872080
8-ДБ	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> , DW5-4 ^T JOTP01000061	98,73	709	MT872079
9-ДБ	<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	825	MT872081

Таблица 3

Активность амилазы и липазы штаммов, выделенных на богатой среде с pH 11

Изолят	Организм	Амилолитическая активность		Липолитическая активность	
		Супернатант, мкмоль/(л·мин) / биомасса, мг/мл	Биомасса, мкмоль/(мг·мин)	Супернатант, мкмоль/(л·мин) / биомасса, мг/мл	Биомасса, мкмоль/(мг·мин)
1	2	3	4	5	6
3-ДБ	<i>Oerskovia paurometabola</i>	18,91 / 16,5	2,96	1,15/ 3,7	2,37
4-ДБ	<i>Brevibacterium pityocampae</i>	22,06 / 5,5	8,67	1,20/ 7,0	1,17
5-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i>	20,69 / 5,8	11,80	0,95/ 4,6	1,85
9-ДБ	<i>Microcella putealis</i>	19,52 / 20,1	2,69	1,45/ 4,4	1,50

Влияние состава сред культивирования на гидролитическую активность наиболее перспективного изолята *P. peli* 3-Т, обладающего липазной активностью. Оптимизирована среда культивирования *Pseudomonas peli* 3-Т, обладающего липазной активностью. Источник азота варьировали, добавляя в среду мочевины, хлорид аммония и нитрат аммония в концентрации 0,03%. Источником углерода служили оливковое масло, подсолнечное масло, глицерин, твин-20 и твин-80 в концентрации 1%. Концентрацию наилучшего источника углерода варьировали в диапазоне 0,1–1,5%. В результате различных комбинаций было установлено, что наилучшим источником углерода для накопления биомассы бактерий *P. peli* 3-Т является глицерин (рис. 4). При использовании глицерина в среде в концентрациях от 0,1 до 1,5% максимальный рост культуры отмечен при концентрации 0,5%. Показано,

что при росте на среде с мочевиной и использованием в качестве источников углерода глицерина или подсолнечного масла значительно увеличивалась липолитическая активность.

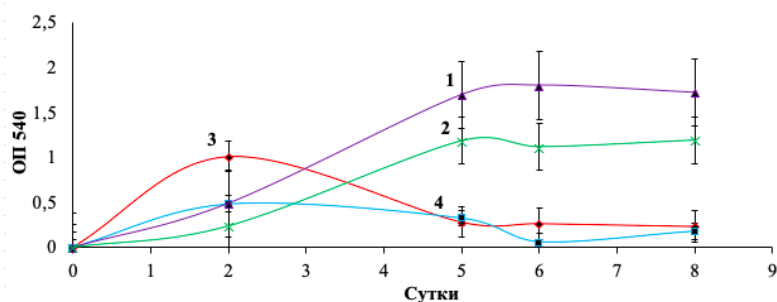


Рисунок 4 – Рост *Pseudomonas peli* 3-Т на среде с мочевиной в качестве источника азота и глицерином (1), твин-20 (2), подсолнечным маслом (3), оливковым маслом (4) в качестве источника углерода

В результате экспериментов по оптимизации среды культивирования перспективного в биотехнологическом отношении штамма *P. peli* – продуцента липазы, был скорректирован ее состав, обеспечивающий получение максимального количества активной биомассы (Таблица 4). В качестве основы предложена среда Пфеннига (Рандагуруева, Лаврентьева, 2009), источник углерода – глицерин (0,5%); источник азота – мочевиная (0,03%).

Таблица 4

Ростовые характеристики и липазная активность штамма *Pseudomonas peli* 3-Т в зависимости от различных сочетаний источников углерода и азота

Показатели Субстрат, источник азота	Урожай биомассы, г/л	Активность липазы, мкмоль/мин/л	Удельная скорость роста (μ) в лог-фазе, ч ⁻¹	Экономический коэффициент потребления субстрата (Y), %
Глицерин (1%); мочевиная (0,03%)	9,3	0,6	0,03	93
Глицерин (0,5%); мочевиная (0,03%)	6,9	1,26	0,08	138
Твин – 20 (1%); мочевиная (0,03%)	6,4	0,06	0,04	64
Глицерин (1%); NH ₄ Cl (0,03%)	9,1	–	0,04	91
Твин – 20 (1%); NH ₄ Cl (0,03%)	6,1	0,1	0,04	61
Глицерин (1%); NH ₄ NO ₃ (0,03%)	10,5	0,001	0,41	105

3. Морфологические и физиолого-биохимические свойства факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* 5-ДБ, изолированного из содового шламохранилища

Проведен ряд исследований, целью которых было выявление особенностей адаптивного ответа алкалофильного штамма бацилл в среде с высокой концентрацией соли и в широком диапазоне pH в сравнении с нейтрофильным представителем того же рода. В качестве исследуемых реакций отмечали изменения морфологии и топографии поверхности, внутриклеточного pH и общего уровня метаболизма.

Объектом исследований являлся штамм 5-ДБ, выделенный на полноценной среде с pH 11, проявивший высокую активность амилазы и идентифицированный как *Bacillus aequororis*. Для сравнения использовали коллекционный штамм *Bacillus subtilis* ATCC 6633, который является нейтрофильным.

Влияние концентрации хлорида натрия и pH на рост и гидролитическую активность *Bacillus aequororis* 5-ДБ. Исследование динамики роста факультативного алкалофила *B. aequororis* 5-ДБ и нейтрофильной коллекционной культуры *B. subtilis* ATCC 6633 на слабо- и высокощелочной среде показало, что *B. aequororis* 5-ДБ накапливает значительно большую биомассу по сравнению с *B. subtilis* ATCC 6633, как на среде с pH 11, так и на среде с pH 8 (рис. 5).

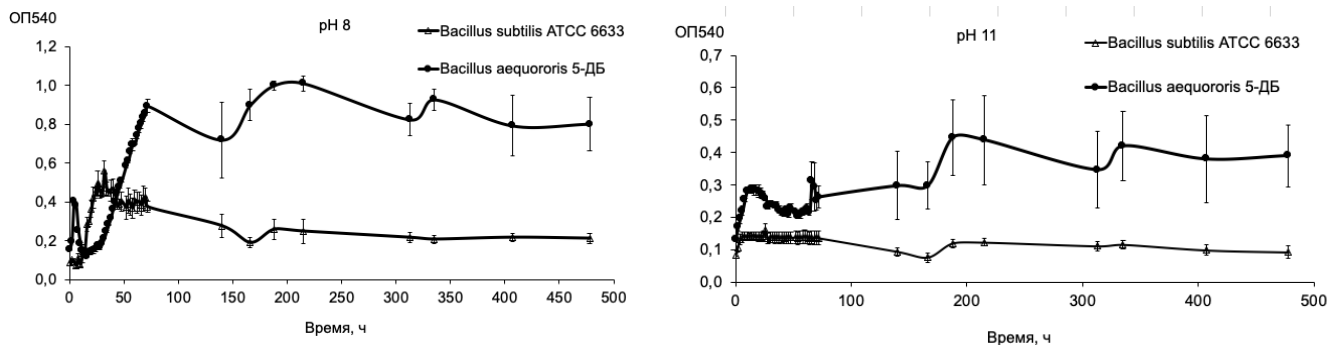


Рисунок 5. Динамика роста *B. subtilis* ATCC 6633, *B. aequororis* 5-ДБ на слабо- и высокощелочной среде

Изучено влияние различных pH и концентрации NaCl на липолитическую и амилолитическую активность алкалофильного штамма *B. aequororis* 5-ДБ (рис. 6). Установлено, что ферментативная активность проявляется в широком интервале pH от 3 до 11. Интересным фактом является повышение активности при сочетании высокой концентрации соли и pH 11, что может быть связано с активацией мембранных транспортных процессов в щелочной среде.

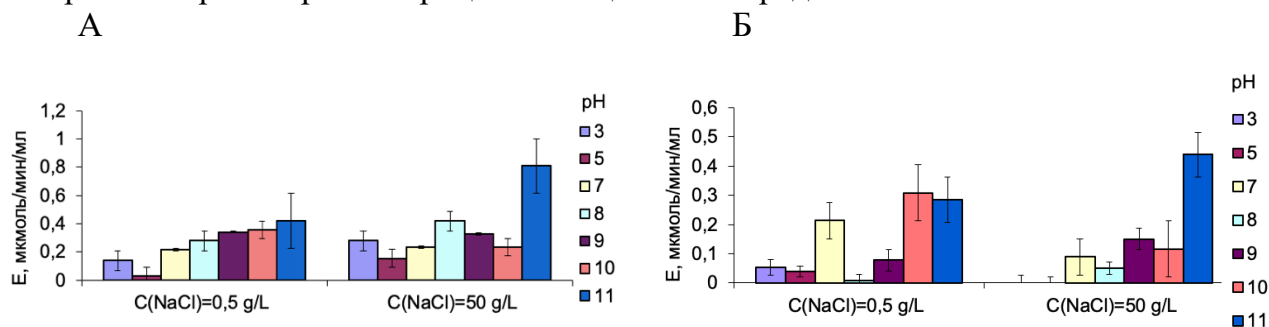


Рисунок 6. Амилолитическая (А) и липолитическая активность (Б) в супернатанте культуры *Bacillus aequororis* 5-ДБ при различных концентрациях соли и pH

Влияние концентрации хлорида натрия и pH на уровень метаболической активности *Bacillus aequororis* 5-ДБ. Для оценки влияния кислотности и концентрации соли в среде на уровень метаболической активности клеток алкалофильного штамма *Bacillus aequororis* 5-ДБ, выделенного из образцов старой карты шламонакопителя, и штамма сравнения *Bacillus subtilis* ATCC 6633, культуры окрашивали препаратом PrestoBlue HS, выявляющим физиологически активные клетки. Культуры предварительно выращивали на полноценной среде, затем инкубировали в солевом растворе с концентрацией NaCl 0,5 или 50 г/л при разных значениях pH (3, 5, 7, 8, 9, 11, 13) в течение 2-х и 48 часов. При окрашивании содержащийся в препарате резазурин в активно метаболизирующих клетках трансформируется в интенсивно флуоресцирующее производное.

Было показано, что *B. subtilis* ATCC 6633 для проявления физиологической активности нуждался в длительной адаптации и проявлял наиболее выраженную метаболическую активность при pH 9. *B. aequororis* 5-ДБ не нуждался в предварительной адаптации и проявлял сходный уровень метаболической активности в широком диапазоне pH от 5 до 11. Однако *B. subtilis* ATCC 6633 был более устойчив

к 48-часовому отсутствию субстрата, что выражалось в отсутствии подавления метаболической активности после этого периода голодания (рис. 7).

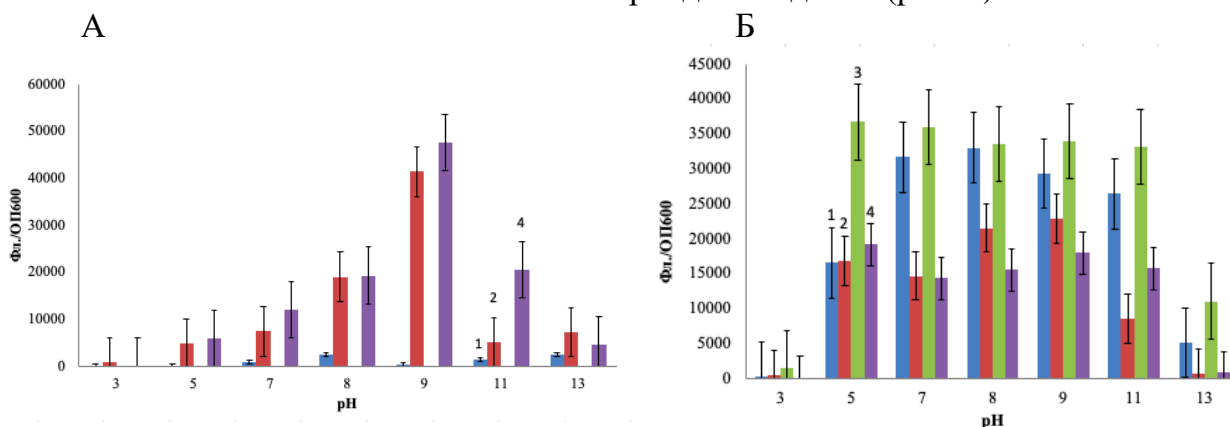


Рисунок 7. Количество активно метаболизирующих клеток *B. subtilis* ATCC 6633 (А), *B. aequororis* 5-ДБ (Б) в условиях: 1 – адаптация 2 ч, 0,5 г/л NaCl; 2 – адаптация 48 ч, 0,5 г/л NaCl; 3 – адаптация 2ч, 50 г/л NaCl; 4 – адаптация 48 ч, 50 г/л NaCl.

Влияние концентрации хлорида натрия и pH на морфологию *Bacillus aequororis* 5-ДБ. Морфологию и топографию поверхности клеток *B. aequororis* 5-ДБ и *B. subtilis* ATCC 6633 при разном pH и концентрации NaCl в среде визуализировали и оценивали методом атомно-силовой микроскопии. Показано, что кратковременное воздействие среды с концентрацией NaCl 50 г/л приводило к возрастанию шероховатости поверхности как алкалофильного *B. aequororis* 5-ДБ, так и нейтрофильного *B. subtilis* ATCC 6633, тогда как после суточной адаптации этот показатель снижался, за исключением воздействия 50 г/л и pH 8 на *B. subtilis* ATCC 6633.

При инкубации в кислой среде (pH 5) шероховатость поверхности *B. aequororis* 5-ДБ существенно не отличалась от контроля, а объём клеток увеличивался на 40%. При помещении клеток *Bacillus subtilis* ATCC 6633 в среду с pH 5 независимо от времени инкубации в ней на 31-35% увеличивалась шероховатость клеток, а также наблюдалось их некоторое укорачивание и увеличение поперечных размеров относительно контроля.

Получены АСМ-изображения клеток *B. aequororis* 5-ДБ и *B. subtilis* ATCC 6633 после инкубации в условиях, отличных от контроля для данного штамма (рис. 8).

Клетки *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии 50 г/л NaCl в среде имели менее ровную поверхность, отмечалось скопление кристаллов соли, а после суточной адаптации в среде с pH 8 и 50 г/л NaCl клетки представляли собой короткие утолщенные палочки, визуально отличающиеся от контроля. Клетки *B. subtilis* ATCC 6633 при воздействии высокоминерализованной среды имели неровные очертания и выраженную шероховатость поверхности, в препаратах отмечалось много неидентифицированных структур, по-видимому, являющихся клеточными обломками. Воздействие кислой среды (pH 5) на клетки *B. subtilis* ATCC 6633 визуально более выражено, поверхность клеток неровная и после двухчасовой, и после суточной адаптации. После суток инкубации в кислой среде наблюдается лизис клеток и присутствие клеточных обломков в препарате. В то же время, *B. aequororis* 5-ДБ более устойчив к pH 5, клетки после двухчасового воздействия ровные, имеют гладкую поверхность, после суток воздействия шероховатость поверхности увеличивается, лизис клеток незначителен.

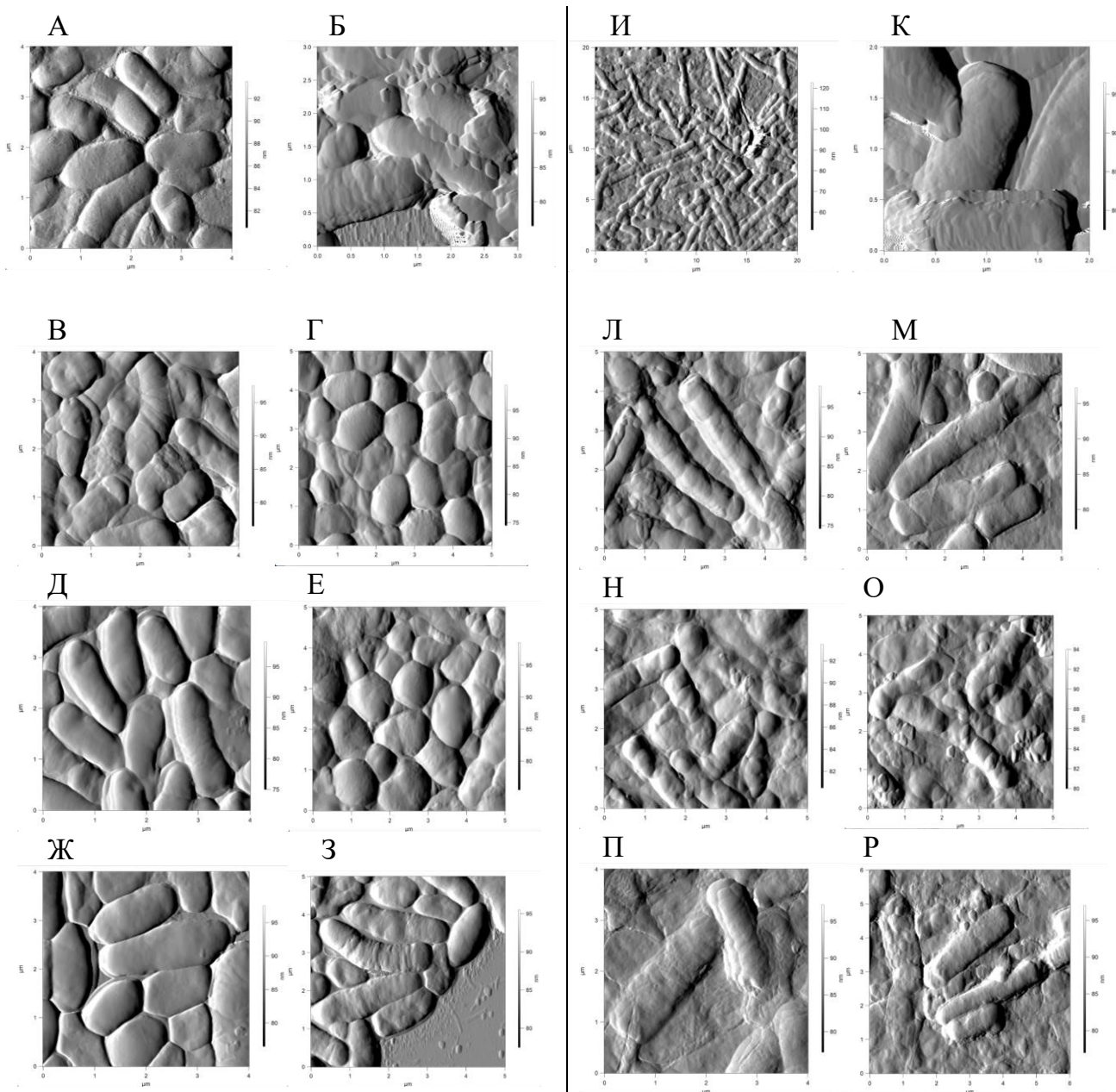


Рисунок 8. АСМ-изображения клеток *B. aequororis* 5-ДБ: А – 0,5 г/л NaCl, pH 11 (контроль); Б – 50 г/л NaCl, pH 11 (сразу); В – 50 г/л NaCl, pH 11 (адаптация сутки); Г – 0,5 г/л NaCl, pH 8 (сразу); Д – 0,5 г/л NaCl, pH 8 (адаптация сутки); Е – 50 г/л NaCl, pH 8 (адаптация сутки); Ж – pH 5 (сразу); З – pH 5 (адаптация сутки). *B. subtilis* ATCC 6633: И – 0,5 г/л NaCl, pH 8 (контроль); К – 50 г/л NaCl, pH 8 (сразу); Л – 50 г/л NaCl, pH 8 (адаптация сутки); М – 0,5 г/л NaCl, pH 11 (сразу); Н – 0,5 г/л NaCl, pH 11 (адаптация сутки); О – 50 г/л NaCl, pH 11 (адаптация сутки); П – pH 5 (сразу); Р – pH 5 (адаптация сутки)

Таким образом, установлено, что морфология клеток алкалофильного *B. aequororis* 5-ДБ менее подвержена изменениям в среде с высокой концентрацией соли (50 г/л), чем нейтрофильного *B. subtilis* ATCC 6633, клетки которого значительно уменьшаются в размерах, а после суточной адаптации к 50 г/л NaCl при pH 8, наоборот, увеличиваются в объеме за счет удлинения. Клетки *B. aequororis* 5-ДБ, являясь преадаптированными к высокой минерализации и щелочной среде, мало изменяются под влиянием условий, отличных от таковых культивирования. Шероховатость поверхности клеток и нейтрофильного, и алкалофильного штамма бацилл незначительно увеличивалась при возрастании концентрации соли в среде,

что может говорить о потере воды клеткой, особенно на первых этапах адаптации к высокому содержанию соли. Интересным фактом является повышенная устойчивость факультативного алкалофила *B. aequororis* 5-ДБ к низкому рН, что является подтверждением общей неспецифической адаптивной способности данного штамма к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Влияние концентрации хлорида натрия и рН среды на внутриклеточный рН *Bacillus aequororis* 5-ДБ. Для измерения рН в работе использовали флуоресцентный зонд cFSE (5 (и 6-)-карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир). Флуоресценция cFSE зависит от рН, зонд в виде диацетатного эфира cFDASE поглощается бактериями во время инкубации. При включении в клетку его сукцинимидильная группа образует конъюгаты с алифатическими аминами. Флуоресценцию можно обнаружить только после расщепления эфира внутриклеточной эстеразой. Карбоксифлуоресцеин не проявляет чувствительности к рН при возбуждении излучением с длиной волны 440 нм и имеет максимальную рН-чувствительность при возбуждении на длине волны 490 нм. После получения флуоресцентного сигнала на каждой длине волны возбуждения было вычислено независимое от концентрации соотношение между рН-чувствительными и нечувствительными к рН сигналами.

Установлено, что для обеих культур почти во всех образцах внутриклеточный рН ниже внеклеточного (Таблица 5, 6), что является нормой для алкалофильных микроорганизмов. Нейтрофилы, растущие при рН 7 имеют маленький ΔpH , сопровождаемый значительным $\Delta\psi$, отрицательным внутри. У алкалофилов внутриклеточный рН значительно ниже внешнего, $\Delta\psi$ алкалофилов выше, чем у нейтрофилов, но он частично компенсируется большим «реверсивным» ΔpH .

Таблица 5

Изменение рН_{in} в клетках *Bacillus aequororis* 5-ДБ в среде с разной концентрацией соли и рН

Концентрация NaCl, г/л	pH _{out}	рН _{in}	\Delta рН	рН _{in}	\Delta рН
		2 часа адаптации		48 часов адаптации	
0,5	3	4,4	1,4	4,4	1,4
	7	6,2	0,8	7,4	0,4
	8	7,7	0,3	7,4	0,6
	9	7	2	8,2	0,8
	11	8,6	2,4	9,3	1,7
50	3	3,9	0,9	3	0
	7	6	1	7,25	0,25
	8	7	1	7,2	0,8
	9	6,8	2,2	8	1
	11	7,9	3,1	9,1	1,9

Таблица 6

Изменение рН_{in} в клетках *Bacillus subtilis* ATCC 6633 в среде с разной концентрацией соли и рН

Концентрация NaCl, г/л	pH _{out}	рН _{in}	\Delta рН	рН _{in}	\Delta рН
		2 часа адаптации		48 часов адаптации	
0,5	3	3	0	3	0
	8	7,6	0,4	7,5	0,5
	9	7,6	1,4	7,8	1,2
	11	9,1	1,9	8,3	2,7
50	3	3	0	3	0
	8	7,7	0,3	7,5	0,5
	9	7,6	1,4	7,9	1,1
	11	8,2	2,8	8,1	2,9

Установлено, что *B. aequororis* 5-ДБ имеет более широкий диапазон толерантности к крайним значениям рН. Даже при рН 3 отмечена небольшая разница в концентрации протонов в отличие от *B. subtilis* ATCC 6633, где она равнялась нулю.

Также следует отметить, что у *B. aequororis* 5-ДБ разница концентраций протонов ΔpH выше при pH 11, $NaCl$ 50 г/л, чем при pH 11, $NaCl$ 0,5 г/л и при pH 8 $NaCl$ 0,5 и 50 г/л.

Для культуры *B. subtilis* ATCC 6633 низкие значения pH являются губительными, а при защелачивании среды разница концентраций протонов повышается и незначительно отличается от таковой у *B. aequororis* 5-ДБ. Таким образом, даже нейтрофильные бактерии способны выдерживать высокий pH внешней среды, но при этом было показано, что факультативный алкалофил более устойчив к низкому pH за счет общей адаптивной способности.

В экспериментах по определению гидролитической активности, уровня метаболизма, внутриклеточного pH и морфометрических показателей было отмечено, что сочетание высокий pH – высокая концентрация хлорида натрия (в наших экспериментах, pH 11 и 50 г/л $NaCl$) для клеток даже более благоприятно, чем сочетания слабощелочная среда – высокая концентрация $NaCl$ (pH 8, 50 г/л) и высокий pH – низкая концентрация $NaCl$ (pH 11, 0,5 г/л). Такая реакция клеток может быть связана с повышенной концентрацией ионов натрия, необходимых для обеспечения энергетического метаболизма в щелочных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Техногенные щелочные местообитания характеризуются уникальными условиями среды. Следовательно, микробное сообщество в данном биотопе также является уникальным и обладает рядом физиологических особенностей, которые обусловлены средой обитания.

В результате исследований нами впервые проведена оценка микробного сообщества в содовом шламохранилище АО «Березниковский содовый завод». Изучено изменение микробного состава при восстановлении территорий после эксплуатации (осушение, частичное восстановление растительного покрова). Для оценки микробного разнообразия были использованы молекулярно-генетические методы, что позволило показать разнообразие прокариотов в экстремальных условиях, созданных деятельностью человека.

Изучен элементный состав образцов щелочной техногенной среды, созданной в результате производства соды. Минеральный состав изучаемой среды отличается от естественных щелочных биотопов, что, очевидно, и является важнейшим фактором отличий в составе микробиоты этих экосистем. Изучена сукцессия бактериального сообщества при восстановлении территорий старой карты шламохранилища. Обнаружены изменения микробного сообщества, связанные со сменой состава техногенного образования, которые могут быть использованы в качестве индикаторов восстановления среды. Оценено α -разнообразие и выровненность бактериального сообщества сред содового шламохранилища.

Методом высева на селективные среды определено количество бактерий с липолитической, протеолитической, амилалитической и целлюлозолитической активностями. Выделены алкалотолерантные бактерии, способные расти в широком диапазоне кислотности (от нейтральных до pH 11) и алкалофильные изоляты, растущие при pH 11, проявляющие высокую активность гидролитических ферментов. Изолированные культуры представляют интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых к щелочным значениям pH и высокой минерализации среды.

Изучен биотехнологический потенциал выделенных и идентифицированных бактериальных изолятов, устойчивых к щелочной среде и высокому содержанию солей, с различными гидролитическими активностями. Обнаруженные свойства селекционированных культур и их ферментов представляют интерес для биотехнологического применения.

Для наиболее продуктивного штамма, обладающего липолитической активностью, оптимизирована среда культивирования. Установлено, что мочевины

способствует индукции липазной активности. Исследованы морфологические и физиолого-биохимические свойства факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* 5-ДБ в сравнении с нейтрофильным *Bacillus subtilis* АТСС 6633. Данный штамм проявил высокую активность амилазы в широком диапазоне рН и степени минерализации. Вычислены морфометрические параметры клеток после инкубации в щелочной среде с высокой концентрацией хлорида натрия. Показано, что морфология клеток алкалофильной бациллы, в отличие от таковой нейтрофильной, не претерпевает значительных изменений при высокой минерализации среды как при непосредственном воздействии, так и после суточной адаптации.

Исследована физиологическая активность культур при инкубации в щелочной среде с высокой концентрацией хлорида натрия. Показано, что клетки *B. subtilis* АТСС 6633 для проявления физиологической активности нуждались в длительной адаптации и проявляли наиболее выраженную жизнеспособность при рН 9, тогда как культура *B. aequororis* не нуждалась в предварительной адаптации и проявляла сходную метаболическую активность в широком диапазоне рН от 5 до 11. Таким образом, выявлены особенности адаптивных реакций и функционирования выделенных бактерий в экстремальных условиях высокоминерализованной и щелочной среды.

Анализ полученных данных позволил заключить, что выделенные штаммы при условии дальнейшей селекции могут являться перспективными объектами в биотехнологии: в производстве моющих средств, биоремедиации, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Перспективой дальнейшей разработки темы диссертационного исследования является селекция выделенных штаммов в направлении увеличения ферментативной активности, создание биопрепаратов на их основе и изучение филогенетического разнообразия домена *Archaea* содового шламохранилища.

ВЫВОДЫ

1. Изучено филогенетическое разнообразие микробиоценоза действующей и старой карты содового шламохранилища г. Березники (Пермский край). Установлено, что бактериальное сообщество в исследуемом биотопе сформировано 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*, среди которых доминирующими являются *Proteobacteria* и *Firmicures*. Появление представителей семейства *Cellulomonadaceae* в грунте старой карты свидетельствует о восстановлении территорий. Показано, что изученные среды отличаются крайне низким α -разнообразием и выравненностью, и максимальный индекс Шеннона, рассчитанный для микробного сообщества сред содового шламохранилища, не превышает 1,86.
2. Показано, что на поверхности грунта старой карты 73% гидролитических бактерий составляли протеолитики, а на глубине 10 см 43% приходилось на долю целлюлолитиков. Подавляющее содержание липолитиков отмечено в содовом шламе и поверхностных техногенных образованиях новой карты содового шламохранилища. Максимальное количество алкалофильных гетеротрофных культивируемых бактерий достигало $8,9 \times 10^7$ КОЕ/г в образцах старой карты содового шламохранилища.
3. Сочетание двух способов выделения чистых культур бактерий-гидролитиков из высокоминерализованной щелочной среды, таких как выделение на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) и на полноценной среде с рН 11 без селективных субстратов, позволило получить обширный материал для скрининга гидролитических активностей среди галоалкалотолерантных бактерий.
4. Выделены и идентифицированы культуры, проявляющие активность гидролитических ферментов (амилазы, липазы, протеазы, целлюлазы). Изолированы

наиболее перспективные штаммы, обладающие как внеклеточными так и связанными с клетками активностями амилазы (*Ensifer morelensis*, 30,32 мкмоль/(л·мин); *Paenisporasarcina quisquiliarum*, 20,03 мкмоль/(мг·мин); *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* 14,7 мкмоль/(л·мин) и 8,65 мкмоль/(мг·мин)), липазы (*Pseudomonas peli*, 0,83 мкмоль/(л·мин) и 2,97 мкмоль/(мг·мин)), протеазы (*Arthrobacter halodurans*, 12 мм; *Micrococcus aloeverae*, 10 мм) и целлюлазы (*Microbacterium pygmaeum*, 0,49 ммоль/(л·сут); *Lisobacter soli*, 0,47 ммоль/(л·сут); *Bacillus indicus*, 0,7 ммоль/(мг·сут)). Наибольшую активность амилазы у культур, полученных на среде с рН 11 и 8, отмечали при рН 10 и 6 соответственно, тогда как удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при рН 8, была наибольшей при рН 11.

5. В результате экспериментов по оптимизации среды культивирования перспективного в биотехнологическом отношении штамма *Pseudomonas peli* 3-Т – продуцента липазы, был скорректирован ее состав, обеспечивающий получение максимального количества активной биомассы. В качестве основы предложена среда Пфеннига, источник углерода – глицерин (0,5%), источник азота – мочеви́на (0,03%). Активность липазы на оптимизированной среде культивирования составляла 1,26 мкмоль/мин/л, урожай биомассы 6,9 г/л, удельная скорость роста в логарифмической фазе 0,08 ч⁻¹, экономический коэффициент потребления субстрата 138%.

6. Изучены морфологические и физиолого-биохимические особенности факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* в условиях повышенной минерализации и широком диапазоне рН среды. Показано, что продуцент амилазы *B. aequororis* 5-ДБ адаптирован к экстремальным условиям и способен к активному метаболизму в широком диапазоне рН (5–11), а сочетание рН 11 с 50 г/л хлорида натрия в среде обеспечивает наибольшую амилазную и липазную активность этого штамма. Установлено, что морфология клеток алкалофильного *B. aequororis* 5-ДБ менее подвержена изменениям в среде с высокой концентрацией соли (50 г/л), чем нейтрофильного *B. subtilis* ATCC 6633.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Шилова А.В. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // Вода и экология. Проблемы и решения. – 2020. – № 1(81). – С. 81-94. (Scopus)
2. Шилова А.В. Выделение и идентификация алкалолентных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 2. – С. 155-165. (Scopus/ WoS)
3. Максимова Ю.Г. Содовые шламохранилища: проблема утилизации отходов и поиск микроорганизмов-продуцентов промышленно значимых ферментов / Ю.Г. Максимова, А.В. Шилова, В.А. Щетко, А.Ю. Максимов // Экология и промышленность России. – 2021. – Т. 25, № 10. – С. 20–25. (Scopus)
4. Шилова А.В. Морфологические аспекты адаптации алкалофильной бактерии *Bacillus aequororis* к высокой солености и щелочности среды / А.В. Шилова, Г.Г. Глебов, Ю.Г. Максимова // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2021. – № 3. (РИНЦ)

Публикации в других журналах и сборниках

5. Шилова А.В. Метагеномный анализ родового состава бактериальной флоры грунта, воды и осадков шламохранилища ОАО «Сода» (г. Березники, Пермский край) / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // *Biomica*. – 2018. – Т. 10, № 1. – С. 24-27.
6. Shilova A., Maksimov A., Maksimova Yu. Phylogenetic diversity of microbiota of sediments, water and coastal surface technogenic formations of soda sludge storage (Berezniki, Perm region, Russia) / A. Shilova, A. Maksimov, Yu. Maksimova // «*Mine Water: Technological and Ecological Challenges*». IMWA 2019 Conference. – Perm, 2019. – p. 706-710.
7. Шилова А.В. Бактерии содового шламохранилища, продуцирующие гидролитические ферменты / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // «Симбиоз-Россия 2020». Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. – Пермь, 2020. – С. 307-312.
8. Шилова А.В. Функциональное разнообразие микрофлоры шламохранилища ОАО «Сода» г. Березники / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // «Биология – наука XXI века». Сборник 22-ой Международной Пущинской школы – конференции молодых ученых. – Пущино, 2018. – С. 327.
9. Шилова А.В. Метагеномный анализ микрофлоры почв, воды и осадков шламохранилища ОАО "Сода", г. Березники (Пермский край) / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018. Сборник Международной научной конференции. – Уфа, 2018. – С. 259.
10. Шилова А.В. Липолитическая активность бактериальных изолятов из щелочных экотопов с высоким содержанием солей / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // «Высокие технологии, определяющие качество жизни». Материалы II Международной научной конференции. – Пермь, 2018. – С. 142-145.
11. Шилова А.В. Активность щелочных гидролаз бактериальных культур, выделенных из техногенной среды / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // «Биотехнологии микроорганизмов». Материалы международной научно-практической конференции. – БГУ, Минск, 2019. – С. 343-346.
12. Шилова А.В. Гидролитическая активность алкалофильных и алкалотолерантных культур, выделенных из искусственной щелочной среды / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // *Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии*. Материалы Всероссийской конференции с международным участием. – МГУ, Москва, 2019. – С. 135.
13. Шилова А.В. Биоразнообразие прокариотов содового шламохранилища – модели экстремально щелочной среды / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // «Экзобиология от прошлого к будущему». Материалы III Всероссийской конференции по астробиологии. – Пущино, 2020. – С. 56-59.
14. Максимов А.Ю. Культуры микроорганизмов-продуцентов гидролитических ферментов, перспективные для переработки отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности / А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова, А.В. Шилова, В.А. Щетко // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. Сборник научных трудов. – 2021. – Т. 13. – 8с.

ШИЛОВА Анна Владимировна

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ГИДРОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать __.__.21 г. Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 1. Тираж __ экз. Заказ.

Набор компьютерный.

Отпечатано в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13